



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

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO pm26TGF-  $\beta$ 1, MIMÉTICO  
DE TGF- $\beta$ 1 HUMANO, NA APOPTOSE INDUZIDA POR TNF- $\alpha$  EM  
*Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Tamiris Sabrina Rodrigues

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti / INGEB-UFU

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira / INGEB-UFU

**UBERLÂNDIA – MG**

**2017**



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

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO pm26TGF-  $\beta$ 1, MIMÉTICO  
DE TGF- $\beta$ 1 HUMANO, NA APOPTOSE INDUZIDA POR TNF- $\alpha$  EM  
*Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Tamiris Sabrina Rodrigues

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira / INGEB-UFU

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

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R696a Rodrigues, Tamiris Sabrina, 1992  
2017 Avaliação da ação do peptídeo sintético pm26TGF-  $\beta$ 1, mimético de TGF- $\beta$ 1 humano, na apoptose induzida por TNF- $\alpha$  em *Drosophila melanogaster* / Tamiris Sabrina Rodrigues. - 2017.  
83 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.  
Coorientador: Carlos Ueira Vieira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.706>  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. 3. Apoptose - Teses. 4. Inflamação - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Vieira, Carlos Ueira, 1981. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 577.1



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

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO pm26TGF-  $\beta$ 1, MIMÉTICO  
DE TGF- $\beta$ 1 HUMANO, NA APOPTOSE INDUZIDA POR TNF- $\alpha$  EM  
*Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Tamiris Sabrina Rodrigues

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti (orientadora)

**Examinadores:** Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes / ICBIM-UFU  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson / FMRP-USP

**Data da defesa:** 31/07/2017

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

*“A minha fé e as minhas crenças não podem ser um obstáculo para a busca de novos conhecimentos, pelo contrário, quanto mais eu busco conhecimento, mais reforço o que eu acredito”*

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais **Farley Cesar Rodrigues** e **Leida Aparecida Rodrigues**, pelo amor incondicional, confiança e apoio! Vocês são os meus maiores exemplos de honestidade, perseverança e respeito!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à **Universidade Federal de Uberlândia**, por oferecer infraestrutura para a realização desse trabalho.

Meus profundos agradecimentos à minha **orientadora Profª Drª Ana Maria Bonetti**, por me receber tão bem como sua aluna e dividir seus conhecimentos e experiências profissionais e pessoais. Obrigada por acreditar no meu potencial e não medir esforços para me auxiliar na busca de mais essa conquista. Você é um grande exemplo de dedicação e profissionalismo e sabe o quanto sou grata por ter a oportunidade de conviver ao lado de uma pessoa tão especial como você!

Agradeço ao meu **co-orientador Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira**, pelo incentivo e confiança depositados e por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas. Por me fazer acreditar que conseguiria alcançar todos os meus objetivos e pelos inúmeros conselhos dados.

Aos professores: **Dr. Robson José de Oliveira Júnior, Drª Rute Magalhães Brito e Drª Sandra Morelli**. Agradeço imensamente pela amizade, apoio, incentivo, compreensão e atenção.

À professora **Drª Larissa Barbosa de Souza**, pela amizade e apoio. Você foi muito importante nessa caminhada!

À todos os **colegas e funcionários do Instituto de Biotecnologia** da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC/UFU) pelos serviços prestados e apoio.

À **Pós-doutoranda Patrícia Tieme Fushimura**, por todos os ensinamentos, amizade, disponibilidade e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos do programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB). Em especial aos amigos, **Jéssica Brito, Lorena Polloni, Izabella Cristina, Maria Paula Carvalho, Carlos Fernando Campos e Henrique Nazareth**.

Aos meus amigos de laboratório, **Jéssica Regina, Romualdo Morandi, Ana Paula Silva, Luiza Diniz, Pedro Guedes, Luana Scalia, Aline Gomes, Victor Alexandre Bastos, Emília Rezende, Carine de Mendonça**. Obrigada pela convivência, pelas risadas, pelo aprendizado e por tornarem o ambiente laboratorial tão enriquecedor e agradável!

Às Agências de Fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro na categoria APQ concedido ao Orientador e Co-orientador dessa Pesquisa.

À **todos** que colaboraram conosco e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho!



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à **Deus** pela vida, por sempre iluminar meus caminhos e por me guiar com sabedoria diante dos obstáculos!

Agradeço aos meus pais, **Farley Cesar Rodrigues** e **Leida Aparecida Rodrigues**, sem dúvida as pessoas que mais acreditam e torcem pela minha realização pessoal e profissional. Obrigada pela compreensão diante dos momentos de ausência, pelos conselhos e orações. Obrigada pela amizade, apoio e por sempre incentivarem a busca pelos meus sonhos. Vocês são meu exemplo de conduta e determinação. É um orgulho poder chamá-los de pais. À vocês, o meu amor incondicional!

Aos meus irmãos, **Jefferson Cesar Rodrigues** e **Jean Carlos Rodrigues**, pela amizade e companheirismo!

Ao meu namorado e amigo, **Hiago Caixeta Cunha**, que acompanhou bem de perto todo o esforço e dedicação durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pela compreensão, carinho, apoio e por ser um dos meus maiores incentivadores. Compartilho com você essa vitória! Obrigada pelo companheirismo e por caminhar ao meu lado!

Aos **Sr. Gilvane Cunha** e **Sr<sup>a</sup>. Maria Anália Caixeta**, pelo carinho, apoio e conselhos nessa jornada. A presença de vocês é muito importante na minha vida.

**À minha família**, por contribuir com a minha formação pessoal e sempre me incentivar. Em especial às minhas avós **Jesa Maria** e **Aparecida Rodrigues**, pelas orações, apoio e carinho.

Aos meus grandes e velhos amigos **Lucas Vinícius Ferreira**, **Stefânia Luiza**, **Ana Paula Dornelas** e **Lara Leão**. Como é bom ter a amizade e o apoio de vocês!

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética e Laboratório de Nanobiotecnologia, do Instituto de Genética e Bioquímica e Laboratório de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia - Minas Gerais, Brasil), com o apoio das seguintes Agências de Fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Drosophila melanogaster</i>, o organismo modelo utilizado</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Construção de Linhagem Transgênica .....	4
1.1.2 Sistema GAL4/UAS .....	7
<b>1.2 Mecanismos de morte celular e TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Ortólogos de TNF- $\alpha$ e TNFR em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	10
<b>1.3 TGF- <math>\beta</math>1: caracterização</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 Interação TGF-<math>\beta</math>1 e TNF-<math>\alpha</math> na apoptose</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5 Peptídeo pm26TGF-<math>\beta</math>1</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivos específicos .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 Peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 .....	18
3.2 Material biológico e grupos experimentais.....	18
3.3 Testes para estudo de ação anti-inflamatória e anti-apoptótica em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	20
3.3.1 Obtenção da progênie .....	20
3.3.2 Análise de imagem .....	22
3.3.3 Teste de Sensibilidade à Luz .....	23
3.3.4 Coleta de hemolinfa.....	24
3.3.5 Preparação dos esfregaços .....	25
3.3.6 Contagem diferencial de hemócitos .....	26
3.4 Análise da expressão gênica .....	27
3.4.1 Extração de RNA total .....	27
3.4.2 Síntese de cDNA .....	28
3.4.3 Análise por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR) .....	29
3.5 Análise estatística.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 Teste de sobrevivência.....	31
4.2 Quantificação da área do olho .....	32
4.3 Teste de Sensibilidade à Luz .....	34
4.4 Análise dos Hemócitos.....	36

<b>4.5 Análise da Expressão dos Genes Codificadores de Eiger e Wengen em <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>42</b>
<b>4.5.1 Níveis de Transcritos do gene eiger em <i>Drosophila melanogaster</i></b> 42	
<b>4.5.2 Níveis de Transcritos do gene wengen em <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>43</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>		<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.</b>	Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i> .....	02
<b>Figura 2.</b>	Representação dos cromossomos de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	02
<b>Figura 3.</b>	Diferenças entre macho e fêmea de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	03
<b>Figura 4.</b>	Uso de elementos P para construir <i>Drosophila melanogaster</i> transgênica.....	06
<b>Figura 5.</b>	Sistema GAL4/UAS em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	08
<b>Figura 6.</b>	Padrão fenotípico de olhos reduzidos e normais em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	09
<b>Figura 7.</b>	Predição da sequência de aminoácidos de Eiger.....	11
<b>Figura 8.</b>	Modelo proposto da indução de morte celular por ativação da via JNK com participação direta de Eiger e Wengen.....	12
<b>Figura 9.</b>	Via de sinalização do TGF- $\beta$ dependente e independente de SMADS.....	13
<b>Figura 10.</b>	Interação da sinalização de TGF- $\beta$ 1 com caminhos extrínsecos e intrínsecos para promoção de sobrevivência celular ou de apoptose.....	14
<b>Figura 11.</b>	Padrão fenotípico de olhos em diferentes linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	20
<b>Figura 12.</b>	Frascos com meio para realização de oviposição de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21

<b>Figura 13.</b>	<i>Vials</i> com tampa de algodão onde são colocadas as larvas de <i>D. melanogaster</i> para realização de tratamento.....	22
<b>Figura 14.</b>	Passo-a-passo da quantificação da área do olho de <i>Drosophila melanogaster</i> pelo software <i>Image J</i> . .....	23
<b>Figura 15.</b>	Aparato para teste de sensibilidade à luz .....	24
<b>Figura 16.</b>	Coleta de hemolinfa de larva de terceiro estágio (L3) de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	25
<b>Figura 17.</b>	Esquema do esfregaço com hemolinfa de <i>D. melanogaster</i> .....	26
<b>Figura 18.</b>	Esquema da leitura de lâmina de esfregaço com hemolinfa de <i>D. melanogaster</i> .....	27
<b>Figura 19.</b>	Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> tratadas com o peptídeo sintético pm26TGF-β1.....	32
<b>Figura 20.</b>	Resultado da quantificação da área do olho de <i>Drosophila melanogaster</i> , linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, tratada com o peptídeo pm26TGF-β1.....	33
<b>Figura 21.</b>	Imagens de cabeças de <i>Drosophila melanogaster</i> mostrando as alterações do tamanho da área do olho nos diferentes grupos tratados.....	34
<b>Figura 22.</b>	Teste de Sensibilidade à Luz de grupos tratados e não-tratados com o peptídeo sintético pm26TGF-β1 da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger (grupos tratado e não tratado) e linhagem selvagem <i>Canton S</i> (não-tratada) de <i>D. melanogaster</i> .....	35
<b>Figura 23.</b>	Morfologia dos diferentes tipos de hemócitos de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	37

<b>Figura 24.</b>	Contagem diferencial de hemócitos de larvas de terceiro estágio (L3) das linhagens <i>White</i> e GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	38
<b>Figura 25.</b>	Contagem diferencial de hemócitos de larvas de terceiro estágio (L3) da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> de grupos tratado e não-tratado com o peptídeo sintético pm26-TGF- $\beta$ 1.....	40
<b>Figura 26.</b>	Número de campos contados na lâmina de esfregaço de hemolinfa, por linhagem/concentração de tratamento, para obter a contagem de 100 (cem) hemócitos.....	41
<b>Figura 27.</b>	Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene eiger obtida por RT-qPCR na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> tratadas com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1.....	42
<b>Figura 28.</b>	Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene wengen obtida por RT-qPCR na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> tratadas com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Sequência dos <i>primers</i> dos genes avaliados neste estudo.....	28



## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
CDH	Contagem Diferencial de Hemócitos
Dpp	Decapentaplégico
G	Grama
GAL4	Fator de transcrição responsivo a galactose 4
INGEB	Instituto de Genética e Bioquímica
JNK	c-Jun N-terminal quinase
L3	Larvas de terceiro estágio
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar
Mm	Milímetro
mL	Mililitro
Min	Minuto
mM	Milimolar
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
Nm	Nanômetro
Pb	Pares de bases
PBMCs	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
pmol	Picomol
SMADS	Proteínas intracelulares que traduzem sinais extracelulares de TGF-β
TIAF	Fator anti-apoptótico induzido por TGF-β
TGF-β	Fator Transformante de Crescimento Beta
TGF-β1	Fator Transformante de Crescimento Beta

TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alpha
TRAF4	Receptor de TNF associado ao fator 4
TRT	Tiosulfato sulfotransferase
T $\beta$ RI	Receptor tipo I de TGF- $\beta$
T $\beta$ RII	Receptor tipo I de TGF- $\beta$
UAS	Sequência de ativação antecedente
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
x g	Força Centrífuga

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

---

Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Cisteína	Cis	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S

---

## RESUMO

A compreensão da ação combinada de TNF $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e TGF- $\beta$ 1 (Fator de Crescimento Tumoral Beta 1) é importante para o entendimento de mecanismos de morte celular e processos inflamatórios. O fato de existirem ortólogos em *Drosophila melanogaster* para as citocinas TNF- $\alpha$  (Eiger) e TGF- $\beta$ 1 (Dpp) e seus respectivos receptores torna essa mosca um modelo biológico relevante para a elucidação desses processos. O gene eiger foi identificado anteriormente como ortólogo do gene que codifica TNF-alfa em mamíferos. Caracterizado como uma citocina inflamatória, Eiger age em *D. melanogaster* induzindo apoptose através da ativação da via JNK (Jun N-terminal kinases), resultando no fenótipo de olho reduzido. Estudos demonstram que o TGF- $\beta$ 1 também pode agir na via JNK induzindo ou inibindo a apoptose celular, de acordo com o contexto celular. Em 2015, Vaz *et al.* selecionaram, pela técnica de *Phage Display*, um peptídeo que mimetiza uma porção da molécula de TGF- $\beta$ 1 humano, denominado peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1, que demonstrou alta afinidade pelo receptor de TGF- $\beta$ 1 e ação anti-inflamatória. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação do peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, mimético de TGF- $\beta$ 1 humano, na via de apoptose induzida por TNF $\alpha$ , utilizando como organismo modelo *D. melanogaster*. Nossos resultados mostraram que moscas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger (fenótipo de olho reduzido) de *D. melanogaster* tratadas com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 apresentaram melhora na taxa de sobrevivência e aumento na área do olho, ainda que não acompanhado de ganho de função. O peptídeo agiu, também, reduzindo a contagem global de hemócitos nas larvas de terceiro estágio, sugerindo efeito anti-inflamatório. Esses dados foram corroborados pela redução da expressão dos transcritos dos genes eiger (ortólogo de TNF- $\alpha$ ) e wengen (ortólogo de TGF- $\beta$ 1) em *D. melanogaster*. Assim sendo, verificamos que o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 atua na via JNK, inibindo a apoptose e validamos o uso de *D. melanogaster* como modelo alternativo para estudo dos processos de morte celular e inflamação bem como para triagem de moléculas biologicamente ativas, com potencial farmacológico.

**Palavras-chave:** apoptose, *Drosophila melanogaster*, eiger, inflamação, pm26-TGF $\beta$ 1, JNK, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ .

## ABSTRACT

Comprehending TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Fator alpha) and TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor beta) combined action is important for understanding cell death and inflammatory processes mechanisms. The fact that there are orthologs in *Drosophila melanogaster* for the cytokines TNF- $\alpha$  (Eiger) and TGF- $\beta$ 1 (Dpp) and their respective receptors make fly a relevant biological model for elucidating those processes. The eiger gene has been identified as an ortholog of the gene responsible for encoding the Tumor Necrosis Factor (TNF-alpha) in mammals. Characterized as an inflammatory cytokine independent of caspase, Eiger acts on *D. melanogaster* inducing apoptosis through the activation of JNK (Jun N-terminal kinases), pathway, resulting in the reduced eye phenotype. Studies demonstrate that TGF- $\beta$ 1 can also act on JNK pathway by inducing or inhibiting cellular apoptosis, depending of the cellular context. In 2015, by the Phage Display technique, Vaz *et al.* selected a peptide that mimics a portion of the human TGF- $\beta$ 1 molecule, called pm26TGF- $\beta$ 1 peptide, which demonstrated high affinity for the TGF- $\beta$  1 receptor and anti-inflammatory action. The objective of this study was to evaluate the synthetic peptide pm26TGF- $\beta$ 1 action (similar to the human TFG- $\beta$ 1) in the apoptosis pathway induced by TNF $\alpha$  using the *Drosophila melanogaster* as a model organism. Our results showed that GMR-GAL4 > UAS-eiger (reduced eye phenotype) of *D. melanogaster* flies treated with the pm26TGF- $\beta$ 1 peptide have had an improvement in their survival rate and an increase in the area of the eye, even if it was not accompanied by function gain. The peptide also acted to reduce the hemocyte overall count in the third-stage larvae, suggesting an anti-inflammatory effect. These data were corroborated by the reduction of eiger (TNF- $\alpha$  ortholog) and wengen (TGF- $\beta$  ortholog) transcript expression. Therefore, we have verified that the synthetic peptide pm26TGF- $\beta$ 1 acts on JNK pathway inhibiting apoptosis and validated the use of *D. melanogaster* as an alternative model for the cell death and inflammation processes study as well as for the screening of biologically active molecules with pharmacological potential.

**Key words:** apoptosis, *Drosophila melanogaster*, eiger, inflammation, pm26-TGF $\beta$ 1, JNK, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$

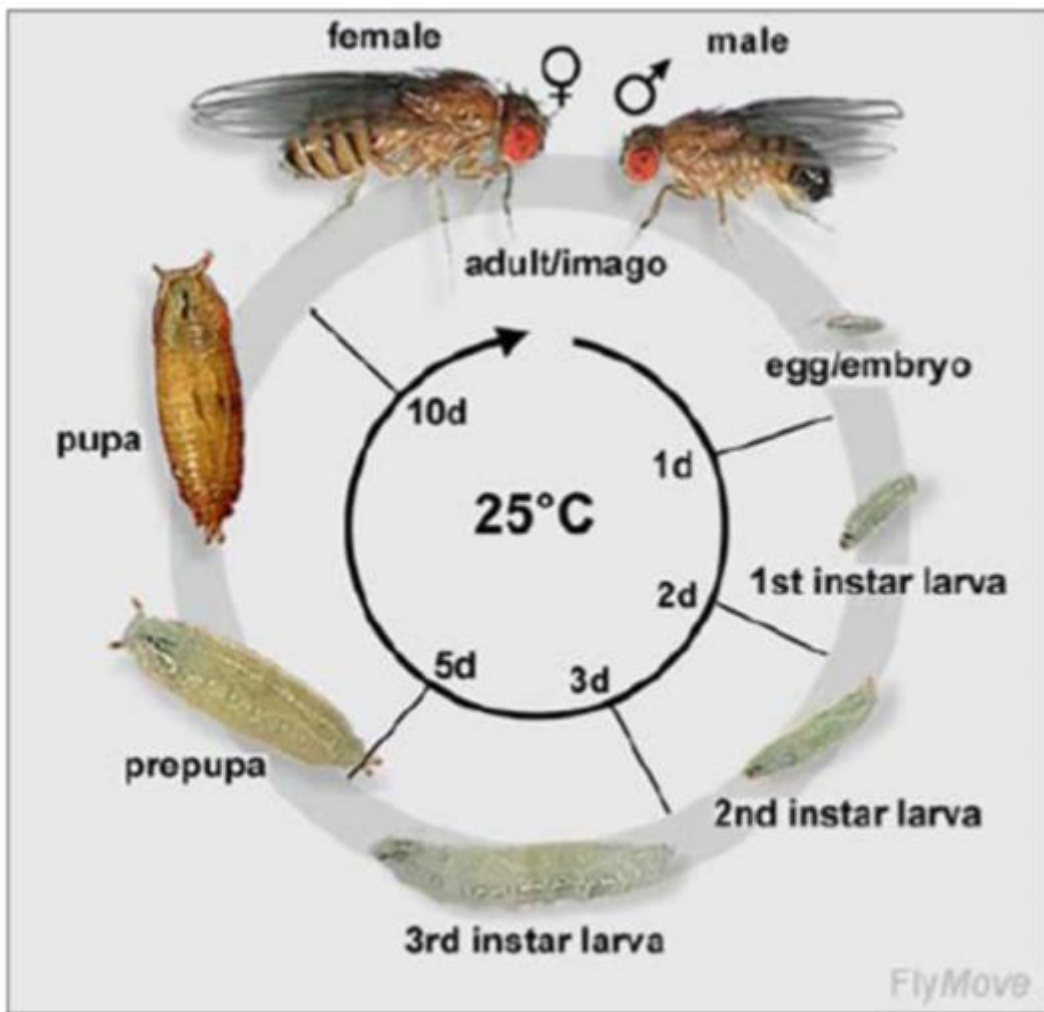
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Drosophila melanogaster*, o organismo modelo utilizado

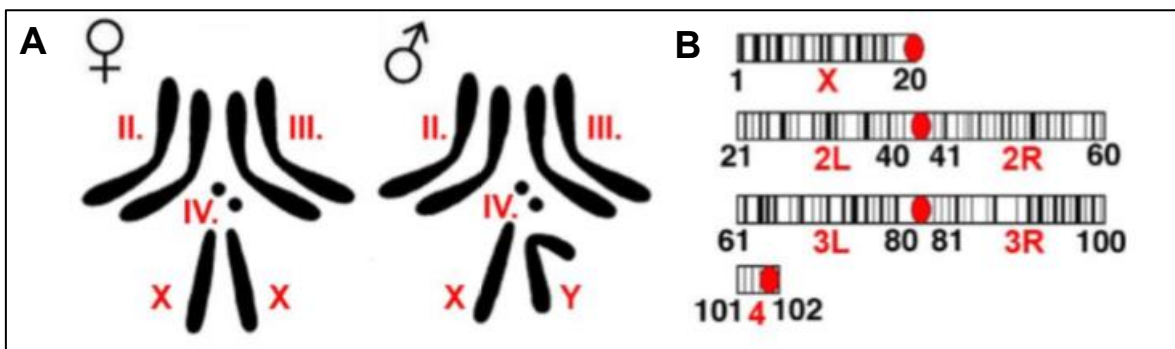
*Drosophila melanogaster* é um inseto holometábolo, pequeno (2-3 milímetros), encontrado em frutas em decomposição, sendo por isso conhecida, popularmente, como mosca da fruta (LYNCH *et al.*, 2012).

A *Drosophila melanogaster* possui ciclo de vida rápido (Figura 1). O desenvolvimento embrionário, após a fertilização e formação do zigoto, ocorre dentro da membrana do ovo, que eclode em larva. O período larval se divide em três estágios (*instars*). No terceiro e último estágio (3° instar – L3), a larva pode alcançar o comprimento de 4,5 milímetros, desenvolvendo-se para o próximo estágio, de pupa. À 25°C, o ciclo de vida se completa em cerca de 10-12 dias, quando a pupa eclode em adulto (DEEPA PARVATHI *et al.*, 2009). As moscas produzem grande número de descendentes em um único cruzamento, além de serem de fácil manutenção e baixo custo (GRAF *et al.*, 1996; JENNINGS, 2011).

A mosca da fruta possui quatro pares de cromossomos ( $2n = 8$ ) (Figura 2), sendo três pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais.

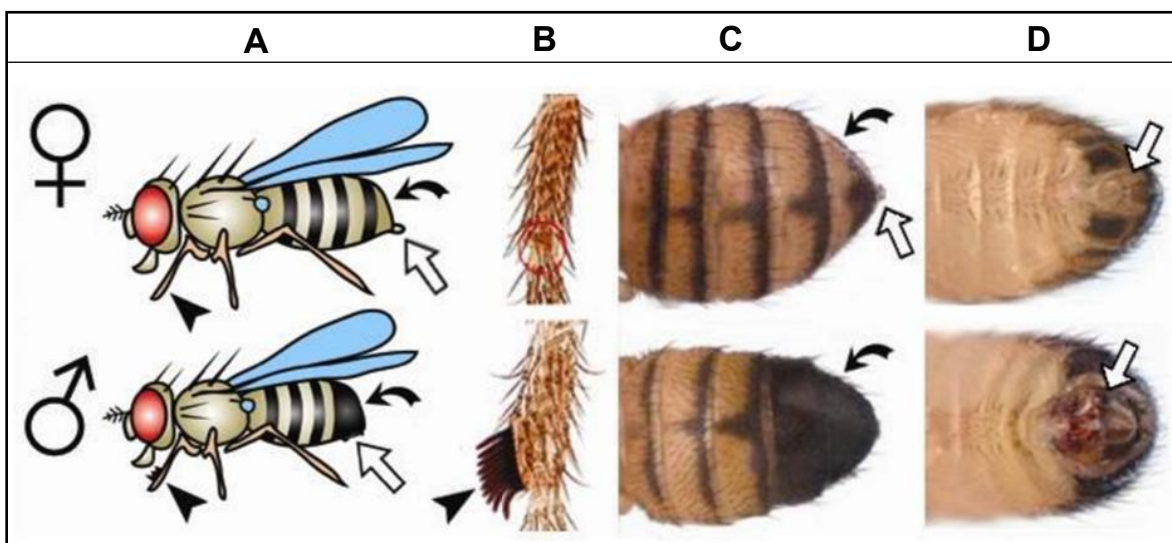


**Figura 1:** Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Fonte: <<http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.htm>>.



**Figura 2:** Representação dos cromossomos de célula da glândula salivar de *Drosophila melanogaster*. **A.** Esquema de cromossomos de célula da glândula salivar. **B.** Os números em preto indicam *loci* gênicos. Os cromossomos 2 e 3 são subdivididos em braços esquerdo (L) e direito (R) e centrômero (ponto vermelho). Fonte: (DE BELLE e HEISENBERG, 1996).

Os machos são identificados, visualmente, por uma mancha escura na extremidade posterior do abdômen e pelo apêndice sexual (semelhante a um pente) localizado nas patas dianteiras, como linhas pretas e grossas (Figura 3). Estes são aferroados na fêmea quando há a tentativa de acasalar. Na mosca macho, os dois últimos segmentos do abdome são mais escuros que os de uma fêmea. Machos têm uma faixa grossa e preta, enquanto que fêmeas tem uma faixa mais escura e uma mais clara acima dessa (AHUJA e SINGH, 2008; CHILDRESS e HALDER, 2008).



**Figura 3:** Diferenças entre macho e fêmea de *Drosophila melanogaster*. As imagens mostram as fêmeas (parte superior) e os machos (parte inferior). **A.** Visão lateral do corpo inteiro (1ª coluna). As fêmeas são ligeiramente maiores que os machos. **B.** Visão ampliada das patas dianteiras. Apenas machos exibem apêndice sexual no primeiro par de patas (ponta de seta). **C.** Vista dorsal. As fêmeas exibem listras escuras separadas na ponta posterior do abdômen, que são fundidas em machos (setas curvas). **D.** Visão ventral do abdômen. As placas anais (setas brancas) são mais escuras e complexas nos machos, e nas fêmeas, exibem uma extensão tipo pino. O abdômen e a placa anal ainda estão pálidos em machos recém eclodidos e podem ser confundidos como indicadores de fêmea, à primeira vista. Durante um período muito curto após a eclosão, as moscas exibem um ponto esverdeado escuro visível em seu abdômen, o mecônio (não mostrado) que é tomado como um indicador da virgindade da fêmea, mesmo que machos férteis estejam presentes. Fonte: (AHUJA e SINGH, 2008; CHILDRESS e HALDER, 2008) com modificações.



A *Drosophila melanogaster* vem sendo utilizada nas ciências biológicas para o desenvolvimento de estudos científicos e foi um dos primeiros organismos a ter seu genoma sequenciado (ADAMS *et al.*, 2000). Após a conclusão do sequenciamento do genoma humano, a homologia observada entre os dois genomas reforçou o papel dessa mosca como organismo modelo para o entendimento da biologia humana, bem como dos mecanismos de certas doenças.

Estima-se que, aproximadamente 75% dos genes relacionados à doença em humanos possuem ortólogos funcionais em *D. melanogaster*. A homologia entre a sequência desses genes é de cerca de 40% de identidade, sendo de 80% – 90% em domínios funcionais conservados (ADAMS *et al.*, 2000). Estudos na mosca da fruta alteraram substancialmente as estimativas da relação evolutiva entre organismos vertebrados e invertebrados.

Nos últimos 50 anos, o estudo genético em *D. melanogaster* foi aplicado com sucesso para decifrar os principais mecanismos subjacentes a inúmeros processos, incluindo desenvolvimento (LAWRENCE, 1992), sinalização (CADIGAN e PEIFER, 2009), ciclo celular (LEE e ORR-WEAVER, 2003), desenvolvimento, função e comportamento do sistema nervoso (BELLEN *et al.*, 2010; WEINER, 1999) e, até mesmo, aspectos moleculares de doenças humanas (BIER, 2005).

A utilização da mosca-da-fruta reduz significativamente os custos para estudos que visam o entendimento de mecanismos moleculares e fisiológicos nos mamíferos, auxiliando na identificação de novos alvos para terapia (LLOYD e TAYLOR, 2010; REITER *et al.*, 2001) e triagem de moléculas biologicamente ativas com potencial farmacológico.

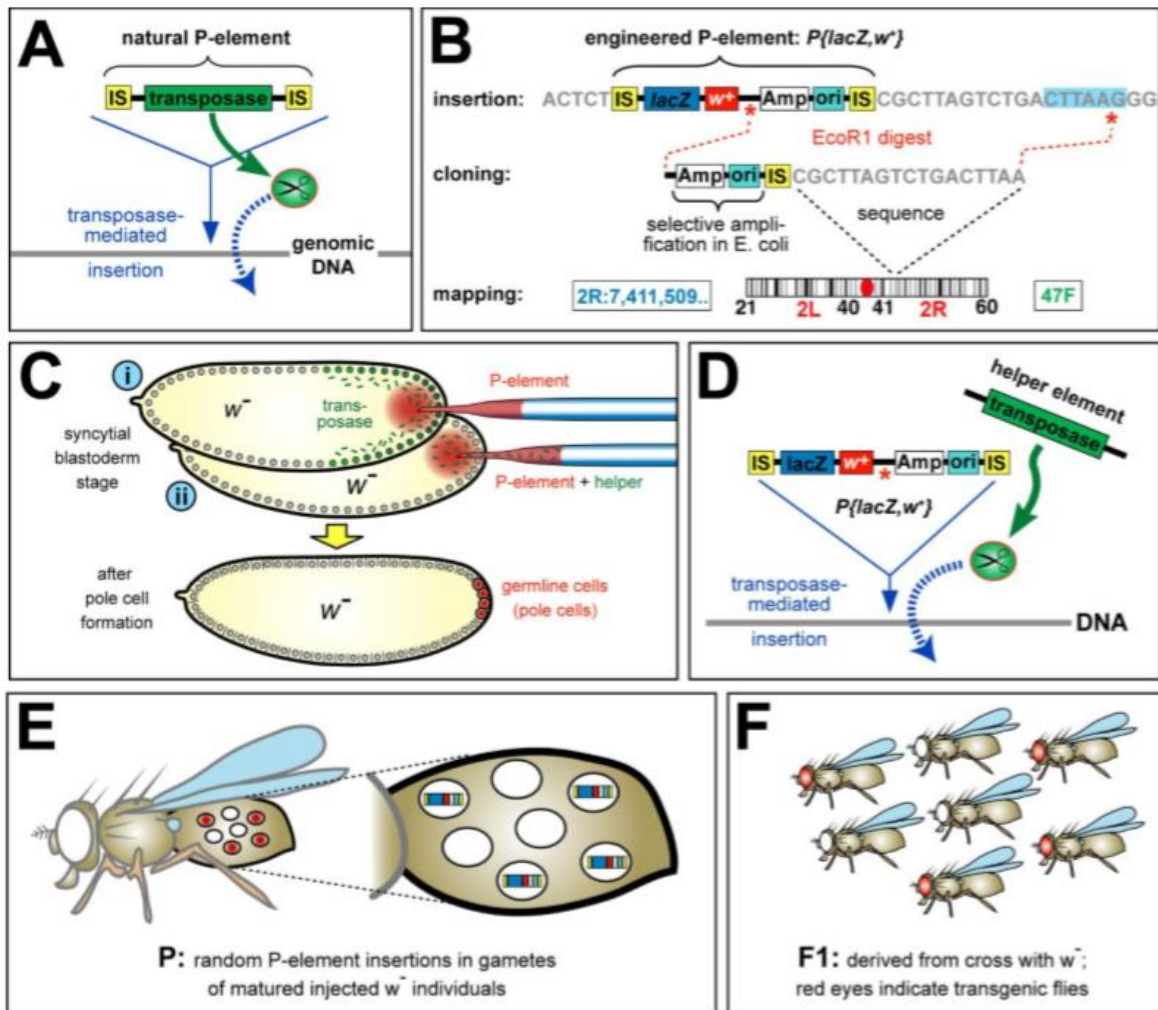
### **1.1.1 Construção de Linhagem Transgênica**

O desenvolvimento de novas técnicas permitiu o estudo minucioso do genótipo da *Drosophila melanogaster* e seu uso como organismo modelo. O sequenciamento completo do seu genoma, bem como a descoberta de elementos transponíveis como veículo para construção de transgênicos e silenciamento gênico (*knock down*), foram cruciais para desvendar a importância científica da mosca da fruta (KELLER, 1996; ROOTE e PROKOP, 2013; TOBA, 1999).

O uso de elementos transponíveis/transposons permitiu a geração de linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster* para estudos de mecanismos específicos. Esses elementos construídos se inserem no genoma da mosca como um elemento endógeno, sendo mantido na mesma posição nas próximas gerações (ROOTE e PROKOP, 2013).

Os primeiros elementos de transposição descobertos e caracterizados molecularmente em eucariotos foram isolados de leveduras mutantes e de *Drosophila melanogaster*, sendo o elemento P o mais utilizado (CARROLL, 2008). As transposases são enzimas que catalisam a migração dos transposons de um local para outro no genoma, por excisão/relocação ou pela replicação (Figura 4-A) (KOOGAN, 2008; ROOTE e PROKOP, 2013).

Para a construção de uma linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster*, transposons são geneticamente modificados. O gene da transposase é retirado e substituído pelos genes de interesse que se deseja incorporar no genoma da *Drosophila* (BACHMANN, 2008; ROOTE e PROKOP, 2013). Estes constructos contêm genes marcadores de seleção em bactérias que permitem a seleção de clones contendo o elemento P (Figura 4-B). Os transposons construídos são injetados no pólo posterior do embrião da *Drosophila*, onde serão incorporados pelas células recém-formadas (BACHMANN, 2008). A maioria dessas células recém-formadas são células sexuais, garantindo a herança da característica (Figura 4-C). Para otimizar 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 dos pólo superior do embrião (Figura 4-D). *Helper elements* são degradados com a proliferação das células injetadas pois não se inserem nem se replicam sozinhos. Após o desaparecimento da atividade enzimática, as inserções dos elementos P se tornam estáveis e a linhagem estabelecida é mantida em estoque.



**Figura 4:** Uso de elemento P para construir *Drosophila melanogaster* transgênica. **A.** Inserção de elemento P natural em regiões do genoma (em amarelo, seqüências de bases complementares a regiões do genoma). **B.** P (Lac Z, w<sup>+</sup>) Elemento P construído e utilizado para construção de transgênicos. O gene da transposase foi substituído pelo gene Lac Z de *E. coli* (caixa azul escuro), um gene marcado *mine-white* w<sup>+</sup> (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 as células sexuais. **D-E.** A inserção do elemento P não acontece em todas as células do indivíduo, o que gera o padrão mosaico que resulta em mosca sem expressão do gene marcador (olhos vermelhos do gene *mine-white*). **F.** Após o cruzamento com *Drosophila melanogaster* w<sup>-</sup>, somente a progênie (F1) transgênica possui olhos vermelhos, devido à presença do gene *mine-white*. Fonte: (ROOTE e PROKOP, 2013).

Centros de estoque de *Drosophila melanogaster* como o *Bloomington* (Estados Unidos), mantêm disponível o acesso aos transgênicos. As linhagens são

mantidas e classificadas conforme sua aplicação e construção gênica (COOK *et al.*, 2010; ST PIERRE SE *et al.*, 2017).

As linhagens *drivers* são construídas para direcionarem a expressão de um gene de interesse a um tecido específico. As linhagens GMR-GAL4 e *yolk*-GAL4, por exemplo, possuem a expressão de GAL4 controlada por promotores gênicos, como, repórter múltiplo ocular (*Glass multiple reporter*) para o olho (LI, 2012) e gema (*yolk*) específico do corpo gorduroso de fêmeas adultas (GIORGI *et al.*, 1991), respectivamente.

Nas linhagens *responders*, a transcrição do gene alvo está sob o comando de uma sequência de ativação antecedente (UAS) dependente de GAL4 (COOK *et al.*, 2010) como a linhagem UAS-*eiger*, para o gene ortólogo do TNF- $\alpha$  (IGAKI *et al.*, 2002) aqui utilizada.

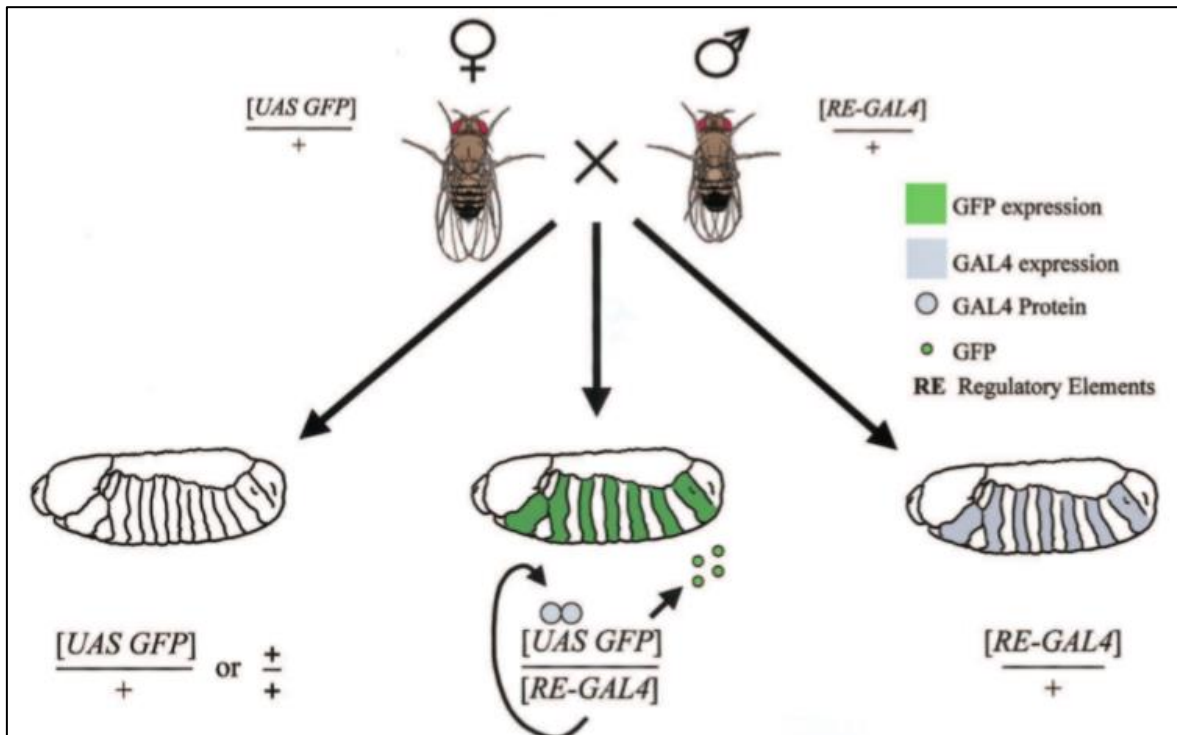
### 1.1.2 Sistema GAL4/UAS

GAL4 é um fator de transcrição identificado na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ELLIOTT e BRAND, 2008; ROOTE, 2013). Essa proteína é composta por 881 aminoácidos e a sua indução por galactose ativa genes como GAL10 e GAL1, situados posteriormente às sequências de ativação antecedentes ou acentuadores (UAS) (CARROLL, 2008; DUFFY, 2002). GAL4 possui pelo menos dois domínios, um para ligação ao DNA e outro para ativação da transcrição. Seus alvos, os acentuadores (UAS) eucarióticos podem agir a grandes distâncias dos promotores dos genes para modular a transcrição (CARROLL, 2008).

UAS e GAL4 não existem naturalmente em *Drosophila* (ELLIOTT e BRAND, 2008; ROOTE, 2013). Fisher *et al.* (1998) demonstraram que a expressão de GAL4 é capaz de induzir a transcrição de um gene repórter sob o controle de UAS, em *D. melanogaster* (DUFFY, 2002).

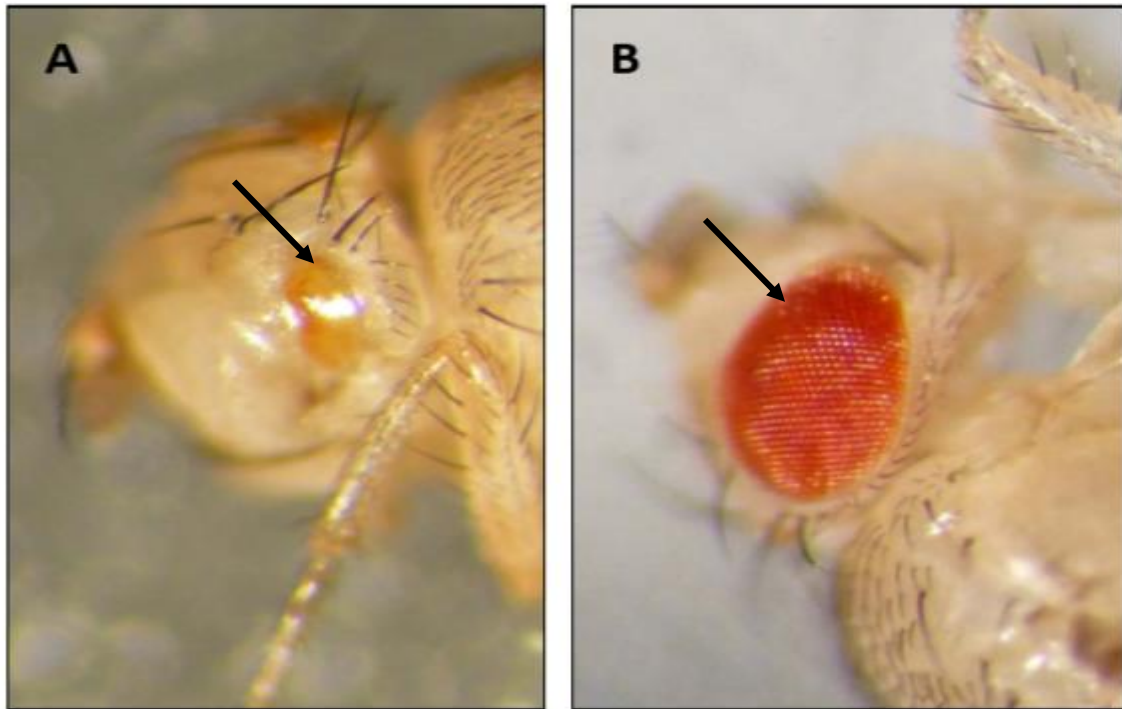
A utilização do sistema GAL4/UAS em *Drosophila* para estudo de expressão gênica começou em 1993 (BRAND, 2008). A ativação do sistema acontece pelo cruzamento entre linhagens expressando GAL4 (*drivers*) com linhagens contendo o elemento UAS (*responder*). Como resultado do cruzamento (Figura 5), a progênie expressa o gene ligado ao UAS sob um padrão de expressão dirigido por GAL4 (ELLIOTT e BRAND, 2008; ROOTE, 2013). Os genes de interesse podem ser

repórteres, diferentes isoformas, de outras espécies ou RNAs de interferência (BRAND, 2008). De modo geral, o sistema GAL4/UAS possibilita o estudo da expressão gênica mediante análise temporal e espacial, sendo considerada uma das técnicas mais eficientes para análise de funções gênicas (DUFFY, 2002).



**Figura 5:** Sistema GAL4/UAS em *Drosophila melanogaster*. Fêmeas portando o *responder* (UAS-GFP) cruzadas com machos expressando o *driver* GAL4 (RE-GAL4) resulta em progênie contendo ambos os elementos do sistema. A presença de GAL4 em segmentos embrionários alternados dirige a expressão do *responder* (UAS-GFP) para esses locais. Fonte: (DUFFY, 2002).

Nesse estudo o sistema GAL4/UAS foi utilizado para a construção da linhagem **GMR-GAL4 > UAS-eiger**. Fêmeas portando o *responder* UAS (UAS-eiger) foram cruzadas com machos expressando o *driver* GAL4 (GMR-GAL4). A progênie (F1) resultante do cruzamento apresenta superexpressão do gene *eiger* (ortólogo de TNF- $\alpha$  humano em *Drosophila melanogaster*) direcionado para o olho da mosca. As moscas dessa linhagem apresentam o fenótipo de olho reduzido, como mostra a Figura 6.



**Figura 6:** Padrão fenotípico de olhos reduzidos e normais em *Drosophila melanogaster*. **A.** Indivíduo da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger, com olho reduzido (seta). **B.** Indivíduo da linhagem selvagem *Canton S*, apresentando olho normal (seta).

## 1.2 Mecanismos de morte celular e TNF- $\alpha$

Em estudos da regulação da morte celular, o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* foi o primeiro a ser utilizado. Nele, essa regulação é intrínseca e funciona através de um programa genético (HORVITZ, 1999). Em *Drosophila* e mamíferos, foi visto que a morte celular é regulada por mecanismos extrínsecos, o chamado controle social da morte celular (RAFF, 1992). O uso da *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, auxilia o estudo desses processos devido à semelhança dos seus mecanismos de morte com os de vertebrados.

*Drosophila* é considerado modelo genético para o estudo *in vivo* da morte celular e sua regulação fisiológica. Nas moscas, a via de morte é estimulada pelas proteínas *Killer*, *Reaper*, *Hid* e *Grim* ou um membro da família Bcl-2 pró-apoptótico (VERNOOY *et al.*, 2000). A expressão dessas proteínas, desencadeantes de morte celular, durante o desenvolvimento do olho da mosca, resulta em fenótipo de olho

reduzido. As moléculas pró-apoptóticas adaptadoras, como *Drosophila* caspase, não causam o fenótipo de olho reduzido. Isso sugere que o fenótipo de olho reduzido seja gerado por superexpressão dos gatilhos de morte celular “apical”, proteínas reguladas nos níveis de transcrição gênica ou pelos níveis de suas moléculas inibitórias (CHEN *et al.*, 1996; COLUSSI *et al.*, 2000; GREYER *et al.*, 1995; IGAKI *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 1996).

Os componentes da família do fator de necrose tumoral (TNF) estão envolvidos na regulação da infecção, inflamação, morte celular, doenças autoimunes e homeostase dos tecidos (AL-SADI *et al.*, 2016; DEORA *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2015; LOCKSLEY *et al.*, 2001; PEDIGO *et al.*, 2016).

Os receptores de TNF (TNFR) são proteínas de membrana do tipo I. A oligomerização, induzida por ligação dos membros da família TNFR, leva ao recrutamento de uma série de proteínas citosólicas para os seus domínios citoplasmáticos e resulta na ativação de caminhos de morte de NFkB, JNK e celular (BAKER e REDDY, 1996; LOCKSLEY *et al.*, 2001).

A alta similaridade do mecanismo de morte celular entre humano e *Drosophila* como a existência de membros da família TNF e TNFR presentes em ambas as espécies, torna esse organismo modelo adequado para elucidar os processos envolvidos nessas vias.

### **1.2.1 Ortólogos de TNF- $\alpha$ e TNFR em *Drosophila melanogaster***

Em 2002, Igaki *et al.* identificaram o gene *eiger* como um novo gatilho de morte celular em *Drosophila melanogaster*, sendo o primeiro e, até então, único ortólogo de TNF- $\alpha$  de mamíferos identificado na mosca da fruta. 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 (Figura 7). Sua homologia com o TNF- $\alpha$  se dá na porção C-terminal, havendo cerca de 25% de identidade entre elas. *Eiger* tem função ligante e está envolvida nos processos de resposta imune do inseto (IGAKI *et al.*, 2002; KANDA *et al.*, 2011). *Eiger* e seu receptor *Wengen* interagem fisicamente através de seus domínios de homologia com TNF e TNFR,

respectivamente, resultando na indução de apoptose celular via JNK (CHA *et al.*, 2003).

```
MTAETLKPFITPTSANDDGFPAKATSTATAQRRTRQLIPLVLGFIGLGLVVAILALTIWQTTRVSHLDKELKSLK
RVVDNLQQRLGINYLDEFDEFQKEYENALIDYPKKVDGLTDEEDDDDDGDLDSIADDEDDDDVSYSSVDDV
GADYEDYTDMLNKLNNAHTGTTPTSETTAEGEGETDSASSASNDDNVFDDFTSYNAHKKKQERKRSRIAD
VRNEEQNIQGNHTELQEKSSNEATSKESPAPLHRRRRMHSRHRHLLVRKGESLLSARSEDSRPAAHFHLS
SRRRHQGSMDYHGDMYIGNDNERNYSYQGHFQTRDGVLTVTNTGLYYVYAQICYNNSHDQNGFIVFQGD
PFLQCLNTVPTNMPHKVHTCHTSGLIHLERNERIHLDIHNDRNAVLREGNNRSYFGIFKV
```

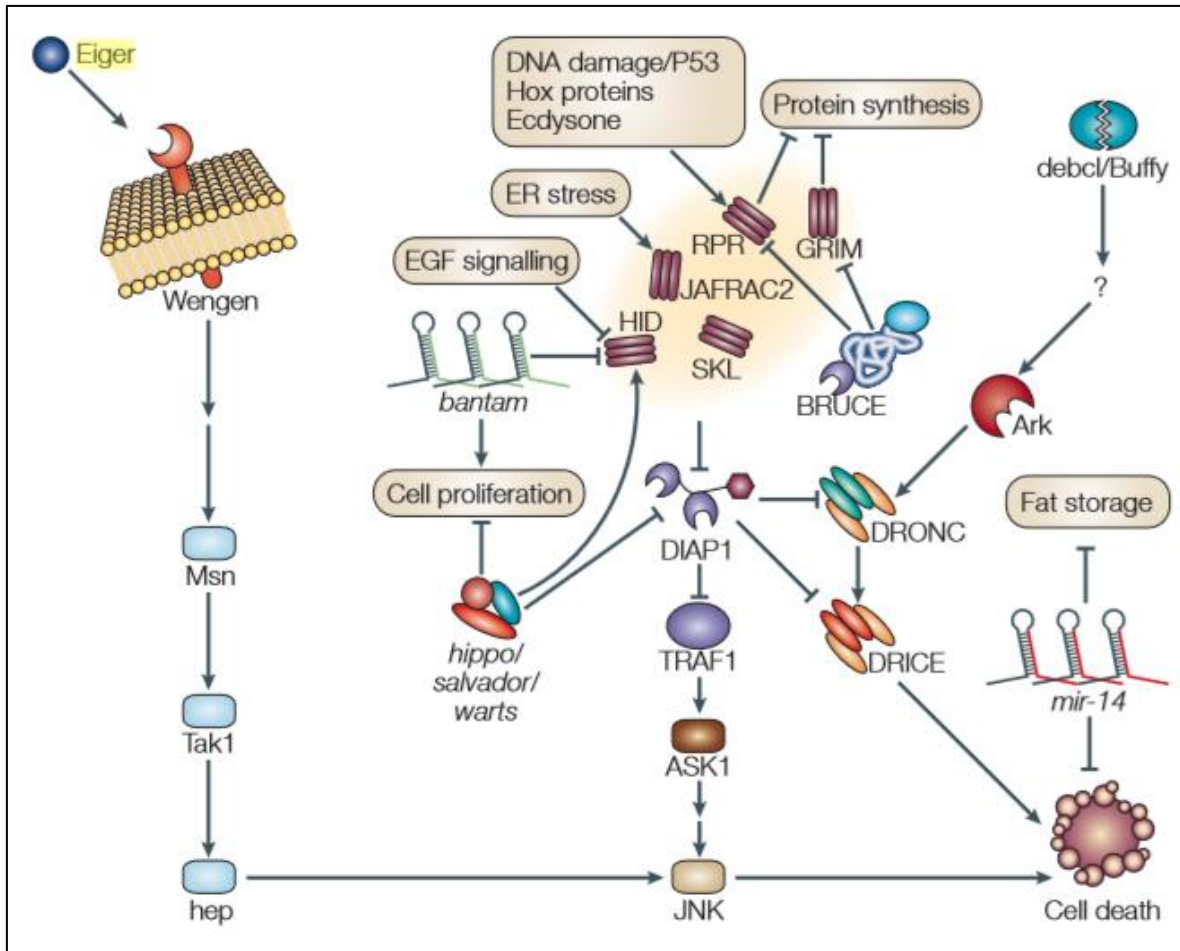
**Figura 7:** Predição da sequência de aminoácidos de Eiger. Região transmembrana assinalada com duplo sublinhado e região C-terminal, destacada com sublinhado simples. Fonte: (MORENO *et al.*, 2002), com modificações.

O fenótipo de olho reduzido induzido por expressão do gene *eiger* depende da via de sinalização de JNK (Figura 8). Nos mamíferos, estudos demonstram que a via JNK é essencial para indução de morte celular por estresse (YANG *et al.*, 1997; TOURNIER *et al.*, 2000) e por choque térmico, independente de caspase (KUMAR *et al.*, 2001).

A sinalização de morte induzida por *Eiger* pode ser bloqueada pelo DIAP1, proteína que suprime a morte celular por inibição direta de caspases (DEVERAUX e REED, 1999) e bloqueio da sinalização de JNK, independente de caspase. A perda de função no olho da *Drosophila* demonstra que *Eiger* é um gatilho fisiológico para a via JNK no disco imaginal do olho, funcionando como um regulador de morte celular dependente de JNK (IGAKI *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2001).

Em suma, o gene *eiger* foi identificado como ortólogo do gene que codifica o Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa) em mamíferos. Caracterizada como uma citocina inflamatória independente de caspase, *Eiger* age em *Drosophila melanogaster* induzindo apoptose através da via de controle do ciclo celular dependente de quinase (JNK) (IGAKI, 2002; PEREZ-GARIJO, 2013; VIDAL, 2010).





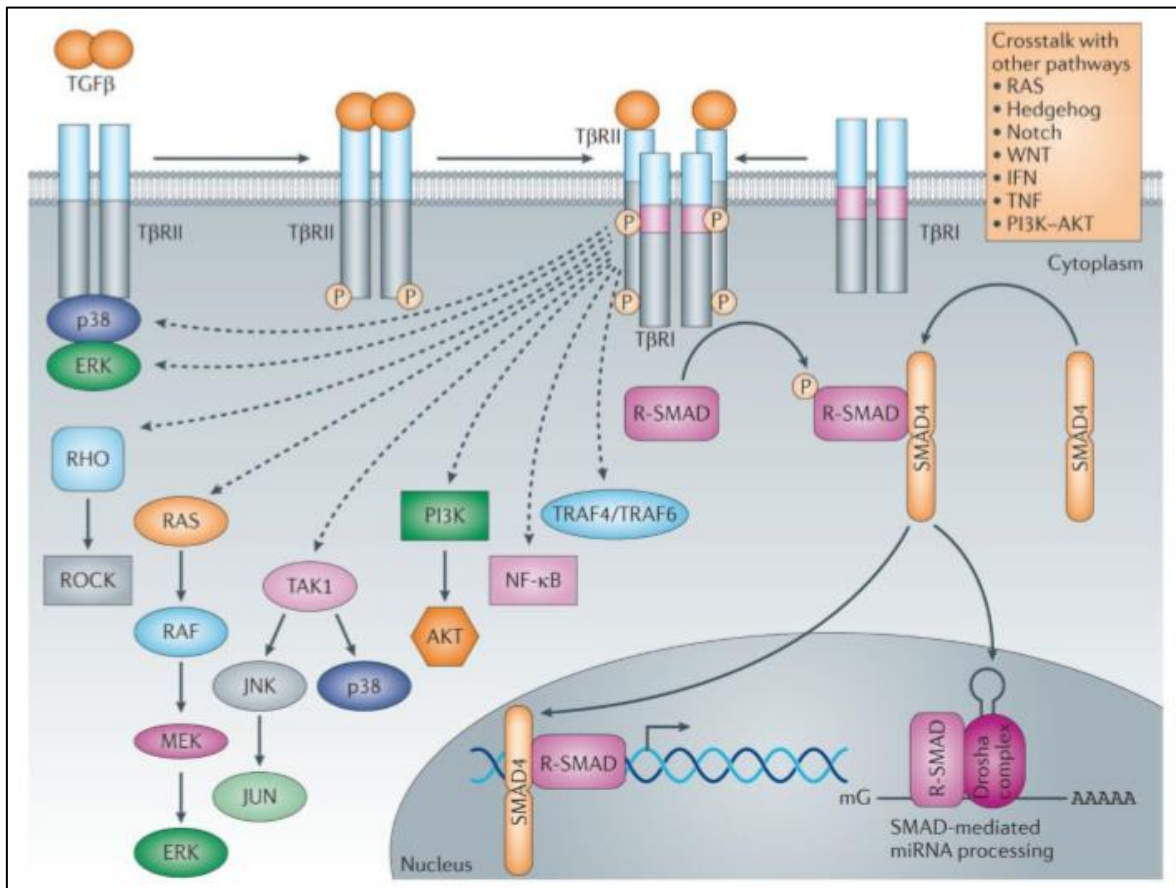
**Figura 8:** Modelo proposto da indução de morte celular por ativação da via JNK com participação direta de Eiger e Wengen. Fonte: (HAY *et al.*, 2004).

### 1.3 TGF- $\beta$ 1: caracterização

O TGF- $\beta$  pertence a uma classe de citocinas pleiotrópicas envolvida em vários processos biológicos como proliferação celular, diferenciação, adesão, migração e apoptose. (SANTIBANEZ, 2011; ZHANG *et al.*, 2014). A superfamília do TGF- $\beta$  é composta por mais de 30 membros. Três isoformas são expressas em mamíferos: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 com homologia maior que 70%. (BAARDSNES *et al.*, 2009).

A transdução do sinal do TGF- $\beta$ 1 é iniciado após a sua ligação aos receptores na superfície celular, dois receptores tipo I (T $\beta$ RI) e dois, tipo II (T $\beta$ RII) formam um complexo tetramérico (LIU e FENG, 2010). O T $\beta$ RII fosforila o T $\beta$ RI, que catalisa a fosforilação das proteínas SMAD2 e 3, que são as primeiras a serem

ativadas e fundamentais para a ativação da cascata de sinalização (LI e GOTLIEB, 2011) (Figura 9). O genoma humano codifica 7 receptores tipo I e 5 receptores tipo II. Ambos os receptores (tipo I e II) contêm um domínio de ligação extracelular N-terminal, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático serina / treonina quinase (BOESEN *et al.*, 2002; GREENWALD *et al.*, 2003).

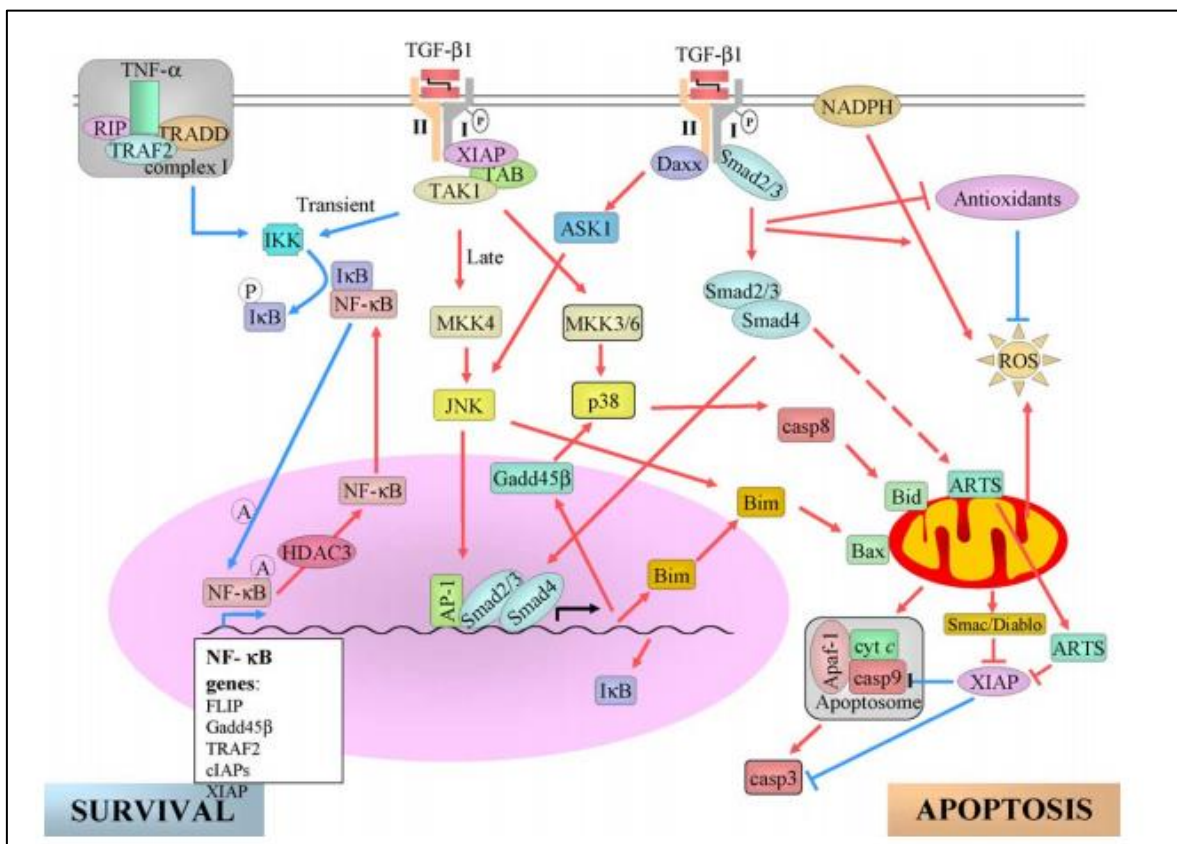


**Figura 9:** Via de sinalização do TGF- $\beta$  dependente e independente de SMADS. A via independente de SMADS transmite o sinal por fatores como o Fator 4 associado ao receptor de TNF (TRAF4), Quinase 1 ativada por TGF- $\beta$ , Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) - AKT, Quinase extracelular reguladora de sinal (ERK), Quinase JUN N-terminal (JNK) e Fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Fonte: (AKHURST e HATA, 2012).

#### 1.4 Interação TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$ na apoptose

As interações moleculares das vias de sinalização TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$  em mamíferos ainda não foram esclarecidas. O TGF- $\beta$ 1 pode aumentar ou neutralizar o efeito citotóxico de TNF- $\alpha$  (Figura 10). Estudos mostraram que o TGF- $\beta$ 1 de

fibroblasto da linhagem murina L929 inibe o efeito citotóxico de TNF- $\alpha$ , provavelmente, mediado por TIAF1 e 2 (fatores anti-apoptóticos induzidos por TGF- $\beta$ 1) e TRT (proteína desencadeante de resistência da matriz extracelular ao TNF- $\alpha$ ) (CHANG N-S,1998). Nos osteoblastos é comum o processo de apoptose para manter a homeostase entre a formação óssea e a reabsorção óssea. Nesse caso, o TGF- $\beta$ 1 tem um efeito protetor, bloqueando o sinal de TNF- $\alpha$  para apoptose (CHEN *et al.*, 2012; SOWA, 2003; WU *et al.*, 2016).



**Figura 10:** Interação da sinalização de TGF- $\beta$ 1 com caminhos extrínsecos e intrínsecos para promoção de sobrevivência celular ou de apoptose. Esses eventos foram descritos em diferentes tipos de células e essa figura integra os dados disponíveis. As linhas vermelha e azul representam as vias apoptótica e de sobrevivência, respectivamente. Fonte: SANCHEZ-CAPELO, 2005.

Outro estudo onde TGF- $\beta$ 1 inibe a apoptose, mas desta vez em cooperação com TNF- $\alpha$ , está em células hepáticas ativadas. Essas células sofrem apoptose espontânea através da ativação da via Fas. No entanto, esse efeito é diminuído pelo TGF- $\beta$ 1 e pelo TNF- $\alpha$ , que reduzem a expressão de Fas, ativam o NF- $\kappa$ B e

aumentam o nível de Bcl-XL (molécula anti-apoptótica da via mitocondrial) (SAILE, 2001).

O gene ortólogo de TNF- $\alpha$  em *Drosophila melanogaster* é um gatilho fisiológico para a via JNK no disco de olho, funcionando como um regulador de morte celular dependente de JNK (IGAKI *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2001). A ativação dessa via leva à apoptose de um grande número de células do olho da mosca, gerando o fenótipo de olho reduzido.

Vários estudos demonstram que o TGF- $\beta$ 1 também pode ativar a via JNK e induzir a apoptose celular (Figura 10). No entanto, em outros contextos celulares, a ativação de JNK por TGF- $\beta$ 1 pode produzir o efeito oposto, evitando a ativação da via apoptótica (HUANG, 2000; SANCHEZ-CAPELO, 2005).

A busca por mais informações para compreender a ação combinada de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 é importante para o entendimento de mecanismos de morte celular e processos inflamatórios. O fato de existirem ortólogos em *Drosophila melanogaster* para as citocinas TNF- $\alpha$  (Eiger) e TGF- $\beta$ 1 (Dpp – Decapentaplégico) e seus respectivos receptores, torna essa mosca um modelo biológico relevante para a elucidação desses processos (CHABU e XU, 2014; IGAKI *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2014; MABERY e SCHNEIDER, 2010; NFONSAM *et al.*, 2012; PÉREZ-GARIJO *et al.*, 2013; STULTZ *et al.*, 2012).

### 1.5 Peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1

*Phage Display* é uma tecnologia utilizada na identificação de peptídeos ou proteínas que interagem com moléculas alvo, na sua conformação nativa, através da exposição de biomoléculas em fagos (COOK *et al.*, 2010). É uma técnica de seleção que utiliza sequências aleatórias de DNA fundidos em genes codificadores de proteínas do capsídeo viral (RANG *et al.*, 2007).

Em 2015, Vaz *et al.* selecionaram, pela técnica de *Phage Display*, um peptídeo que mimetiza uma porção da molécula do TGF- $\beta$ 1, denominado de peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1, que demonstrou alta afinidade pelo receptor de TGF- $\beta$ 1 (T $\beta$ RII).

Estudos mostram que o TGF- $\beta$  humano possui ação ambígua, dependendo da via em que está envolvido. Em doenças autoimunes, o TGF- $\beta$  possui função anti-inflamatória, enquanto que no processo de carcinogênese, atua com ação pró-inflamatória e contribui para o crescimento tumoral (FABREGAT *et al.*, 2014; MASSAGUÉ, 2008). A seleção de um peptídeo que mimetiza apenas uma porção da estrutura dessa citocina cria um contexto para decifrar os mecanismos de ação do TGF- $\beta$  que, após elucidado, se torna um fármaco potencial para tratamento de doenças inflamatórias.

Experimentos demonstraram a grande similaridade do peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 com a molécula de TGF- $\beta$ 1, bem como de seu efeito no processo inflamatório. Em camundongos com peritonite, tratados com o peptídeo mimético, observou-se redução da migração de neutrófilos e aumento no processo de rolamento de leucócitos. Células PMCS (Células Mononucleares do Sangue Periférico) pré-tratadas com o peptídeo mimético e estimuladas com LPS e PMA, apresentaram queda dos níveis de TNF- $\alpha$  e aumento dos níveis de IL-10 (VAZ *et al.*, 2015). Apesar desse estudo mostrar um efeito anti-inflamatório do peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1, as vias envolvidas nesse processo ainda não estão esclarecidas.

Por esse motivo, esse estudo buscou contribuir para o esclarecimento dos efeitos do peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, mimético de TGF- $\beta$ 1 humano, na via de morte celular induzida por TNF- $\alpha$  e verificar se sua ação causa, também, mudanças nas células do sistema imune da mosca *D. melanogaster*, indicativo de indicando redução da inflamação.

Nossa hipótese foi de que o tratamento de moscas da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger (fenótipo de olho reduzido) com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, teria efeito na via JNK, reduzindo os níveis de TNF- $\alpha$  no olho e inibindo a apoptose na região ocular da *Drosophila melanogaster*. A linhagem de *D. melanogaster* com fenótipo de olho reduzido, devido à expressão de altos níveis de TNF- $\alpha$  no olho, foi utilizada como modelo biológico experimental. Consideramos a linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger um potencial modelo para estudo de drogas envolvidas no processo de morte celular e inflamação.

## 2 OBJETIVO GERAL

Analisar, em *Drosophila melanogaster*, a ação do peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, mimético de TGF- $\beta$ 1 humano, na via de apoptose induzida por TNF $\alpha$ .

### 2.1 Objetivos específicos

- Verificar, por meio de Teste de Sobrevivência, a concentração do peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, mimético de TFG- $\beta$ 1 humano, a ser utilizada nos experimentos;
- Avaliar a atividade anti-apoptótica do peptídeo sintético, através da mensuração da área dos olhos;
- Verificar, por meio de Teste de Sensibilidade à Luz, os efeitos do tratamento com pm26TGF- $\beta$ 1 no funcionamento do olho de *D. melanogaster*;
- Verificar, por meio de testes para estudo de ação anti-inflamatória e anti-apoptótica, os efeitos do peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 em *D. melanogaster* com superexpressão do gene *eiger* no olho;
- Quantificar, por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), os níveis de transcritos dos genes *eiger* e *wengen* em pupas de *Drosophila melanogaster* não tratadas e tratadas com pm26TGF-  $\beta$ 1;
- Validar a utilização de *D. melanogaster* como modelo alternativo para estudo dos processos de morte celular e inflamação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética (LABGEN) e no Laboratório de Nanobiotecnologia (LABNANO) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

#### 3.1 Peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1

O peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 foi selecionado pela técnica de *Phage Display* por pesquisadores do Laboratório de Nanobiotecnologia (VAZ, et al., 2015) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade de Uberlândia (UFU) (VAZ *et al.*; 2015). O peptídeo tem peso molecular de 1389,58g/mol e a sequência de aminoácidos ACESPLKRQC GGGS.

Para realização dos testes o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 foi sintetizado pela empresa *GenScript* (Estados Unidos).

#### 3.2 Material biológico e grupos experimentais

Nos experimentos foram utilizadas larvas, pupas e adultos da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger, de *Drosophila melanogaster*. Para controle, utilizamos a linhagem mutante *White* e a linhagem selvagem *Canton S* (Figura 11).

As linhagens transgênicas GMR-GAL4 e UAS-eiger foram gentilmente cedidas pelo Dr. Masayuki Miura, da Universidade Global de Tóquio – JAPAN e as linhagens *Canton S* (selvagem) e *White* (mutante), adquiridas do banco de estoque de linhagens de *Drosophila melanogaster Bloomington* (*Drosophila Stock Center – Indiana University*) e mantidas no Laboratório de Genética do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade de Uberlândia (UFU).

Seguem os ensaios e os grupos experimentais em cada uma das metodologias:

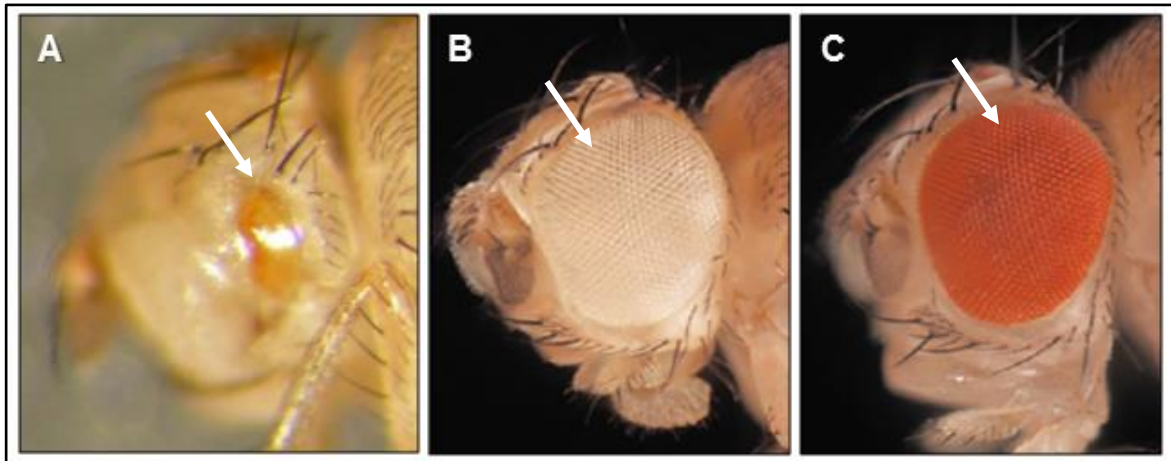
- **Ensaio de sobrevivência:** análise de larvas, pupas e moscas adultas da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster*, de

grupos tratados com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 (concentrações de 0,0002; 0,0004; 0,0008; 0,0016; 0,0032; 0,0064; 0,0128 e 0,0512 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1) e não tratado (controle negativo, água);

- **Quantificação da área do olho:** mensuração de olho de moscas adultas da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger, de *Drosophila melanogaster*, de grupos tratados com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 (concentrações de 0,0002; 0,0032; 0,0064 e 0,0128 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1) e não tratado (controle negativo, água);
- **Teste de sensibilidade à luz:** análise de moscas adultas da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster*, de grupos tratados com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 (concentrações de 0,0002; 0,0004; 0,0008; 0,0016; 0,0032; 0,0064; 0,0128; 0,0256 e 0,0512 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1) e não tratado (controle negativo, água). Para controle entre linhagens foram analisadas moscas adultas da linhagem selvagem Canton S (não-tratadas) por apresentarem condição normal de morfologia e função do olho.
- **Coleta de hemolinfa:** hemolinfa coletada de larvas de terceiro estágio (L3) da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster*, de grupos tratados com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 por 48 horas (concentrações de 0,0002; 0,0032; 0,0256 e 0,0512 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1) e não tratado (controle negativo, água). Para controle, foi utilizada hemolinfa de larvas de terceiro estágio (L3) da linhagem selvagem Canton S (não-tratada) e da linhagem mutante White (não-tratada) por apresentarem padrão normal na contagem de hemócitos.
- **Análise de expressão gênica:** RNA extraído de pupas da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger de *D. melanogaster*, de grupos tratados com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 (concentrações de 0,0002; 0,0032 e 0,0512 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1) e não tratado (controle negativo, água) para síntese de cDNA e análise por RT-PCR em Tempo Real.

- **Observação:** para todas as metodologias, o tratamento de *D. melanogaster* com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 foi realizado utilizando larvas de terceiro estágio (L3).





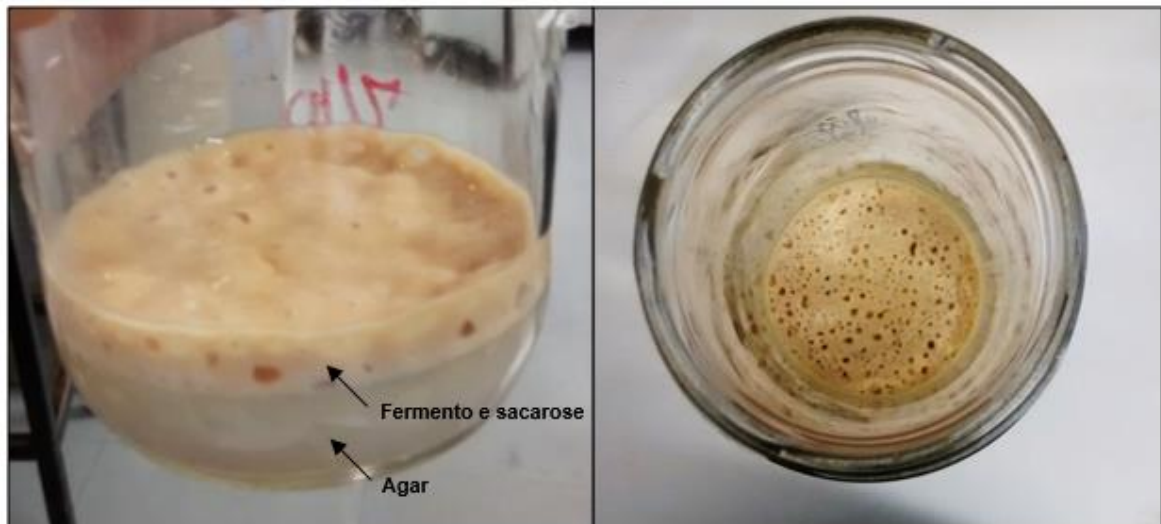
**Figura 11:** Padrão fenotípico de olhos em diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*. **A.** Linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, com fenótipo de olho reduzido (seta). **B.** Linhagem *White*, com fenótipo de olho branco (seta). **C.** Linhagem *Canton S*, fenótipo de olho vermelho (seta).

As linhagens em estudo são mantidas em estoque no Laboratório de Genética do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em frascos contendo  $\frac{1}{4}$  de meio de cultura à base de fubá (1500 ml de água; 27 g de levedura; 15 g de farinha de soja; 109,5 g de fubá; 9 g de ágar; 115,5 g de xarope de glicose; solução ácida e solução de Nipagin) em estufa incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio, SOLAB).

### **3.3 Testes para estudo de ação anti-inflamatória e anti-apoptótica em *Drosophila melanogaster***

#### **3.3.1 Obtenção da progênie**

A coleta de larvas dos descendentes das três linhagens foi feita em frascos para oviposição contendo meio de cultura à base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose, conforme mostrado na Figura 12.



**Figura 12:** Frascos com meio para oviposição de *Drosophila melanogaster*, vista lateral e superior.

As moscas adultas foram mantidas nesse meio por 8 horas para cruzamento e oviposição. Após esse período, as moscas adultas foram retiradas dos frascos, restando no meio apenas os ovos. Após  $72 \pm 4$  horas, larvas de terceiro estágio (L3) da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger foram lavadas com água ultrapura (Direct-Q Millipore) e coletadas com auxílio de peneira de malha fina. As larvas foram colocadas em *vials* (Figura 13) (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S. A.) e 5 ml do peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 nas concentrações 0,0002; 0,0004; 0,0008; 0,0016; 0,0032; 0,0064; 0,0128; 0,0256; e 0,0512 mg/ml. As larvas foram submetidas a tratamento crônico por 48 horas, até completarem o processo de metamorfose.



**Figura 13:** Vials com tampa de algodão onde são colocadas as larvas de *D. melanogaster* para realização de tratamento.

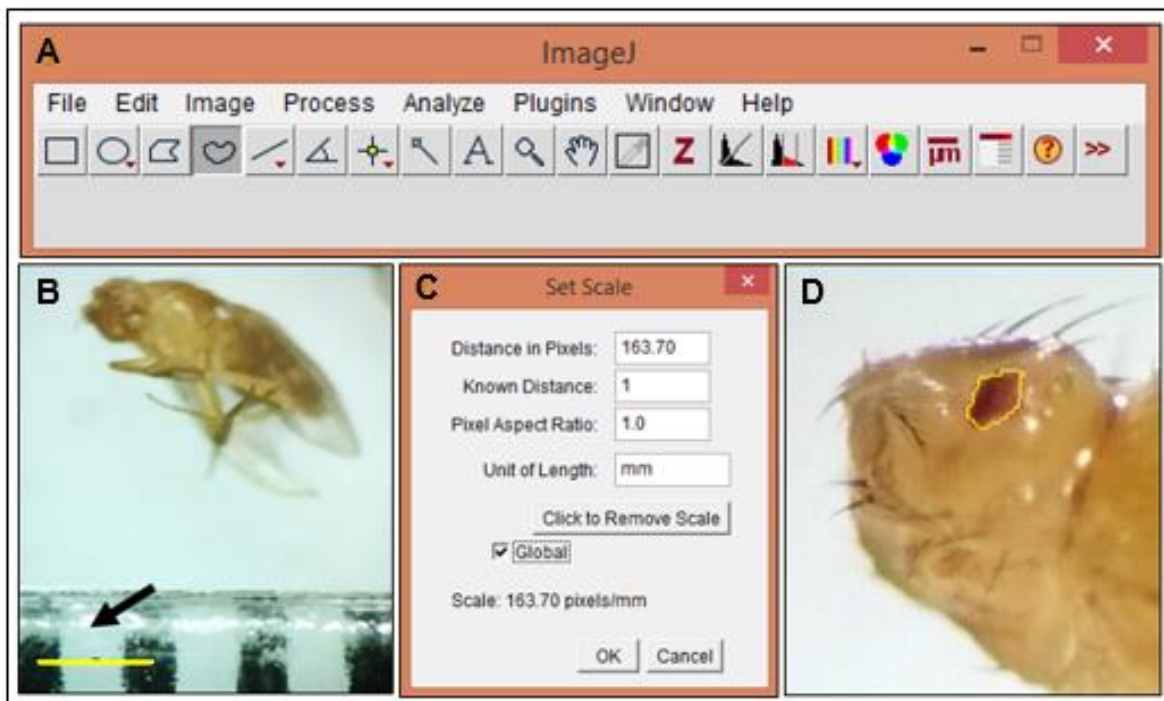
As concentrações utilizadas foram baseadas em ensaio de sobrevivência em *Drosophila melanogaster*, em tratamento de camundongos e PBMCs (Células Mononucleares do Sangue Periférico) com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 (VAZ, 2015). Água ultrapura foi usada para tratamento das larvas no controle negativo.

Para a realização do ensaio de sobrevivência foram tratadas vinte (20) larvas em cada uma das concentrações. Registrou-se quantas larvas se tornaram pupas e quantas pupas eclodiram em adultos.

### 3.3.2 Análise de imagem

Após a eclosão, moscas adultas GMR-GAL4 > UAS-eiger tratadas com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 foram anestesiadas e sacrificadas com éter etílico, fixadas em etanol 70% para visualização em microscópio estereoscópico (*Nikon SMZ 800*, aumento de 2,5X) e fotografadas com câmera fotográfica digital, para análise da área do olho. As imagens obtidas foram analisadas pelo *Software Mac*

*Biophotonics Image J* (Figura 14). Para a análise, a área de cada olho foi selecionada e quantificada em mm<sup>2</sup>.

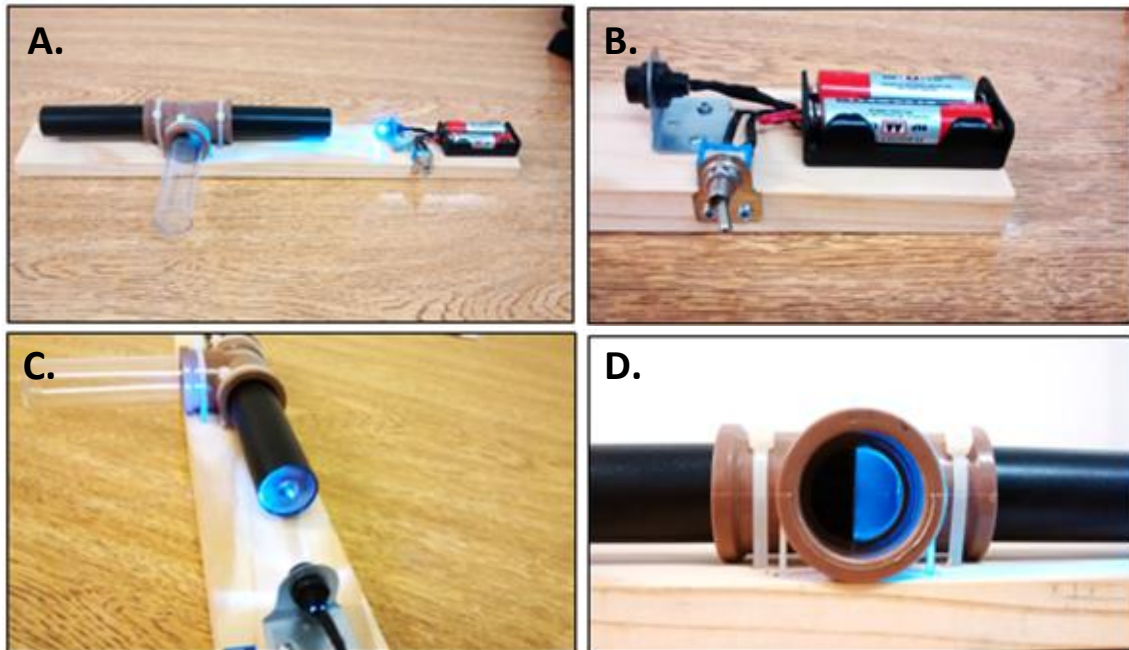


**Figura 14:** Passo-a-passo da quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster* pelo *Software Image J*. **A.** Layout do *software Image J*. **B.** Seleção de comprimento para calibração do tamanho da imagem. **C.** Janela de calibração. **D.** Área do olho selecionada para quantificação.

### 3.3.3 Teste de Sensibilidade à Luz

Para testar o *status* funcional da visão das moscas, foi realizado o Teste de Sensibilidade à Luz. Larvas de terceiro estágio da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 e as moscas que eclodiram foram analisadas.

Foram utilizadas para o teste 30 (trinta) moscas adultas de cada uma das concentrações. Inicialmente, as moscas foram mantidas em um tubo fechado, em ausência de luz (envolto por papel preto) por 3 minutos, para ambientação. Após isso, o tubo de ambientação foi aberto permitindo a migração das moscas para um de dois possíveis caminhos, um deles iluminado e outro totalmente escuro (Figura 15).



**Figura 15:** Aparato para Teste de Sensibilidade à Luz. **A.** Visão geral do aparato. **B.** Dispositivo para criado para iluminar o tubo. **C.** Imagem lateral do aparato. **D.** Visão interna do aparato, mostrando metade iluminada (seta) e metade escura (ponta de seta) para onde podem migrar as moscas. Aparato criado por RODRIGUES, T.S. (2017)

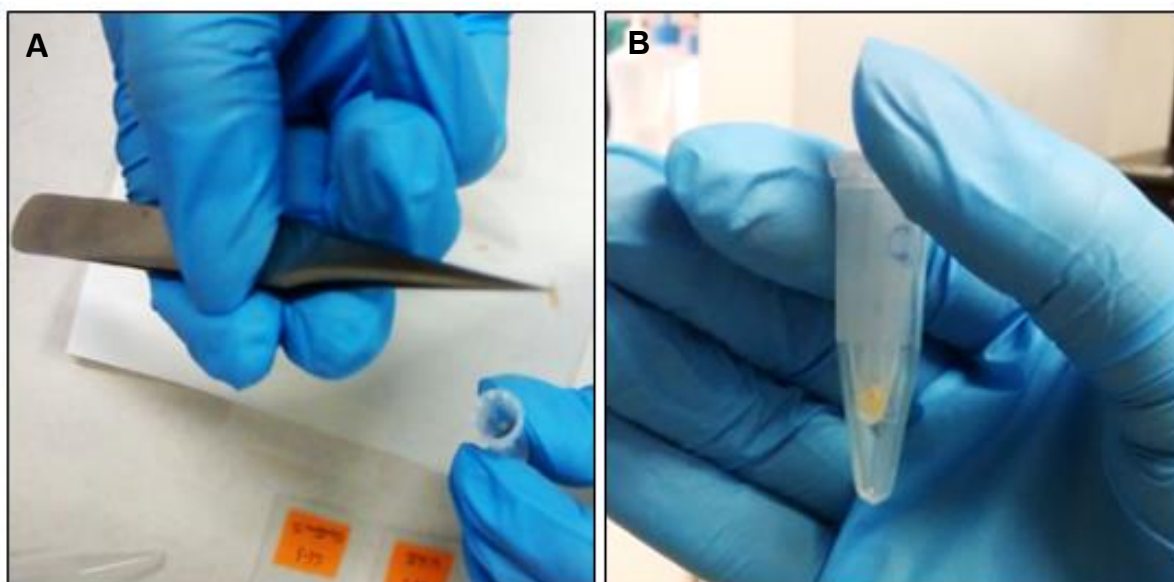
### 3.3.4 Coleta de hemolinfa

Larvas de terceiro estágio (L3) da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger tratadas (concentrações 0,0002; 0,0032; 0,0256 e 0,0512 mg/ml) com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 por 48h e não-tratadas (controle negativo, água) foram retiradas dos frascos de tratamento, contadas, lavadas e secas em papel filtro. Esse procedimento foi realizado, também, para larvas de terceiro estágio (L3) das linhagens selvagem Canton S e mutante White, ambas não-tratadas.

Para a coleta de hemolinfa foi preparado um microtubo de 0,5 ml com pequeno corte transversal no fundo, que foi colocado dentro de um microtubo de 1,5 ml, criando um sistema de filtro para a passagem da hemolinfa (Figura 16).

Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, esterilizada em etanol 70%, foi feita punção na parte distal das larvas, que foram colocadas no microtubo de 0,5 ml (aparato para filtragem) para centrifugação por 10 segundos. Foram coletadas

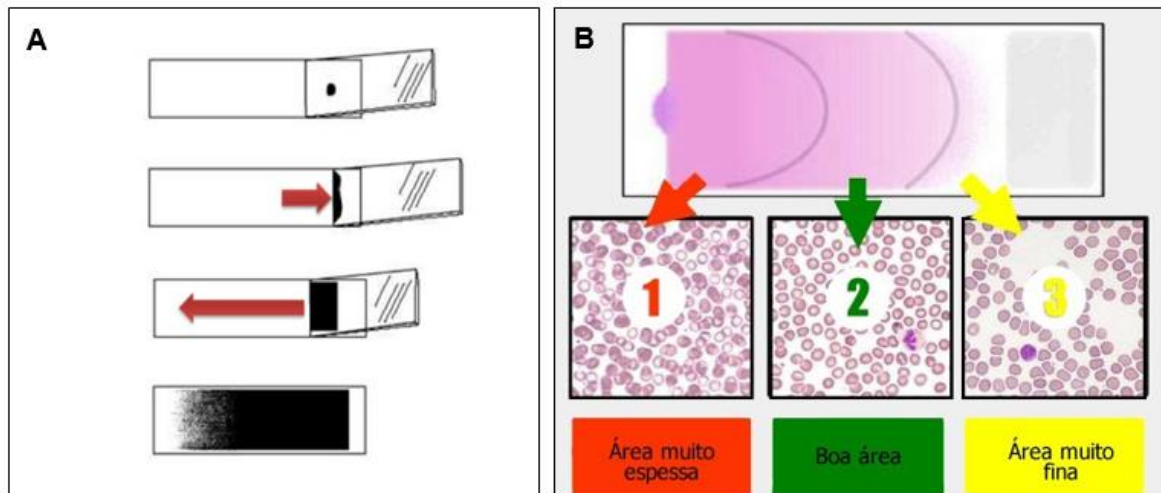
10 (dez) larvas para obtenção de 2 uL de hemolinfa, quantidade suficiente para o esfregaço.



**Figura 16:** Coleta de hemolinfa de larva de terceiro estágio (L3) de *Drosophila melanogaster*. **A.** Coleta de larva e punção com pinça. **B.** Sistema de filtro para coleta de hemolinfa.

### 3.3.5 Preparação dos esfregaços

Os 2  $\mu$ L de hemolinfa foram misturados com PBS (tampão fosfato), na proporção de 1:1 e realizado os esfregaços em lâminas de vidro, para cada uma das concentrações testadas (Figura 17A). Após secagem à temperatura ambiente, os esfregaços foram fixados com álcool metílico por 2 minutos e secos à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com solução de Giemsa, coradas por 10 minutos, lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e cobertas com lamínula para a análise das lâminas.

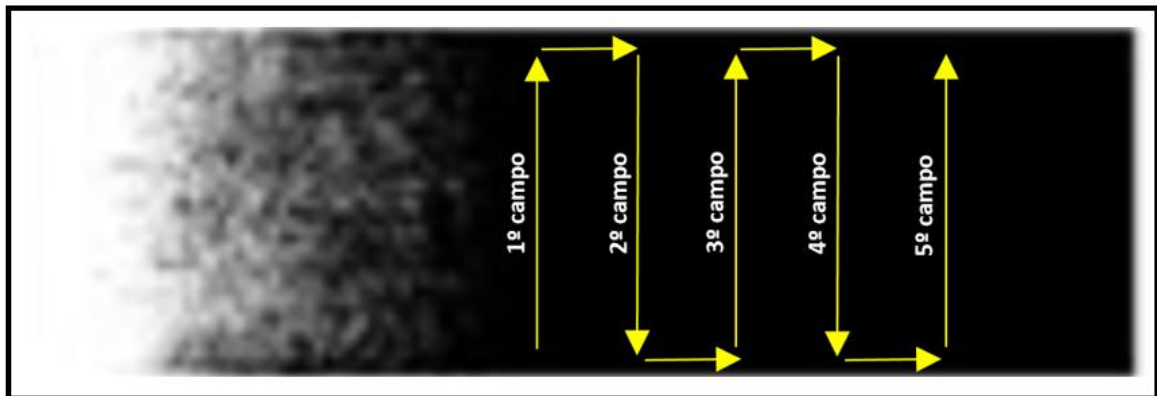


**Figura 17:** Esquema do esfregaço de hemolinfa de *D. melanogaster*. **A.** Passo-a-passo para a confecção de esfregaço. **B.** Esfregaço de sangue humano exemplificando a forma correta de selecionar a área ideal para a realização de contagem de células. Fonte: <<http://www.biomedicinapadiao.com.br/2012/07/pratica-contagem-diferencial-de.html>>.

### 3.3.6 Contagem diferencial de hemócitos

Para realizar a contagem diferencial de hemócitos (Figura 17B) as lâminas de esfregaço foram analisadas em aumento 100X em microscópio de luz (*Leica*) com sistema de captura de imagem acoplado.

As imagens foram capturadas utilizando o *software* LAS EZ. Para contagem foram analisadas e fotografadas 100 (cem) células por esfregaço, diferenciadas segundo variações morfológicas. A Figura 18 demonstra como foi realizada a contagem das células na lâmina.



**Figura 18:** Esquema da leitura de lâmina de esfregaço de hemolinfa de *D. melanogaster*. As setas amarelas mostram a maneira como a lâmina deve ser percorrida para a contagem de células.

### 3.4 Análise da expressão gênica

#### 3.4.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi feita pelo método do TRIZOL (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, *Ambion – Life Technologies*) seguindo as recomendações do fabricante. As pupas de *Drosophila melanogaster* foram maceradas em Trizol (500 mL de Trizol para cada 20 pupas). O tecido foi agitado em vortex e incubado à 30°C por 5 minutos. Adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,5 mL de Trizol, agitação por 15 segundos em vortex e centrifugação a 12000g à 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para microtubo de 1,5 mL, adicionados 500 µL de isopropanol para cada 0,5 mL e incubado em ultrafreezer (- 80°C) por 10 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000g à 4°C por 10 minutos. O *pellet* lavado com 1 ml de etanol 75% gelado e centrifugado a 7500 g à 4°C por 5 minutos. Depois de seco à temperatura ambiente, o RNA foi ressuspendido em água ultrapura. O RNA foi tratado com 10U de DNase I RNase free (Promega) 10X diluída (10 U para cada 10 µg de RNA). A reação foi incubada à 37°C por 1 hora, seguido de aquecimento a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. O RNA foi quantificado em *Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer)* à 260 nm.



### 3.4.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA (RT) foi utilizada a enzima *M-MLV transcriptase reverse* (Promega) e Oligo dT (15) (*Invitrogen*), seguindo instruções dos fabricantes. Na reação de transcrição reversa foi utilizado 1 µg de RNA total tratado, 10 pmol de Oligo dT (15) e 10 mM de dNTP. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos para desnaturar a estrutura secundária do molde e, em seguida, colocada em gelo. Acrescentados 2 µL de tampão M-MLV 10X, 0,1 M de DTT, 200 unidades de M-MLV transcriptase reverse, completando-se o volume para 20 µL com água ultrapura livre de nucleases. A reação foi incubada à 37°C por 50 minutos, seguido de aquecimento a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima.

Apenas a primeira fita do cDNA foi sintetizada por transcrição reversa. A segunda fita foi sintetizada por PCR com o uso de *primers* específicos para os genes alvo. Como controle, foi utilizada amostra sem o cDNA. A qualidade do cDNA foi testada, com o gene de controle endógeno da proteína ribossomal L32 (RPL32). Os *primers* dos genes avaliados neste estudo estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Sequência dos *primers* dos genes avaliados neste estudo.

Gene / Enzima	ID	<i>Primers</i>	Tamanho (pb)	TA (°C)
Ortólogo do TNF-α em humano	eiger	F: ATCGTCATCATCATCGTCG R: TGGCACTCGTTGGCGTTAT	138 pb	59°C
Ortólogo do receptor de TNF-α em humano	wengen	F: ACCTGGCTCTGCTACTGCTGTC R: GCAGCGGAGGATGAAGAGG	72 pb	59°C
Proteína ribossomal L32	RPL32	F: GACCATCCGCCAGCATAC R: CGGCGACGCACTCTGTT	138 pb	59°C

**ID:** Abreviação arbitrária dos nomes dos genes. **pb:** Tamanho dos fragmentos produzidos pelos *primers*, em pares de base. **TA (°C):** temperatura de anelamento, em graus Celsius.

### 3.4.3 Análise por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas simultaneamente para os genes alvo e o gene normalizador (RPL32) em placas de leitura óptica de 96-well, em sete repetições amostrais e duplicata técnica. Nas reações para o gene RPL32, foi utilizado 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 5 pmol de cada primer, 1 µl de cDNA, completando-se com água ultrapura (DirectQ Millipore) autoclavada para um volume final de 10 µl. Nas reações para os genes *eiger* e *wengen*, foram utilizados 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 10 pmol de cada *primer*, 1 µl de cDNA, completando-se com água ultrapura (DirectQ Millipore) autoclavada para um volume final de 10 µl. Todas as reações foram normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação.

As reações de PCR foram processadas em 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto.

O CT (*Cycle threshold*) foi definido de acordo com o primeiro ciclo no qual ocorre um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de PCR. Os valores de CT foram calculados pelo 7300 System Software (Applied Biosystems) e foram usados para calcular a expressão do mRNA do gene de interesse relativo ao mRNA do gene normalizador (RPL32). Os valores de CT foram transformados em valores de quantificação de acordo com o método de Livak e Schmittgen (2001) que é determinado pela resolução da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde CT = *cycle threshold*;  $\Delta CT$  = CT do gene alvo – CT do gene de controle endógeno (RPL32);  $\Delta\Delta CT$  =  $\Delta CT$  da amostra -  $\Delta CT$  da amostra normalizadora. Nesta análise foi utilizado como amostra calibradora um *pool* de amostras de pupa, estágio de desenvolvimento avaliado por esse método.

A especificidade dos produtos de RT-qPCR foi verificada por meio da análise da curva de dissociação de todos os genes. Os produtos da RT-qPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em Tampão TBE 1X (TRIS Base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) corado com Brometo de Etídeo (0,5 mg/mL) e visualizado em Fotodocumentador (*Image Quant 150, GE*). Para

acompanhar a migração dos fragmentos amplificados foram utilizados marcadores de peso molecular de 50 pb e de 100 pb (*Ludwig Biotec*).

### **3.5 Análise estatística**

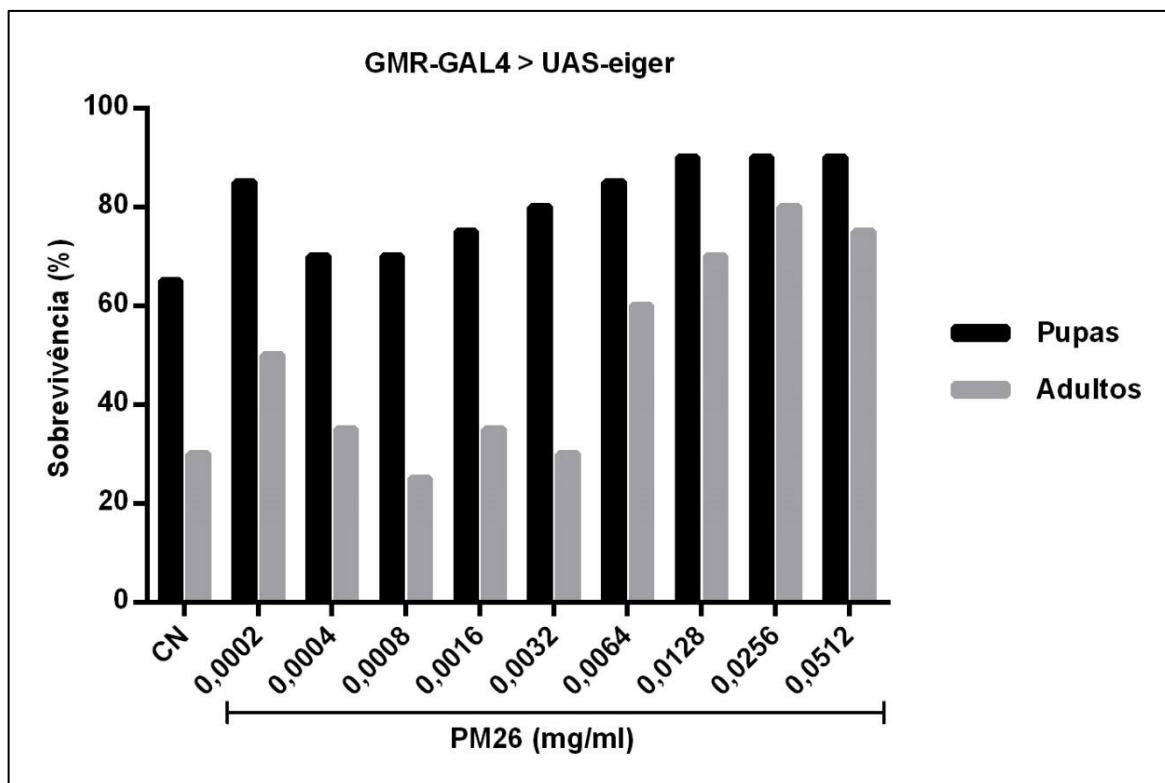
Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* (Version 6.00). Para a análise da área do olho da mosca, o teste de normalidade utilizado foi o Teste *D'Agostino & Pearson*, seguido pelo Teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações, com valor de  $p \leq 0,05$ , seguido pelo pós-teste *Dunn's* para múltiplas comparações.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste de sobrevivência

A escolha das concentrações utilizadas nos experimentos para testar o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* foi feita mediante ensaio de sobrevivência em larvas expostas a diferentes concentrações do peptídeo. Os resultados são apresentados na figura 19. As moscas da linhagem GMR-GAL-4 > UAS-eiger mostraram prejuízo na taxa de sobrevivência. A elevada produção de TNF- $\alpha$  nessa linhagem transgênica, parece afetar o processo de metamorfose, interferindo na sobrevivência das moscas.

As concentrações 0,0008 mg/ml e 0,0032 mg/ml afetaram o processo de metamorfose, interferindo na sobrevivência das moscas. Todos os demais grupos tratados apresentaram aumento das taxas de sobrevivência, ou seja, mais larvas transformaram-se em pupa e mais pupas eclodiram em adultos.

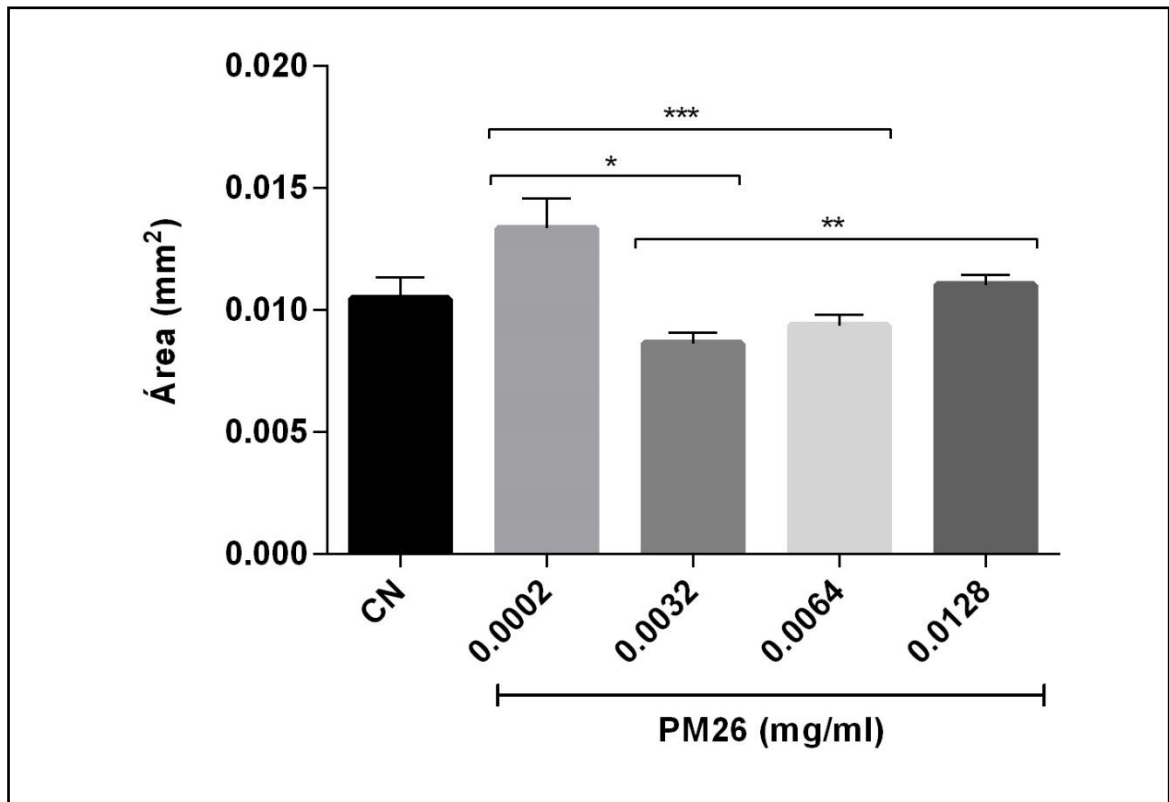


**Figura 19:** Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* tratadas com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1. **CN** = controle negativo (água). **pm26TGF- $\beta$ 1** (concentrações em mg/ml).

#### 4.2 Quantificação da área do olho

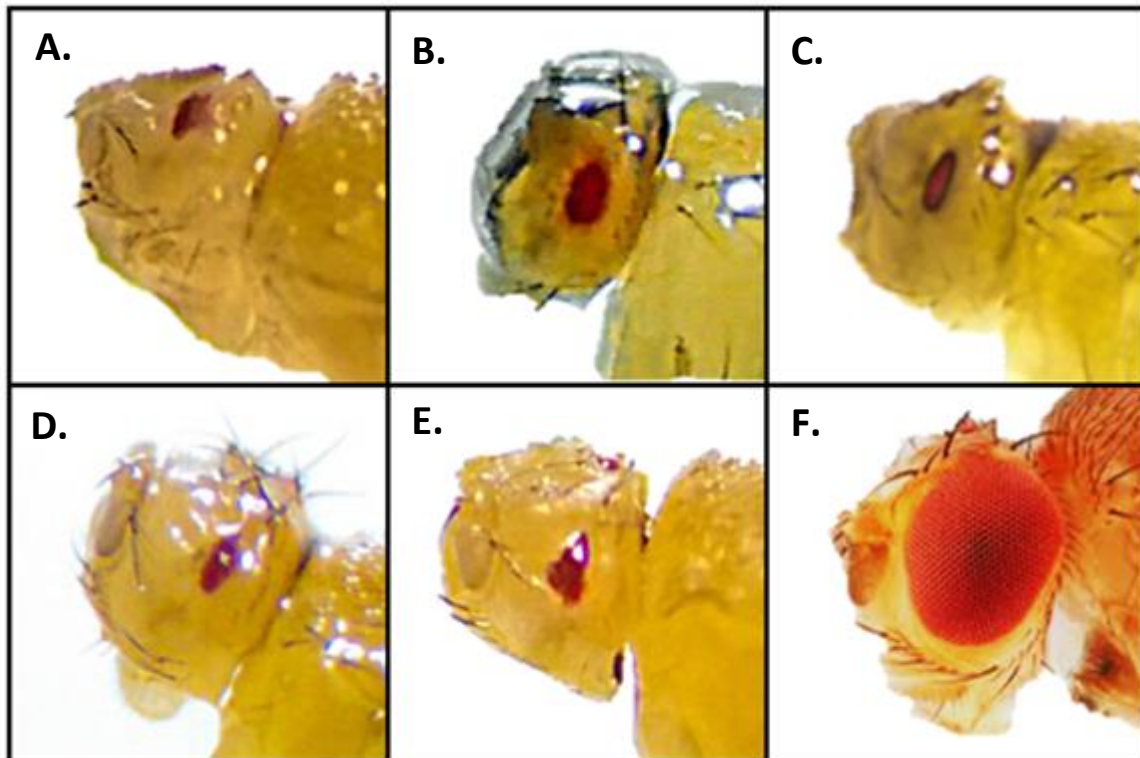
A partir do resultado do Teste de Sobrevivência, larvas de terceiro estágio (L3) de *Drosophila melanogaster* foram tratadas com pm26TGF- $\beta$ 1 nas concentrações de 0,0002; 0,0032; 0,0064; 0,0128 mg/ml e após eclosão, foi feita análise da área do olho.

Após verificar que os resultados obtidos em quatro experimentos independentes eram concordantes, com boa reprodutibilidade, os dados foram agrupados, totalizando uma média de 20 (vinte) moscas analisadas por concentração de tratamento. Os resultados estão dispostos nas Figuras 20 e 21.



**Figura 20:** Resultado da quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster*, linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, tratada com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 (concentrações 0,0002; 0,0032; 0,0064 e 0,0128 mg/ml) e não-tratada (CN, controle negativo, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$  teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

O grupo tratado com uma concentração de 0,0002 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1, apresentou aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da área do olho em relação aos grupos tratados com 0,0032 g/ml e 0,0064 mg/ml. O grupo tratado com 0,0128 mg/ml de peptídeo apresentou um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da área do olho em relação ao grupo tratado com 0,0032 g/ml.



**Figura 21:** Imagens de cabeças de *Drosophila melanogaster* mostrando a área do olho (seta no olho) nos diferentes grupos tratados e no controle. Concentrações de tratamento: **A.** CN – controle negativo, tratado com água. **B.** 0,0002 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1. **C.** 0,0032 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1. **D.** 0,0064 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1. **E.** 0,0128 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1. **F.** Olho de mosca *Canton S*, linhagem selvagem sem tratamento, olho de tamanho normal.

Verifica-se que o grupo tratado com 0,0002 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1 foi o que apresentou o melhor resultado para o aumento da área do olho. O tratamento com 0,0032 mg/ml mostrou o pior resultado, quase não diferindo do CN (controle negativo).

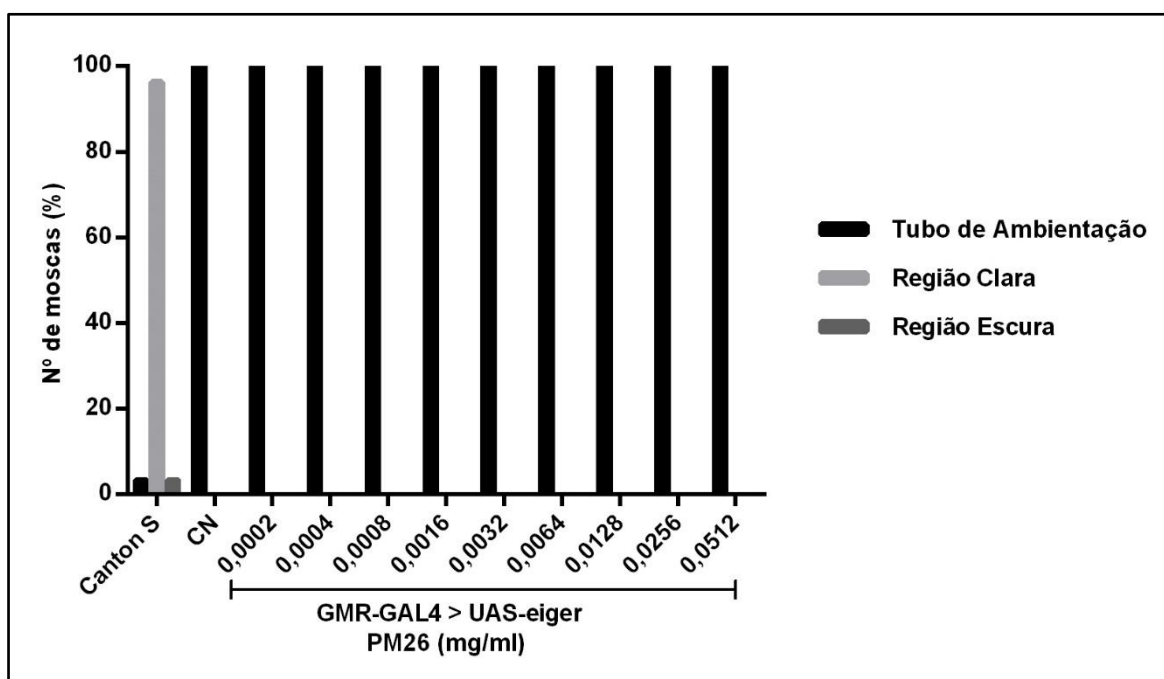
Os resultados apresentados na Figura 21 corroboram os resultados da mensuração da área do olho (Figura 20) para o tratamento com diferentes concentrações do peptídeo sintético.

### 4.3 Teste de Sensibilidade à Luz

O teste de sensibilidade à luz foi realizado para verificar se as alterações da área do olho nas moscas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger tratadas com pm26TGF- $\beta$ 1 seriam acompanhadas de alteração funcional na visão. As linhagens

com formação normal do olho e visão em perfeitas condições, representadas nesse teste pela linhagem selvagem *Canton S*, migram instintivamente em direção à luz. Essa fototaxia foi utilizada como parâmetro para verificar se as moscas da linhagem de olho reduzido recuperaram, além da área do olho, a visão.

A linhagem controle *Canton S* respondeu ao estímulo luminoso, com fototaxia positiva, conforme esperado. Noventa e seis por cento (96,34%) das moscas *Canton S* colocadas no Aparato para Teste de Sensibilidade à Luz, migraram para a região iluminada em menos de cinco segundos; 3,3% permaneceram no tubo de ambientação e outros 3,33% migraram para a região escura do Aparato. Cem por cento (100%) das moscas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger não tratadas e tratadas com o pm26TGF- $\beta$ 1, permaneceram no tubo de ambientação (Figura 22).

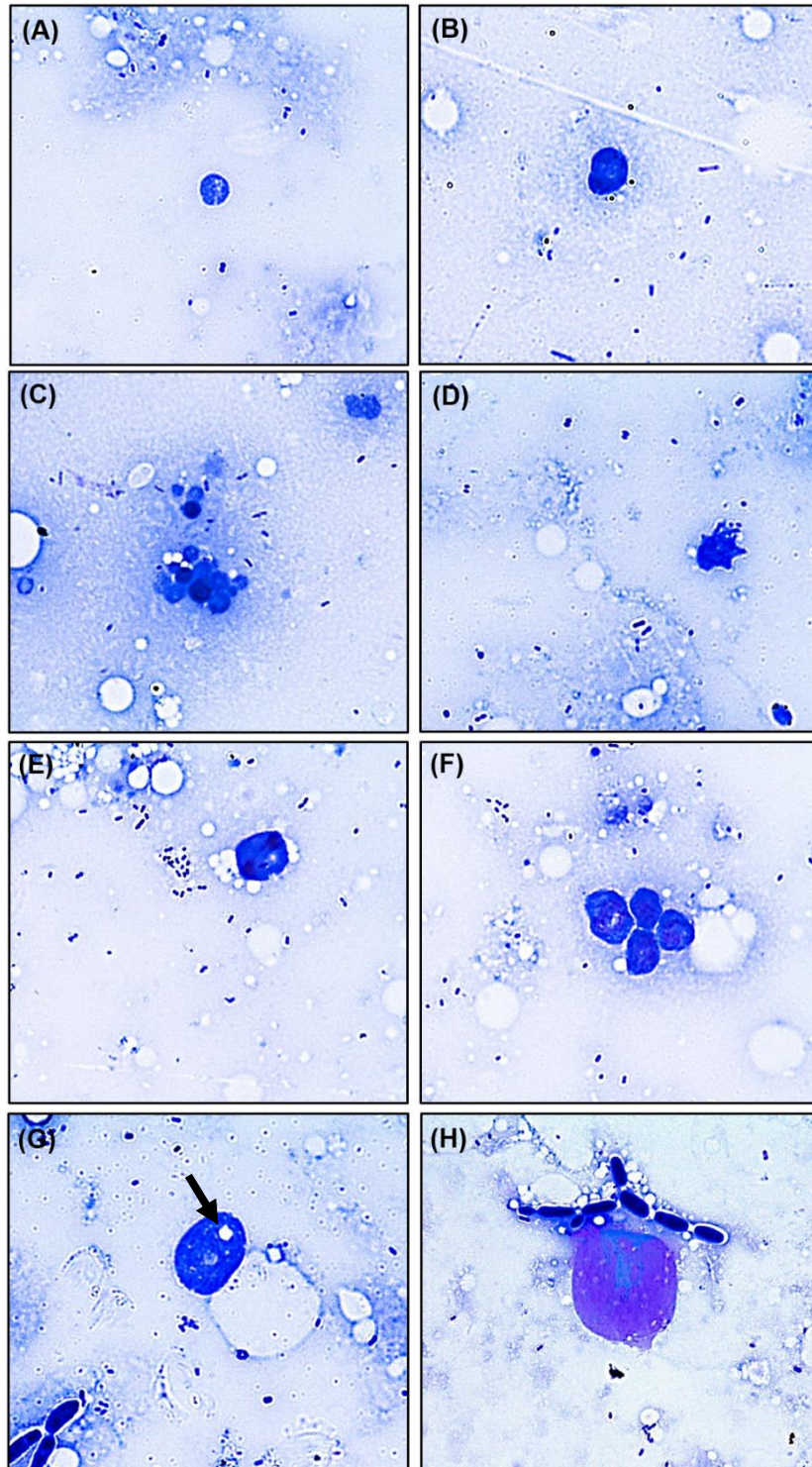


**Figura 22:** Teste de Sensibilidade à Luz de grupos tratados e não tratados com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger (grupos tratado e não tratado) e linhagem selvagem *Canton S* (não tratada) de *D. melanogaster*.



#### **4.4 Análise dos Hemócitos**

Durante a análise para contagem de hemócitos, esses tipos foram analisados nas lâminas de esfregaço de hemolinfa de *D. melanogaster*. As imagens capturadas estão dispostas na Figura 23.

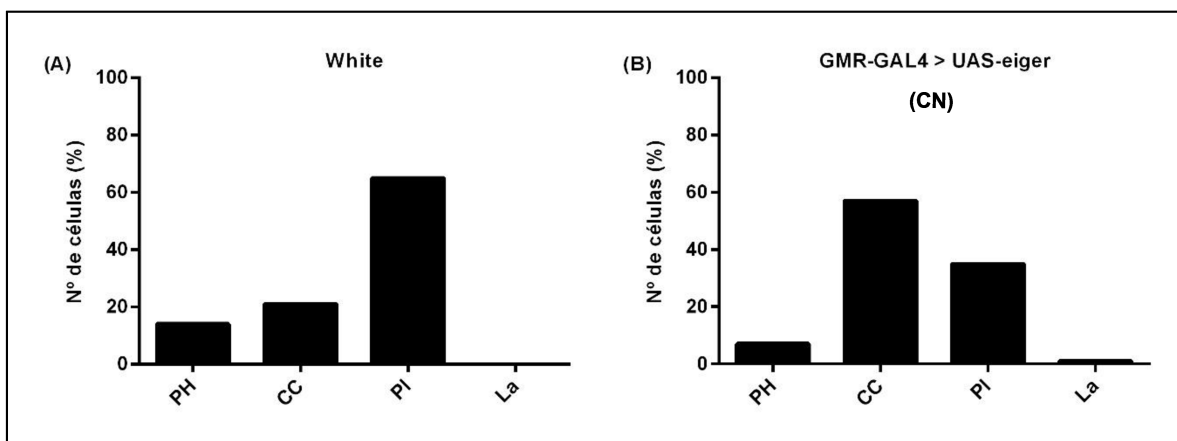


**Figura 23:** Morfologia dos diferentes tipos de hemócitos em hemolinfa de *Drosophila melanogaster*. **A.** Pró-hemócito. **B.** Pró-hemócito sugerindo processo de mitose. **C.** Aglomerado de pró-hemócitos. **D.** Plasmatócito emitindo projeções. **E.** Plasmatócito sugerindo processo de mitose. **F.** Aglomerado de plasmatócitos. **G.** Célula Cristalina contendo cristal de melanina (seta). **H.** Lamelócitos.

A contagem diferencial de hemócitos (CDH) representa a contagem individual dos tipos de hemócitos numa população total. Em primeiro lugar foi realizada a CDH na linhagem mutante *White* e linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger. A linhagem *White* é sempre utilizada para a construção de linhagens transgênicas e, por esse motivo, foi incluída em nossas análises, como controle do teste. Em seguida, foram analisadas as moscas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger tratadas com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1. A CDH nas linhagens analisadas mostrou:

- **White:** 14% de pró-hemócitos, 21% de células cristalinas, 65% de plasmatócitos. Nenhum lamelócito foi encontrado entre as 100 (cem) células contadas.
- **GMR-GAL4 > UAS-eiger:** 7% de pró-hemócitos, 57% de células cristalinas, 35% de plasmatócitos e 1% de lamelócitos.

Os dados estão representados em gráficos nas Figuras 24.

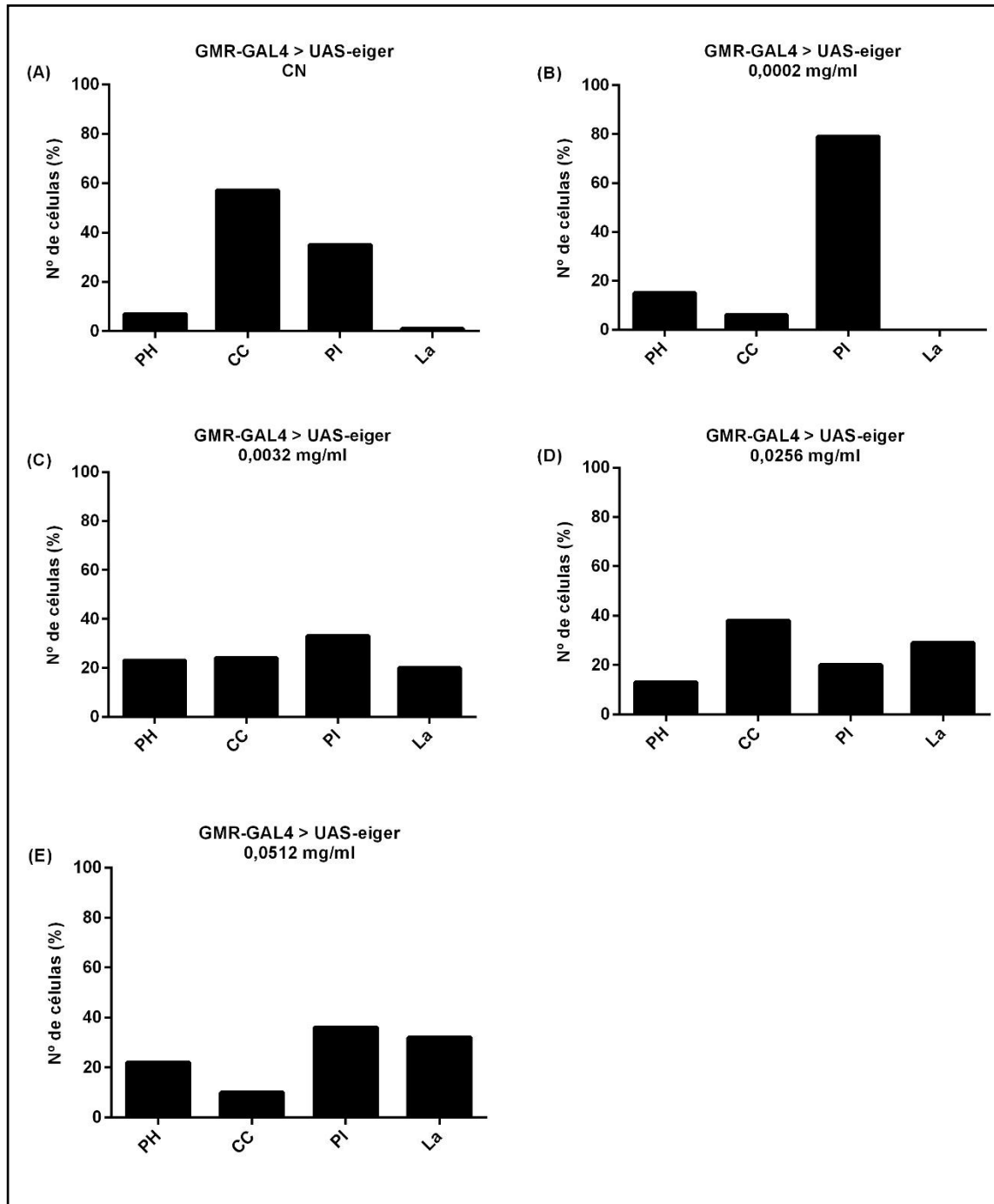


**Figura 24:** Contagem diferencial de hemócitos de larvas de terceiro estágio (L3) das linhagens *White* e GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster*. **A.** Linhagem mutante *White*, não-tratada. **B.** Linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger, não-tratada (CN). **(PH)** Pró-hemócitos. **(CC)** Células Cristalinas. **(PI)** Plasmatócitos. **(La)** Lamelócitos.

A linhagem *White* apresentou, predominantemente, plasmatócitos e a linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, células cristalinas. O número de pró-hemócitos encontrados foi cerca de duas vezes maior na linhagem *White*. As linhagens

apresentaram resultados similares apenas na CDH de lamelócitos, praticamente ausentes nas duas.

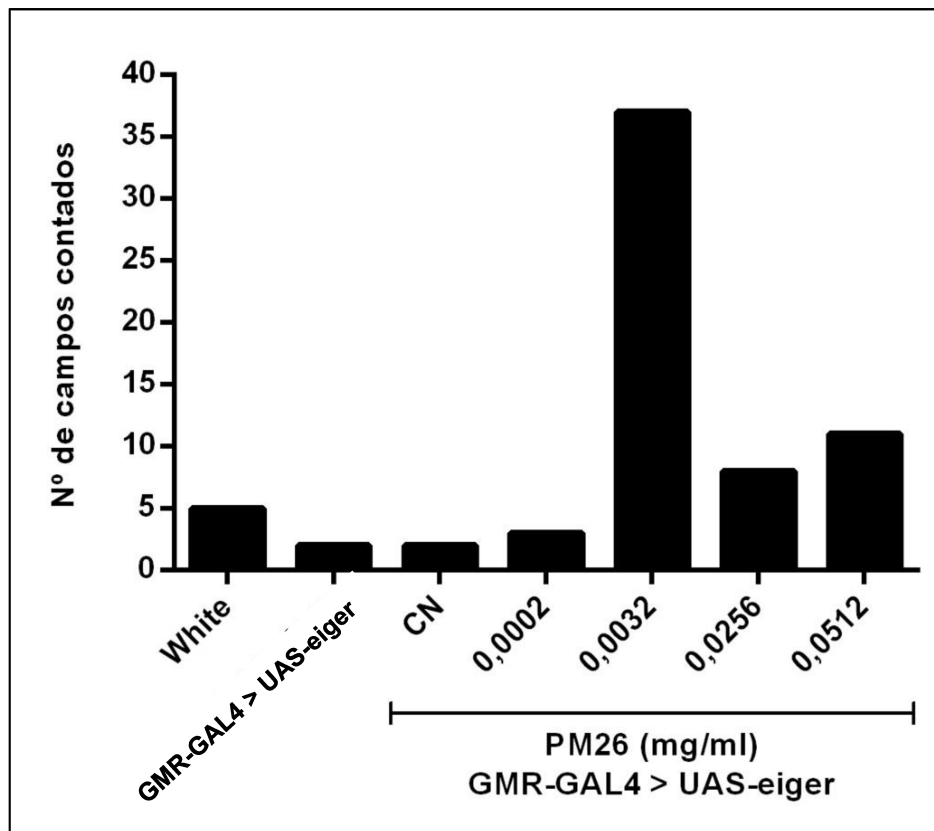
A mesma análise foi feita com larvas de terceiro estágio tratadas com o peptídeo. A Figura 25 mostra que houve aumento no número de pró-hemócitos nas larvas tratadas quando se compara ao controle negativo. Foi observado uma queda 51% (57% no CN e 6% em 0,0002mg/ml) no número de células cristalinas na concentração de 0,0002 mg/ml em relação ao grupo controle negativo. Mesmo aumentando nas concentrações seguintes, a saber 24% em 0,0032 mg/ml; 38% em 0,0256 mg/ml e 10% em 0,0512 mg/ml, o número de células cristalinas ainda se manteve inferior ao número encontrado no controle negativo tratado com água, (57%). O número de plasmatócitos aumentou na concentração 0,0002 mg/ml (79%); se manteve similar ao controle negativo (35%) nas concentrações 0,0032 mg/ml (33%) e 0,0512 mg/ml (36%) e inferior a ele na concentração de 0,0256 mg/ml (20%). O número de lamelócitos, quase ausente no controle negativo (1%) e ausente na concentração de 0,0002 mg/ml, aumentou à medida que aumentou a concentração de tratamento com o peptídeo com, 20% em 0,0032 mg/ml; 29% em 0,0256mg/ml e 32% em 0,0512 mg/ml.



**Figura 25:** Contagem diferencial de hemócitos de larvas de terceiro estágio (L3) da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* de grupos tratado e não-tratado (CN) com o peptídeo sintético pm26-TGF- $\beta$ . **A.** CN, grupo tratado com água. **B.** Grupo tratado com 0,0002 mg/ml de pm26-TGF- $\beta$ 1. **C.** Grupo tratado com 0,0032 mg/ml **D.** Grupo tratado com 0,0256 mg/ml. **E.** Grupo tratado com 0,0512 mg/ml do peptídeo. **(PH)** Pró-hemócitos. **(CC)** Células Cristalinas. **(PI)** Plasmatócitos. **(La)** Lamelócitos.

A contagem diferencial de hemócitos na hemolinfa dos grupos de tratamento e controle foi feita em 100 (cem) células.

Na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger não tratada, grupo controle negativo (tratado com água) e grupo tratado com 0,0002 mg/ml de pm26TGF- $\beta$ 1, o número de hemócitos foi maior do que na linhagem mutante (*White*) utilizada como controle. Para o tratamento 0,0032 mg/ml, foi necessário a contagem de 37 (trinta e sete) campos para a obtenção de 100 (cem) células, devido à redução do número de hemócitos. As concentrações 0,0256 e 0,0512 mg/ml, também promoveram a redução no número de hemócitos. A Figura 26 apresenta, graficamente, o número de campos percorridos para obtenção dos hemócitos.

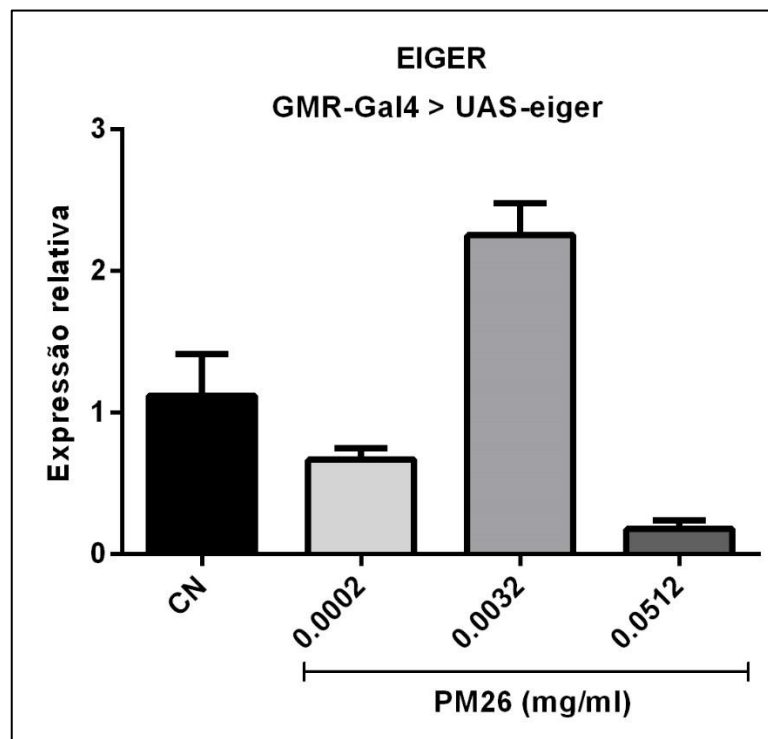


**Figura 26:** Número de campos contados na lâmina de esfregaço de hemolinfa, de *Drosophila melanogaster* por linhagem/concentração de tratamento, para obter a contagem de 100 (cem) hemócitos.

## 4.5 Análise da Expressão dos Genes Codificadores de Eiger e Wengen em *Drosophila melanogaster*

### 4.5.1 Níveis de Transcritos do gene eiger em *Drosophila melanogaster*

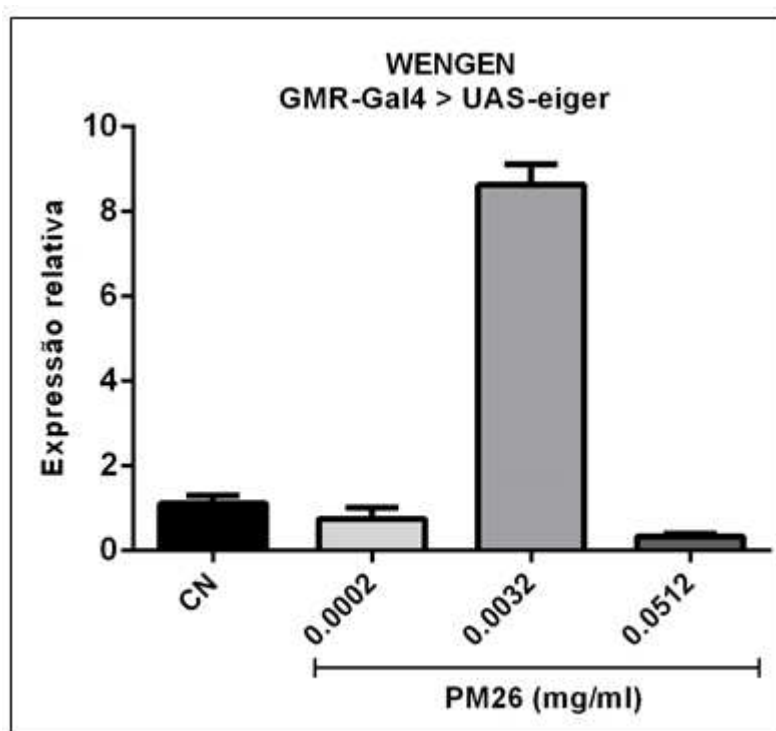
O gene *eiger* em *Drosophila melanogaster* é codificador da proteína ortóloga do TNF- $\alpha$  humano (Eiger). Nas pupas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-*eiger* de *Drosophila melanogaster* tratadas com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, os transcritos do gene *eiger* apresentaram diferentes perfis nas concentrações de tratamento. A expressão relativa de *eiger* na concentração de 0,0002 mg/ml foi menor do que a do controle negativo (tratado com água). Ocorre aumento da expressão relativa de *eiger* na concentração de 0,0032 mg/ml, seguida de queda na concentração de 0,0512 mg/ml de peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 (Figura 27).



**Figura 27:** Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene *eiger* obtida por RT-qPCR na linhagem GMR-GAL4 > UAS-*eiger* de *Drosophila melanogaster* tratada e não-tratada (CN) com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1.

#### 4.5.2 Níveis de Transcritos do gene wengen em *Drosophila melanogaster*

O gene wengen em *Drosophila melanogaster* é codificador da proteína ortóloga do receptor de TNF- $\alpha$  humano (Wengen). Em pupas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* tratadas com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1, os transcritos do gene wengen (Figura 28) apresentaram a mesma expressão relativa observada para o gene eiger. A expressão relativa de wengen na concentração de 0,0002 mg/ml foi menor do que controle negativo (tratado com água). Na concentração de 0,0032 mg/ml, houve aumento da expressão relativa de wengen, seguida de queda de expressão na concentração de 0,0512 mg/ml de peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1.



**Figura 28:** Representação gráfica (média e desvio padrão) da expressão relativa do gene wengen obtida por RT-qPCR na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* tratada com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1.



## 5 DISCUSSÃO

A resposta inflamatória e a morte celular são processos essenciais para a manutenção da homeostase do organismo, porém precisam ser cuidadosamente modulados pelo sistema imune para não se tornarem prejudiciais, causando lesões e danos irreversíveis ao tecido (MAHER *et al.*, 2014). Dessa forma, a busca por novos medicamentos que tratem com eficácia e baixa toxicidade as doenças inflamatórias tem despertado o interesse dos pesquisadores e das grandes empresas farmacêuticas.

Moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes são denominadas de citocinas. A citocina TGF- $\beta$ 1 atua em diversos processos biológicos como proliferação celular, diferenciação, adesão e apoptose (ZHANG *et al.*, 2014; SANTIBANEZ, 2011). Sua ação anti-inflamatória envolve amplo espectro de alterações que ocorrem em diferentes vias que, juntas, contribuem para o controle do processo inflamatório (GOTLIEB, 2011). Apesar de muitos estudos, os processos em que TGF- $\beta$ 1 está envolvido e sua atuação no processo de apoptose ainda não estão bem estabelecidos, pois pode atuar como agente pró ou anti-apoptótico (Figura 10) dependendo do contexto biológico (CAPELO, 2005; CHEN *et al.*, 2012; SOWA, 2003; WU *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de possíveis fármacos associados à via TGF- $\beta$  é de grande importância para o tratamento de doenças imunes, como artrite reumatoide, visando a redução do processo inflamatório por várias vias, como as induzidas pelo Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) (LOCKSLEY *et al.*, 2001).

Os componentes da família do fator de necrose tumoral (TNF) estão envolvidos na regulação da infecção, inflamação, doenças autoimunes e homeostase dos tecidos (LOCKSLEY *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 1994). A ligação de TNF ao seu receptor, TNFR, leva ao recrutamento de uma série de proteínas citosólicas para os seus domínios citoplasmáticos e resulta na ativação de caminhos de morte via NF- $\kappa$ B e JNK (BAKER e REDDY, 1996; LOCKSLEY *et al.*, 2001).

Um estudo desenvolvido no Laboratório de Nanobiotecnologia, do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (Minas Gerais, Brasil)

levou à seleção, pela técnica de *Phage Display*, de um peptídeo sintético, mimético de TGF- $\beta$ 1 humano, com potencial similar ou maior do que a própria molécula (VAZ *et al.*, 2015).

O peptídeo sintético, denominado pm26TGF- $\beta$ 1, mimetiza uma porção da molécula de TGF- $\beta$ 1. Ensaios *in vivo*, *in vitro* e análise estrutural demonstraram que o peptídeo reconhece, com sucesso, o receptor T $\beta$ RII com ligação de alta afinidade (HINCK e O'CONNOR-MCCOURT, 2011; VAZ *et al.*, 2015). Além disso, pm26TGF- $\beta$ 1 foi capaz de diminuir a liberação de TNF- $\alpha$  no processo inflamatório em PBMCs estimuladas com LPS e PMA, ambos associados à ativação de NF- $\kappa$ B (CRANE *et al.*, 2014) que resulta na produção de TNF- $\alpha$  (SLOBODIN *et al.*, 2007). Apesar dos níveis de TNF- $\alpha$  não terem sido dosados nos tratamentos *in vivo*, a redução do rolamento de leucócitos e da migração de neutrófilos podem ser evidências da capacidade do peptídeo em reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  (VAZ *et al.*, 2015).

As vias pelas quais o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 contribui para a redução do processo inflamatório são ainda desconhecidas, apesar do indicativo de sua ação na redução dos níveis de TNF- $\alpha$ .

Informações sobre a ação combinada de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 são de extrema importância para o entendimento de mecanismos de morte celular e processos inflamatórios. Em *Drosophila melanogaster* existem ortólogos para as citocinas TNF- $\alpha$  (Eiger em *D. melanogaster*) e TGF- $\beta$ 1 (Dpp em *D. melanogaster*) e seus respectivos receptores, o que a torna um modelo biológico ideal para essa análise.

Nossa pergunta foi: “O efeito protetor do peptídeo mimético pm26TGF- $\beta$ 1 pode ter ação na via de morte celular induzida por TNF- $\alpha$ ”?

Para responder essa pergunta, nossa proposta foi utilizar o organismo modelo *D. melanogaster* para avaliar se o efeito protetor do peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, que mimetiza o TGF- $\beta$ 1 humano, pode ocorrer pela via de morte celular induzida por TNF- $\alpha$ .

Os experimentos conduzidos nesse estudo foram realizados na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *D. melanogaster*, que apresenta superexpressão do gene eiger, ortólogo de TNF- $\alpha$  humano, direcionado para o tecido do olho, onde produz o fenótipo de olho reduzido (Figura 6).

Como não há estudos com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1, além daquele que descreve sua seleção e realiza testes iniciais para a compreensão de suas funções

(VAZ *et al.*, 2015) nosso trabalho é o primeiro a testar em *Drosophila melanogaster* o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, mimético de TGF- $\beta$ 1 humano.

Para a escolha das concentrações de tratamento, partimos de uma análise das concentrações realizada por Vaz *et al.* (2015) em camundongos e em células PBMCs. Os efeitos descritos no trabalho desses autores foram obtidos com concentrações de 1 – 3 mg/kg de peso animal. Iniciamos nossas concentrações com o valor médio dessa concentração, ajustada para a diluição no meio de tratamento para *D. melanogaster*, padronizado em 5 mililitros. Com isso, obtivemos a concentração inicial de tratamento da ordem de 0,0002 mg/ml de meio, a partir da realização do Teste de Sobrevivência. As concentrações seguintes tinham o valor anterior dobrado.

O peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 não gerou toxicidade para as larvas expostas cronicamente (48 horas) por ingestão junto ao alimento (meio de fubá). Esse dado é a primeira evidência de interferência sistêmica positiva do tratamento das moscas com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1. Esse efeito sistêmico pode estar ocorrendo pelo fato de existirem receptores para o peptídeo em vários tecidos, onde deve haver receptores para o ortólogo de TGF- $\beta$  humano. Apesar do enfoque ser na via de apoptose, outras vias podem estar sendo influenciadas pela ação do peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1. Essa ação sistêmica ainda deve ser investigada.

Observamos que o número de larvas que se transformaram em pupa e, posteriormente, eclodiram em adultos aumentou na concentração de 0,0002 mg/ml de peptídeo e se manteve próximo ao número observado no controle negativo (tratado com água) nas concentrações de 0,0004 mg/ml e 0,0016 mg/ml. Nas concentrações de 0,0008 mg/ml e 0,0032mg/ml, a taxa de sobrevivência caiu, tornando-se menor do que no grupo não-tratado e, a partir da concentração 0,0064 mg/ml, a taxa de sobrevivência das moscas voltou a aumentar (Figura 19). Verificamos, assim, que, na maioria das concentrações, o peptídeo melhorou a taxa de sobrevivência, durante a metamorfose da mosca. Essa ação positiva não mostrou linearidade, pois ocorreu queda no número de pupas eclodidas em algumas concentrações intermediárias.

A linhagem utilizada para o tratamento com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 apresenta desenvolvimento normal do olho (não é formado ou tem sua formação

gravemente prejudicada) devido ao alto nível de TNF- $\alpha$  presente naquele tecido, gerando fenótipo olho reduzido.

A reversão desse fenótipo seria uma das melhores evidências da ação anti-apoptótica do peptídeo pelo bloqueio da via de apoptose, através da redução dos níveis de Eiger (ortólogo de TNF- $\alpha$ ) e não ativação da via JNK (IGAKI *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2001). Sabemos que eiger ativa a via JNK e causa apoptose das células. Após tratamento das moscas com o peptídeo sintético mimético de TGF- $\beta$ 1 humano, os adultos que eclodiram tiveram seus olhos avaliados quanto à reversão do fenótipo de olho reduzido e mensuração da área recuperada. Os resultados mostraram que houve aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da área do olho na concentração de 0,0002 mg/ml. A concentração de 0,0032 mg/ml levou à redução da área do olho quando comparada ao controle negativo (tratado com água). A área volta a ser recuperada nas concentrações seguintes do peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 (Figuras 20 e 21). O tratamento com o peptídeo alterou a área dos olhos das moscas, porém a melhora não mostrou simetria para os dois olhos de um mesmo indivíduo. Conclui-se, até aqui, que o peptídeo é eficaz para reduzir a morte de células durante o desenvolvimento do olho, permitindo o desenvolvimento desse.

Para analisar se o aumento observado na área do olho das moscas veio acompanhado de ganho funcional da visão, projetamos um aparato para realização de Teste de Sensibilidade à Luz (Figura 15, RODRIGUES, 2017). Esse teste baseia-se no comportamento de fototaxia da mosca. Diante de dois ambientes, um iluminado e outro sem luz, as moscas, instintivamente, migram para o ambiente com luz (DUBNAU, 2014).

Quando as moscas da linhagem *Canton S* (selvagem e controle) com olhos normalmente desenvolvidos, foram colocadas nesse Aparato, cerca de 94% delas saíram do tubo de ambientação e migraram para a região clara, em menos de 5 (cinco) segundos. O mesmo teste com as moscas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger tratadas com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 e com recuperação parcial do olho, mostrou que, após três minutos, elas ainda permaneciam no tubo de ambientação (Figura 22). Duas explicações são possíveis para isso: primeiro, apesar da área do olho ter aumentado nas moscas, em alguns tratamentos, isso não foi suficiente para recuperar a estrutura dos omatídeos (células responsáveis

pela composição do olho e pela visão da mosca) e segundo, que houve recuperação parcial da visão, que permitiu detectar a baixa luminosidade do tubo de ambientação como área suficientemente clara, levando à permanência delas nesse tubo. Rieger *et al.* (2007) avaliaram as preferências de luz de *D. melanogaster* deixando as moscas escolherem, entre ambientes de diferentes iluminações, aquele mais confortável para se alimentarem e repousarem. O método revelou que as moscas preferem ambientes com luz fraca, como pode ter ocorrido aqui, com as moscas que permaneceram no tubo de ambientação. Não é possível concluir, ainda, se elas voltaram a enxergar.

Durante a realização dos demais testes observamos um possível prejuízo na motilidade das moscas da linhagem GMR-GAL > UAS-eiger. Se esse prejuízo realmente existir, ele estará prejudicando a migração dessas moscas para os campos claro ou escuro, sendo uma terceira hipótese para justificar a permanência delas no tubo de ambientação. Outras metodologias serão utilizadas para testar a locomoção dessas moscas, para explicar os resultados obtidos no Teste de Sensibilidade à Luz.

Para avaliar a ação do peptídeo no processo inflamatório, realizamos a contagem diferencial de hemócitos em esfregaço de hemolinfa de larvas de terceiro estágio de *Drosophila melanogaster*. Nesse estágio larval, podem ser encontrados, além da célula precursora (pró-hemócito), três classes de células: plasmatócitos, células cristalinas e lamelócitos (HARTENSTEIN, 2006).

Noventa e cinco por cento (95%) dos hemócitos circulantes em larvas L3 saudáveis, são plasmatócitos. Os plasmatócitos são semelhantes aos monócitos/macrófagos de mamíferos e funcionam como guardiões para manter a homeostase das células e tecidos e efetuar o reconhecimento do patógeno para respostas imunes subsequentes. São responsáveis pela remoção de detritos apoptóticos, fagocitose de microrganismos invasores e reparação de tecidos danificados (EVANS *et al.*, 2003; HARTENSTEIN, 2006).

As células cristalinas são maiores que os plasmatócitos. Esse tipo celular corresponde a, aproximadamente, 5% dos hemócitos circulantes na hemolinfa da mosca. As inclusões dessas células contêm grandes quantidades de componentes do processo de melanização, envolvendo uma cascata de serinas/proteases que levam à síntese de melanina. São as principais executoras da memória inata. A

melanina é crucial para evitar a perda de hemolinfa em injúrias, imobilizar patógenos microbianos e facilitar a cicatrização de feridas. O subproduto de seus radicais livres pode matar diretamente microrganismos (BINGGELI et al., 2014; HARTENSTEIN, 2006).

Diferentes fisicamente dos plasmatócitos e das células cristalinas, os lamelócitos são planos, adesivos e maiores que todos os outros tipos hemócitos de *Drosophila melanogaster*. Pode encapsular invasores maiores e são capazes de, com o auxílio de células cristalinas, lançar uma cascata de melanização para destruir parasitas invasores. São essenciais na imunidade contra infecção parasitária. São formados a partir da diferenciação de plasmatócitos e, raramente, são vistos em larvas saudáveis (HARTENSTEIN, V., 2006; RIZKI, 1992)

Primeiramente, realizamos a contagem diferencial de hemócitos na linhagem GMR-GAL > UAS-eiger não-tratada com o peptídeo e comparamos o resultado com o perfil de uma linhagem mutante (*White*) (Figura 24).

Na linhagem *White*, obtivemos 14% de pró-hemócitos, 21% de células cristalinas, 65% de plasmatócitos e nenhum lamelócito nas 100 (cem) células contadas.

Os dados de vários estudos relatam que, em linhagens normais, os plasmatócitos são os hemócitos circulantes predominantes em larvas de terceiro estágio (EVANS et al., 2003), seguidos pelas células cristalinas (BINGGELI et al., 2014), assim como o que obtivemos na linhagem *White*. Em nossa análise não foram encontrados lamelócitos na hemolinfa da linhagem *White*. Segundo (HARTENSTEIN, 2006; RISKI, 1992) essas células são raramente vistas em larvas saudáveis.

A linhagem transgênica GMR-GAL > UAS-eiger, apresentou como hemócito circulante predominante as células cristalinas (57%), seguido pelos plasmatócitos (35%). Apenas 1% de lamelócitos foram encontrados na linhagem GMR-GAL > UAS-eiger sem tratamento com o peptídeo sintético. Sabemos que essa linhagem apresenta superexpressão de TNF- $\alpha$  no olho. O alto nível dessa citocina, induz a apoptose em células do olho pela ativação da via JNK e as células programadas para morrer, devem ser eliminadas rapidamente. Isto é essencial no processo de apoptose, pois células mortas podem liberar substâncias citotóxicas, danificando as células vizinhas.

Em todos os organismos celulares, as células apoptóticas são removidas por fagocitose. Em *Drosophila melanogaster*, os hemócitos do tipo plasmatócito agem como macrófagos e, portanto, é o tipo celular qualificado para realizar a fagocitose. Pelo fato dessa linhagem apresentar elevada apoptose no olho, seria esperado que a maioria dos pró-hemócitos se diferenciasssem em plasmatócitos. Não foi isso, no entanto, o que nossos resultados mostraram, pois as células cristalinas foram as predominantes (Figuras 24). Em *Drosophila*, não há evidências de que os plasmatócitos desempenhem papel ativo na apoptose. Mutantes com baixa produção de hemócitos não parecem ter o processo de apoptose prejudicado (BANGS *et al.*, 2000).

O número de campos percorridos no esfregaço para a obtenção de 100 (cem) hemócitos para a realização da contagem diferencial (CDH) nos permite fazer uma previsão do número deles. Na lâmina de esfregaço de hemolinfa da linhagem *White* foram percorridos 5 campos, enquanto na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, apenas 2 para obter o mesmo número de células (Figura 26). Isso nos leva a estimar que a linhagem transgênica possui um número maior (2-3x) de hemócitos em relação à linhagem *White*. Levantamos a hipótese de que exista um processo inflamatório, induzido pelos altos níveis de TNF-  $\alpha$ , que justifique esse maior número de células.

A mesma análise foi feita nos grupos da linhagem GMR-GAL > UAS-eiger tratados com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 em diferentes concentrações (Figuras 25). O grupo tratado com 0,0002 mg/ml apresentou aumento do número de plasmatócitos, que foi o tipo celular mais abundante (79%) encontrado para essa concentração de tratamento. Esse resultado foi similar ao observado na linhagem *White* não-tratada, sugerindo reestabelecimento das populações celulares normais de hemócitos (BINGGELI *et al.*, 2014; EVANS *et al.*, 2003; HARTENSTEIN, 2006; RISKI, 1992).

Sendo os plasmatócitos responsáveis pela fagocitose, eles poderiam estar envolvidos na remoção de detritos apoptóticos. Mesmo que estudos já tenham mostrado que sua presença entre os hemócitos circulantes não seja essencial para esse processo (BANGS *et al.*, 2000), sugerimos que sua presença possa auxiliar no restabelecimento da homeostase na hemolinfa da mosca já que, na concentração 0,0002 mg/ml houve uma contagem de 79% de plasmatócitos e foi a

concentração de tratamento que apresentou melhor taxa de sobrevivência e maior aumento da área do olho das moscas (Figuras 19, 20 e 21).

Observamos que, em moscas GMR-GAL > UAS-eiger tratadas, houve aumento (20%) no número de lamelócitos, na concentração 0,0032 mg/ml e esse aumento continuou subindo para 29% e 32%, nas concentrações de 0,0256 mg/ml e 0,0512 mg/ml, respectivamente. O tipo celular lamelócito raramente é visto em larvas saudáveis, ocorrendo apenas em situações adversas tais como infecção parasitária e estresse oxidativo (HARTENSTEIN, 2006; MARKUS, 2009; WILLIAMS, 2007).

Uma possível explicação para o aumento de lamelócitos é que altas concentrações do peptídeo sintético mimético de TGF- $\beta$ 1 ativa vias envolvidas na diferenciação de plasmatócitos em lamelócitos.

Outra hipótese é que o peptídeo sintético, em altas concentrações, provoca estresse oxidativo e consequente aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essa situação adversa, de estresse oxidativo, levaria à diferenciação de plasmatócitos em lamelócitos, justificando o aumento do número dessas células. Dados da literatura mostram que a ativação de vias como JAK/STAT e P38 em hemócitos circulantes, desencadeia a diferenciação de lamelócitos, que aparecem na circulação (ZETTERVAKK, 2004). Em 2005, Liu *et al.* mostraram que, em distúrbios fibróticos humanos, TGF- $\beta$ 1 aumenta a produção de ROS e inibe enzimas antioxidantes, levando a desequilíbrio redox.

Observamos que o tratamento das moscas GMR-GAL4 > UAS-eiger com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 alterou a contagem diferencial de hemócitos (CDH) nas larvas de terceiro estágio analisadas. Ferramentas moleculares adicionais serão utilizadas para explicar esse aumento do número de lamelócitos na hemolinfa de larvas de terceiro estágio de *D. melanogaster* tratadas com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1.

A análise da expressão relativa dos transcritos dos genes eiger e wengen (Figuras 27 e 28) corrobora os resultados obtidos nas análises anteriores, em que a concentração de tratamento de 0,0002 mg/ml com pm26TGF- $\beta$ 1 se mostrou eficiente para recuperação da área do olho e redução do número de hemócitos circulantes (estimativa a partir dos resultados da contagem diferencial de hemócitos).



A expressão relativa de transcritos do gene *eiger* nas pupas tratadas com o peptídeo sintético mimético de TGF- $\beta$ 1 foi menor que a do grupo não tratado. A redução dos níveis do ortólogo de TNF- $\alpha$  (*eiger*) confirmou os resultados anteriores. A expressão relativa de transcritos do gene *wengen* (receptor de *eiger*) nas pupas tratadas com o peptídeo, também foi menor do que a do grupo não tratado.

Os resultados dos testes, ao contrário do esperado, não mostraram linearidade para as diferentes concentrações de tratamento com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, na linhagem GMR-GAL > UAS-*eiger*, conforme anteriormente justificado.

As metodologias utilizadas nesse estudo mostraram que o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, que mimetiza TGF- $\beta$ 1 humano, atua no processo de apoptose induzido pela ativação da via JNK, através da citocina TNF- $\alpha$ , exercendo papel protetor. Os resultados obtidos confirmaram nossa hipótese de trabalho contribuíram para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela ação anti-inflamatória do peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1.

## 6 CONCLUSÕES

- O peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1, que mimetiza TGF- $\beta$ 1 humano, melhorou a taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* nas concentrações de 0,0002, 0,0004, 0,0016, 0,0064, 0,0128, 0,0256 e 0,0512 mg/ml, mas não nas concentrações de 0,0008 mg/ml e 0,0032 mg/ml;
- O tratamento com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1 recuperou a área dos olhos das moscas da linhagem transgênica GMR-GAL4 > UAS-eiger, que apresenta fenótipo de olho reduzido;
- A recuperação da área do olho não seguiu padrão de simetria para os dois olhos de um mesmo indivíduo;
- As moscas da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger tratadas com pm26TGF- $\beta$ 1 e submetidas ao Teste de Sensibilidade à Luz, permaneceram no tubo de ambientação, não apresentando fototaxia positiva;
- A recuperação da área do olho dos grupos da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *D. melanogaster* tratados com o peptídeo pm26TGF- $\beta$ 1, aparentemente, não foi acompanhada de ganho de função, conforme demonstrado pelo Teste de Sensibilidade à Luz;
- Larvas de terceiro estágio (L3) da linhagem GAL4 > UAS-eiger (fenótipo de olho reduzido), apresentam células cristalinas como tipo predominante de hemócito circulante;
- As concentrações de tratamento com o peptídeo sintético pm26TGF- $\beta$ 1 que levaram ao aumento da área do olho na linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster*, também promoveram redução na contagem global de hemócitos, sugerindo efeito anti-inflamatório;

- Houve redução na expressão dos transcritos dos genes *eiger* (órtologo de TNF- $\alpha$  humano) e *wengen* (ortólogo do receptor de TNF- $\alpha$  humano) em pupas tratadas com pm26TGF- $\beta$ 1 nas concentrações 0,0002 mg/ml e 0,0512 mg/ml;
- *Drosophila melanogaster* mostrou ser importante modelo alternativo para estudo de processos de morte celular e inflamação, além de ser modelo adequado para triagem de moléculas biologicamente ativas, com potencial farmacológico.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5461, p. 2185–95, 24 mar. 2000. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>

AHUJA, A.; SINGH, R. S. Variation and Evolution of Male Sex Combs in *Drosophila*: Nature of Selection Response and Theories of Genetic Variation for Sexual Traits. **Genetics**, v. 179, n. 1, p. 503–509, 1 maio 2008. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.086363>

AKHURST, R. J.; HATA, A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 790–811, 24 set. 2012. <https://doi.org/10.1038/nrd3810>

AL-SADI, R. et al. TNF- $\alpha$  Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK- $\alpha$  Axis Activation of the Canonical NF- $\kappa$ B Pathway. **The American journal of pathology**, v. 186, n. 5, p. 1151–65, maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.12.016>

ANDERL, I. et al. Transdifferentiation and proliferation in two distinct hemocyte lineages in *Drosophila melanogaster* larvae after wasp infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005746, 14 jul. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005746>

BAARDSNES, J. et al. TbetaR-II discriminates the high- and low-affinity TGF-beta isoforms via two hydrogen-bonded ion pairs. **Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 2146–55, 17 mar. 2009. <https://doi.org/10.1021/bi8019004>

BAKER, S. J.; REDDY, E. P. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. **Oncogene**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 4 jan. 1996.

BANGS, P.; FRANC, N.; WHITE, K. Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, n. 11, p. 1027–1034, 1 nov. 2000. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400754>

BELLEN, H. J.; TONG, C.; TSUDA, H. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 514–522, 9 abr. 2010. <https://doi.org/10.1038/nrn2839>

BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 1, p. 9–23, jan. 2005. <https://doi.org/10.1038/nrg1503>

BINGGELI, O. et al. Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004067, 1 maio 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004067>

BOESEN, C. C. et al. The 1.1 Å crystal structure of human TGF- $\beta$  type II receptor ligand binding domain. **Structure (London, England : 1993)**, v. 10, n. 7, p. 913–9, 1 jul. 2002.

CADIGAN, K. M.; PEIFER, M. Wnt signaling from development to disease: Insights from model systems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. a002881–a002881, 1 ago. 2009.

CARROLL, A. F. G. S. R. W. R. C. L. S. B. **Introdução à genética**, 9ª. Rio de Janeiro: 2008.

CHABU, C.; XU, T. Oncogenic Ras stimulates Eiger/TNF exocytosis to promote growth. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 24, p. 4729–39, dez. 2014. <https://doi.org/10.1242/dev.108092>

CHA, G.-H. et al. Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathways. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 22, p. 7982–91, nov. 2003. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.7982-7991.2003>

CHANG, N. S. et al. Cloning and characterization of a novel transforming growth factor- $\beta$ 1-induced TIAF1 protein that inhibits tumor necrosis factor cytotoxicity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 253, n. 3, p. 743–9, 30 dez. 1998. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9846>

CHEN, P. et al. grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. **Genes & development**, v. 10, n. 14, p. 1773–82, 15 jul. 1996. <https://doi.org/10.1101/gad.10.14.1773>

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y.-P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 2, p. 272–88, 2012. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>

CHILDRESS, J.; HALDER, G. Appendix: Phenotypic Markers in *Drosophila*. In: DAHMANN, C. (Ed.). ***Drosophila Methods and Protocols: Humana Press***. pp. 27-44, 2008.

COLUSSI, P. A. et al. Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. **The Journal of cell biology**, v. 148, n. 4, p. 703–14, 21 fev. 2000. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.703>

COOK, K. R. et al. New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. **Fly**, v. 4, n. 1, p. 88–91, 2010. <https://doi.org/10.4161/fly.4.1.11230>

CRANE, M. et al. Lipopolysaccharide, immune activation, and liver abnormalities in HIV/hepatitis B virus (HBV)-coinfected individuals receiving HBV-active combination antiretroviral therapy. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 5, p. 745–51, 1 set. 2014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu119>

DAHMANN, C. ***Drosophila: methods and protocols***. [s.l.] Humana Press, 2008. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1>

DE BELLE, J. S.; HEISENBERG, M. Expression of *Drosophila* mushroom body mutations in alternative genetic backgrounds: a case study of the mushroom body miniature gene (mbm). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9875–80, 3 set. 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9875>

DEORA, A. et al. Transmembrane TNF-dependent uptake of anti-TNF antibodies. **mAbs**, v. 9, n. 4, p. 680–695, 2017. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1304869>

DUBNAU, J. **Behavioral genetics of the fly (*Drosophila melanogaster*)**. Cambridge University Press. 2014. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511920585>

DUFFY, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. **genesis**, v. 34, n. 1–2, p. 1–15, set. 2002.

ELLIOTT, D. A.; BRAND, A. H. The GAL4 System. In: CLIFTON, N. J. (Ed.) **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 420p. 79–95. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_5)

EVANS, C. J.; BANERJEE, U. Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 30, n. 2, p. 223–8, [s.d.]. [https://doi.org/10.1016/S1079-9796\(03\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S1079-9796(03)00028-7)

FABREGAT, I. et al. TGF-beta signaling in cancer treatment. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 17, p. 2934–47, 2014. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990591>

**FlyBase Reference Report: FISHER, et al., 2012, BDGP in situ homepage.** Disponível em: <<http://flybase.org/reports/FBrf0219073.html>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

**FlyBase 102: ST. PIRRE SE, P. L. et al., 2014, The Flybase Consortium.** Disponível em: <[http://flybase.org/static\\_pages/news/articles/2013\\_12/](http://flybase.org/static_pages/news/articles/2013_12/)>. Acesso em: 14 abr. 2017.

GIORGI, F. et al. Ultrastructural analysis of *Drosophila* ovarian follicles differing in yolk polypeptide (yps) composition. **Development**, n. 117/1, 1 jan. 1993.

GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis**, v. 6, p. 9–13, 1996.

GREENWALD, J. et al. The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. **Molecular cell**, v. 11, n. 3, p. 605–17, 1 mar. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00094-7)

GRETHER, M. E. et al. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. **Genes & development**, v. 9, n. 14, p. 1694–708, 15 jul. 1995. <https://doi.org/10.1101/gad.9.14.1694>

HARTENSTEIN, V. Blood cells and blood cell development in the animal Kingdom. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 1, p. 677–712, nov. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093317>

HAY, B. A.; HUH, J. R.; GUO, M. The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 12, p. 911–922, dez. 2004. <https://doi.org/10.1038/nrg1491>

HINCK, A. P.; O'CONNOR-MCCOURT, M. D. Structures of TGF- $\beta$  receptor complexes: implications for function and therapeutic intervention using ligand traps. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 12, n. 12, p. 2081–98, dez. 2011. <https://doi.org/10.2174/138920111798808383>

HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cancer research**, v. 59, n. 7 Suppl, p. 1701s–1706s, 1 abr. 1999.

HUANG, Y. et al. Transforming growth factor-beta 1 suppresses serum deprivation-induced death of A549 cells through differential effects on c-Jun and JNK activities. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18234–42, 16 jun. 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909431199>

IGAKI, T. et al. Drob-1, a *Drosophila* member of the Bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 2, p. 662–7, 18 jan. 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.662>

IGAKI, T. et al. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. **The EMBO journal**, v. 21, n. 12, p. 3009–18, 17 jun. 2002. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf306>

JENNINGS, B. H. *Drosophila*: a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190–195, maio 2011. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4)

KANDA, H. et al. Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 47, p. 18977–18982, 22 nov. 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103242108>

KANG, J. et al. Bar represses dPax2 and decapentaplegic to regulate cell fate and morphogenetic cell death in *Drosophila* eye. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88171, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088171>

KAUPPILA, S. et al. Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. **Oncogene**, v. 22, n. 31, p. 4860–4867, 31 jul. 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206715>



KELLER, E. F. *Drosophila* embryos as transitional objects: the work of Donald Poulson and Christiane Nüsslein-Volhard. **Historical studies in the physical and biological sciences : HSPS**, v. 26, n. 2, p. 313–46, 1996.

KUMAR, A. et al. The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factor-kappaB, JNK, and cell death pathways and binds to ectodysplasin A. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2668–77, 26 jan. 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008356200>

LAWRENCE, P. A. The making of a fly: the genetics of animal design. **The making of a fly: the genetics of animal design.**, 1992.

LEE, J. et al. TNF- $\alpha$  Induced by Hepatitis C Virus via TLR7 and TLR8 in Hepatocytes Supports Interferon Signaling via an Autocrine Mechanism. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 5, p. e1004937, maio 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004937>

LEE, L. A.; ORR-WEAVER, T. L. Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. **Annual Review of Genetics**, v. 37, n. 1, p. 545–578, dez. 2003. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143149>

LI, C.; GOTLIEB, A. I. Transforming Growth Factor-beta regulates the growth of valve interstitial cells in Vitro. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 4, p. 1746–1755, out. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.007>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta (T)) CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LI, W.-Z. et al. A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 1997–2002, 6 ago. 2012.

LIU, T.; FENG, X.-H. Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. **The Biochemical journal**, v. 430, n. 2, p. 191–8, 1 set. 2010. <https://doi.org/10.1042/BJ20100427>

LLOYD, T. E.; TAYLOR, J. P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1184, p. e1-20, jan. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05432.x>

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 23 fev. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)

LYNCH, J. A.; EL-SHERIF, E.; BROWN, S. J. Comparisons of the embryonic development of *Drosophila*, *Nasonia*, and *Tribolium*. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 1, p. 16–39, jan. 2012. <https://doi.org/10.1002/wdev.3>

MABERY, E. M.; SCHNEIDER, D. S. The *Drosophila* TNF ortholog eiger is required in the fat body for a robust immune response. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 4, p. 371–8, 2010. <https://doi.org/10.1159/000315050>

MAHER, K. et al. Decreased IL-10 expression in stefin B-deficient macrophages is regulated by the MAP kinase and STAT-3 signaling pathways. **FEBS letters**, v. 588, n. 5, p. 720–6, 3 mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.015>

MARKUS, R. et al. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4805–4809, 24 mar. 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801766106>

MASSAGUÉ, J. TGFbeta in Cancer. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 215–30, 25 jul. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>

MAZZOCCA, A.; ANTONACI, S.; GIANNELLI, G. The TGF- $\beta$  signaling pathway as a pharmacological target in a hepatocellular carcinoma. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 27, p. 4148–54, 2012. <https://doi.org/10.2174/138161212802430431>

MORENO, E.; YAN, M.; BASLER, K. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. **Current biology: CB**, v. 12, n. 14, p. 1263–8, 23 jul. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00954-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00954-5)

\_\_\_\_\_. Mutação, variação e evolução. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Introdução à genética**. pp. 425-431. 2008.

NFONSAM, L. E. et al. Analysis of the transcriptomes downstream of Eyeless and the Hedgehog, Decapentaplegic and Notch signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e44583, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044583>

PEDIGO, C. E. et al. Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 9, p. 3336–50, 1 set. 2016. <https://doi.org/10.1172/JCI85939>

PEREZ-GARIJO, A.; FUCHS, Y.; STELLER, H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. **eLife**, v. 2, p. e01004, 24 set. 2013. <https://doi.org/10.7554/eLife.01004>

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

REED, J. C. APOPTOSIS-BASED THERAPIES. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 2, p. 111–121, 1 fev. 2002. <https://doi.org/10.1038/nrd726>

REITER, L. T. et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 1114–1125, 1 jun. 2001. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>

RIEGER, D. et al. The fruit fly *Drosophila melanogaster* favors dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk. **Journal of Biological Rhythms**, v. 22, n. 5, p. 387–399, 29 out. 2007. <https://doi.org/10.1177/0748730407306198>

RIZKI, T. M.; RIZKI, R. M. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by Leptopilina. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 16, n. 2–3, p. 103–110, mar. 1992. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(92\)90011-Z](https://doi.org/10.1016/0145-305X(92)90011-Z)

ROOTE, J.; PROKOP, A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 3, n. 2, p. 353–8, fev. 2013. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004820>

SAILE, B. et al. The bcl, NFkappaB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. **European journal of cell biology**, v. 80, n. 8, p. 554–61, ago. 2001.

SANCHEZCAPELO, A. Dual role for TGF-β1 in apoptosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 1, p. 15–34, fev. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.11.002>

SANTIBAÑEZ, J. F.; QUINTANILLA, M.; BERNABEU, C. TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 121, n. 6, p. 233–251, 1 set. 2011. <https://doi.org/10.1042/CS20110086>

SMITH, C. A.; FARRAH, T.; GOODWIN, R. G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 959–62, 25 mar. 1994. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90372-7)

SLOBODIN, G. et al. LPS-stimulated production of TNF- $\alpha$  by peripheral blood monocytes in patients with Behcet's Disease. **Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 5, p. 764–767, 2 abr. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10067-006-0371-6>

SOWA, H. et al. Parathyroid hormone-Smad3 axis exerts anti-apoptotic action and augments anabolic action of Transforming Growth Factor in Osteoblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 52240–52252, 26 dez. 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302566200>

STULTZ, B. G. et al. Hox proteins coordinate peripodial decapentaplegic expression to direct adult head morphogenesis in *Drosophila*. **Developmental biology**, v. 369, n. 2, p. 362–76, 15 set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.012>

TANG, G. et al. Inhibition of JNK activation through NF- $\kappa$ B target genes. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 313–317, 15 nov. 2001. <https://doi.org/10.1038/35104568>

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, fev. 1999.

TOURNIER, C. et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5467, p. 870–4, 5 mai. 2000. <https://doi.org/10.1126/science.288.5467.870>

VAZ, E. R. et al. A short peptide that mimics the binding domain of TGF- $\beta$ 1 presents potent anti-inflammatory activity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136116, 27 ago. 2015.

VERNOOY, S. Y. et al. Cell death regulation in *Drosophila*: conservation of mechanism and unique insights. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 2, p. F69–76, 24 jul. 2000. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.F69>

VIDAL, M. The dark side of fly TNF. **Cell Cycle**, v. 9, n. 19, p. 3851–3856, 29 out. 2010. <https://doi.org/10.4161/cc.9.19.13280>

WEINER, J. **Time, love, memory : a great biologist and his quest for the origins of behavior**. [s.l.] Vintage Books, 2000.

WILLIAMS, M. J. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4711>

WHITE, K.; TAHAOGLU, E.; STELLER, H. Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5250, p. 805–7, 9 fev. 1996. <https://doi.org/10.1126/science.271.5250.805>

WU, M.; CHEN, G.; LI, Y.-P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. **Bone Research**, v. 4, p. 16009, 26 abr. 2016. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.9>

YANG, D. D. et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 865–870, 23 out. 1997. <https://doi.org/10.1038/39899>

ZETTERVALL, C.-J. et al. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 39, p. 14192–14197, 28 set. 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403789101>