



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Desenvolvimento de um modelo de doenças inflamatórias sistêmicas em
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Natália Melquie Monteiro Teles

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

UBERLÂNDIA – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Desenvolvimento de um modelo de doenças inflamatórias sistêmicas em
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Natália Melquie Monteiro Teles

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Desenvolvimento de um modelo de doenças inflamatórias sistêmicas em
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Natália Melquie Monteiro Teles

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (Orientador)

Examinadores:

Data da Defesa: 29/07/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

DEDICATÓRIA

Dedico mais essa conquista profissional e pessoal aos maiores amores da minha vida: minha mãe, Maria Bonfim. G. M. Teles, meu pai, Jesus Messias M. Teles e meu irmão, Alef Judah M. Teles, meus exemplos de vidas e inspiração diária, que deixei há dois anos em Palmas-TO quando vim para Uberlândia-MG continuar os estudos.

Aqueles da minha família materna e paterna, avós, tios, tias e primos que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso e me apoiando em cada etapa dessa conquista e das anteriores que formaram os degraus para que subisse e aqui eu estivesse.

Aos meus parentes pela alma. Amigos de longas datas e recentes, alguns ausentes, que estiveram durante todo esse tempo acreditando, torcendo por mim e me apoiando de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de continuar a cada novo dia em busca dos meus objetivos.

À minha família, mãe, pai e irmão pela base e apoio incondicional em todas as decisões da minha vida. A eles, que não importa para onde eu vá, pois para lá, sempre poderei voltar.

À minha família, tia Tatiana, Edson, Rízia, Aina e Geovana pelo amor, estrutura física e emocional, importantíssimos nesses dois anos de mestrado. Muito obrigado.

Aos meus amigos, Junior, Carla, Bernardo e Nana pelo apoio e cuidado durante todo o mestrado, mas principalmente no início da minha chegada a Uberlândia.

Ao meu orientador, Carlos Ueira Vieira pelas oportunidades de orientação e ensinamentos.

À professora Ana Maria Boneti pelo apoio, acolhimento e principalmente pelos conselhos.

À minha família LABGEN. Amigos que compõem uma das melhores equipes de laboratório que já conheci. Pelo acolhimento desde o início, por todo apoio dado que de alguma forma contribui para minha formação e construção da minha dissertação.

Aos amigos e demais da equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia que sempre estiveram de portas abertas para mim.

Quero agradecer especialmente, aos meus amigos que tanto me apoiaram nesse mestrado, doando parte do seu tempo para me ajudarem, Patrícia T. Fujimura, Célio D. S. Junior, Ana Carolina C. Dias, Naiara A. Borges, Emília R. Vaz, Denis Prudêncio e Washington Carvalho.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de cursar o mestrado e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos, muitíssimo obrigada.

Sumário

Capítulo I: 1

Fundamentação teórica.....	1
1. O sistema imune	2
1.2 Autoimunidade e o TNF- α	3
1.2.1- Ortólogo do TNF- α	4
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> , o organismo modelo	6
1.3.1 Linhagens Transgênicas	9
1.3.1.1 O sistema GAL4/UAS	12
1.4 Drogas anti-inflamatórias	13
Referencias	16

Capítulo II..... 26

Resumo.....	27
-------------	----

Abstract.....	28
---------------	----

1 INTRODUÇÃO.....	29
-------------------	----

2 Objetivo Geral.....	31
-----------------------	----

2.1 Objetivos específicos.....	31
--------------------------------	----

3 Metodologia	32
---------------------	----

3.1 Material Biológico	32
------------------------------	----

3.2 Cruzamentos	32
-----------------------	----

3.3 Obtenção da prole	32
-----------------------------	----

3.4 Expressão de Eiger em tecido específico	33
---	----

3.5	Obtenção de linhagem com superexpressão de Eiger	35
3.6	Biotestes	35
3.6.1	Ensaio de oviposição (fecundidade)	35
3.6.2	Desenvolvimento em larva	36
3.6.3	Avaliação de motilidade larval	36
3.6.4	Desenvolvimento em pupa	40
3.7	Teste com Drogas	40
4	RESULTADOS	43
4.1	Superexpressão de Eiger em tecido específico.....	43
4.1.1	Olhos	43
4.1.2	Corpo gorduroso de fêmeas adultas.....	49
4.1.3	Cérebro.....	49
4.1.4	Expressão ubíqua durante o desenvolvimento	52
4.2	Biotestes	52
4.2.1	Oviposição	52
4.2.2	Desenvolvimento de ovos em larvas	55
4.2.3	Motilidade larval.....	56
4.2.4	Desenvolvimento de larvas em pupas	57
4.2.5	Desenvolvimento em moscas recém-emergidas.	60
4.3	Teste com Drogas	62
4.4	Viabilidade após Knock down ubíquo de Eiger.....	63
5	DISCUSSÃO	64

6	Conclusões.....	70
7	Referencias.....	71

Lista de Figura da Fundamentação teórica

Figura 1. Modelo proposto da indução de morte celular por ativação da via JNK com participação direta de Eiger e Wengen.....	6
Figura 2. O ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	7
Figura 3. Dimorfismos sexual em <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Figura 4. Uso de elementos P para gerar <i>Drosophila</i> transgênica.	11
Figura 5. O sistema GAL4/UAS em <i>Drosophila melanogaster</i>	1
Figura 6. Cascata de ativação do ácido araquidônico e a ação de anti-inflamatórios sobre seus mediadores.	15

Capítulo I:

Fundamentação teórica

Fundamentação teórica

1. O sistema imune

A resposta imunológica desempenha a importante função de defesa do organismo contra patógenos e outras substâncias estranhas ¹. Além do reconhecimento de patógenos, eventualmente, o sistema imunológico pode reconhecer células do organismo como não próprias. Como o sistema imune consegue discriminar os constituintes invasores dos próprios constituintes? A resposta é que este sistema dispõe de duas linhas de defesa que de maneiras distintas e simultâneas, conseguem eliminar os patógenos sem que haja o reconhecimento das células próprias². A imunidade inata é caracterizada como inespecífica, que se desenvolve dentro de padrões repetitivos e está presente em toda escala zoológica. A imunidade adaptativa é específica e apresenta tipicamente uma resposta primária fraca e de curta duração, seguida após novo contato, por uma resposta mais intensa e duradoura, fruto da geração de uma memória imunológica do primeiro momento³. A resposta imune adquirida se desenvolveu em sistemas filogeneticamente mais velhos, sendo controlada e assistida. Entretanto, esta resposta seria ineficiente sem a presença da resposta inata. Isso porque ambas as respostas precisam agir simultaneamente na proteção contra organismos invasores²

Os mecanismos inatos são iniciados, em geral, a partir da interação do antígeno com receptores presentes na membrana plasmática de algumas células. Em vertebrados, os principais componentes da imunidade inata são: (1) barreiras físico-químicas, tais como os epitélios e as substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais; (2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) e células matadoras naturais (NK); (3) proteínas do sangue, incluindo os membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e (4) citocinas, efetoras da imunidade inata e adaptativa que regulam e coordenam muitas atividades deste sistema como por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral- α ⁴.

1.2 Autoimunidade e o TNF- α

Falhas nos mecanismos de autotolerância do sistema imune podem gerar uma resposta inflamatória devido às reações chamadas de auto-ímmunes. Isto acontece porque células do próprio organismo são reconhecidas pelo sistema imune, sendo consideradas autoantígenos, e geram, portanto, uma resposta imune severa que pode levar até ao aparecimento de lesões¹. Essas reações são o ponto de partida para o desencadeamento das doenças auto-ímmunes, que acometem pessoas de todas as idades, raças, sexos e classes sociais⁵. Muitas dessas doenças inflamatórias crônicas e degenerativas têm etiologia complexa como, por exemplo, a doença inflamatória intestinal (DII)^{6; 7; 8} artrite reumatóide (RA)^{9; 10} dentre outras^{11 9}.

As citocinas desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento das doenças auto-ímmunes, essas glicoproteínas extracelulares iniciam sua ação pela ligação a receptores específicos na superfície da célula-alvo, e uma vez secretadas agem em vários tipos celulares regulando a resposta imune. Como por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)^{2,12;13}. Esta é uma citocina pró-inflamatória produzida por células do sistema imune em resposta a uma variedade de estímulos^{1; 14; 15}.

O TNF- α é fundamental para a resposta inflamatória aguda frente às infecções bacterianas sendo responsável por muitas das complicações sistêmicas das infecções graves. Sua principal fonte celular são os fagócitos mononucleares ativados, as células *natural killer* (NK), os mastócitos e as células T estimuladas por antígenos^{1; 15; 16}.

O receptor de TNF- α (TNFR) de membrana possui domínio de morte e envia sinais pró-apoptóticos do meio extracelular para o meio intracelular participando assim de um mecanismo extrínseco de indução de apoptose¹⁷. A principal função dessa citocina no sistema imune de vertebrados é estimular o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para os locais de infecção e ativar essas células para destruírem os agentes invasores^{1; 16}.

O TNF- α promove diversas outras ações sobre células endoteliais e sobre os leucócitos como a expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio, estimulação da secreção de quimiocinas, recrutamento de leucócitos e

necrose tecidual^{1; 18}. Acredita-se que o TNF- α ative as células sinoviais residentes para produzir enzimas proteolíticas que medeiam a destruição da cartilagem dos ligamentos e dos tendões das articulações na RA¹⁴. Intervenções terapêuticas eficazes contra citocinas, como bloqueadores de TNF, bem como estudos de polimorfismos do TNF- α confirmam a participação da citocina pró-inflamatória nos processos de autoimunidade (RA e DC)^{19;20}

1.2.1- O ortólogo do TNF- α

Os primeiros estudos sobre apoptose foram realizados em *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo^{21,22}. Contudo, um motivo importante dificultou esses estudos, pois nenhum dos membros da família TNF estão presentes nessa espécie²¹. Ainda, a regulação da morte celular em mamíferos difere da que acontece nesses nematóides, sendo no primeiro amplamente regulada por mecanismos extrínsecos enquanto no segundo a regulação da morte celular está sob o controle de mecanismos intrínsecos^{21, 22,23}. Os mecanismos intrínsecos são ativados por sinais microambientais intracelulares e se iniciam na mitocôndria. E através do complexo enzimático apoptossomo resulta na ativação de caspases indutoras de apoptose¹⁷.

Apesar de não ter sido reportado a existência de mecanismos extrínsecos para a regulação de morte celular em invertebrados, há uma alta similaridade do mecanismo de morte celular entre humano e *Drosophila* como por exemplo, a existência dos membros da família TNF e TNFR presentes em ambas as espécies^{23,24}. *Drosophila* codifica duas proteínas ortólogas ao par TNF e seu receptor TNFR: nomeadas Eiger e Wengen respectivamente^{23, 24}.

Eiger é o primeiro e até então o único homólogo do TNF em *Drosophila*^{25, 26,23}. O gene Eiger codifica uma proteína do tipo II que contém um domínio citoplasmático, uma região transmembrana localizada entre o 36º e o 62º aminoácido, e um domínio extracelular de 353 aminoácidos. Sua homologia com o TNF- α humano se dá na porção C- terminal, havendo 20% a 25% de identidade entre as duas²⁶. A proteína de *Drosophila*, ortóloga ao TNF tem função ligante e está envolvida nos processos de resposta imune do inseto^{23; 26; 25; 27;}.

Alguns estudos mostraram que Eiger exerce papel nos processos biológicos de resposta imune inata, indução de apoptose, regulação negativa na transmissão da sinapse neuromuscular e homeostase neuronal^{28;23;24}. Produtos derivados da expressão desse gene já foram detectados em diferentes células e tecidos, como: plasmócitos, olho larval/adulto, abdômen adulto, asas, escutelo, sistema nervoso central²³ larval/adulto, corpo gorduroso larval, glândula salivar adulto e exoesqueleto²⁸.

Eiger e seu receptor Wengen agem em mecanismo sinérgico que resulta na indução da apoptose celular, principalmente pela via JNK (figura 1), embora alguns estudos apontem a participação de Wengen em outras vias de morte celular como a via inflamatória dependente do domínio protéico de imunodeficiência (IMD)²⁹. A estrutura e função de Eiger sugerem que o mecanismo extrínseco de indução de morte celular pode ter sido evolutivamente conservado em *D. melanogaster*^{23; 26}. Estudos genéticos revelam que a atividade de caspases não é essencial para o mecanismo de morte celular induzido por Eiger^{23; 25; 30}. Eiger e Wengen interagem fisicamente um com o outro através de seus domínios de homologia com TNF e TNFR, respectivamente. Essas descobertas possibilitam entender melhor os papéis evolutivamente conservados dessas proteínas no desenvolvimento normal bem como em condições patofisiológicas³¹.

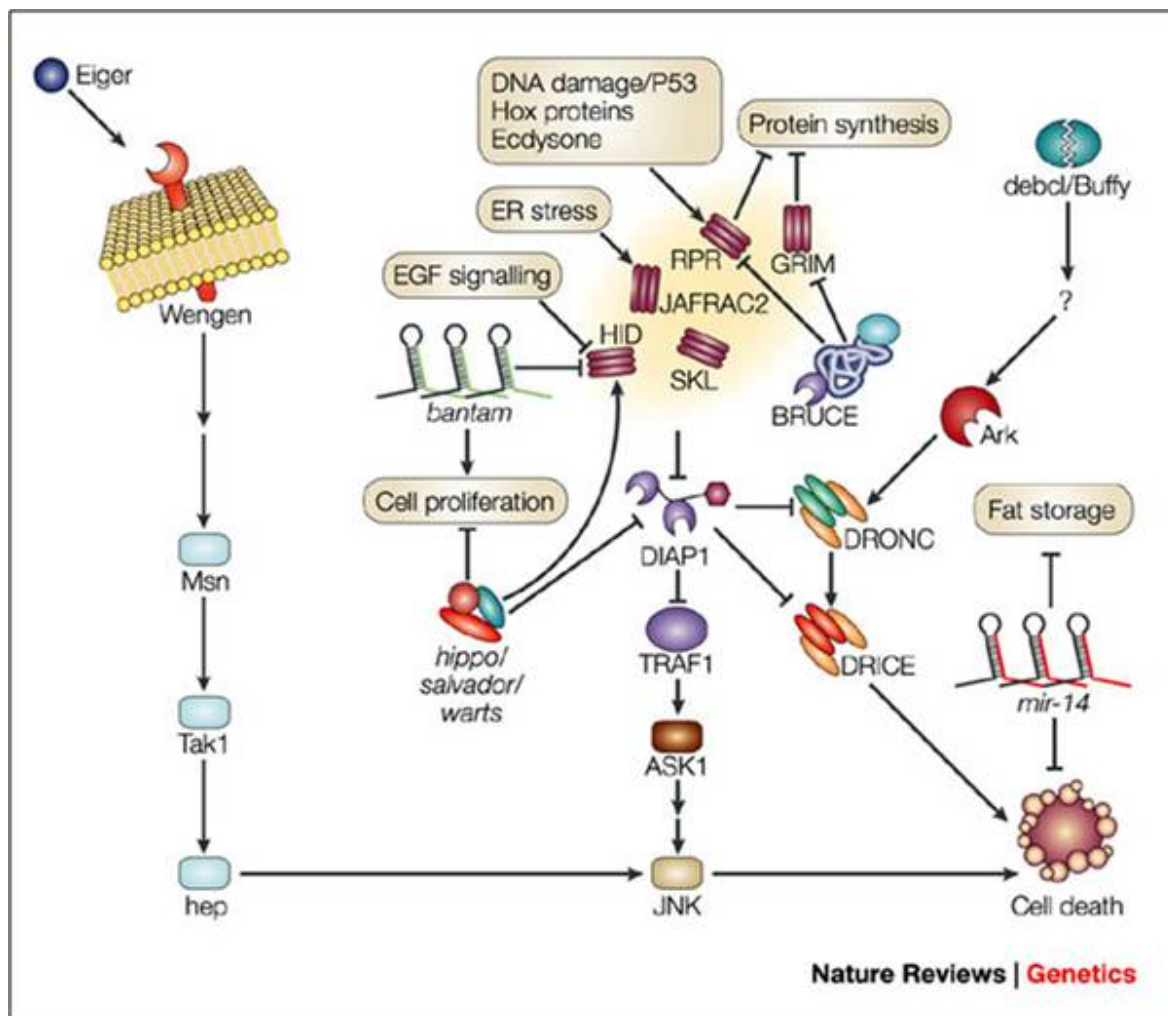


Figura 1. Modelo proposto da indução de morte celular por ativação da via JNK com participação direta de Eiger e Wengen ³².

1.3 *Drosophila melanogaster*, o organismo modelo

Drosophila melanogaster é um inseto holometábolo, pequeno, que naturalmente se encontra em volta das frutas em putrefação e, por isso, é também conhecida por mosca da fruta³³. Com um rápido ciclo de vida (figura 2), as fêmeas podem produzir, numa semana, várias dezenas de descendentes resultantes de uma única fecundação. Os ovos da *D. melanogaster* medem cerca de 1mm (figura 3 e figura 9). Em média demora um dia entre a fertilização e o aparecimento das larvas, estas larvas passam por 3 estágios até formar uma pupa. A eclosão do indivíduo adulto ocorre cerca de 10 dias após a oviposição. Após a eclosão, são necessárias cerca de 5 a 8 horas para as fêmeas se

tornarem férteis e mais de 8 horas para que os machos se tornem. O período de desenvolvimento destas moscas varia em função da temperatura. Os tempos descritos correspondem a uma temperatura de 25° C. Após atingirem a fase adulta têm uma expectativa média de vida de, cerca, de 60 dias^{34; 35; 36}.

Machos e fêmeas podem ser facilmente separados pela presença de dimorfismos sexuais (figura 3). As fêmeas (um pouco maiores que os machos) apresentam uma alternância típica de listras claras e escuras no abdômen. Os machos (menores que as fêmeas) apresentam a extremidade do abdômen negra devido à fusão dos segmentos terminais (esta distinção não é clara nos indivíduos recentemente eclodidos da pupa devido à sua fraca pigmentação). Contudo, o critério mais seguro para distinção do sexo baseia-se na observação de uma estrutura pilosa, exclusiva dos machos, denominada “pente sexual”, situada no primeiro par de patas (figura 3 A). Os indivíduos recém-eclodidos apresentam uma mancha no abdômen, característica desta fase, herdada do estágio de pupa, não defecante. Essa característica é útil durante o processo de seleção de fêmeas virgens³⁴.

Por mais de um século, *Drosophila* vem sendo utilizada como um eficiente organismo modelo para pesquisas^{36; 37; 38} sendo considerada como o metazoário mais explorado em pesquisas científicas³⁹, incluindo o estudo dos mecanismos que envolvem o sistema imune inato e de doenças relacionadas a este sistema^{23; 25; 27; 26; 24; 40}. Inicialmente, a mosca das frutas foi o veículo essencial para se chegar às informações de genética clássica e básica, sendo reconhecida e utilizada posteriormente (durante a primeira metade do século 20) como uma ferramenta eficiente na dissecação de problemas biológicos³⁵. Durante os últimos 50 anos, estudos genéticos utilizando *Drosophila* vêm sendo aplicados com sucesso para decifrar os principais mecanismos que sustentam uma variedade de fundamentos biológicos e seus processos, incluindo sinalização^{41; 42}, ciclo celular^{23; 25; 43; 44}, sistema nervoso^{45; 46; 47; 48}, comportamento^{37; 49}, desenvolvimento^{50; 51} e aspectos moleculares de doenças humanas^{23; 40; 52; 53}.

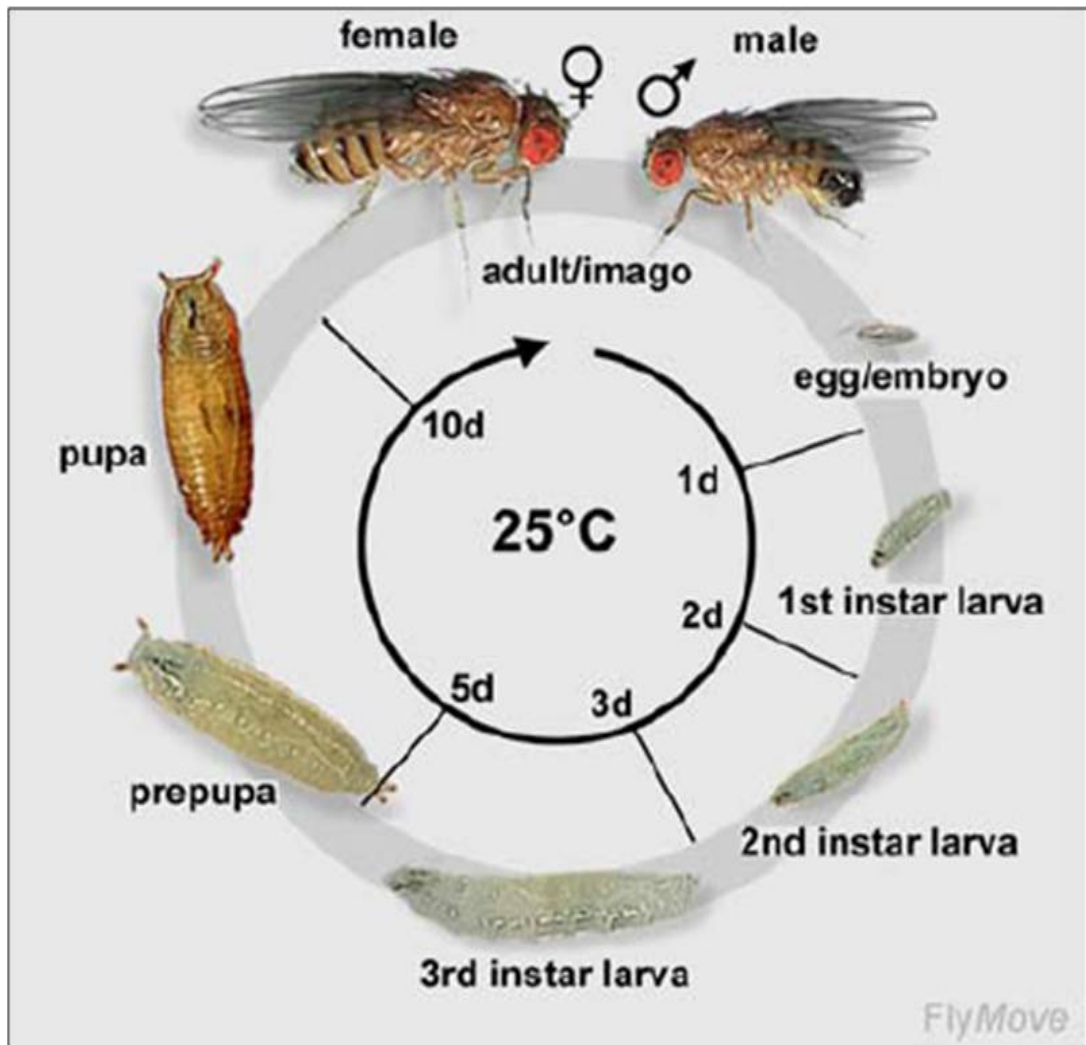


Figura 2. O ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*³⁴.

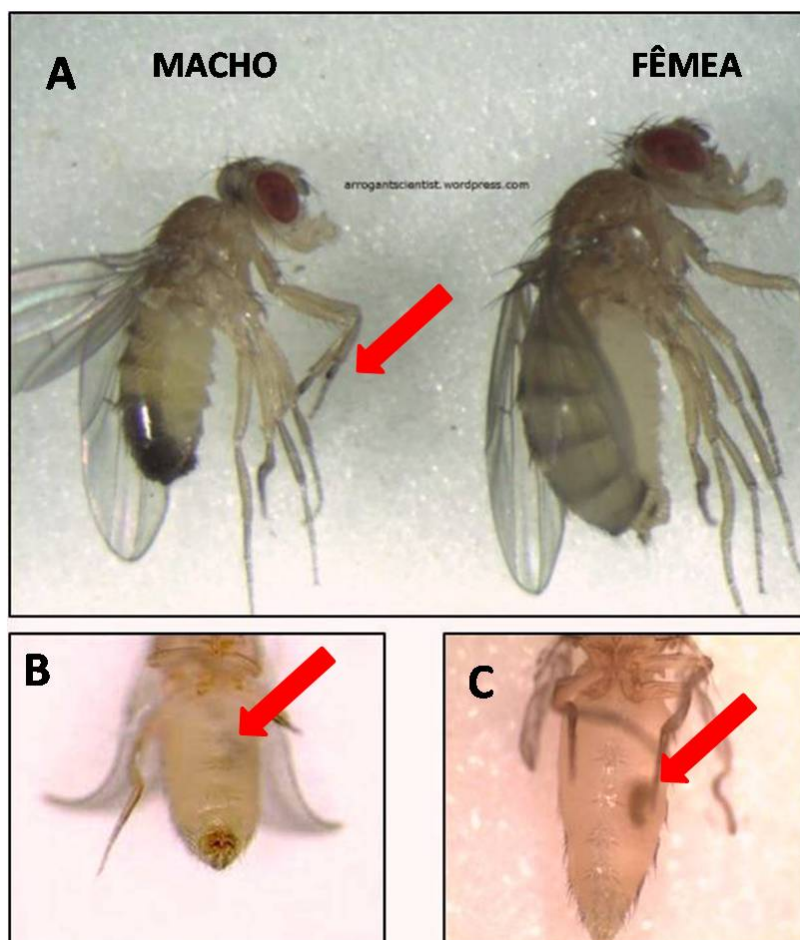


Figura 3. Dimorfismo sexual em *Drosophila melanogaster*. “Apêndices sexuais” no primeiro par de pernas de machos (A marcado com seta). Porção posterior do abdômen de machos mais escura (A e B), enquanto em fêmea é mais clara (A e C). Mancha no abdômen dos recém-nascidos (B e C, marcado com setas). Imagem disponível em site⁵⁴ com adaptações.

1.3.1 Linhagens Transgênicas

Ao longo das últimas décadas houve um aumento considerável no desenvolvimento de ferramentas moleculares que têm possibilitado a análise de muitos processos biológicos. Graças ao advento da biologia molecular estudos revolucionários tem sido realizados utilizando *D. melanogaster* como organismo modelo, a exemplo do sequenciamento do genoma completo, a descoberta de elementos transponíveis como veículo para construção de transgênicos e silenciamento gênico (*knock down*)^{34; 39; 55}. A geração de linhagens transgênicas de *D. melanogaster* pode ser baseada no uso de elementos

transponíveis/transposons. Esses elementos construídos se inserem no genoma da *Drosophila* como um elemento endógeno e a partir de então é mantido na mesma posição nas gerações seguintes³⁴.

Os primeiros elementos de transposição descobertos e caracterizados molecularmente em eucariontes foram isolados de levedura mutantes e de *D. melanogaster*. De todos os elementos transponíveis caracterizados em *Drosophila melanogaster*, os mais úteis são os elementos P. Esses elementos foram descobertos por Margaret Kidwell enquanto estudava disgenia híbrida⁵⁶. Transposons naturais codificam enzimas especializadas chamadas transposases. Essas enzimas catalisam a mobilização dos transposons para outros locais do genoma seja por excisão/re-locação ou pela replicação^{34; 57} (figura 4 A).

Para obtenção dos transgênicos de *D. melanogaster*, transposons são modificados geneticamente. O gene da transposase é removido e substituído por outros genes que se deseja introduzir no genoma da *Drosophila*^{34; 55}. Estes constructos contêm genes marcadores de seleção em bactérias que permitem a seleção de clones contendo o elemento P (figura 4 B). Para inserir os transposons construídos no genoma da *Drosophila* eles são injetados no pólo posterior do embrião da *Drosophila* onde serão incorporados pelas células recém-formadas do pólo⁵⁸, possivelmente, muitas células sexuais, garantia para a transmissão da característica (figura 4 C). Para catalisar a inserção dos elementos P no genoma das células, elementos que codificam o gene da transposase (*helper elements*) são injetados juntamente com os elementos P nas células do pólo posterior do embrião (figura 4 C). *Helper elements* não se inserem e tampouco se replicam sozinhos, portanto são degradados gradualmente com a proliferação das células injetadas. Após o desaparecimento da atividade enzimática, as inserções dos elementos P são estabilizadas e a linhagem estabelecida sendo mantida em estoques³⁴.

O acesso aos transgênicos é possível através dos grupos de pesquisa que o criaram, mas também estão disponíveis em centros de estoques de *Drosophila* como os centros Bloomington⁵⁹. Há uma grande variedade de linhagens disponíveis, classificadas conforme o tipo de construção gênica e suas aplicações^{28; 59}.

As linhagens *drivers* são construídas para direcionarem a expressão de um gene de interesse ao um tecido específico como por exemplo, as linhagens GMR-GAL4, *yolk*-GAL4 e *da*-GAL4 cuja transcrição de GAL4 está sob o comando do promotores dos genes: repórter múltiplo ocular (*Glass multiple reporter*) para o olho, podendo estender a expressão para pernas e asas^{60; 61}, gema (*yolk*) específico de corpo gorduroso de fêmeas adultas⁶¹ e *daughterless* com expressão ubíqua, respectivamente⁶².

As linhagens *responders* são caracterizadas por um sistema de expressão gênica cuja transcrição do gene alvo está sob o comando de uma sequência de ativação antecedente (UAS) dependente de GAL4⁵⁹. Alguns exemplos de linhagens *responders* são: UAS-eiger, para gene ortólogo do TNF-alfa; UAS-eiger-IR para um RNA de interferência²³ para o gene eiger e UAS-tdTom para a proteína fluorescente tomate²⁸.

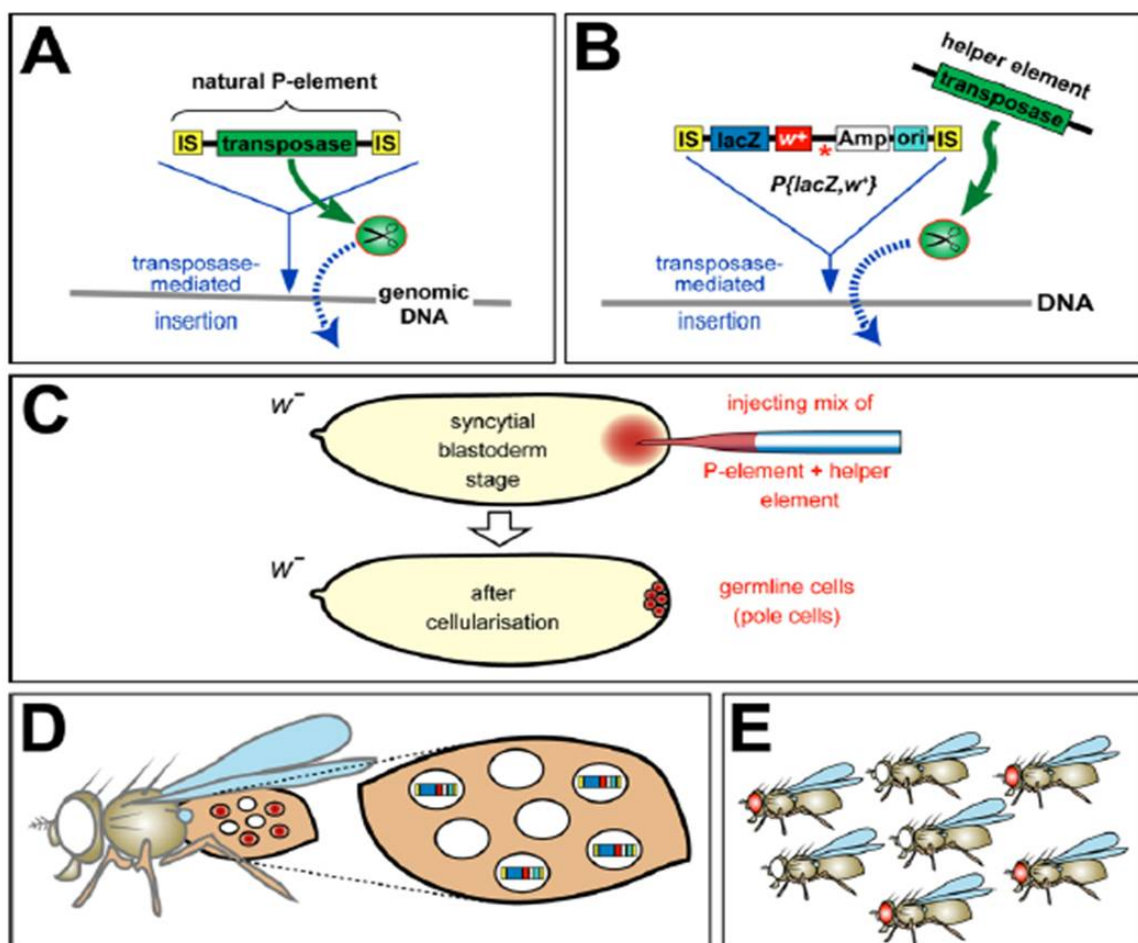


Figura 4. Uso de elementos P para gerar *Drosophila* transgênica. (A) Inserção de elemento P natural (em amarelo, as sequências de bases complementares a regiões do genoma). (B) $P\{lacZ, w^+\}$ é um elemento P construído e utilizado para a construção de transgênicos. O gene da

transposase foi substituído pelo gene lacZ de *E. coli* (caixa azul escuro), um gene marcador, mine-white (caixa vermelha), um gene de resistência a antibiótico (caixa branca) e uma origem de replicação (caixa azul claro). (C) Injeção na porção posterior do embrião onde estão células sexuais. (D) A inserção do elemento P não acontece em todas as células do indivíduo, o que gera o padrão mosaico que resulta em *Drosophila* sem expressão do gene marcador (olhos vermelhos do gene mine-white). (E) Após cruzamento com *Drosophila* -w, somente a prole transgênica possui olhos vermelhos (devido à presença do gene mine-white) e poderá ser selecionada³⁴

1.3.1.1 O sistema GAL4/UAS

Gal4 é um fator de transcrição identificado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*^{34; 63; 64}. É uma proteína composta por 881 aminoácidos induzida por galactose para ativar genes como GAL10 e GAL1, situados posteriormente à sequências de ativação antecedentes, ou acentuador (UAS)^{39; 64; 65}. Gal4 tem pelo menos dois domínios, um para ligação ao DNA e outro para ativação da transcrição, uma característica modular comum encontrada em fatores de ligação ao DNA. Seus alvos, os acentuadores (UAS) eucarióticos podem agir a grandes distâncias dos promotores dos genes para modular a transcrição^{39; 64}. Essas sequências de ativação contêm sítios de ligação para vários fatores de transcrição, incluindo a RNA polimerase, que agem cooperativamente resultando em uma variedade de respostas incluindo recrutamento de demais ativadores e remodelagem da cromatina⁶⁴.

UAS e GAL4 não existem naturalmente em *Drosophila*^{34; 63}. Entretanto em 1988 Fisher *et al.* demonstrou que a expressão de GAL4 é capaz de induzir a transcrição de um gene repórter sob o controle de UAS em *Drosophila*³⁹.

A utilização do sistema GAL4/UAS em *Drosophila* no estudo de expressão gênica acontece desde 1993⁶⁶. A ativação do sistema acontece pelo simples cruzamento entre linhagens expressando Gal4 (*drivers*) com linhagens contendo o elemento UAS (*responder*). Como resultado do cruzamento, a prole irá expressar o gene ligado ao UAS sob um padrão de expressão dirigido por GAL4^{34; 63} (figura 5). Os genes de interesse podem ser repórteres, diferentes isoformas ou de outras espécies e RNAs de interferência⁶³. De modo geral, o sistema GAL4/UAS possibilita o estudo da expressão gênica mediante uma análise temporal e espacial, sendo considerada umas das técnicas mais eficientes nesses estudos, ou um “canivete suíço” para a análise das funções gênicas³⁹.

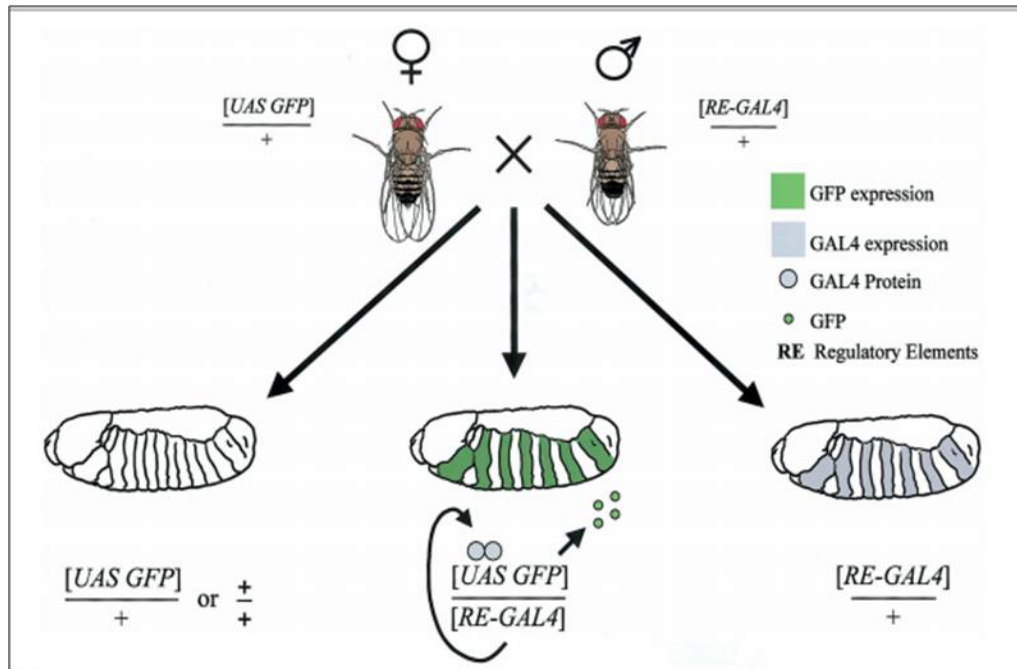


Figura 5. O sistema GAL4/UAS em *Drosophila melanogaster*. Fêmeas portando o responder (UAS-GFP) são cruzadas com machos expressando o driver Gal4 (RE-GAL4) resulta em prole contendo ambos os elementos do sistema. A presença de GAL4 em segmentos embrionários alternados dirige a expressão do responder (UAS-GFP) para esses locais³⁹.

1.4 Drogas anti-inflamatórias

Muitos estudos são focados no entendimento dos processos inflamatórios bem como no desenvolvimento de princípios ativos para controle desse processo^{67; 68; 69}. Drogas anti-inflamatórias são fármacos cujos princípios ativos interferem no processo reacional de defesa do organismo, amenizando os danos e proporcionando mais conforto⁷⁰. Esses medicamentos podem agir sobre vias metabólicas, inibindo a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL1)^{71; 72; 73}, ou bloqueando a ação de enzimas importantes na cascata do ácido araquidônico como a fosfolipase (A2)^{74; 75; 52; 53; 76} e a ciclooxigenase (COX-1 e COX-2)^{73; 77; 78; 79; 80}.

As drogas anti-inflamatórias são classificadas como esteroidais ou não esteroidais que agem sobre pontos diferentes na inativação do processo

inflamatório, mas possuem um ponto em comum, que é a inibição da síntese de um grupo de mediadores químicos inflamatórios denominados eicosanóides^{70; 81; 52; 53} Figura (6).

Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) possuem propriedades analgésica, antitérmica, antitrombótica além da função anti-inflamatória^{49; 81}, sendo o ácido acetilsalicílico o mais antigo antiinflamatório não esteroidal conhecido^{1 49}. O principal representante do grupo dos eicosanóides inibidos pelos AINEs são as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (mediadores do processo inflamatório) para esse efeito, os AINEs agem basicamente sobre as COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzível somente em condições patológicas)^{1; 81} impedindo que o ácido araquidônico seja liberado no meio intracelular e posteriormente metabolizado pelas vias da prostaglandina sintetases e lipooxigenases (LOX) resultando no bloqueio do processo inflamatório^{1; 81} (Figura 6).

Anti-inflamatórios esteroidais ou glicocorticóides (AIEs) são drogas que mimetizam os efeitos do hormônio cortisol, considerados os mais eficazes antiinflamatórios disponíveis, suplantando os não-esteróides (AINEs)⁸¹. Sua principal função sobre o processo inflamatório é inibir a fosfolipase A2 a partir da indução da proteína lipoportina⁷⁰. Na via bioquímica dos eicosanóides a ação da A2 ocorre em um nível acima da ciclooxigenase e o resultado da ação antiinflamatória é a diminuição da concentração do ácido araquidônico para ser processado pelas COXs, e assim inibe as duas vias, simultaneamente⁸¹ (Figura 6). Além disso, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1⁷².

Drogas antiinflamatórias têm sido utilizadas em *D. melanogaster* possibilitando a exploração e o entendimento dos processos biológicos envolvendo o sistema imune. Medicamentos esteróides (AIEs) como dexametasona tem sido útil na identificação de moléculas de sinalização durante o processo de defesa do inseto em resposta a infecções⁸², na identificação de sinergismo entre vias metabólicas do sistema nervoso envolvendo vias de apoptose celular⁸³ e na inibição de resposta imune celular⁸², através da inativação da fosfolipase (A2)⁸⁴. Os medicamentos não esteróides (AINEs) como o ácido acetilsalicílico têm sido

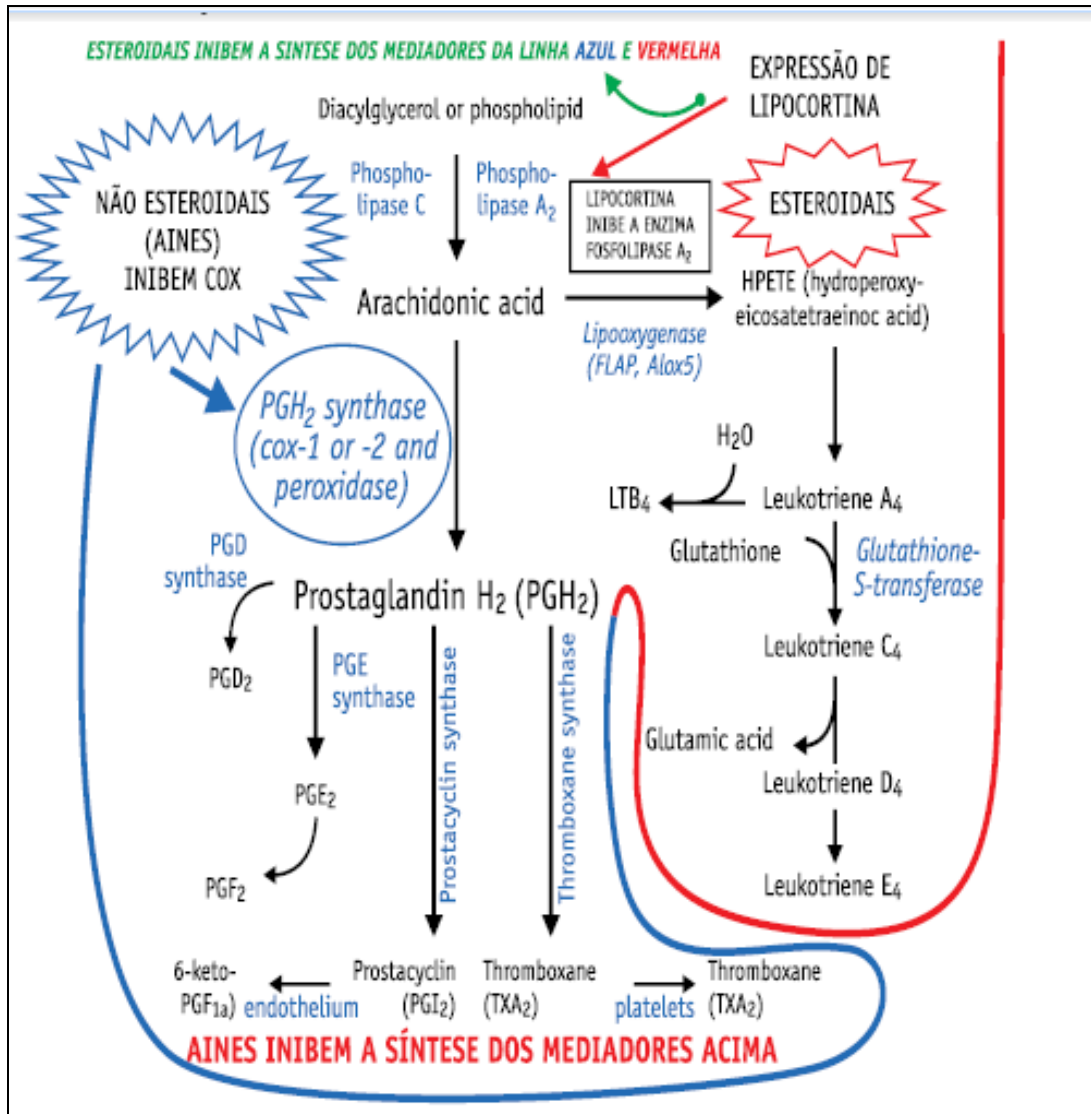
ação sobre canais iônicos do inseto ⁸⁵.

Figura 6. Cascata de ativação do ácido araquidônico e a ação de anti-inflamatórios sobre seus mediadores⁸⁶.

Referencia

- ¹ ABBAS, K., A.; LICHTMAN, A, H. **Imunologia Celular e Molecular** 2005.
- ² KIMBRELL, D. A.; BEUTLER, B. The evolution and genetics of innate immunity. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 4, p. 256-67, Apr 2001. ISSN 1471-0056 (Print)
1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283698> >.
- ³ KENNEDY, M. A. A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 40, n. 3, p. 369-79, May 2010. ISSN 1878-1306 (Electronic)
0195-5616 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471522> >.
- ⁴ LINDE, A. et al. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. **J Vet Intern Med**, v. 22, n. 2, p. 247-65, Mar-Apr 2008. ISSN 0891-6640 (Print)
0891-6640 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18312280> >.
- ⁵ CANAS, C. A.; CANAS, F. The biological significance of evolution in autoimmune phenomena. **Autoimmune Dis**, v. 2012, p. 784315, 2012. ISSN 2090-0430 (Electronic)
2090-0430 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22482039> >.
- ⁶ BALLARD, A. E. Traditional and complementary therapies used together in the treatment, relief and control of Chron's disease and polyarthritis. **Complement Ther Nurs Midwifery**, v. 2, n. 2, p. 52-4, Apr 1996. ISSN 1353-6117 (Print)
1353-6117 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9439274> >.
- ⁷ GOLOVICS, P. A. et al. [The effect of early immunosuppressive therapy on the rate of resections performed in patients with Chron's disease, in Veszprem county, Hungary, a population-based cohort study]. **Orv Hetil**, v. 153, n. 14, p. 541-52, Apr 8 2012. ISSN 0030-6002 (Print)
0030-6002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450143> >.
- ⁸ EGLINTON, T. W. et al. Clinical and genetic risk factors for perianal Crohn's disease in a population-based cohort. **Am J Gastroenterol**, v. 107, n. 4, p. 589-96, Apr 2012. ISSN 1572-0241 (Electronic)
0002-9270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158027> >.

- ⁹ CLARKE, A.; VYSE, T. J. Genetics of rheumatic disease. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 5, p. 248, 2009. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19849816> >.
- ¹⁰ MOON, S. J. et al. Periarticular osteoporosis is a prominent feature in early rheumatoid arthritis: estimation using shaft to periarticular bone mineral density ratio. **J Korean Med Sci**, v. 28, n. 2, p. 287-94, Feb 2013. ISSN 1598-6357 (Electronic)

1011-8934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399828> >.
- ¹¹ LONGHI, M. S. et al. T-regs in autoimmune hepatitis-systemic lupus erythematosus/mixed connective tissue disease overlap syndrome are functionally defective and display a Th1 cytokine profile. **J Autoimmun**, v. 41, p. 146-51, Mar 2013. ISSN 1095-9157 (Electronic)

0896-8411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287048> >.
- ¹² SERRANO, N. C.; MILLAN, P.; PAEZ, M. C. Non-HLA associations with autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 5, n. 3, p. 209-14, Mar 2006. ISSN 1568-9972 (Print)

1568-9972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16483921> >.
- ¹³ LU, Z. et al. Effect of the polymorphism of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A gene promoter on the susceptibility to ulcerative colitis: a meta-analysis. **Digestion**, v. 78, n. 1, p. 44-51, 2008. ISSN 1421-9867 (Electronic)

0012-2823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827481> >.
- ¹⁴ DAYER, J. M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J Exp Med**, v. 162, n. 6, p. 2163-8, Dec 1 1985. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999289> >.
- ¹⁵ GOH, L. et al. A systematic review of the influence of anti-TNF on infection rates in patients with rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 53, n. 6, p. 501-15, Nov-Dec 2013. ISSN 1809-4570 (Electronic)

0482-5004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477729> >.
- ¹⁶ FORTE, W. C. N. **A Brief Review of the Basics of Immunology: The Innate and Adaptive Response**. 2ª.
- ¹⁷ ROSSI, D.; GAIDANO, G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. **Haematologica**, v. 88, n. 2, p. 212-8, Feb 2003. ISSN 0390-6078 (Print)

0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12604411> >.

- ¹⁸ GARCIA-VIDAL, C. et al. Risk factors for opportunistic infections in infliximab-treated patients: the importance of screening in prevention. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 28, n. 4, p. 331-7, Apr 2009. ISSN 1435-4373 (Electronic)
0934-9723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797940> >.
- ¹⁹ VAN DEVENTER, S. J. Review article: targeting TNF alpha as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease--the mechanisms of action of infliximab. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 13 Suppl 4, p. 3-8; discussion 38, Sep 1999. ISSN 0269-2813 (Print)
0269-2813 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10597333> >.
- ²⁰ BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1627-40, May 12 2007. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499605> >.
- ²¹ REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 2, p. 111-21, Feb 2002. ISSN 1474-1776 (Print)
1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120092> >.
- ²² HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cancer Res**, v. 59, n. 7 Suppl, p. 1701s-1706s, Apr 1 1999. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197583> >.
- ²³ IGAKI, T. et al. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. **EMBO J**, v. 21, n. 12, p. 3009-18, Jun 17 2002. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065414> >.
- ²⁴ KAUPPILA, S. et al. Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in Drosophila. **Oncogene**, v. 22, n. 31, p. 4860-7, Jul 31 2003. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894227> >.
- ²⁵ KANDA, H. et al. Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 47, p. 18977-82, Nov 22 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065747> >.

- ²⁶ MORENO, E.; YAN, M.; BASLER, K. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the Drosophila homolog of the TNF superfamily. **Curr Biol**, v. 12, n. 14, p. 1263-8, Jul 23 2002. ISSN 0960-9822 (Print)
- 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176339> >.
- ²⁷ STEFANATOS, R. K.; VIDAL, M. Tumor invasion and metastasis in Drosophila: a bold past, a bright future. **J Genet Genomics**, v. 38, n. 10, p. 431-8, Oct 20 2011. ISSN 1673-8527 (Print)
- 1673-8527 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035864> >.
- ²⁸ ST. PIERRE SE, P. L., STEFANCIK R, MCQUILTON P, AND THE FLYBASE CONSORTIUM. FlyBase 102. 2014. Disponível em: < <http://flybase.org/reports/FBgn0033483.html> >. Acesso em: 10 de Junho de 2014.
- ²⁹ CHA, G. H. et al. Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in Drosophila melanogaster mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 22, p. 7982-91, Nov 2003. ISSN 0270-7306 (Print)
- 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585960> >.
- ³⁰ BRANDT, S. M. et al. Secreted Bacterial Effectors and Host-Produced Eiger/TNF Drive Death in a Salmonella-Infected Fruit Fly. **PLoS Biol**, v. 2, n. 12, p. e418, Dec 2004. ISSN 1545-7885 (Electronic)
- 1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15562316> >.
- ³¹ KANDA, H. et al. Wengen, a member of the Drosophila tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. **J Biol Chem**, v. 277, n. 32, p. 28372-5, Aug 9 2002. ISSN 0021-9258 (Print)
- 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084706> >.
- ³² HAY, B. A.; HUH, J. R.; GUO, M. The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in Drosophila. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 12, p. 911-22, Dec 2004. ISSN 1471-0056 (Print)
- 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573123> >.
- ³³ LYNCH, J. A.; EL-SHERIF, E.; BROWN, S. J. Comparisons of the embryonic development of Drosophila, Nasonia, and Tribolium. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 1, n. 1, p. 16-39, Jan-Feb 2012. ISSN 1759-7692 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23801665> >.

- ³⁴ ROOTE, J.; PROKOP, A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. **G3 (Bethesda)**, v. 3, n. 2, p. 353-8, Feb 2013. ISSN 2160-1836 (Electronic)
2160-1836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23390611> >.
- ³⁵ KELLER, E. F. *Drosophila* embryos as transitional objects: the work of Donald Poulson and Christiane Nusslein-Volhard. **Hist Stud Phys Biol Sci**, v. 26, n. 2, p. 313-46, 1996. ISSN 0890-9997 (Print)
0890-9997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11613313> >.
- ³⁶ ASHBURNER, M. The Development of *Drosophila melanogaster*. In: PRESS, C. S. H. L. (Ed.). New York, 1993. p.1493–1506.
- ³⁷ BELLEN, H. J.; TONG, C.; TSUDA, H. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 7, p. 514-22, Jul 2010. ISSN 1471-0048 (Electronic)
1471-0048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383202> >.
- ³⁸ MARTINEZ ARIAS, A. ***Drosophila melanogaster and the development of biology in the 20th century.*** 2008.
- ³⁹ DUFFY, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. **Genesis**, v. 34, n. 1-2, p. 1-15, Sep-Oct 2002. ISSN 1526-954X (Print)
1526-954X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324939> >.
- ⁴⁰ IGAKI, T. et al. Eiger and wengen: the *Drosophila* orthologs of TNF/TNFR. **Adv Exp Med Biol**, v. 691, p. 45-50, 2011. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153308> >.
- ⁴¹ MIRON, M.; SONENBERG, N. Regulation of translation via TOR signaling: insights from *Drosophila melanogaster*. **J Nutr**, v. 131, n. 11, p. 2988S-93S, Nov 2001. ISSN 0022-3166 (Print)
0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694634> >.
- ⁴² CADIGAN, K. M.; PEIFER, M. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 2, p. a002881, Aug 2009. ISSN 1943-0264 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066091> >.

- ⁴³ LEE, L. A.; ORR-WEAVER, T. L. Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. **Annu Rev Genet**, v. 37, p. 545-78, 2003. ISSN 0066-4197 (Print)
- 0066-4197 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14616073> >.
- ⁴⁴ MA, X. et al. Bendless modulates JNK-mediated cell death and migration in *Drosophila*. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 3, p. 407-15, Mar 2014. ISSN 1476-5403 (Electronic)
- 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162658> >.
- ⁴⁵ LANG, M. et al. Inhibition of human high-affinity copper importer Ctr1 orthologous in the nervous system of *Drosophila* ameliorates Abeta42-induced Alzheimer's disease-like symptoms. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 11, p. 2604-12, Nov 2013. ISSN 1558-1497 (Electronic)
- 0197-4580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23827522> >.
- ⁴⁶ ZHANG, J. et al. Macrophage beta2 integrin-mediated, HuR-dependent stabilization of angiogenic factor-encoding mRNAs in inflammatory angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 180, n. 4, p. 1751-60, Apr 2012. ISSN 1525-2191 (Electronic)
- 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22322302> >.
- ⁴⁷ KOUSHIKA, S. P.; LISBIN, M. J.; WHITE, K. ELAV, a *Drosophila* neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. **Curr Biol**, v. 6, n. 12, p. 1634-41, Dec 1 1996. ISSN 0960-9822 (Print)
- 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994828> >.
- ⁴⁸ CHAN, H. Y.; BONINI, N. M. *Drosophila* models of human neurodegenerative disease. **Cell Death Differ**, v. 7, n. 11, p. 1075-80, Nov 2000. ISSN 1350-9047 (Print)
- 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139281> >.
- ⁴⁹ SHIMADA, I.; KAWAZOE, Y.; HARA, H. A temporal model of animal behavior based on a fractality in the feeding of *Drosophila melanogaster*. **Biol Cybern**, v. 68, n. 6, p. 477-81, 1993. ISSN 0340-1200 (Print)
- 0340-1200 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8324055> >.
- ⁵⁰ DAMMAI, V. et al. *Drosophila* awd, the homolog of human nm23, regulates FGF receptor levels and functions synergistically with shi/dynamin during tracheal development. **Genes Dev**, v. 17, n. 22, p. 2812-24, Nov 15 2003. ISSN 0890-9369 (Print)
- 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630942> >.

- ⁵¹ KUMITA, J. R. et al. Disease-related amyloidogenic variants of human lysozyme trigger the unfolded protein response and disturb eye development in *Drosophila melanogaster*. **FASEB J**, v. 26, n. 1, p. 192-202, Jan 2012. ISSN 1530-6860 (Electronic)
0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965601> >.
- ⁵² BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 1, p. 9-23, Jan 2005. ISSN 1471-0056 (Print)
1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630418> >.
- ⁵³ CHIEN, S. et al. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 1, p. 149-51, Jan 1 2002. ISSN 1362-4962 (Electronic)
0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752278> >.
- ⁵⁴ SCIENTIST, A. **Balancer Chromosomes** 2009.
- ⁵⁵ TOBA, G. et al. The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 151, n. 2, p. 725-37, Feb 1999. ISSN 0016-6731 (Print)
0016-6731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927464> >.
- ⁵⁶ CARROLL, A. F. G. S. R. W. R. C. L. S. B. **Introdução à genética**. 9ª. Rio de Janeiro: 2008. ISBN 978-85-277-1497-6.
- ⁵⁷ _____. Mutação, variação e evolução. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Introdução à genética**. 9ª, 2008. p.425-431. ISBN 978-85-277-1497-6.
- ⁵⁸ BACHMANN A, K. E. **Drosophila Methods and Protocols**. 2008.
- ⁵⁹ COOK, K. R. et al. New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. **Fly (Austin)**, v. 4, n. 1, p. 88-91, Jan-Mar 2010. ISSN 1933-6942 (Electronic)
1933-6934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160480> >.
- ⁶⁰ LI, W. Z. et al. A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. **Genet Mol Res**, v. 11, n. 3, p. 1997-2002, 2012. ISSN 1676-5680 (Electronic)
1676-5680 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911584> >.

- ⁶¹ GIORGI, F. et al. Ultrastructural analysis of *Drosophila* ovarian follicles differing in yolk polypeptide (yps) composition. **Development**, v. 117, n. 1, p. 319-28, Jan 1993. ISSN 0950-1991 (Print)
- 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223255> >.
- ⁶² FISHER, B., WEISZMANN, R., FRISE, E., HAMMONDS, A., TOMANCAK, P., BEATON, A., BERMAN, B., QUAN, E., SHU, S., LEWIS, S., RUBIN, G., BARALE, C., LAGUERTAS, E., QUINN, J., GHOSH, A., HARTENSTEIN, V., ASHBURNER, M., CELNIKER, S. . BDGP insitu. 2012. Disponível em: < <http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl> >.
- ⁶³ ELLIOTT, D. A.; BRAND, A. H. The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes. **Methods Mol Biol**, v. 420, p. 79-95, 2008. ISSN 1064-3745 (Print)
- 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641942> >.
- ⁶⁴ CARROLL, A. F. G. S. R. W. R. C. L. S. B. **Introdução à genética**. 9ª. Rio de Janeiro: 2008. ISBN 978-85-277-1497-6.
- ⁶⁵ LAUGHON, A.; GESTELAND, R. F. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. **Mol Cell Biol**, v. 4, n. 2, p. 260-7, Feb 1984. ISSN 0270-7306 (Print)
- 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6366516> >.
- ⁶⁶ BRAND, A. H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. **Development**, v. 118, n. 2, p. 401-15, Jun 1993. ISSN 0950-1991 (Print)
- 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223268> >.
- ⁶⁷ ALLISON, A. C. et al. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, n. 7, p. 1341-57, Oct 2001. ISSN 0278-5846 (Print)
- 0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513350> >.
- ⁶⁸ ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. **Ann Intern Med**, v. 156, n. 5, p. 350-9, Mar 6 2012. ISSN 1539-3704 (Electronic)
- 0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393130> >.
- ⁶⁹ HOFFMANN, F. [The analgesic potency of acetylsalicylic acid and salicylamide; algesiometric measurements and their results in practice]. **Arztl Wochensh**, v. 8, n. 29, p. 698-701, Jul 17 1953. ISSN 0365-6403 (Print)

0365-6403 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13080058> >.

⁷⁰ RANG, H. P. D., M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. . **Farmacologia**. 6ª. Rio de Janeiro: 2007.

⁷¹ LOPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 4, p. 495-506, Aug 15 2008. ISSN 1873-2968 (Electronic)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590707> >.

⁷² KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J Pharmacol Sci**, v. 96, n. 3, p. 229-45, Nov 2004. ISSN 1347-8613 (Print)

1347-8613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539763> >.

⁷³ NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 4, p. 418-25, Oct 2001. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566638> >.

⁷⁴ OLSON, E. D. et al. Kinetic evaluation of cell membrane hydrolysis during apoptosis by human isoforms of secretory phospholipase A2. **J Biol Chem**, v. 285, n. 14, p. 10993-1002, Apr 2 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139082> >.

⁷⁵ JONAT, C. et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. **Cell**, v. 62, n. 6, p. 1189-204, Sep 21 1990. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2169351> >.

⁷⁶ SAMPEY, A. V.; HUTCHINSON, P.; MORAND, E. F. Annexin I and dexamethasone effects on phospholipase and cyclooxygenase activity in human synoviocytes. **Mediators Inflamm**, v. 9, n. 3-4, p. 125-32, 2000. ISSN 0962-9351 (Print)

0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11132768> >.

⁷⁷ SILVAN, A. M. et al. Antiinflammatory activity of coumarins from Santolina oblongifolia. **J Nat Prod**, v. 59, n. 12, p. 1183-5, Dec 1996. ISSN 0163-3864 (Print)

0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8988605> >.

- ⁷⁸ BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 2-3, p. 325-37, May 13 2008. ISSN 0014-2999 (Print)
- 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417116> >.
- ⁷⁹ SANTANGELO, C. et al. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann Ist Super Sanita**, v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007. ISSN 0021-2571 (Print)
- 0021-2571 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209273> >.
- ⁸⁰ DZIELSKA-OLCZAK, M. [What is new about nonsteroidal antiinflammatory drugs?]. **Pol Merkur Lekarski**, v. 23, n. 138, p. 454-8, Dec 2007. ISSN 1426-9686 (Print)
- 1426-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432131> >.
- ⁸¹ BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. I. E. D.; ESTRATÉGICOS., D. A. F. E. I. **Formulário terapêutico nacional 2008: Rename 2006**. Brasília: 2008. 807 ISBN 978-85-334-1473-0.
- ⁸² CARTON, Y. et al. Dexamethasone inhibition of the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* against a parasitoid. **J Parasitol**, v. 88, n. 2, p. 405-7, Apr 2002. ISSN 0022-3395 (Print)
- 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054022> >.
- ⁸³ PENG, Y. et al. Neural inhibition by c-Jun as a synergizing factor in bone morphogenetic protein 4 signaling. **Neuroscience**, v. 109, n. 4, p. 657-64, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)
- 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927148> >.
- ⁸⁴ YAJIMA, M. et al. A newly established in vitro culture using transgenic *Drosophila* reveals functional coupling between the phospholipase A2-generated fatty acid cascade and lipopolysaccharide-dependent activation of the immune deficiency (imd) pathway in insect immunity. **Biochem J**, v. 371, n. Pt 1, p. 205-10, Apr 1 2003. ISSN 0264-6021 (Print)
- 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12513692> >.
- ⁸⁵ FROLOV, R. V.; BERIM, I. G.; SINGH, S. Inhibition of delayed rectifier potassium channels and induction of arrhythmia: a novel effect of celecoxib and the mechanism underlying it. **J Biol Chem**, v. 283, n. 3, p. 1518-24, Jan 18 2008. ISSN 0021-9258 (Print)
- 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984087> >.
- ⁸⁶ BRANDÃO, A. **Anti-inflamatórios: uma compreensão total**. Pharmacia Brasileira: 30-44 p. 2011.

Capítulo II

**Desenvolvimento de um modelo de doenças inflamatórias sistêmicas em
*Drosophila melanogaster***

Resumo

O sistema imune desempenha importante papel de defesa nos organismos, sendo as citocinas, a exemplo do TNF- α , importantes reguladores do sistema imune. Eiger é o primeiro e até então o único ortólogo do TNF em *Drosophila melanogaster* e está envolvido nos processos de resposta imune do inseto. O uso de ferramentas moleculares em associação aos elementos transponíveis do tipo P são os veículos mais utilizados para obtenção dos transgênicos de *D. melanogaster* que favorece a utilização deste organismo modelo nos estudos sobre o sistema imune. *D. melanogaster* também tem sido utilizada para teste de fármacos. Drogas antiinflamatórias esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs) têm sido administradas em *Drosophila melanogaster* com o objetivo de estudar processos inflamatórios. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi validar um modelo alternativo, eficiente, rápido e econômico para o estudo do processo inflamatório sistêmico controlado por drogas anti-inflamatórias. Para isso foram utilizadas linhagens transgênicas de *D. melanogaster* para obtenção de indivíduos com superexpressão de Eiger tecido específica ou ubíqua e para o silenciamento ubíquo de Eiger. A existência de um fenótipo visível nestes indivíduos se mostrou dependente do número de cópias do responder e ou do tipo de tecido para o qual essa superexpressão foi direcionada sendo que os indivíduos com superexpressão ubíqua de Eiger não passaram do estágio de pupa. Estes apresentaram baixo desempenho no desenvolvimento, que resultou em diferenças estatisticamente significativas em relação a seus parentais (da-GAL4) e (UAS-eiger) e a linhagem selvagem (Canton S). Sugerindo a ação de um processo inflamatório sistêmico de forma ubíqua o que resulta na morte dos indivíduos. A administração de drogas antiinflamatórias esteroidal e não esteroidal foi incapaz de reverter o fenótipo resultante da superexpressão de Eiger. Deste modo, a realização de análises posteriores tais como dissecação seguida por imunomarcação, microscopia, bem como testes com outras drogas que atuem sobre vias inflamatórias se fazem necessários para melhor investigar e caracterizar esse possível processo inflamatório sistêmico.

Palavras chaves: Eiger, autoimunidade, TNF- α , inflamação.

Abstract

The immune system has an important role in the defense of the organisms and cytokines, such as TNF- α , are important regulators of the immune system. *Eiger* is the first and so far the only TNF ortholog in *Drosophila melanogaster* involved in the processes of insect immune response. The use of molecular tools in association with P elements are the vehicles most often used for obtaining transgenic *D. melanogaster*, which is a great model organism in studies of the immune system. *D. melanogaster* has also been used for drug testing. Steroidal anti-inflammatory drugs (SIAs) and (NSAIDs) have been administered in *Drosophila melanogaster* aiming to study inflammatory processes. Thus, the aim of this study was to validate an alternative, efficient, fast and economical model for the study of systemic inflammatory process controlled by anti-inflammatory drugs. We used transgenic lines of *D. melanogaster* to obtain individuals overexpressing Eiger in specific tissues and individuals ubiquitously expressing Eiger for further silencing testing. The existence of a visible phenotype in the individuals proved to be dependent on either the responder expression quantity or the type of tissue to which the overexpression was directed. Individuals with ubiquitous overexpression of Eiger remained in the pupal stage and showed low performance in development, which resulted in statistically significant differences compared to their parental (da-GAL4 and UAS-eiger) and wild type (Canton S). This suggests the action of a systemic inflammatory process in a ubiquitous manner that results in the death of all individuals. The action of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs did not reverse the phenotype resulting from the overexpression of Eiger. Further analyses, such as dissection followed by immunostaining, microscopy, and tests with other drugs that target inflammatory pathways, are needed to further investigate and characterize this systemic inflammatory process.

Keywords: Eiger, autoimmunity, TNF- α , inflammation.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune exerce um importante papel na defesa dos organismos, entretanto pode promover danos aos tecidos com a perda da autotolerância. Essa reação inflamatória exacerbada pode desencadear doenças inflamatórias crônicas e degenerativas, denominadas auto-imunes¹, por etiologia multifatorial complexa² e ainda não totalmente conhecidas. Entre as doenças autoimunes estão a doença inflamatória intestinal (DII)^{3; 4; 5}, a artrite reumatóide (RA)^{2; 6}, Psoríase, Lúpus Eritematoso e outras^{7 2}.

Entre as moléculas presentes na defesa do organismo, as citocinas desempenham funções importantes para a imunidade. Contudo, em doenças autoimunes a super produção de algumas dessas moléculas amplifica o processo inflamatório no organismo^{8,9,10}. O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) é uma citocina crítica para o agravamento da doenças autoimunes. Considerada uma citocina pró-inflamatória, o TNF- α em conjunto com seu receptor (TNFR) desencadeia uma resposta aguda frente às infecções bacterianas e participam de um mecanismo extrínseco de indução de apoptose^{11; 12; 13}

Entre os invertebrados a *Drosophila* foi o primeiro animal a apresentar um ortólogo a TNF- α e do TNFR, denominados *Eiger* e *Wengen*, respectivamente^{14,15}. Seu gene codifica uma proteína do tipo II que está envolvida nos processos de resposta imune do inseto e morte celular¹⁵. A expressão gênica é abrangente^{15, 33, 16, 17, 18} e pode ocorrer em vários tecidos, tais como plasmócitos, olho larval/adulto, abdômen adulto, asas, escutelo, sistema nervoso central larval/adulto, corpo gorduroso larval, glândula salivar adulto e exoesqueleto¹⁸.

A construção de *D. melanogaster* transgênicas tem se tornado cada vez mais comum nos estudos que utilizam esse organismo modelo, inclusive naqueles envolvendo o sistema imune^{15, 19}. O uso de ferramentas moleculares em associação aos elementos transponíveis do tipo P, descobertos na própria *Drosophila melanogaster*²⁰ são os veículos mais utilizados para obtenção desses transgênicos. Para isso, os transposons são modificados geneticamente^{18; 39} para conter genes alvos cuja expressão estará sob o comando do sistema GAL4/UAS

de ativação²¹. Uma vez inseridos no genoma da *Drosophila melanogaster* são mantidos na mesma posição pelas gerações seguintes²²

A mosca da fruta, *D. Melanogaster*, têm sido considerada um modelo alternativo do processo de descobertas de drogas. A vantagem de se utilizar este modelo animal é o baixo custo de manutenção, propagação, e rapidez no estudo e validação quando comparado aos modelos mamíferos tradicionais²³.

Em doenças inflamatórias, o controle do processo inflamatório é uma perspectiva de muitos estudos focados no entendimento e exploração do sistema imune como o desenvolvimento de princípios ativos que agem controlando esses processos^{24; 25; 26}. Drogas antiinflamatórias podem agir sobre vias metabólicas, inibindo a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL1)^{27; 28; 29}, ou bloqueando a ação de enzimas fundamentais na cascata do ácido araquidônico, a exemplo dos antiinflamatórios esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs) que agem sobre as fosfolipase (A2)^{30; 31; 54; 52; 53} e a ciclooxigenase (COX-1 e COX-2)^{29; 32; 33; 34; 35}, respectivamente.

Por expressar ortólogos de TNF- α e seu receptor (TNFR), *Drosophila melanogaster* poderia ser utilizada como modelo animal para os teste de medicamentos esteroidal e não esteroidal, com o objetivo de estudar processos inflamatórios que se assemelham consideravelmente com os dos humanos³⁶ como por exemplo, as vias de apoptose celular^{37; 38} e teste de eficiência de drogas utilizadas em quadros de doenças autoimunes³⁶. Dessa forma, as características de *Eiger* e *Wengen* de *Drosophila melanogaster* despertam interesse e justificam a utilização desse organismo como modelo para o estudo dos mecanismos envolvendo o sistema imune inato^{15, 19, 16, 17, 14}

2 Objetivo Geral

- Validar um modelo alternativo, eficiente, rápido e econômico para o estudo do processo inflamatório sistêmico controlado por drogas antiinflamatórias.

2.1 Objetivos específicos

- Obter indivíduos de *Drosophila melanogaster* com superexpressão de Eiger tecido específica.
- Estabelecer uma linhagem com fenótipo visível característico da superexpressão de Eiger tecido específica.
- Obter indivíduos com superexpressão ubíqua de Eiger.
- Avaliar morfolologicamente e fisiologicamente o desenvolvimento dos indivíduos com superexpressão ubíqua de Eiger, do primeiro ao último estágio de vida.
- Obter indivíduos com o gene Eiger silenciado.
- Testar a ação de drogas antiinflamatórias quanto à reversão do fenótipo resultante da superexpressão de Eiger.

3 Metodologia

3.1 Material Biológico

As linhagens GMR-GAL4 e UAS-eiger foram gentilmente cedidas pelo Dr. Masayuki Miura da Universidade Global de Tóquio – JAPAN. As linhagens Yolk-Gal4 e da-Gal4 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jules Holfman da Universidade de Strasbourg – França e elav-GAL4 obtida no Centro de Estoque Bloomington da Universidade de Indiana.

Todas as linhagens foram mantidas em meio próprio para cultura de *Drosophila*, Fubá de milho (170g), sacarose (51,7g), Agar (15g), dextrose (103g), extrato de levedura (31g) e água (1845 mL).

3.2 Cruzamentos

Para a realização dos cruzamentos foram utilizados indivíduos adultos com idade entre um e sete dias sendo 10 fêmeas virgens (coletadas em no máximo 4 horas de eclosão e com mancha no abdômem) e 10 machos.. A seleção dos indivíduos foi feita com auxílio de um sistema de anestesia, composto por uma pedra porosa e uma mangueira que utiliza dióxido de carbono (CO₂) para o devido fim. Para as análises fenotípicas das gerações foram utilizadas amostras populacionais do total de indivíduos das proles.

Os indivíduos selecionados foram separados quanto ao gênero e colocados para o cruzamento sempre respeitando a proporção de 1:1 de machos e fêmeas em frascos plásticos com tampas porosas de algodão. Os frascos onde foram realizados os cruzamentos foram mantidos durante 24 horas, condicionados a temperatura constante de 25° C com ciclos de 12:12 claro/escuro.

3.3 Obtenção da prole

Após o cruzamento e oviposição (24 horas), os indivíduos parentais foram removidos de seus respectivos frascos permitindo o desenvolvimento dos embriões em larvas, pupas e indivíduos adultos. Assim, tivemos o controle para que não houvesse a mistura de indivíduos adultos com seus parentais.

3.4 Expressão de Eiger em tecido específico

Para obtenção dos indivíduos com superexpressão de Eiger em tecido específico foram utilizadas as linhagens de *D. melanogaster* referentes aos cruzamentos 1 a 4 da TABELA 1. O cruzamento 1 foi realizado para superexpressar Eiger no olho¹⁵, no corpo gorduroso de fêmeas adultas (Cruzamento 2), no cérebro (cruzamento 3) e de forma ubíqua (cruzamento 4).

Para obtenção de indivíduos com expressão reduzida de Eiger foram realizados cruzamentos entre as linhagens UAS-eiger-IR e da-GAL4 (Tabela 1: cruzamento 5) para efeito de *knock down* do gene Eiger de forma ubíqua.

Tabela 1. Cruzamento entre linhagens de *Drosophila melanogaster* para superexpressão de Eiger tecido específica e redução da expressão de Eiger.

Nº*	Linhagem (fêmea)	Linhagem (macho)	(Prole)	Local da expressão
1	GMR-GAL4	UAS-eiger	GMR-GAL4; UAS-eiger;	Olho
2	Yolk Gal4	UAS-eiger	UAS-eiger; Yolk-Gal 4	Corpo gorduroso**
3	GMR-GAL4; UAS eiger	elav-GAL4	elav-GAL4; UAS-eiger;	Cérebro
4	GMR-GAL4; UAS eiger	da-GAL4	GMR-GAL4; UAS eiger; da-GAL4	De forma ubíqua
5	UAS-eiger-IR	da-GAL4	UAS-eiger-IR; da-GAL4	m-RNA de eiger

*Nº: Número do cruzamento. ** Corpo gorduroso de fêmeas adultas

3.5 Obtenção de linhagem com superexpressão de Eiger

Os indivíduos obtidos na F1 resultante do cruzamento entre as linhagens GMR-GAL4 e UAS-eiger, que expressavam fenótipos característicos da superexpressão de Eiger (olhos reduzidos) foram selecionados, obedecendo-se os critérios de seleção de fêmeas virgens e proporções 1:1 machos e fêmeas.

A F1 foi então, intracruzada para aumentar a proporção de indivíduos. Os indivíduos obtidos na F2 foram analisados a fim de identificar a expressão ou ausência do fenótipo característico esperado.

Foi realizado o intracruzamento da geração F2 utilizando 10 casais, os mesmo foram isolados para o cruzamento em meio de cultura para *Drosophila*. As proles obtidas foram analisadas e separadas por sexo em diferentes frascos, até que todas as pupas se desenvolvessem em moscas. Os indivíduos originados dos cruzamentos em que 100% das proles apresentam o fenótipo de interesse foram selecionados e colocados em novo meio de cultura para cruzamentos e geração de uma linhagem com superexpressão de Eiger.

3.6 Biotestes

Os indivíduos pertencentes a F1 do cruzamento 4 com genótipo GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4 (Tabela 1) foram utilizados para realizações de testes *in vivo* quanto a possíveis alterações fenotípicas. As linhagens Canton S, UAS-eiger e da-GAL4 foram utilizadas como controle (Tabela 2). Os testes foram realizados à temperatura constante de 25°C e ciclos de 12:12 claro/escuro.

3.6.1 Ensaio de oviposição (fecundidade)

Dez fêmeas virgens e 10 machos de cada uma das linhagens controle (Canton S, UAS-eiger e da-GAL4) e 10 fêmeas virgens GMR-GAL4; UAS-eiger e 10 machos da-GAL4 para o tratamento (o embrião desse cruzamento terá superexpressão ubíqua de Eiger) foram utilizados em cruzamentos controlados para a contagem do número de embriões.

Os cruzamentos aconteceram entre casais, conforme descrição anterior^{39, 40, 41, 15}, entretanto, o experimento foi adaptado e realizado em placas de cultura celular contendo meio (60 g de Agar, 58 g de dextrose, 29 g de açúcar, 30 g de levedura, 50 g de fubá, 455 mL de suco de uva e 445 mL de água) e devidamente vedadas e aeradas (Figura 1).

Após 24 horas de cruzamento, os casais foram retirados dos poços com o auxílio de uma bomba à vácuo conforme demonstrado na figura 1.

Os machos de cada casal foram descartados. As fêmeas grávidas foram colocadas em uma nova placa contendo meio sendo trocadas de placa a cada 24 horas. Os ovos postos foram contados diariamente com a ajuda de uma lupa (Nikon SMZ 800), por um período de 10 dias conforme descrito anteriormente^{42; 43}.

3.6.2 Desenvolvimento em larva

Os ovos postos foram monitorados quanto à eclosão e o seu desenvolvimento em larva. Após a transferência das fêmeas e contagem dos ovos, as placas foram mantidas sob as condições experimentais por 48 horas, sendo realizada então, a contagem das larvas e dos ovos eclodidos. A contagem dos ovos eclodidos é uma certificação da viabilidade embrionária. A contagem de embriões eclodidos e larvas resultantes de todos os ovos postos por cada fêmea foi realizada durante os 10 dias de registro de oviposição.

3.6.3 Avaliação de motilidade larval

Foi realizado conforme descrito em outros estudos^{43; 44}, mas com adaptações.

Placas de petri contendo meio Agar corado com *Giemsa* (100 µL/mL de meio) foram utilizadas juntamente com pasta de levedura para pão contendo açúcar (Figura 2).

O teste foi realizado em triplicata para cada uma das linhagens (Tabela 2), utilizando-se em cada replicata 10 larvas no estágio larval 3.

Para cada teste, as 10 larvas foram colocadas, juntas na lateral da placa e na lateral oposta foi colocada uma pequena porção da pasta de levedura (Figura 2).



Figura 1: Sistema de captura das moscas. As placas foram adaptadas a esse sistema que consiste na junção de uma mangueira com ponteiros de 1000 micro Litros, que tiveram suas pontas cortadas, dispostas uma de cada lado da mangueira. Uma ponteira conectada a bomba faz sucção sendo a outra ponteira de captura que é separada da mangueira por uma tela para evitar que as moscas escapem.

Tabela 2. Linhagens de *Drosophila melanogaster* usadas em todos os biotestes e nos testes com drogas.

Cruzamento	Linhagem (fêmeas)	Linhagem (machos)	Linhagem (Prole)
Controle selvagem	Canton S	Canton S	Canton S
Controle parent 1	UAS-eiger	UAS-eiger	UAS-eiger
Controle parent 2	da- GAL4	da-GAL4	da- GAL4
Tratamento	GMR-GAL4; UAS-eiger	da-GAL4	GMR-GAL4; UAS eiger; da-GAL4

O movimento das larvas atraídas pelo alimento foi monitorado por uma câmera durante 10 minutos, numa sala, a 25°C sem a presença de pessoas ou outras possíveis influências de desvio do teste. Após as filmagens, os vídeos foram analisados com a ajuda de uma régua centralizada na imagem da placa, dessa forma foi contabilizado a cada minuto do vídeo o número de larvas que alcançaram ou ultrapassaram o meio da placa.



Figura 2. Sistema experimental para avaliação da motilidade larval. Placa de petri (55mm) contendo Agar e Giemsa. À direita: 10 larvas (L3) a caminho do alimento. À esquerda: pasta com água e fermento biológico e açúcar.

3.6.4 Desenvolvimento em pupa

Após as avaliações de oviposição e desenvolvimento dos ovos em larvas foi avaliado o desenvolvimento das larvas em pupas. Essa avaliação foi feita em triplicata para cada cruzamento mostrado na Tabela 2. Cada replicata foi feita em frascos contendo meio próprio para cultura de *Drosophila*. Inicialmente, uma amostra populacional de cada linhagem em teste, composta por 15 fêmeas virgens e 15 machos foi colocada em um frasco, contendo meio de cultura purê de batata (composto por 1.5 g de purê de batata instantâneo (Yoki) macerado e 6 mL de água e 0,2 gramas de fermento biológico seco). Foram montados 7 frascos para cada genótipo testado.

Os indivíduos foram mantidos em frascos durante 3 dias. Em seguida os frascos foram lavados com água destilada e o seu conteúdo foi transferido para uma placa de petri sobre um fundo escuro. Em seguida, e o mais rápido possível foi realizada a coleta das larvas com o auxílio de pincel (numeração 1); sendo adicionadas 30 larvas (L1) em frascos novos, contendo meio de fubá. Os frascos foram mantidos sob as condições supra citadas para os biotestes e a partir do 4º dia iniciou-se o registro do número de pupas. A contagem foi realizada diariamente, sempre no mesmo horário durante 4 dias, com auxílio de uma caneta para marcar as pupas contidas nas paredes dos frascos. Após a contagem das pupas, os indivíduos adultos desenvolvidos dos cruzamentos controles foram retirados diariamente e contados.

3.7 Teste com Drogas

Drogas anti-inflamatórias foram testadas para avaliar o seu possível efeito na superexpressão de *eiger*. Os indivíduos foram monitorados quanto às possíveis reversões fenotípicas. Indivíduos com genótipos GMR-GAL4; UAS-*eiger* (fenótipo olho reduzido) e GMR-GAL4; UAS *eiger*; da-GAL4 (fenótipo morte pupal) foram tratados com antiinflamatório esteroideal (dexametasona) e não estereoidal (ácido acetilsalicílico).

Para coleta de larvas, 15 fêmeas virgens e 15 machos foram colocados em frascos contendo meio de cultura purê de batata (composto por 0,75 g de purê de batata (Yoki) macerado e 5 mL de água). Após o cruzamento por 24 horas, os adultos foram retirados. Após dois dias os vials foram lavados com água e o seu

conteúdo foi transferido para uma placa de petri sobre um fundo escuro. Em seguida foi realizada a coleta das larvas com o auxílio de pincel (numeração 1).

Para tratamento, dez larvas foram adicionadas a cada *vial* contendo meio próprio para cultura de *Drosophila* e medicamentos anti-inflamatórios em diferentes concentrações. O experimento foi realizado em triplicata (3 frascos) para cada concentração das drogas (Tabela 3).

Tabela 3. Teste com drogas antiinflamatórias em indivíduos com superexpressão de eiger.

DROGAS	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)				
	0,5	0.05	0.005	-	-
DEXAMETASONA	0,5	0.05	0.005	-	-
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	0,116	0,058	0,029	0,0145	724x10 ⁻³

Drogas ingeridas pelas larvas de *Drosophila melanogaster* (GMR-GAL4; UAS-eiger), (GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4) e (Canton S).

4 RESULTADOS

4.1 Superexpressão de Eiger em tecido específico

4.1.1 Olhos

Foram analisados 285 indivíduos obtidos na F1, resultantes do cruzamento entre as linhagens parentais GMR-GAL4 e UAS-eiger (Tabela 1: cruzamento 1) e (Figura 3). A prole apresentou 165 fêmeas e 120 machos com olhos, asas e pernas normais. Além disso, a motilidade em andar e voar também se mantiveram íntegras. Seguindo a proporção mendeliana, toda a prole F1 apresentou-se heterozigota (Figura 3).

A partir do intercruzamento da F1 e obtenção da F2, ficou comprovada a capacidade reprodutiva da geração F1, resultado que soma às outras características normais da primeira geração. Foram analisados 115 indivíduos da geração F2 composta por 62 fêmeas e 53 machos, desses, 21 indivíduos (18,26%) apresentaram olhos reduzidos, característicos da superexpressão de Eiger (Figura 4 A) sendo 15 fêmeas e 6 machos, o que segue a previsão genotípica feita para o cruzamento (Tabela 4). Observou-se ainda que o fenótipo de olho reduzido está presente em condições de homozigose ou heterozigose para GMR-GAL4, mas somente em homozigose para UAS-eiger, ou seja, a superexpressão do gene Eiger sob o comando do driver GMR-GAL4 em fenótipo visível, depende de uma condição de homozigose (Figura 5 A e B).

O cruzamento entre a F2 resultou em 224 indivíduos sendo 132 com olhos reduzidos e 92 com olhos normais. Para o estabelecimento de uma linhagem de olho reduzido 10 casais foram formados de indivíduos virgens de olho reduzidos. Dos 10 casais testados, o casal 5 produziu 28 indivíduos somente com olho reduzidos e o casal 10 com 33 indivíduos, todos com olhos reduzidos. O padrão genotípico e fenotípico para os casais que produziram 100% da prole com olhos reduzidos, bem como os casais que produziram indivíduos com olhos normais podem ser visualizados na Figura 5 A e B, respectivamente.

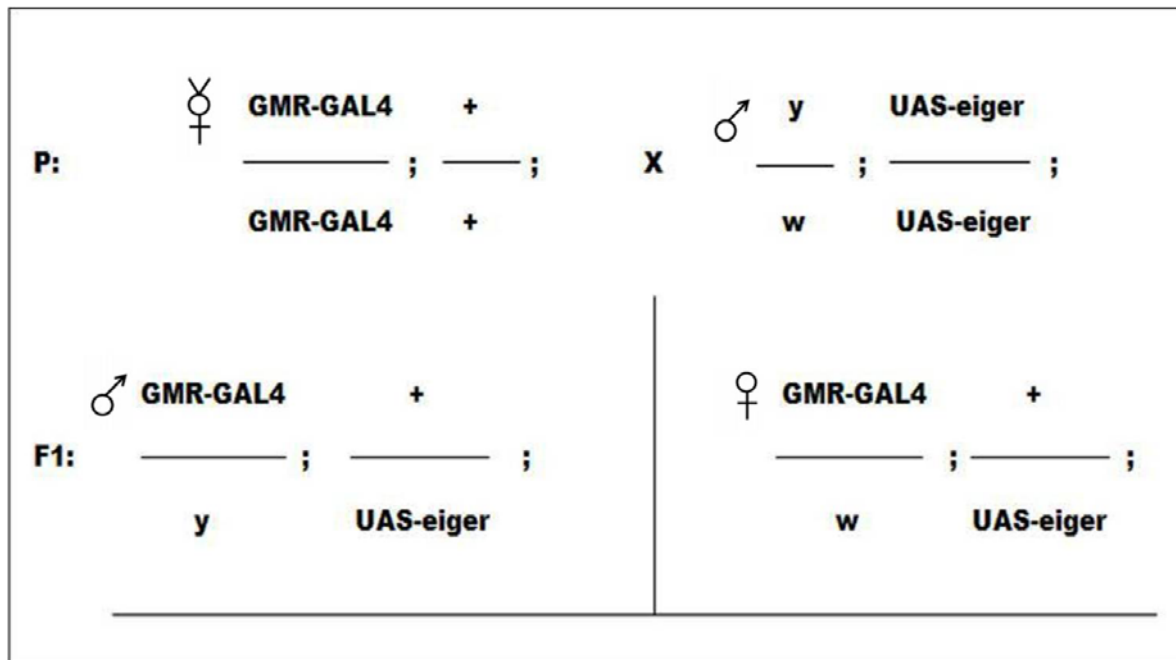


Figura 3: Cruzamento entre fêmeas virgens GMR-GAL4 e machos UAS-eiger resultando em prole (F1) duplo heterozigota.

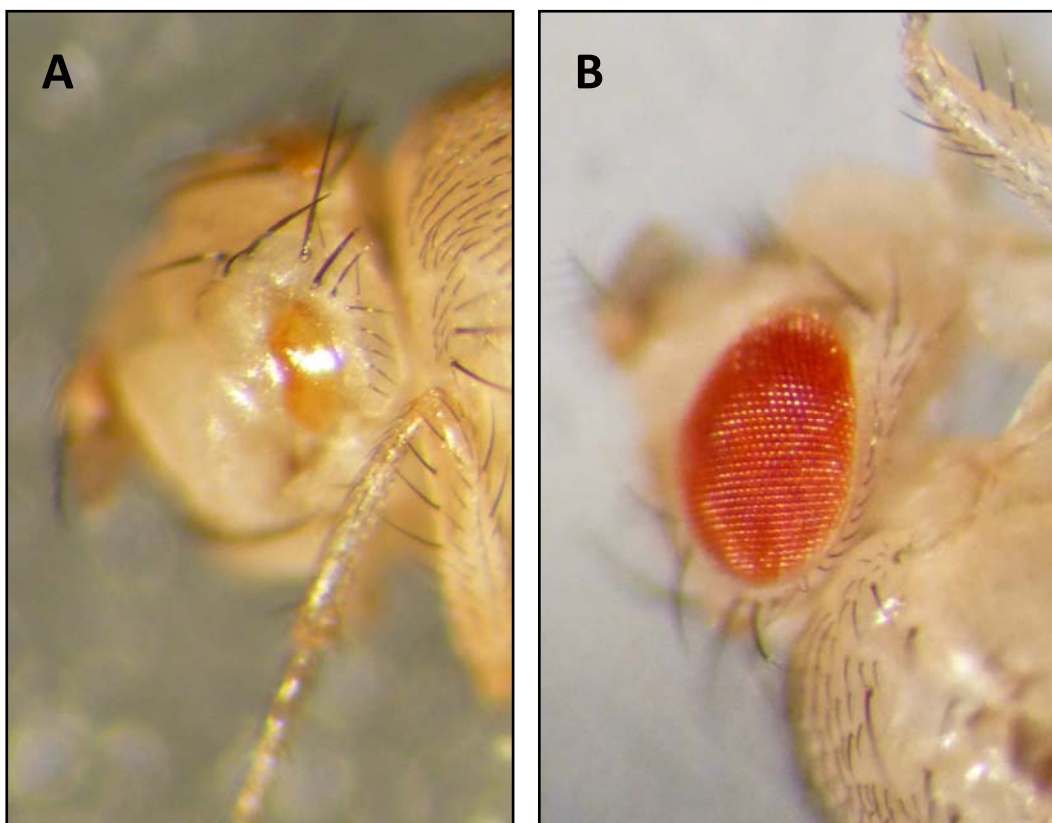


Figura 4: Padrão fenotípico de olhos reduzidos e normais. Em A esta representando um indivíduo com olho reduzido. Em B, um indivíduo com o olho normal.

Tabela 4. Obtenção de indivíduos com superexpressão de eiger no olho.

F1xF1	♀		♂	
	GMR-GAL4 / w ; + / eiger		X GMR- GAL4 / y ; + / eiger	
	GMR-GAL4	/	GMR-GAL4 ; +	/ +
	GMR-GAL4	/	GMR-GAL4 ; +	/ eiger
	GMR-GAL4	/	GMR-GAL4 ; eiger	/ +
	GMR-GAL4	/	GMR-GAL4 ; eiger	/ eiger
	♀ Olho reduzido			
	GMR-GAL4	/	Y ; +	/ +
	GMR-GAL4	/	Y ; +	/ eiger
	GMR-GAL4	/	Y ; eiger	/ +
	GMR-GAL4	/	Y ; eiger	/ eiger
	♂ Olho reduzido			
F2	w	/	GMR-GAL4 ; +	/ +
	w	/	GMR-GAL4 ; +	/ eiger
	w	/	GMR-GAL4 ; eiger	/ +
	w	/	GMR-GAL4 ; eiger	/ eiger
	♀ Olho reduzido			
	w	/	w ; +	/ +
	w	/	w ; +	/ eiger
	w	/	w ; eiger	/ +
	w	/	w ; eiger	/ eiger

PARENTAIS F2 x F2		F3	
A			
$\frac{\text{GMR-GAL4}}{y} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \times$	$\frac{\text{GMR-GAL4}}{\text{GMR-GAL4}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} =$	$\frac{y}{\text{GMR-GAL4}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \quad \text{♂ Olho reduzido}$	
		$\frac{\text{GMR-GAL4}}{\text{GMR-GAL4}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \quad \text{♀ Olho reduzido}$	

Figura 5 A. Geração F2 com olhos reduzidos e o seu cruzamento sendo a fêmea homozigota. Genótipo e fenótipo de F3.

PARENTAIS F2 x F2		F3	
<p style="text-align: center;">B</p> $\frac{\text{GMR-GAL4}}{\text{Y}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \times \frac{\text{w}}{\text{GMR-GAL4}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}}$		$\frac{\text{GMR-GAL4}}{\text{GMR-GAL4}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \quad \text{♀}$	Olho reduzido
		$\frac{\text{y}}{\text{GMR-GAL4}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \quad \text{♂}$	Olho reduzido
		$\frac{\text{w}}{\text{GMR-GAL4}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \quad \text{♀}$	Olho reduzido
		$\frac{\text{w}}{\text{y}} ; \frac{\text{eiger}}{\text{eiger}} \quad \text{♂}$	Olho normal

Figura 5 B. Geração F2 com olhos reduzidos, fêmea heterozigota. Genótipo e fenótipo de F3.

4.1.2 Corpo gorduroso de fêmeas adultas

O cruzamento entre as linhagens *yolk-GAL4* e *UAS-eiger* (Tabela 1: cruzamento 2) e (Figura 6) resultou em 117 indivíduos sendo 57 machos e 60 fêmeas. Os indivíduos F1 foram duplo heterozigotos. Entretanto, nenhum dos indivíduos apresentaram alterações morfológicas ou fisiológicas visíveis. O cruzamento entre a geração F1 (Tabela 5) resultou em 99 indivíduos, 41 machos e 58 fêmeas.

Incluindo machos e fêmeas 44,4% da prole (F2) herdaram o *driver* e o *responder*, no entanto, somente nas fêmeas adultas, a superexpressão de *Eiger* foi ativada. Deste total somente 22,2% das fêmeas foram homozigotas para *Eiger*. Entretanto, todos os indivíduos apresentaram morfologia externa e comportamento normais.

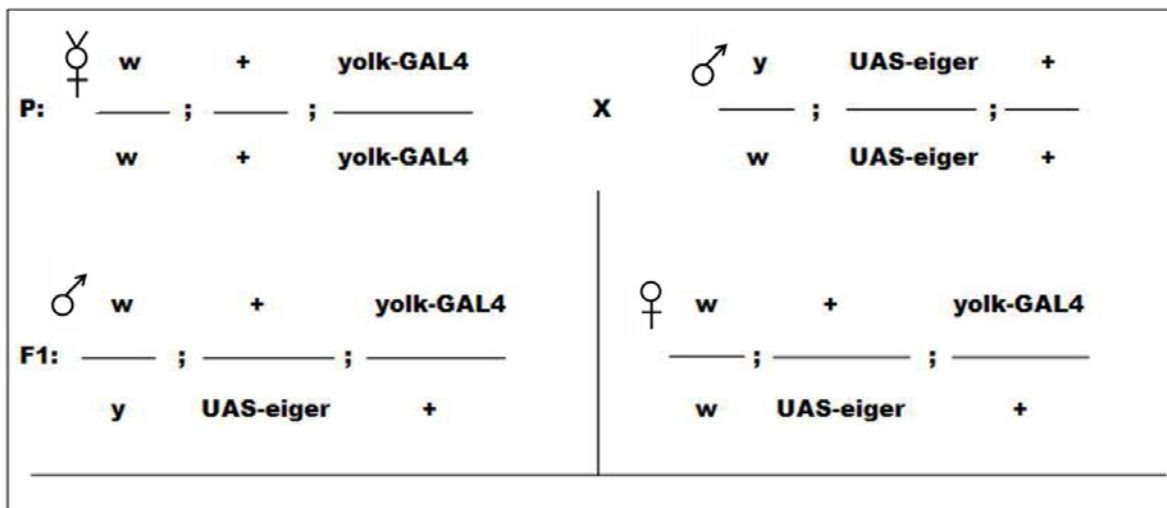




Figura 6. Cruzamento entre fêmeas virgens *yolk-GAL4* (driver) e machos *UAS-eiger* (responder) e genótipo da F1 duplo heterozigota.

4.1.3 Cérebro

O cruzamento entre as linhagens *elav-GAL4* e *GMR-GAL4*; *UAS-eiger* (Tabela 1: cruzamento 3) e (Figura 7) resultou em 119 indivíduos sendo 52

machos e 67 fêmeas. Seguindo proporções mendelianas, todos os indivíduos da geração F1 herdaram as construções gênicas *driver* e *responder* em heterozigose. Entretanto, nenhum dos indivíduos apresentaram alterações morfológicas, fisiológicas ou comportamentais visíveis.

Tabela 5. Previsão genotípica da prole resultante do cruzamento entre a geração F1 (descendente de UAS-eiger e *yolk-GAL4*).

F1xF1		
	w / w ; + / eiger ; yolk-GAL4 / +	X w / y ; + / eiger ; yolk-GAL4 / +
F2	w / w ; eiger / eiger ; yolk-GAL4 / yolk-GAL4	
	w / w ; + / eiger ; yolk-GAL4 / yolk-GAL4	
	w / w ; + / + ; yolk-GAL4 / yolk-GAL4	
	w / y ; eiger / eiger ; yolk-GAL4 / yolk-GAL4	
	w / y ; + / eiger ; yolk-GAL4 / yolk-GAL4	
	w / y ; + / + ; yolk-GAL4 / yolk-GAL4	
	w / w ; eiger / eiger ; + / yolk-GAL4	
	w / w ; + / eiger ; + / yolk-GAL4	
	w / w ; + / + ; + / yolk-GAL4	
	w / y ; eiger / eiger ; + / yolk-GAL4	
	w / y ; + / eiger ; + / yolk-GAL4	
	w / y ; + / + ; + / yolk-GAL4	
	w / w ; eiger / eiger ; + / +	
	w / w ; + / eiger ; + / +	
	w / w ; + / + ; + / +	
	w / y ; eiger / eiger ; + / +	
	w / y ; + / eiger ; + / +	
	w / y ; + / + ; + / +	

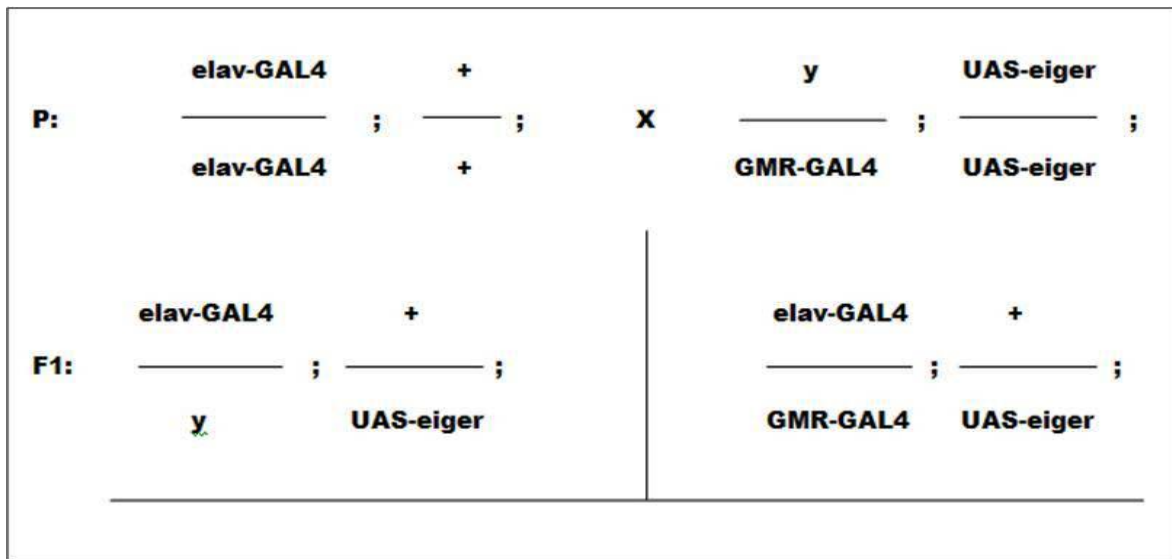


Figura 7. Cruzamento entre fêmeas virgens elav-GAL4 (driver) e machos GMR-GAL4; UAS-eiger (responder) e genótipo da F1 duplo heterozigota.

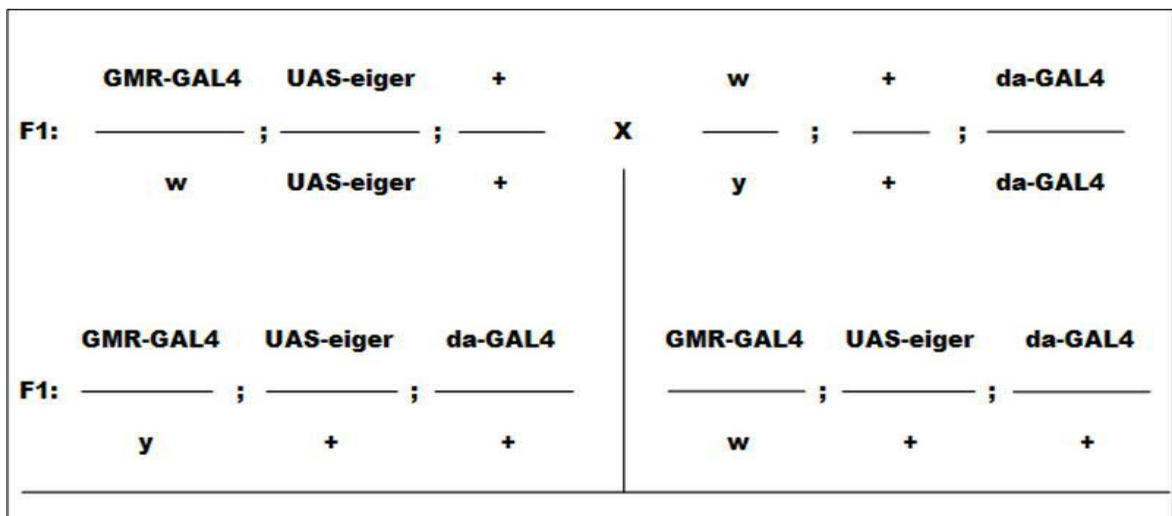


Figura 8: Cruzamento entre fêmeas virgens GMR-GAL4; eiger; (responder) e machos da-GAL4 (driver). Genótipo da F1 duplo heterozigoto

4.1.4 Expressão ubíqua durante o desenvolvimento

O cruzamento entre as linhagens GMR-GAL4; UAS-eiger e da-GAL4 não resultou em nenhum indivíduo adulto, pois os descendentes deste cruzamento não se desenvolveram além do estágio de pupa. Alguns testes *in vivo* foram feitos para analisar algumas características fenotípicas de indivíduos com esse genótipo.

4.2 Biotestes

4.2.1 Oviposição

A oviposição foi o primeiro bioteste realizado entre as linhagens de *Drosophila melanogaster* (Tabela 2) e (Figura 9 B). O número de ovos postos pelas 10 fêmeas de cada linhagem durante os 10 dias de observação revelou que não há uma diferença estatística significativa entre as oviposições dos controles e o tratamento (teste Tukey, $P > 0,05$) (Figura 10).



Figura 9. Poço de placa contendo a prole de um casal de *Drosophila melanogaster* (A). Ovos botados diariamente (B). Larvas no 2º estágio (C).

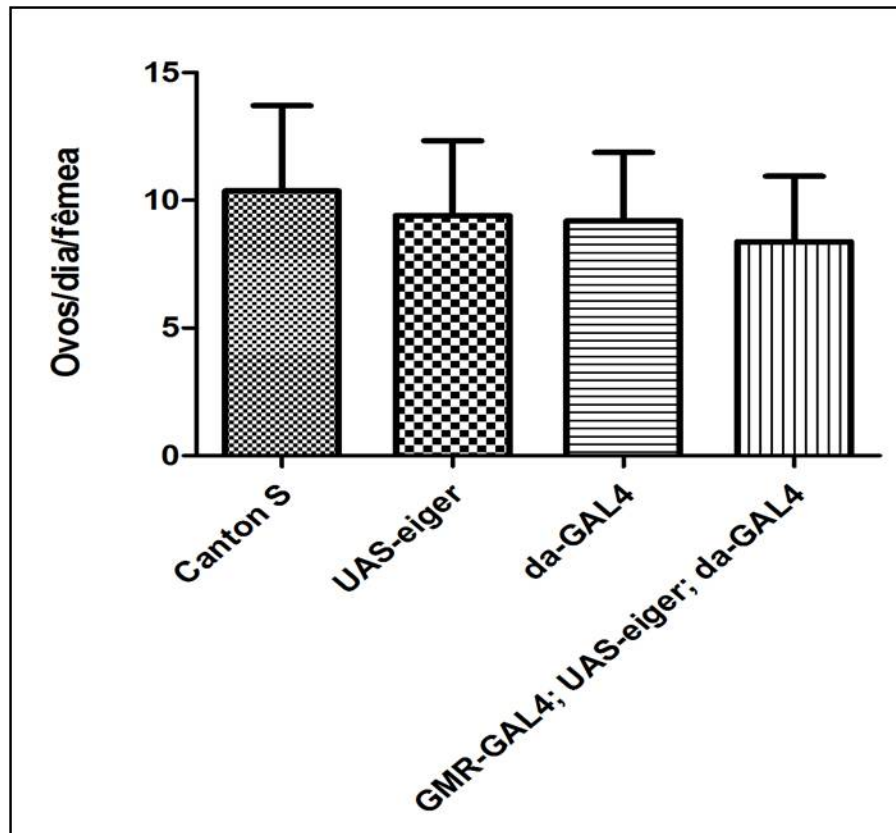


Figura 10. Média de oviposição diária por fêmea das linhagens selvagem (Canton S), parentais (da-GAL4 e UAS-eiger e com expressão ubíqua de eiger (GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4). Diferenças não significativas (teste Tukey, $P > 0.05$).

4.2.2 Desenvolvimento de ovos em larvas

O desenvolvimento dos ovos em larvas (Figuras 9 C) foi analisado através de porcentagem de larvas eclodidas em relação ao número de ovos (Figura 11).

A diferença entre os percentuais de desenvolvimento de ovos em larvas encontrados para as linhagens controle (Canton S e UAS-eiger) e para os indivíduos GMR-GAL4; eiger; da-GAL4 foi significativa (teste Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Entretanto, a diferença entre a linhagem controle da-GAL4 e os indivíduos GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4 não foi significativa (teste Kruskal-Wallis $P > 0,05$).

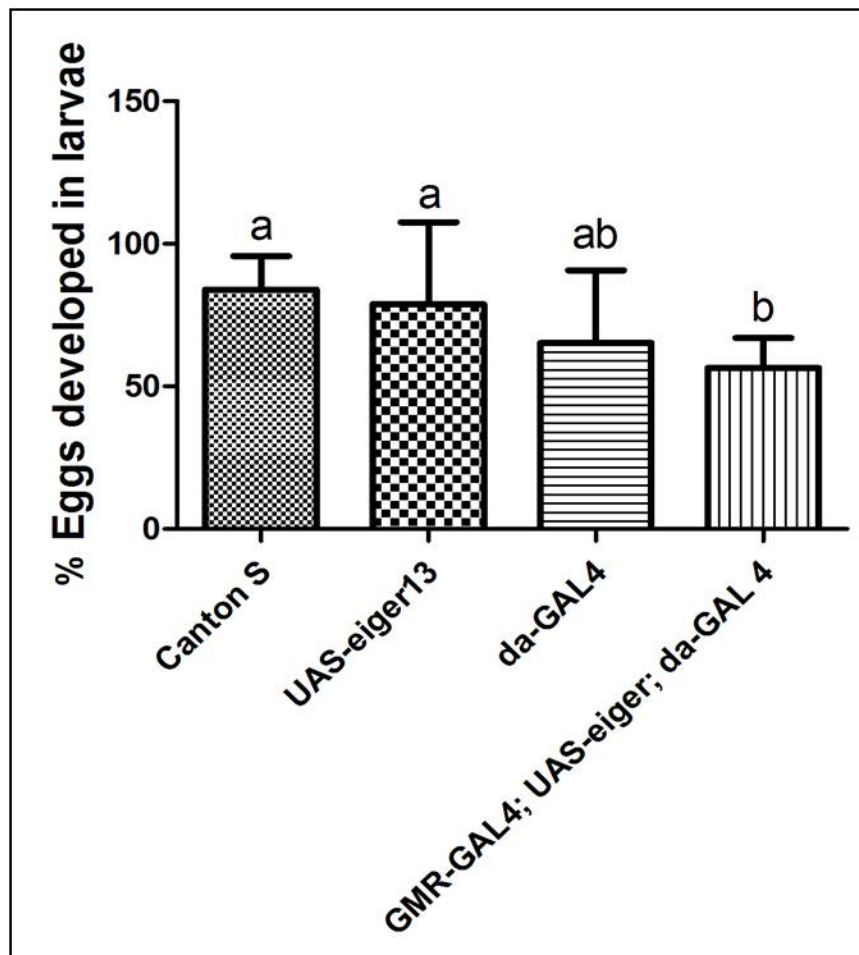


Figura 11. Percentual de ovos desenvolvidos em larvas para cada uma das linhagens em teste: selvagem (Canton S), parentais (da-GAL4 e

UAS-eiger) e com supexpressão ubíqua de eiger (UAS-eiger; da-GAL4). Diferença significativa entre os controles (Canton S e UAS-eiger) e os indivíduos UAS-eiger; da-GAL4 e não significativa entre controle parental (da-GAL4) e o tratamento. (teste Kruskal-Wallis $P < 0.05$).

4.2.3 Motilidade larval

Esta análise revelou uma discrepância de motilidade entre os indivíduos testados e as linhagens controle, estatisticamente significativa (teste Tukey, $P < 0,01$) (Figura 12). Já no primeiro minuto de experimentação, foi possível observar que as linhagens controles foram mais rápidas do que a linhagem com superexpressão ubíqua de Eiger. Diferente das linhagens controle, as larvas GMR-GAL4; eiger; da-GAL4 não alcançaram a marca do percurso no primeiro minuto, se mantiveram atrás das demais linhagens em todo o experimento.

Durante toda a experimentação, as linhagens controle se mantiveram direcionadas e mais rápidas rumo ao alimento no outro lado da placa, resultando em diferenças de motilidade estatisticamente não significativas entre as mesmas (teste de Tukey, $p > 0.01$).

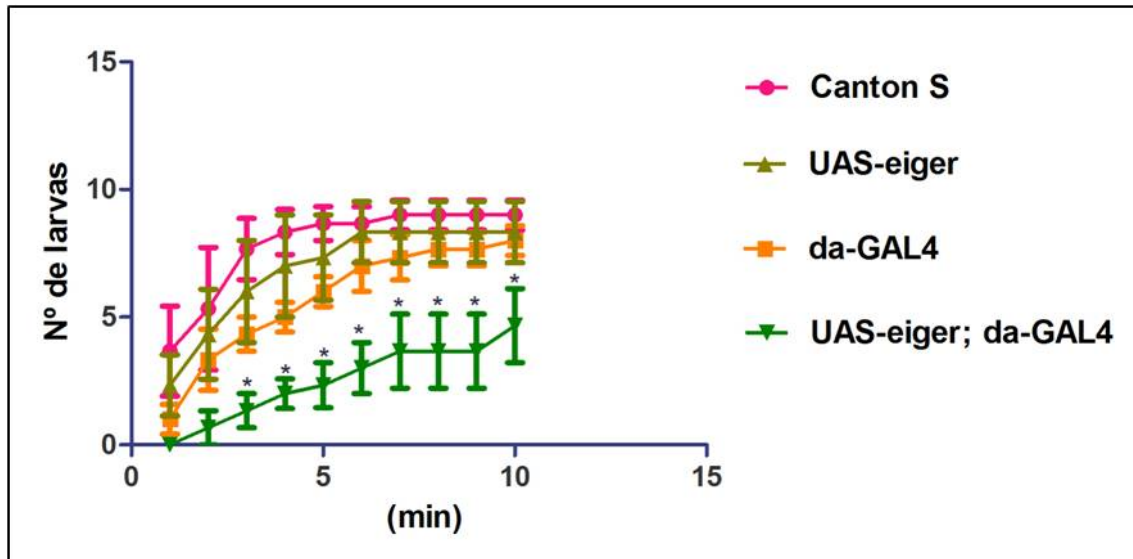


Figura 12. Larvas no 3º estágio, avaliadas quanto à motilidade. Número de larvas que alcançaram metade do percurso em determinado tempo. Linhagens controle: Canton S, UAS-eiger e da-GAL4 e larvas com genótipo para superexpressão ubíqua de eiger: GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4. Diferença de motilidade estatisticamente significativa (teste Tukey, $P < 0.01$).

4.2.4 Desenvolvimento de larvas em pupas

A avaliação deste estágio de desenvolvimento entre as linhagens controle (selvagem e parentais) e o tratamento (superexpressão ubíqua de Eiger) revelou diferença estatística significativa (teste Tukey, $P < 0.05$) (Figura 13).

Não houve diferença significativa entre as médias de desenvolvimento em pupa entre as linhagens controle Canton S e UAS-eiger (teste Tukey, $P < 0.05$). Entretanto, houve diferença significativa entre as linhagens Canton S e da-GAL4 (teste Tukey, $P < 0.05$). Entre as linhagens controle parentais (UAS-eiger e da-GAL4) não houve diferença estatística significativa (teste Tukey, $P > 0.05$).

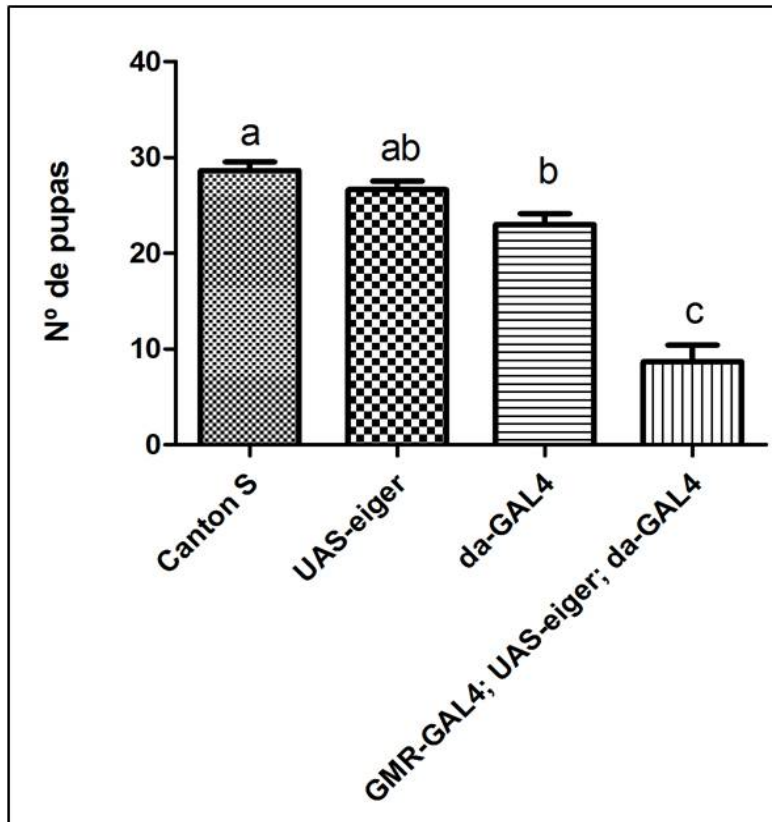


Figura 13. Média de larvas desenvolvidas em pupas para cada uma das linhagens em teste: selvagem (Canton S), parentais (da-GAL4 e UAS-eiger) e com expressão ubíqua de eiger (GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4). Diferença significativa na razão larva/pupa entre os controles e GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4 (teste Tukey, $P < 0.05$).



Figura 14. Pupas de *Drosophila melanogaster*. Prole com genótipo (GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4) para superexpressão ubíqua de eiger. Seta aponta algumas pupas secas e escurecidas sem haver a eclosão de adultos.

4.2.5 Desenvolvimento em moscas recém-emergidas.

As pupas provenientes do bioteste anterior (desenvolvimento de larvas em pupas) foram analisadas para a avaliação de eclosão em moscas adultas (figura 15).

Em relação aos indivíduos com o genótipo GMR-GAL4; eiger; da-GAL4 com superexpressão ubíqua de Eiger; não foi registrado nenhum indivíduo recém-emergido (Figura 15b), ou seja, para esta linhagem, o estágio de pupa é o último estágio de desenvolvimento, pois as mesmas escureceram e secaram após 7 dias de observação, caracterizando a morte das mesmas (Figura 14 e Figura 16). O desenvolvimento de pupas em moscas recém-emergidas foi estatisticamente diferente entre as linhagens controle e o tratamento (teste Tukey, $P < 0.05$).

A linhagem Canton S apresentou a maior taxa de eclosão de pupas dentre as linhagens controle, seguida de UAS-eiger e da-GAL4, contudo, a diferença entre elas e não foi estatisticamente significativa (teste Tukey, $P > 0.05$).

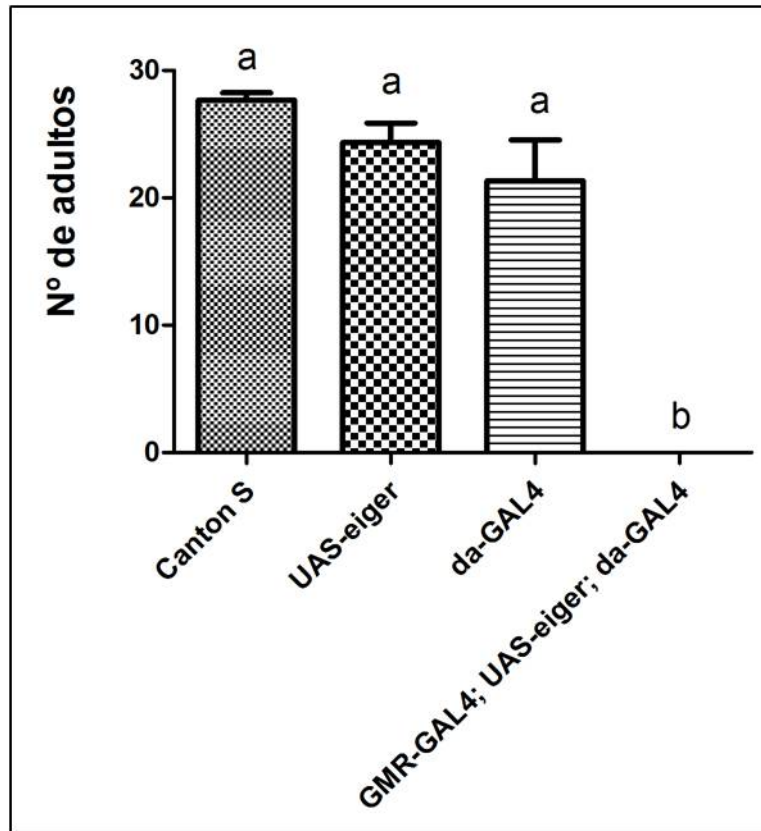


Figura 15. Desenvolvimento de pupas em moscas recém-emergidas. Linhagens controle: Canton S (selvagem), UAS-eiger e da-GAL4 (parentais) e linhagem tratamento: GMR-GAL4; eiger; da-GAL4. (teste Tukey, $P < 0.05$).

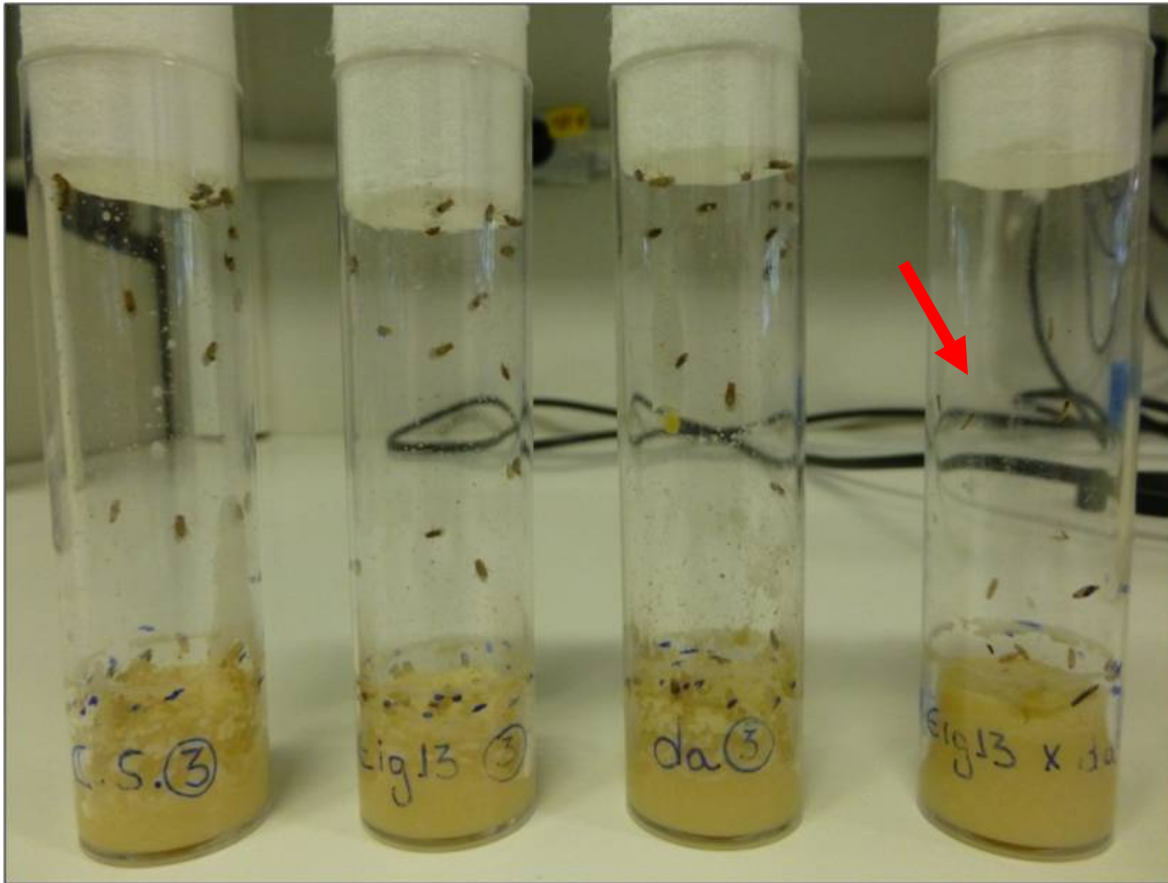


Figura 16. Indivíduos adultos após sete dias do surgimento de pupas. Ausência de indivíduos adultos em GMR-GAL4; UAS-eiger x da-GAL4 (indicado pela seta).

4.3 Teste com Drogas

Todos os tratamentos com diferentes concentrações de dexametasona resultaram em indivíduos sem reversões fenotípicas. Todos os indivíduos adultos da linhagem GMR-GAL4; UAS-eiger apresentaram olhos reduzidos (figura 4 A) e nenhuma das pupas resultantes do cruzamento, cuja prole apresenta superexpressão ubíqua de Eiger (GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4) eclodiram em indivíduos adultos. Quanto à linhagem controle (Canton S) todos os indivíduos adultos apresentaram características fenotípicas normais.

Em relação ao teste com antiinflamatório não esteroide (ácido acetilsalicílico), também, não foi observada reversão fenotípica.

4.4 Viabilidade após *Knock down* ubíquo de Eiger

A prole resultante do cruzamento entre a linhagem cujo genótipo codifica o RNA *hairpin* para Eiger (UAS-eiger-IR) e a linhagem que dirige a expressão ubíqua (da-GAL4) (Figura 17) apresentou 81 indivíduos sendo 43 fêmeas e 38 machos. Esses indivíduos não apresentaram alterações morfológicas visíveis.

P:	w	UAS-eiger-IR	+	X	y	+	da-GAL4
	_____	_____	_____		_____	_____	_____
	w	UAS-eiger-IR	+		w	+	da-GAL4
	_____	_____	_____		_____	_____	_____
F1:	w	UAS-eiger-IR	+		w	UAS-eiger-IR	+
	_____	_____	_____		_____	_____	_____
	y	+	da-GAL4		w	+	da-GAL4
	_____	_____	_____		_____	_____	_____

Figura 17. Cruzamento entre fêmeas virgens da-GAL4 (driver) e machos UAS-eiger-IR (responder *knock down* para eiger) e genótipo da F1 duplo heterozigota.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho buscou-se o estabelecimento de um modelo de doença inflamatória sistêmica em *Drosophila melanogaster* com fenótipo visível e bem definido. Os *drivers* para corpo gorduroso de fêmeas adultas para o cérebro e para direcionamento ubíquo juntamente com o *responder*, que superexpressa *eiger* podem gerar uma prole afetada, devido a um quadro inflamatório sistêmico, uma vez que tecidos de suma importância para os indivíduos são alvos. Esse inseto permite a triagem rápida de possíveis novos fármacos.

Um estudo realizado anteriormente utilizou o sistema GAL4/UAS para direcionar a superexpressão de *Eiger* para os olhos, o que resultou em lesão tecidual e comprometimento do órgão¹⁵. O mesmo resultado foi obtido no presente estudo, após cruzamentos consecutivos entre as gerações, mais especificamente, a partir da F2 homozigota (tabela 4). No entanto, não foram observadas nenhuma alteração em indivíduos em que o direcionamento da superexpressão de *Eiger* foi para os tecidos do corpo gorduroso de fêmeas adultas e cérebro. Provavelmente estes resultados se devam ao local para onde foi direcionada a superexpressão tecido específica, ou seja, órgãos internos, como os olhos, cérebro e gônadas que em mamíferos, geralmente envolvidos em mecanismos de imunoprivilégio^{45; 46; 47; 48}, além de exigirem a aplicação de métodos de detecção mais detalhados e invasivos, como dissecação.

Outra explicação possível para a falta de alterações fenotípicas evidentes nos indivíduos com *driver* para o cérebro é a quantidade de expressão, os homozigotos contêm o dobro de cópias do gene dos heterozigotos (portanto produzem maior nível de proteínas), uma vez que os indivíduos F1 avaliados foram todos duplo heterozigotos (*driver* e *responder*). Esse fenômeno foi observado também no ensaio de superexpressão de *Eiger* nos olhos. A diferença de expressão gênica entre heterozigoto e homozigoto pode ser decisiva para um alcance de superexpressão detectável por métodos menos laboriosos como o exame visual utilizado neste estudo.

No caso dos indivíduos com direcionamento de superexpressão de *Eiger* para o corpo gorduroso de fêmeas adultas, alguns indivíduos homozigotos para

o constructo Eiger foram obtidos através de cruzamento entre a F1 (tabela 5). No entanto, não foi possível observar alteração morfológica visível. Sendo assim, o direcionamento da superexpressão de Eiger para tecido específico se mostra como a uma explicação mais eficiente do que a quantidade de expressão, neste caso. O *driver* *yolk-GAL4*, proveniente de um gene que expressa o precursor de vitelogenina ⁴⁹ promove a expressão do *responder* (Eiger) de forma restrita a um tecido que não afeta os indivíduos acometidos de forma severa.

A partir da obtenção dos indivíduos com olhos reduzidos (figura 5 A e B) e estabelecimento de uma linhagem com essa característica, os mesmos foram utilizados como os parentais portadores do *responder* UAS-eiger nos cruzamentos subsequentes (tabela 1), (figura 7) e (figura 8) por reportarem o funcionamento do sistema GAL4/UAS devido a presença de um fenótipo visível característica fundamental nos estudos sobre expressão gênica, utilizando o sistema GAL4/UAS em cruzamentos de *Drosophila melanogaster* ⁵⁰.

A superexpressão ubíqua de Eiger em heterozigose foi capaz de promover alteração fenotípica visível mostrando que esse tipo de driver difere de todos os outros apresentados pelas proles resultante dos cruzamentos anteriores. O direcionamento tecidual também deve ser considerado, uma vez que o *driver* utilizado dirige a expressão do *responder* para vários tecidos do organismo, a saber: discos imaginais das asas e olhos, cordão nervoso ventral, músculos, ovários, glândulas salivares, antenas, pernas, halteres e um conjunto de células do sistema nervoso central ^{51 52; 53; 54}.

Provavelmente, as influências do direcionamento da expressão e a quantidade de expressão (heterozigose) também se aplicam ao resultado obtido para redução da expressão de Eiger por *knock down* em prole resultante do cruzamento entre as linhagens da-GAL4 e UAS-eigerIR (tabela 1) e (figura 17). Apesar de diminuir significativamente os níveis de expressão de Eiger ¹⁵ de forma ubíqua, alterações morfológicas visíveis não foram encontradas. A geração de prole homozigota para o aumento dos níveis de RNA-*hairpin* contra Eiger será, ainda, avaliada.

As análises subseqüentes com a prole para superexpressão ubíqua de Eiger (GMR-GAL4/+; UAS-eiger/+; da-GAL4/+) foram conduzidas explorando características relacionadas aos estágios de desenvolvimento dos indivíduos do início ao fim e também, características fisiológicas.

O primeiro bioteste realizado entre as linhagens de *Drosophila melanogaster* (Tabela 2) e (Figura 9 B) apresentou oviposições com diferenças estatísticas não significativas entre as linhagens controle e tratamento, o que sugere a não influência dos constructos (GAL4/UAS) sobre o processo. Resultado obtido em estudo anterior também apresentou padrões semelhantes para oviposição resultante de cruzamentos entre linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster* portando o sistema GAL4/UAS⁵⁵.

A característica de um desenvolvimento embrionário externo^{22; 56; 57 58; 59; 60; 61} provavelmente seja a explicação para a indiferença entre as oviposições, principalmente entre tratamento e controles; provavelmente não houve ativação de expressão gênica do sistema *driver-responder* (da-GAL4-UAS-eiger) que resultasse em superprodução ubíqua de Eiger que leva à apoptose celular^{15; 62;26}; a ponto de lesionar tecidos pré-embrionários inviabilizando a oviposição dos indivíduos (GMR-GAL4/+; UAS-eiger/+; da-GAL4/+). Além das condições padronizadas de experimentação em que foram realizados os biotestes como alimentação, temperatura, controle de luminosidade que provavelmente mantiveram a vitelogênese e retenção dos ovos no corpo, condições essas importantes para manutenção dos ciclos circadianos^{58; 59; 60}.

O segundo bioteste, seguindo nas fases de desenvolvimento de *D. melanogaster* avaliou o desenvolvimento larval, que resultou em diferenças significativas entre o tratamento e os controles (figura 11); provavelmente devido a superexpressão de Eiger dirigida para os tecidos embrionários dos indivíduos de genótipo GMR-GAL4/+; UAS-eiger/+; da-GAL4/+. Eiger foi identificado em estudos anteriores como gene ortólogo do Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa) de mamíferos^{15; 62 63; 64; 65; 66}. Caracterizado como uma citocina inflamatória independente de caspase, Eiger age em *D. melanogaster* induzindo apoptose através da via de controle do ciclo celular dependente de

Kinases (JNK) ^{15; 64}. Na presença de danos tissulares pode representar um sinal perigoso agindo como promotor tumoral, estimulando a migração celular invasiva e retardando o início da metamorfose ⁶³. Pode agir também mediante um efeito propagativo de apoptose ou seja, induz a morte de células localizadas em compartimentos vizinhos ⁶⁴.

No presente estudo, o gene *Eiger* foi superexpresso, através do sistema (da-GAL4-UAS-eiger), nos tecidos e fases do desenvolvimento em que outro gene, o gene *daughterless* “da”, é expresso naturalmente. Altos níveis de expressão de “da” são detectados durante as primeiras e últimas fases do desenvolvimento embrionário, atingindo células germinativas e nutridoras ^{53; 67}. Outros estudos também detectaram altos níveis de expressão de da em estruturas embrionárias precursoras do Sistema Nervoso Central (SNC) e os músculos dos indivíduos ^{51; 31}. Uma ação massiva de *Eiger* e de forma ubíqua sobre os indivíduos do genótipo GMR-GAL4/+; UAS-eiger/+; da-GAL4/+, através de uma super-ativação do sistema imune pode levar alguns indivíduos à morte, explicando assim diminuição significativa de eclosão de larvas.

Entretanto a diferença só foi significativa (teste Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) entre expressão ubíqua de *eiger* e os controles selvagem (Canton S) e parental (UAS-eiger), o que reforça a existência de um estado de silenciamento transcricional do responder na ausência de GAL4, conforme observado em estudos anteriores ²¹.

Esse resultado também sugere a existência de fator que diferencia os controles entre si, pois apesar de não haver diferença estatística significativa entre os mesmos, a linhagem controle parental da-GAL4 (figura 11) também não apresentou diferença significativa com animais GMR-GAL4; UAS-eiger; da-GAL4. Estudos pioneiros sobre o sistema de ativação GAL4/UAS em *D. melanogaster* não indicavam haver efeitos fenotípicos deletérios pela expressão de GAL4 nesta espécie ^{21; 68; 37}. No entanto estudos posteriores reportaram anomalias no desenvolvimento provocado pela expressão de GAL4 ^{69; 70}. Deste modo, expressão ubíqua da proteína GAL4 na linhagem parental (da-GAL4) provavelmente promove diminuição do *fitness* desses indivíduos.

As larvas no estágio 3 de desenvolvimento foram avaliadas quanto à motilidade (figura 2), e a expressão ubíqua de Eiger promove diminuição significativa nesse fenótipo. Provavelmente devido a superexpressão de Eiger nos tecidos precursores do sistema neuromuscular, principalmente durante o estágio embrionário, conforme discutido anteriormente e durante as últimas fases do estágio larval 3, uma vez que resultados de outros estudos apontam para níveis de expressão de “da” (cujo promotor dá início à ativação do sistema da-GAL4/UAS-eiger) de moderados a moderadamente altos durante essa fase do desenvolvimento ⁷¹. Uma ação inflamatória severa durante a formação desses tecidos pode ter acarretado em lesões irreversíveis, que prejudicaram o sistema motor das larvas (GMR-GAL4/+; UAS-eiger/+; da-GAL4/+).

Outros estudos mais recentes mostraram resultados em que larvas de *D. melanogaster* apresentaram deficiência no comportamento locomotor e redução do tempo de vida por desequilíbrio bioquímico em motoneurônios ⁷². Mostraram ainda, a importância da normalidade funcional do sistema imune nessas células nervosas motoras através dos níveis de expressão de Eiger e seu receptor, Wengen ⁷³. Sobretudo, análises posteriores como dissecação seguida por imunomarcação e microscopia seriam necessárias para melhor investigar e caracterizar os possíveis efeitos desse processo inflamatório sistêmico.

Estudos comprovam a importância e essencialidade dos sistemas neural, hormonal e imune para o desenvolvimento pupal de *Drosophila melanogaster*. O equilíbrio dos processos apoptóticos, por exemplo é comprovadamente imprescindível^{74; 75; 76; 77; 78; 79}, principalmente para o estabelecimento do estágio pupal quando ocorre a histólise dos tecidos larvais⁷⁷. As fases que compreendem o estágio de pupa até eclosão de adultos têm sido mostradas como fases delicadas que estão sob controle de relógio circadiano^{80; 81} que por sua vez sofre influência de inúmeros fatores bioquímicos como a produção e ação de ecdisona, hormônio que favorece o crescimento e a diferenciação das estruturas do indivíduo adulto sendo sua produção diretamente dependente de equilíbrio hormonal e neurogênico⁸¹.

O perfil de expressão do gene *daughterless* aponta níveis de expressão deste gene que variam de moderadamente alto a moderado para o início e para o final do estágio de pupa, respectivamente⁷¹. Uma vez avaliada e comprovada a presença da expressão deste gene em tecidos como o SNC, glândulas salivares e discos imaginais⁷¹, sugere-se que a superexpressão de Eiger está sendo direcionada para os referidos tecidos durante o estágio de pupa. Uma vez que o sistema utilizado no presente estudo (da-GAL4/UAS-eiger) está sob o comando da expressão de gene *daughterless* “da”. Essa superexpressão, provavelmente resultou na ativação de um processo inflamatório do tipo autoimune de forma ubíqua, que neste último estágio pode ter se acumulado aos danos causados pelo mesmo processo inflamatório desde o estágio embrionário. Resultando assim, na inviabilidade da prole e morte de todos os indivíduos com genótipo GMR-GAL4/+; eiger/+; da-GAL4/+. Entretanto, estudos posteriores utilizando técnicas moleculares e histológicas poderão explorar mais detalhadamente esses resultados, inclusive a (s) do estágio pupal em que acontece a morte desses indivíduos.

Indivíduos com superexpressão de Eiger nos olhos (GMR-GAL4; UAS-eiger) e com superexpressão ubíqua de Eiger (GMR-GAL4/+; UAS-eiger/+; da-GAL4/+) foram submetidos a um teste utilizando diferentes dosagens de drogas antiinflamatórias (tabela 3) quanto a uma possível reversão fenotípica por bloqueio do intenso processo inflamatório. Os resultados não revelaram nenhuma reversão fenotípica em nenhuma das concentrações de drogas testadas. Entretanto um estudo anterior induziu a inativação da via inflamatória dependente do domínio protéico de imunodeficiência (IMD) em *Drosophila*, devido a ausência de lipolissacarídeos (LPS) que naturalmente ativam as vias que induzem apoptose celular⁸². As drogas utilizadas no presente estudo, dexametasona (esteroidal) e ácido acetilsalicílico (não esteroideal) foram escolhidas por serem drogas comerciais que têm efeito antiinflamatório comprovado em mamíferos principalmente em humanos^{30; 31; 35; 83; 84; 85; 86}.

A ação inibidora de dexametasona sobre a fosfolipase A2 em *Drosophila* já foi observada em estudo quanto ao bloqueio da via IMD^{82; 87}. Entretanto,

aparentemente os compostos testados não modularam a expressão ou funcionamento da via de sinalização de Eiger no presente estudo, o que torna necessário a realização de análises posteriores para verificação das ações de outras drogas que tenham como alvo outros moduladores ativos em via (s) de inflamação com a participação de Eiger.

6 CONCLUSÕES

- A obtenção de um fenótipo visível resultante da superexpressão de eiger tecido específica depende da quantidade de expressão e ou do tecido para onde foi direcionada a superexpressão.
- O silenciamento gênico ubíquo de eiger não resulta em alterações fenotípicas visíveis em indivíduos heterozigotos.
- A superexpressão ubíqua de eiger resulta em fenótipo visível em indivíduos heterozigotos.
- A superexpressão de eiger afeta os indivíduos desde o início do estágio embrionário até o estágio de pupa, o último estágio de vida desses indivíduos.
- Os fármacos, dexametasona e ácido acetilsalisílico não revertem o fenótipo característico da superexpressão. Desse modo, outras drogas antiinflamatórias precisam ser testadas.

7 REFERENCIAS

- ¹ CANAS, C. A.; CANAS, F. The biological significance of evolution in autoimmune phenomena. **Autoimmune Dis**, v. 2012, p. 784315, 2012. ISSN 2090-0430 (Electronic)
2090-0430 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22482039> >.
- ² CLARKE, A.; VYSE, T. J. Genetics of rheumatic disease. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 5, p. 248, 2009. ISSN 1478-6362 (Electronic)
1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19849816> >.
- ³ BALLARD, A. E. Traditional and complementary therapies used together in the treatment, relief and control of Chron's disease and polyarthritis. **Complement Ther Nurs Midwifery**, v. 2, n. 2, p. 52-4, Apr 1996. ISSN 1353-6117 (Print)
1353-6117 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9439274> >.
- ⁴ GOLOVICS, P. A. et al. [The effect of early immunosuppressive therapy on the rate of resections performed in patients with Chron's disease, in Veszprem county, Hungary, a population-based cohort study]. **Orv Hetil**, v. 153, n. 14, p. 541-52, Apr 8 2012. ISSN 0030-6002 (Print)
0030-6002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450143> >.
- ⁵ EGLINTON, T. W. et al. Clinical and genetic risk factors for perianal Crohn's disease in a population-based cohort. **Am J Gastroenterol**, v. 107, n. 4, p. 589-96, Apr 2012. ISSN 1572-0241 (Electronic)
0002-9270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158027> >.
- ⁶ MOON, S. J. et al. Periarticular osteoporosis is a prominent feature in early rheumatoid arthritis: estimation using shaft to periarticular bone mineral density ratio. **J Korean Med Sci**, v. 28, n. 2, p. 287-94, Feb 2013. ISSN 1598-6357 (Electronic)
1011-8934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399828> >.
- ⁷ LONGHI, M. S. et al. T-regs in autoimmune hepatitis-systemic lupus erythematosus/mixed connective tissue disease overlap syndrome are functionally defective and display a Th1 cytokine profile. **J Autoimmun**, v. 41, p. 146-51, Mar 2013. ISSN 1095-9157 (Electronic)
0896-8411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287048> >.

- ⁸ KIMBRELL, D. A.; BEUTLER, B. The evolution and genetics of innate immunity. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 4, p. 256-67, Apr 2001. ISSN 1471-0056 (Print)
1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283698> >.
- ⁹ SERRANO, N. C.; MILLAN, P.; PAEZ, M. C. Non-HLA associations with autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 5, n. 3, p. 209-14, Mar 2006. ISSN 1568-9972 (Print)
1568-9972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16483921> >.
- ¹⁰ LU, Z. et al. Effect of the polymorphism of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A gene promoter on the susceptibility to ulcerative colitis: a meta-analysis. **Digestion**, v. 78, n. 1, p. 44-51, 2008. ISSN 1421-9867 (Electronic)
0012-2823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827481> >.
- ¹¹ ABBAS, K., A.; LICHTMAN, A, H. **Imunologia Celular e Molecular** 2005.
- ¹² DAYER, J. M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J Exp Med**, v. 162, n. 6, p. 2163-8, Dec 1 1985. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999289> >.
- ¹³ GOH, L. et al. A systematic review of the influence of anti-TNF on infection rates in patients with rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 53, n. 6, p. 501-15, Nov-Dec 2013. ISSN 1809-4570 (Electronic)
0482-5004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477729> >.
- ¹⁴ MORENO, E.; YAN, M.; BASLER, K. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the Drosophila homolog of the TNF superfamily. **Curr Biol**, v. 12, n. 14, p. 1263-8, Jul 23 2002. ISSN 0960-9822 (Print)
0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176339> >.
- ¹⁵ IGAKI, T. et al. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. **EMBO J**, v. 21, n. 12, p. 3009-18, Jun 17 2002. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065414> >.

- ¹⁶ KANDA, H. et al. Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 47, p. 18977-82, Nov 22 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065747> >.
- ¹⁷ STEFANATOS, R. K.; VIDAL, M. Tumor invasion and metastasis in Drosophila: a bold past, a bright future. **J Genet Genomics**, v. 38, n. 10, p. 431-8, Oct 20 2011. ISSN 1673-8527 (Print)
1673-8527 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035864> >.
- ¹⁸ ST. PIERRE SE, P. L., STEFANCIK R, MCQUILTON P, AND THE FLYBASE CONSORTIUM. FlyBase 102. 2014. Disponível em: < <http://flybase.org/reports/FBgn0033483.html> >. Acesso em: 10 de Junho de 2014.
- ¹⁹ KAUPPILA, S. et al. Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in Drosophila. **Oncogene**, v. 22, n. 31, p. 4860-7, Jul 31 2003. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894227> >.
- ²⁰ CARROLL, A. F. G. S. R. W. R. C. L. S. B. **Introdução à genética**. 9ª. Rio de Janeiro: 2008. ISBN 978-85-277-1497-6.
- ²¹ DUFFY, J. B. GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife. **Genesis**, v. 34, n. 1-2, p. 1-15, Sep-Oct 2002. ISSN 1526-954X (Print)
1526-954X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324939> >.
- ²² ROOTE, J.; PROKOP, A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for Drosophila genetics. **G3 (Bethesda)**, v. 3, n. 2, p. 353-8, Feb 2013. ISSN 2160-1836 (Electronic)
2160-1836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23390611> >.
- ²³ PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 2, p. 411-36, Jun 2011. ISSN 1521-0081 (Electronic)
0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415126> >.

- ²⁴ ALLISON, A. C. et al. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, n. 7, p. 1341-57, Oct 2001. ISSN 0278-5846 (Print)
0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513350> >.
- ²⁵ ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. **Ann Intern Med**, v. 156, n. 5, p. 350-9, Mar 6 2012. ISSN 1539-3704 (Electronic)
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393130> >.
- ²⁶ HOFFMANN, F. [The analgesic potency of acetylsalicylic acid and salicylamide; algometric measurements and their results in practice]. **Arztl Wochensh**, v. 8, n. 29, p. 698-701, Jul 17 1953. ISSN 0365-6403 (Print)
0365-6403 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13080058> >.
- ²⁷ LOPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 4, p. 495-506, Aug 15 2008. ISSN 1873-2968 (Electronic)
0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590707> >.
- ²⁸ KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J Pharmacol Sci**, v. 96, n. 3, p. 229-45, Nov 2004. ISSN 1347-8613 (Print)
1347-8613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539763> >.
- ²⁹ NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 4, p. 418-25, Oct 2001. ISSN 0002-9165 (Print)
0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566638> >.
- ³⁰ OLSON, E. D. et al. Kinetic evaluation of cell membrane hydrolysis during apoptosis by human isoforms of secretory phospholipase A2. **J Biol Chem**, v. 285, n. 14, p. 10993-1002, Apr 2 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139082> >.
- ³¹ JONAT, C. et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. **Cell**, v. 62, n. 6, p. 1189-204, Sep 21 1990. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2169351> >.

- ³² SILVAN, A. M. et al. Antiinflammatory activity of coumarins from Santolina oblongifolia. **J Nat Prod**, v. 59, n. 12, p. 1183-5, Dec 1996. ISSN 0163-3864 (Print)

0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8988605> >.

- ³³ BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 2-3, p. 325-37, May 13 2008. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417116> >.

- ³⁴ SANTANGELO, C. et al. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann Ist Super Sanita**, v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007. ISSN 0021-2571 (Print)

0021-2571 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209273> >.

- ³⁵ DZIELSKA-OLCZAK, M. [What is new about nonsteroidal antiinflammatory drugs?]. **Pol Merkur Lekarski**, v. 23, n. 138, p. 454-8, Dec 2007. ISSN 1426-9686 (Print)

1426-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432131> >.

- ³⁶ FROLOV, R. V.; BERIM, I. G.; SINGH, S. Inhibition of delayed rectifier potassium channels and induction of arrhythmia: a novel effect of celecoxib and the mechanism underlying it. **J Biol Chem**, v. 283, n. 3, p. 1518-24, Jan 18 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984087> >.

- ³⁷ CARTON, Y. et al. Dexamethasone inhibition of the cellular immune response of Drosophila melanogaster against a parasitoid. **J Parasitol**, v. 88, n. 2, p. 405-7, Apr 2002. ISSN 0022-3395 (Print)

0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054022> >.

- ³⁸ PENG, Y. et al. Neural inhibition by c-Jun as a synergizing factor in bone morphogenetic protein 4 signaling. **Neuroscience**, v. 109, n. 4, p. 657-64, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927148> >.

- ³⁹ BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1627-40, May 12 2007. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499605> >.

- ⁴⁰ CAMINERO, A.; COMABELLA, M.; MONTALBAN, X. Role of tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNFRSF1A R92Q mutation in the pathogenesis of TNF receptor-associated periodic syndrome and multiple sclerosis. **Clin Exp Immunol**, v. 166, n. 3, p. 338-45, Dec 2011. ISSN 1365-2249 (Electronic)

0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22059991> >.

- ⁴¹ REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 2, p. 111-21, Feb 2002. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120092> >.

- ⁴² HERNDON, L. A.; WOLFNER, M. F. A Drosophila seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 22, p. 10114-8, Oct 24 1995. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479736> >.

- ⁴³ RAM, K. R.; WOLFNER, M. F. Sustained post-mating response in Drosophila melanogaster requires multiple seminal fluid proteins. **PLoS Genet**, v. 3, n. 12, p. e238, Dec 2007. ISSN 1553-7404 (Electronic)

1553-7390 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18085830> >.

- ⁴⁴ CALDWELL, J. C. et al. Dynamic analysis of larval locomotion in Drosophila chordotonal organ mutants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 26, p. 16053-8, Dec 23 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673076> >.

- ⁴⁵ HONG, S.; VAN KAER, L. Immune privilege: keeping an eye on natural killer T cells. **J Exp Med**, v. 190, n. 9, p. 1197-200, Nov 1 1999. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544192> >.

- ⁴⁶ FORRESTER, J. V.; XU, H. Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. **Front Immunol**, v. 3, p. 338, 2012. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23230433> >.

- ⁴⁷ ZENCLUSSEN, A. C. Regulatory T cells in pregnancy. **Springer Semin Immunopathol**, v. 28, n. 1, p. 31-9, Aug 2006. ISSN 0344-4325 (Print)

0344-4325 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838178> >.

- 48 CARARE, R. O.; HAWKES, C. A.; WELLER, R. O. Afferent and efferent immunological pathways of the brain. Anatomy, function and failure. **Brain Behav Immun**, v. 36, p. 9-14, Feb 2014. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145049> >.

- 49 GIORGI, F. et al. Ultrastructural analysis of Drosophila ovarian follicles differing in yolk polypeptide (yps) composition. **Development**, v. 117, n. 1, p. 319-28, Jan 1993. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223255> >.

- 50 TOBA, G. et al. The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in Drosophila melanogaster. **Genetics**, v. 151, n. 2, p. 725-37, Feb 1999. ISSN 0016-6731 (Print)

0016-6731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927464> >.

- 51 VAESSIN, H. et al. daughterless is essential for neuronal precursor differentiation but not for initiation of neuronal precursor formation in Drosophila embryo. **Development**, v. 120, n. 4, p. 935-45, Apr 1994. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600969> >.

- 52 VENKATARAMAN, M. Effects of cryopreservation on immune responses: IX. Stimulus-mediated dichotomy in IL-10 production by frozen human peripheral blood mononuclear cells. **J Hematother**, v. 5, n. 3, p. 301-8, Jun 1996. ISSN 1061-6128 (Print)

1061-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8817398> >.

- 53 CUMMINGS, C. A.; CRONMILLER, C. The daughterless gene functions together with Notch and Delta in the control of ovarian follicle development in Drosophila. **Development**, v. 120, n. 2, p. 381-94, Feb 1994. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8149916> >.

- 54 CRONMILLER, C.; CUMMINGS, C. A. The daughterless gene product in Drosophila is a nuclear protein that is broadly expressed throughout the organism during development. **Mech Dev**, v. 42, n. 3, p. 159-69, Aug 1993. ISSN 0925-4773 (Print)

0925-4773 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8217842> >.

- 55 BAUMANN, A. et al. Paralogous genes involved in juvenile hormone action in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 185, n. 4, p. 1327-36, Aug 2010. ISSN 1943-2631 (Electronic)
0016-6731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498297> >.
- 56 KELLER, E. F. *Drosophila* embryos as transitional objects: the work of Donald Poulson and Christiane Nusslein-Volhard. **Hist Stud Phys Biol Sci**, v. 26, n. 2, p. 313-46, 1996. ISSN 0890-9997 (Print)
0890-9997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11613313> >.
- 57 FOE, V. E.; ODELL, G. M.; EDGAR, B. A. **Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: Point and counterpoint**: 149-300 p. 1993.
- 58 PITTENDRIGH, C. S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 25, p. 159-84, 1960. ISSN 0091-7451 (Print)
0091-7451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13736116> >.
- 59 HOWLADER, G.; SHARMA, V. K. Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies *Drosophila melanogaster*. **J Insect Physiol**, v. 52, n. 8, p. 779-85, Aug 2006. ISSN 0022-1910 (Print)
0022-1910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781727> >.
- 60 T, M.; HARI DASS, S.; SHARMA, V. K. Egg-laying rhythm in *Drosophila melanogaster*. **J Genet**, v. 87, n. 5, p. 495-504, Dec 2008. ISSN 0022-1333 (Print)
0022-1333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147938> >.
- 61 WASHINGTON, D. **Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment**. 2000.
- 62 IGAKI, T. et al. Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. **Dev Cell**, v. 16, n. 3, p. 458-65, Mar 2009. ISSN 1878-1551 (Electronic)
1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289090> >.
- 63 VIDAL, M. The dark side of fly TNF: an ancient developmental proof reading mechanism turned into tumor promoter. **Cell Cycle**, v. 9, n. 19, p. 3851-6, Oct 1 2010. ISSN 1551-4005 (Electronic)
1551-4005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935490> >.

- ⁶⁴ PEREZ-GARIJO, A.; FUCHS, Y.; STELLER, H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. **Elife**, v. 2, p. e01004, 2013. ISSN 2050-084X (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24066226> >.
- ⁶⁵ IGAKI, T. et al. Eiger and wengen: the Drosophila orthologs of TNF/TNFR. **Adv Exp Med Biol**, v. 691, p. 45-50, 2011. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153308> >.
- ⁶⁶ MA, X. et al. Bendless modulates JNK-mediated cell death and migration in Drosophila. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 3, p. 407-15, Mar 2014. ISSN 1476-5403 (Electronic)
1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162658> >.
- ⁶⁷ FISHER, B., WEISZMANN, R., FRISE, E., HAMMONDS, A., TOMANCAK, P., BEATON, A., BERMAN, B., QUAN, E., SHU, S., LEWIS, S., RUBIN, G., BARALE, C., LAGUERTAS, E., QUINN, J., GHOSH, A., HARTENSTEIN, V., ASHBURNER, M., CELNIKER, S. . BDGP insitu. 2012. Disponível em: < <http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl> >.
- ⁶⁸ BRAND, A. H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. **Development**, v. 118, n. 2, p. 401-15, Jun 1993. ISSN 0950-1991 (Print)
0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223268> >.
- ⁶⁹ M., F. Reiterative use of the EGF receptor triggers
differentiation of all cell types in the Drosophila eye. **Cell**, v. 87, p. 651– 660, 1996 1996.
- ⁷⁰ KRAMER, J. M.; STAVELEY, B. E. GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of Drosophila melanogaster. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 43-7, 2003. ISSN 1676-5680 (Electronic)
1676-5680 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917801> >.
- ⁷¹ GELBART, W. M., EMMERT, D.B. **FlyBase High Throughput Expression Pattern Data**. <http://flybase.org/reports/FBrf0221009.html> 2013.
- ⁷² FEIGUIN, F. et al. Depletion of TDP-43 affects Drosophila motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. **FEBS Lett**, v. 583, n. 10, p. 1586-92, May 19 2009. ISSN 1873-3468 (Electronic)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379745> >.

- ⁷³ KELLER, L. C. et al. Glial-derived prodegenerative signaling in the *Drosophila* neuromuscular system. **Neuron**, v. 72, n. 5, p. 760-75, Dec 8 2011. ISSN 1097-4199 (Electronic)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22153373> >.

- ⁷⁴ ABRAMS, J. M. et al. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. **Development**, v. 117, n. 1, p. 29-43, Jan 1993. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223253> >.

- ⁷⁵ JIANG, C.; BAEHRECKE, E. H.; THUMMEL, C. S. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. **Development**, v. 124, n. 22, p. 4673-83, Nov 1997. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409683> >.

- ⁷⁶ FARKAS, R.; MECHLER, B. M. The timing of *drosophila* salivary gland apoptosis displays an I(2)gl-dose response. **Cell Death Differ**, v. 7, n. 1, p. 89-101, Jan 2000. ISSN 1350-9047 (Print)

1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713724> >.

- ⁷⁷ SIVITER, R. J. et al. Ance, a *Drosophila* angiotensin-converting enzyme homologue, is expressed in imaginal cells during metamorphosis and is regulated by the steroid, 20-hydroxyecdysone. **Biochem J**, v. 367, n. Pt 1, p. 187-93, Oct 1 2002. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093364> >.

- ⁷⁸ KOZLOVA, T.; LAM, G.; THUMMEL, C. S. *Drosophila* DHR38 nuclear receptor is required for adult cuticle integrity at eclosion. **Dev Dyn**, v. 238, n. 3, p. 701-7, Mar 2009. ISSN 1058-8388 (Print)

1058-8388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19235727> >.

- ⁷⁹ SHIMONO, K. et al. Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic morphology, and segment- and age-dependent programmed cell death. **Neural Dev**, v. 4, p. 37, 2009. ISSN 1749-8104 (Electronic)

1749-8104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799768> >.

⁸⁰ MUKHERJEE, N. et al. A model based on oscillatory threshold and build-up of a developmental substance explains gating of adult emergence in *Drosophila melanogaster*. **J Exp Biol**, v. 215, n. Pt 17, p. 2960-8, Sep 1 2012. ISSN 1477-9145 (Electronic)

0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875765> >.

⁸¹ PARK, J. H. et al. Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of *Drosophila* causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior. **Development**, v. 130, n. 12, p. 2645-56, Jun 2003. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736209> >.

⁸² YAJIMA, M. et al. A newly established in vitro culture using transgenic *Drosophila* reveals functional coupling between the phospholipase A2-generated fatty acid cascade and lipopolysaccharide-dependent activation of the immune deficiency (imd) pathway in insect immunity. **Biochem J**, v. 371, n. Pt 1, p. 205-10, Apr 1 2003. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12513692> >.

⁸³ SAMPEY, A. V.; HUTCHINSON, P.; MORAND, E. F. Annexin I and dexamethasone effects on phospholipase and cyclooxygenase activity in human synoviocytes. **Mediators Inflamm**, v. 9, n. 3-4, p. 125-32, 2000. ISSN 0962-9351 (Print)

0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11132768> >.

⁸⁴ STEVENSON, D. D. Diagnosis, prevention, and treatment of adverse reactions to aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Allergy Clin Immunol**, v. 74, n. 4 Pt 2, p. 617-22, Oct 1984. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6436354> >.

⁸⁵ VERGNE, P.; BERTIN, P.; TREVES, R. [Aspirin, pain and inflammation]. **Rev Med Interne**, v. 21 Suppl 1, p. 89s-96s, Mar 2000. ISSN 0248-8663 (Print)

0248-8663 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10763210> >.

⁸⁶ HASAN, D. M. et al. Evidence that acetylsalicylic acid attenuates inflammation in the walls of human cerebral aneurysms: preliminary results. **J Am Heart Assoc**, v. 2, n. 1, p. e000019, Feb 2013. ISSN 2047-9980 (Electronic)

2047-9980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525414> >.

⁸⁷ SEKIYA, M. et al. Establishment of ex vivo systems to identify compounds acting on innate immune responses and to determine their target molecules using transgenic *Drosophila*. **Life Sci**, v. 80, n. 2, p. 113-9, Dec 14 2006. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978662> >.