



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

**Análise Morfológica de Pequi Sem e Com Espinho (Fruto de  
*Caryocar brasiliense*) e seus Efeitos em *Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Mariana Gonçalves Mendes

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

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Oliveira Nogueira

**UBERLÂNDIA - MG**  
**2019**



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

**Análise Morfológica de Pequi Sem e Com Espinho (Fruto de  
*Caryocar brasiliense*) e seus Efeitos em *Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Mariana Gonçalves Mendes

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

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Oliveira Nogueira

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte  
dos requisitos para obtenção do  
Título de Doutora em Genética e  
Bioquímica (Área Genética).**

UBERLÂNDIA - MG  
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M538    Mendes, Mariana Gonçalves, 1988-  
2019      Análise Morfológica de Pequi Sem e Com Espinho (Fruto de  
Caryocar brasiliense) e seus Efeitos em Drosophila melanogaster  
[recurso eletrônico] / Mariana Gonçalves Mendes. - 2019.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.

Coorientadora: Ana Paula Oliveira Nogueira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-  
graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2504>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Bonetti, Ana Maria, 1949-, (Orient.). II. Nogueira,  
Ana Paula Oliveira, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de  
Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 20/2019/PPGGB				
Data:	Dezesseis de dezembro de 2019	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	12:45h
Matrícula do Discente:	11523GBI017				
Nome do Discente:	Mariana Gonçalves Mendes				
Título do Trabalho:	Análise morfológica de pequi sem e com espinho (fruto de <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) e seus efeitos em <i>Drosophila melanogaster</i> .				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Genética, Biologia e Melhoramento de Plantas e Animais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização fenotípica, molecular e sequenciamento de última geração de <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. e seus frutos sem e com espinho no endocarpo.				

Aos dezesseis dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, às 08:30 horas no Bloco 2E, sala 211, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Profª. Drª. Luciana Cardoso Nogueira Londe, Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira, Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola e Profª. Drª. Ana Maria Bonetti, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Profª. Drª. Ana Maria Bonetti, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

**APROVADO (A).**

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria Bonetti, Presidente**, em 16/12/2019, às 14:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).





Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Membro de Comissão**, em 16/12/2019, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira, Membro de Comissão**, em 16/12/2019, às 21:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Cardoso Nogueira Londe, Usuário Externo**, em 17/12/2019, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Mancini Filho, Usuário Externo**, em 17/12/2019, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1766157** e o código CRC **40209183**.



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

**Análise Morfológica de Pequi Sem e Com Espinho (Fruto de  
*Caryocar brasiliense*) e seus Efeitos em *Drosophila melanogaster***

**Aluna:** Mariana Gonçalves Mendes

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti (Orientadora) / IBTEC-UFU

**Examinadores:** Prof. Dr. Jorge Mancini Filho / FCF – USP  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Cardoso Nogueira Londe / EPAMIG NORTE  
Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira / INBIO-UFU  
Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola / IBTEC - UFU

**Data da Defesa:** 16 / 12 / 2019

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

---



Ana Maria Bonetti  
Orientadora

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Helena Gonçalves Mendes e Onilton Ferreira Mendes**, que sempre estiveram presentes, apoiando meus sonhos e objetivos! Vocês são meus maiores exemplos de amor, dedicação, determinação, força, perseverança e respeito.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me conceder a vida, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento no decorrer deste caminho até aqui.

Agradeço aos meus pais, **Helena** e **Onilton**, por todo amor e carinho...pela presença constante, por formarem o alicerce que me deram força e coragem para buscar meus sonhos e objetivos. Agradeço à minha **mãe**, por estar sempre ao meu lado, desde o princípio, acompanhando, apoiando, orientando, dando força para que eu não desanimasse diante de quaisquer obstáculos que viessem a surgir. Agradeço ao meu **pai** pelo carinho de sempre e por estar sempre apoiando meus objetivos. Obrigada a vocês pelo apoio, a compreensão e a paciência! Vocês são meus exemplos de fé e perseverança! Vocês fazem parte de mais essa conquista!

Agradeço ao meu esposo, amigo e companheiro, **Henderson**, por seu amor, atenção, carinho, compreensão e paciência. Por estar sempre disposto a auxiliar. Por todas as conversas e momentos de ansiedade e alegria compartilhados. Pela companhia nos estudos, sobretudo nos momentos de finalização desse trabalho. Obrigada pelo incentivo e pela força! Com você, compartilho essa vitória!

À minha família, por contribuir com o meu crescimento e com a minha formação pessoal, sempre me incentivando. Em especial agradeço aos **Meus Avós**, que são meus exemplos de determinação, fé e resiliência!

Meu profundo agradecimento à minha orientadora, **Professora Dra. Ana Maria Bonetti**. São dez anos de convivência, desde a graduação até este momento. Agradeço por todos os aprendizados e sobretudo por me ensinar esse amor pela ciência, pela educação e pela busca constante pelo crescimento como profissional e como pessoa! Você é um exemplo de profissional e seu amor pelo ensino me incentiva sempre mais a seguir por esse caminho! Muito obrigada!

Agradeço à minha coorientadora, **Professora Dra. Ana Paula Oliveira Nogueira**, por aceitar o convite em participar desse projeto e por sua colaboração no desenvolvimento desse trabalho! Muito obrigada!

Agradeço ao **Professor Dr. Carlos Ueira Vieira**, pela grande contribuição intelectual na realização desse trabalho, por todos os conselhos e orientações. Obrigada por sua presença, por seus ensinamentos e por seu exemplo!

Agradeço à toda **equipe do Laboratório de Genética** que contribuiu para realização desse trabalho! Obrigada pela convivência, pelas conversas, pelas risadas, pelo aprendizado e por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável!

Em especial agradeço à **MSc Tamiris Sabrina**, que tanto me incentivou e auxiliou na concretização dos objetivos desse trabalho, na realização dos experimentos, nas análises e discussões, pelas conversas, pela amizade e parceria, muito obrigada! À **Dra. Jéssica Regina**, que sempre esteve presente auxiliando, não só intelectualmente, mas também com seus conselhos e conversas de incentivo, meu muito obrigada! À **Luíza Diniz**, por sua ajuda, seus pensamentos sempre positivos, por seu exemplo de foco e determinação. Muito obrigada, vocês fazem parte dessa conquista!!!

Agradeço ao **MSc Bruno Gomes** e ao **MSc Rodrigo Franco**, pela contribuição intelectual, pela ajuda na realização dos experimentos e pela parceria nesse projeto!

Agradeço à **Dra. Rafaela Cabral Marinho**, pelo auxílio e pelo incentivo na realização desse trabalho.

Agradeço ao **Dr. Marcos Vieira de Faria** pela colaboração nas coletas de material biológico na Fazenda Experimental / UFU

Agradeço aos Professores **Dr. Foued Salmen Espíndola** e **Dr. Paulo Eugênio Oliveira**, pela parceria e pela contribuição intelectual na realização desse trabalho.

À secretaria e Coordenação da Pós-Graduação pelo comprometimento em sempre oferecer o melhor ao nosso Programa e a todos os discentes.

Aos técnicos e docentes que contribuíram e cumpriram com seu dever, auxiliando na realização dessa pesquisa e no decorrer do curso.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, ao Programa de Pós-Graduação Genética e Bioquímica pela disponibilização de equipamentos e estrutura.

Às Agências de Fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo investimento realizado para produção científica.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir para melhoria desse trabalho e com meu crescimento como pesquisadora e professora.

A todos que colaboraram e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1. Sobre o pequi e o fruto Pequi.....	20
1.1.1 Cerrado, ocorrência e importância do pequi.....	20
1.1.2 Caracterização do pequi.....	23
1.1.3 Constituintes químicos, importância nutricional e farmacológica do fruto pequi.....	27
1.2. Sobre <i>Drosophila melanogaster</i> , organismo modelo utilizado para o teste de potencial farmacológico do pequi.....	31
1.2.1 Construção da linhagem transgênica.....	34
1.2.2 Sistema GAL4 / UAS.....	34
1.2.3 Mecanismos de morte celular e TNF- $\alpha$ .....	36
1.2.4 Ortólogos de TNF- $\alpha$ e TNFR humanos em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	37
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>41</b>
2.1. Objetivos Específicos.....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1. Coleta de frutos, amostragem e armazenamento.....	42
3.2. Análise biométrica dos frutos.....	43
3.3. Preparação do extrato etanólico.....	43
3.4. Material biológico e grupos para análise do potencial farmacológico do pequi.....	44
3.5. Testes para estudo de ação anti-inflamatória e anti-apoptótica dos extratos de pequi em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	45
3.5.1 Obtenção da progênie de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	45
3.5.2 Análise de imagem.....	46
3.5.3 Análise da expressão gênica.....	47
3.6. Análises estatísticas .....	51
3.6.1 Biometria dos frutos.....	51
3.6.2 Testes com extrato etanólico de pequi com e sem espinho.....	52
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
4.1. Resultados de análise morfológica de fruto (pequi) de pequi.....	52

4.2 Resultados da Análise do Potencial Farmacológico de Frutos (pequi) de Pequizeiro.....	63
4.3. Resultados da Análise da Expressão dos Transcritos dos Genes Codificadores de Eiger e Wengen em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	73
4.3.1 Níveis de Transcritos do gene eiger em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	73
4.3.2 Níveis de Transcritos do gene wengen em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	76
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência dos primers dos genes avaliados neste estudo .....	49
<b>Tabela 2:</b> Características descritivas de frutos de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess. sem e com espinho no endocarpo. ....	53
<b>Tabela 3:</b> Média estimada das características avaliadas em frutos sem e com espinho no caroço de <i>Caryocar brasiliense</i> .....	56
<b>Tabela 4:</b> Matriz de Dissimilaridade Genética com base na estatística $D^2$ de Mahalanobis dos 15 pequizeiros ( <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.) sem e com espinho no endocarpo. ....	58
<b>Tabela 5:</b> Agrupamento de Tocher obtido a partir da estatística $D^2$ de Mahalanobis .....	59
<b>Tabela 6:</b> Contribuição relativa de oito características de frutos sem e com espinho no endocarpo de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess para a divergência genética (Singh, 1981) baseada na distância generalizada de Mahalanobis.....	62
<b>Tabela 7:</b> Correlações genética (abaixo da diagonal) e fenotípica (acima da diagonal) entre as características morfológicas de pequis sem e com espinhos no endocarpo.....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Pequizeiro cultivado na Estação Experimental Fazenda Água Limpa - UFU, Uberlândia – MG, 2017. <b>A)</b> pequizeiro adulto <b>B)</b> vista superior dos botões florais <b>C)</b> flor do pequizeiro. <b>Fonte:</b> Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes. 24	
<b>Figura 2-</b> Pequi (Fruto do pequizeiro). <b>A-1 e A-2)</b> Frutos na árvore. <b>B)</b> Disposição dos pirênios (seta) no fruto. <b>C-1)</b> Detalhes do endocarpo sem e <b>C-2)</b> com espinho <b>Fonte:</b> Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes. .... 26	
<b>Figura 3-</b> Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i> . <b>Fonte:</b> ROOTE; PROKOP, 2013. .... 32	
<b>Figura 4-</b> Representação dos cromossomos de célula da glândula salivar de <i>Drosophila melanogaster</i> . <b>A)</b> Esquema de cromossomos de célula da glândula salivar. <b>B)</b> Os números em preto indicam loci gênicos. Os cromossomos 2 e 3 são subdivididos em braços esquerdo ( <b>L</b> ) e direito ( <b>R</b> ) e centrômero (ponto vermelho). <b>Fonte:</b> DE BELLE; HEISENBERG, 1996. .... 33	
<b>Figura 5-</b> Sistema GAL4/UAS em <i>Drosophila melanogaster</i> . Fêmeas portando o responder (UASGFP) cruzadas com machos expressando o driver GAL4 (REGAL4) 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. <b>Fonte:</b> (DUFFY, 2002). .... 35	
<b>Figura 6-</b> Padrão fenotípico de olhos reduzidos e normais em <i>Drosophila melanogaster</i> . <b>A)</b> Indivíduo transgênico GMR-GAL4 > UAS-eiger, com olho reduzido (seta). <b>B)</b> Indivíduo da linhagem selvagem Canton S, apresentando olho normal (seta). <b>Fonte:</b> Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes. .... 36	
<b>Figura 7-</b> Predição da sequência de aminoácidos de Eiger. Região transmembrana assinalada com duplo sublinhado e região C-terminal, destacada com sublinhado simples. <b>Fonte:</b> MORENO et al., 2002, com modificações. .... 38	
<b>Figura 8 -</b> Modelo proposto da indução de morte celular por ativação da via JNK com participação direta de Eiger e Wengen. <b>Fonte:</b> HAY et al., 2004. .... 39	
<b>Figura 9 –</b> Obtenção da progênie de <i>Drosophila melanogaster</i> . <b>A)</b> Frascos com meio para oviposição e adultos <b>B)</b> Coleta de larvas (L3) <b>C-1 e C-2)</b> Vials com larvas para tratamento. <b>Fonte:</b> elaborada pela autora. .... 46	

<b>Figura 10</b> - Quantificação da área do olho de <i>Drosophila melanogaster</i> pelo Software Image J. <b>A)</b> Layout do software Image J. <b>B)</b> Janela de calibração. <b>C)</b> Olho a ser analisado (seta). Fonte.....	47
<b>Figura 11</b> - Frutos do pequi em corte longitudinal. <b>A)</b> Pequi sem espinhos no endocarpo. <b>B)</b> Pequi com espinhos no endocarpo. <b>MI</b> – Mesocarpo Interno; <b>LA</b> -amêndoa. <b>Fonte:</b> Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes.....	54
<b>Figura 12</b> - Dendrograma da análise de 15 pequizeiros pelo método de ligação média entre grupo (UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) obtido a partir da matriz de dissimilaridade para os oito caracteres morfológicos dos frutos. ....	60
<b>Figura 13</b> - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> tratadas com extrato etanólico da Polpa De Pequi Sem Espinho (PSE) e CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml. ....	63
<b>Figura 14</b> - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> tratadas com extrato etanólico da polpa de pequi com espinho (PCE). CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml. ....	64
<b>Figura 15</b> - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> tratadas com extrato etanólico da casca de pequi sem espinho (CSE). CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml. ....	65
<b>Figura 16</b> - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de <i>Drosophila melanogaster</i> tratadas com extrato etanólico da casca de pequi com espinho (CCE). CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml. ....	66
<b>Figura 17</b> - Resultado da quantificação da área do olho de <i>Drosophila melanogaster</i> GMRGAL4 > UAS-eiger, tratada com o extrato etanólico da Polpa De Pequi Sem Espinho-PSE (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ teste Kruskal-Wallis para múltiplas comparações).....	68
<b>Figura 18</b> - Resultado da quantificação da área do olho de <i>Drosophila melanogaster</i> GMRGAL4 > UAS-eiger tratada com o extrato etanólico da Polpa De Pequi Com	

Espinho-PCE (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ teste Kruskal-Wallis para múltiplas comparações).....	69
<b>Figura 19</b> - Resultado da quantificação da área do olho de <i>Drosophila melanogaster</i> , linhagem GMRGAL4 > UAS-eiger, tratada com o extrato etanólico da Casca De Pequi Sem Espinho (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ teste Kruskal-Wallis para múltiplas comparações). ....	70
<b>Figura 20</b> - Resultado da quantificação da área do olho de <i>Drosophila melanogaster</i> , linhagem GMRGAL4 > UAS-eiger, tratada com o extrato etanólico da Casca De Pequi Com Espinho (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ teste Kruskal-Wallis para múltiplas comparações). ....	71
<b>Figura 21</b> - Imagens de <i>Drosophila melanogaster</i> GMRGAL4 > UAS-eiger mostrando a área do olho (setas) nos diferentes grupos tratados e no controle. <b>A)</b> Controle (água); <b>B)</b> Tratada com extrato de Casca de Pequi Sem Espinho (CSE); <b>C)</b> Tratada com extrato de Polpa de Pequi Sem Espinho (PSE); <b>D)</b> Tratada com Polpa de Pequi Com espinho (PCE). <b>Fonte:</b> Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes. ....	72
<b>Figura 22</b> - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa de expressão de transcritos do gene eiger obtida por RT-qPCR em <i>Drosophila melanogaster</i> GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada ( <b>CN</b> ) com o extrato etanólico da Polpa de Pequi Sem ( <b>PSE</b> ) e Com Espinho no endocarpo ( <b>PCE</b> ). ....	74
<b>Figura 23</b> - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene eiger obtida por RT-qPCR em <i>Drosophila melanogaster</i> GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada (CN) com extrato etanólico da Casca de Pequi Sem( <b>CSE</b> ) e Com Espinho no endocarpo ( <b>CCE</b> ). ....	75
<b>Figura 24</b> - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene wengen obtida por RT-qPCR em <i>Drosophila melanogaster</i> GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada (CN) com os extratos etanólicos da Polpa de Pequi Sem ( <b>PSE</b> ) e Com Espinho ( <b>PCE</b> ) no endocarpo. ....	77

**Figura 25** - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos transcritos do gene *wengen* obtida por RT-qPCR em *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada (CN) com o extrato etanólico da Casca de Pequi Sem (**CSE**) e com espinhos (**CCE**) no endocarpo. 78

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ANOVA	Análise de variância
cm	Centímetro
g	Grama
Gal4	Fator de transcrição responsivo a galactose 4
IBTEC	Instituto de Biotecnologia
JNK	c-Jun N-terminal quinase
L	Litro
L3	Larva de terceiro instar
LABGEN	Laboratório de Genética
LABIBI	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular
LABNANO	Laboratório de Nanobiotecnologia
M	Molar
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
pb	Pares de base
pH	Potencial Hidrogeniônico
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNA-seq	RNA <i>sequencing</i>
RT	Transcriptase Reversa
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alpha
UAS	Sequência de Ativação Antecedente
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
x g	Força Centrífuga

## RESUMO

O pequi ( *Caryocar brasiliense* ) é uma das espécies que tem maior destaque no Cerrado brasileiro e apresenta variabilidade em suas características físicas e químicas. Contudo, há poucos dados na literatura sobre o pequi sem espinho no endocarpo. É uma espécie de base econômica extrativista e é bastante utilizada na alimentação e prospecção de moléculas com efeitos farmacológicos. Os produtos secundários do metabolismo de *C. brasiliense* possuem diversas funções como antioxidantes e bloqueadores da ação de enzimas específicas que causam inflamação. O objetivo desse estudo foi analisar as características morfológicas dos frutos sem e com espinho no endocarpo e avaliar os efeitos do extrato etanólico dos frutos, *in vivo*, utilizando o organismo modelo *Drosophila melanogaster*. Foram avaliadas massa, altura e largura do fruto; massa, largura e comprimento dos pirênios; espessura da polpa e largura da castanha (semente). Para os experimentos sobre a possibilidade de exploração farmacológica dos componentes do pequi, moscas da espécie *D. melanogaster* da linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, que desenvolve o fenótipo de olho reduzido foram tratadas com extrato etanólico de polpa e de casca dos frutos sem e com espinho no endocarpo, em diferentes concentrações. A partir das características dos frutos foi possível avaliar a diversidade genética dos pequizeiros. Frutos sem espinho apresentaram medidas superiores às de frutos com espinho. Os métodos de agrupamento Tocher e UPGMA separaram as amostras de pequizeiros em três grupos, sendo um deles o que produziu frutos com os maiores valores de características externas e internas. Duas plantas, a B26 e a B28, mostraram características que as distinguem para programa de melhoramento genético. Nossos resultados mostraram, ainda, a possibilidade de uso dos frutos na indústria farmacêutica. Moscas da espécie *D. melanogaster* tratadas com os extratos etanólicos de polpa e casca de pequi sem e com espinho apresentaram aumento da área do olho. Esses dados foram corroborados pela redução da expressão dos transcritos dos genes eiger (ortólogo de TNF- $\alpha$  humano) e wengen (ortólogo do receptor de TNF- $\alpha$  humano), em *D. melanogaster*, ambos relacionados a processos inflamatórios. Verificamos que o extrato etanólico dos frutos sem e com espinho tem efeitos positivos e podem atuar em vias da inflamação. Validou-se o uso de *D. melanogaster* como organismo

modelo alternativo para estudo dos processos de morte celular e inflamação, bem como para triagem de compostos naturais com potencial farmacológico.

**Palavras-chave:** *Drosophila melanogaster*, pequi, biometria, extrato etanólico, expressão gênica.



## ABSTRACT

Pequi ( *Caryocar brasiliense* ) is one of the most prominent species in the Brazilian Cerrado and has variability in its physical and chemical characteristics, however, there is little data in the literature for individuals without thorns. It is an extractive economic specie and it is widely used in the feeding and prospecting molecules with pharmacological effects. Secondary metabolites of *C. brasiliense* have several functions as antioxidants and blockers of the action of specific enzymes that cause inflammation. The aim of this study was to analyze the morphological characteristics of fruits with and without thorn in the endocarp and to evaluate the effects of the ethanolic extract of the fruits, *in vivo*, with *Drosophila melanogaster*. Initially the weight, height and width of the fruit were determined; pyrene weight, width and length; pulp thickness and almond width. For experiments about the potential of pharmacological exploration of pequi components, flies of *D. melanogaster* from GMR-GAL4> UAS-eiger lineage, which develops the reduced eye phenotype, were treated with ethanolic extract of pulp and peel of fruits without and with thorn in the endocarp at different concentrations. From the characteristics of the fruits it was possible to evaluate the genetic diversity of pequizeiros. Fruits without thorn presented higher measurements than fruits with thorn. The Tocher and UPGMA clustering methods separated the pequi tree samples into three groups, one of which produced fruits with the highest values of external and internal characteristics. Two plants, B26 and B28 showed characteristics that distinguish them for breeding program. Our results also showed the possibility of using these fruits for pharmaceutical industry. Flies of *D. melanogaster* species treated with ethanolic extracts of pequi pulp and peel without and with thorn promoted the eye recovery. These data were corroborated by the reduction of eiger (human TNF- $\alpha$  ortholog) and wengen (human TNF- $\alpha$  receptor ortholog) transcript expression in *D. melanogaster*, both related to cell death processes. We verified that the ethanolic extract of pequi without and with thorns has positive effects and may act in the pathway of cell death process. Validate the use of *D. melanogaster* as an alternative model organism for the cell death and inflammation processes study as well as for better comprehension about natural compounds with pharmacological potential.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, pequi, biometry, ethanolic extract, gene expression.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Sobre Cerrado, Pequizeiro e fruto Pequi**

#### **1.1.1 Cerrado, ocorrência e importância do pequi**

A região do Cerrado ocupa área expressiva do território brasileiro e é considerada um dos mais importantes biomas da América do Sul, principalmente, devido a sua biodiversidade (BRAGA, 2016; SILVA; FONSECA, 2016). O Cerrado é composto por diferentes fitofisionomias, com grande variedade de plantas nativas e espécies de animais. Apresenta características peculiares com formatos, cores e sabores variados e incomparáveis, tornando-o uma fonte de exploração científica e econômica (VERA et al., 2005; BRAGA, 2016; SILVA; FONSECA, 2016).

É o segundo maior bioma do Brasil, com extensão, aproximadamente, de 21% do território nacional, cerca de dois milhões de quilômetros quadrados. A distribuição geográfica do Cerrado abrange parte de alguns estados nas regiões Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal), Norte (Tocantins, Pará, Amapá, Rondônia, Amazonas, Roraima), Sul (Paraná), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Nordeste (Bahia, Piauí, Maranhão e Ceará) (KLINK; MACHADO, 2005; VERA et al., 2005; BRAGA, 2016; BRASIL, 2019).

Como consequência de sua extensão, ocorre grande variabilidade de clima e de solos. Apresenta clima estacional, com período chuvoso (outubro a março) seguido por período seco (abril a setembro) com fauna e flora diversa (KLINK; MACHADO, 2005; VERA et al., 2005; BRAGA, 2016; BRASIL, 2019).

A vegetação do cerrado é marcada por fatores climáticos típicos, que desencadeiam alterações na paisagem natural causadas pelo fogo em épocas de seca e, hoje, pela extensiva área de desmatamento devido às atividades antrópicas ligadas à criação de bovinos e à agricultura (BRAGA, 2016; ROESLER, LORENCINI, PASTORE, 2010).

O processo de fragmentação, em decorrência das atividades ligadas ao crescimento populacional e ao desenvolvimento do agronegócio, põe em risco a manutenção e o equilíbrio ambiental do Cerrado (FERNANDES; PESSÔA, 2011; RIBEIRO; RODRIGUES, 2006; SANTOS, 2010). As implicações diretas da

fragmentação sobre a biodiversidade são a redução indiscriminada das áreas, extinção e comprometimento evolutivo em função da perda de variabilidade genética, podendo levar à diminuição da adaptação das espécies às mudanças ambientais (JÚNIOR et al., 2004; BRASIL, 2019).

Além da importância ambiental, o Cerrado tem grande relevância social. Muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais como, indígenas, ribeirinhos, babaqueiros, vazanteiros e comunidades quilombolas que, juntas, fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro e possuem um conhecimento tradicional de sua biodiversidade (BRASIL, 2019). Mais de 10 tipos de frutos comestíveis são regularmente consumidos pela população local e comercializados como, o pequi (fruto de *Caryocar brasiliense*), buriti (fruto de *Mauritia flexuosa*), mangaba (fruto de *Hancornia speciosa*), cagaita (fruto de *Eugenia dysenterica*), bacupari (fruto de *Salacia crassifolia*), cajuzinho do cerrado (fruto de *Anacardium humile*), araticum (fruto de *Annona crassifolia*) e as sementes do barueiro (fruto de *Dipteryx alata*) (BRASIL, 2019). Muitas espécies têm uso medicinal, outras podem ser usadas na recuperação de solos degradados, outras são barreiras contra o vento, proteção contra a erosão ou são habitat de predadores naturais de pragas.

Muitas espécies de plantas e animais correm risco de extinção. Estima-se que 20% das espécies nativas e endêmicas já não ocorram em áreas protegidas e que, pelo menos, 137 espécies de animais que ocorrem no Cerrado estão ameaçadas de extinção. Depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o bioma brasileiro que mais sofreu alterações com a ocupação humana. Com a crescente pressão para a abertura de novas áreas, visando incrementar a produção de carne e grãos para exportação, tem havido um progressivo esgotamento dos recursos naturais da região. Nas três últimas décadas, o Cerrado vem sendo degradado pela expansão da fronteira agrícola brasileira. Além disso, o bioma Cerrado é palco de uma exploração extremamente predatória de seu material lenhoso para produção de carvão (BRASIL, 2018).

Apesar do reconhecimento de sua importância biológica, os esforços para preservação do Cerrado são insuficientes, já que, de todos os *hot spots* mundiais, é o que possui a menor porcentagem de áreas sob proteção integral (MARRIS, 2005; SILVA; FONSECA, 2016; BRASIL, 2019). O Bioma apresenta 8,21% de seu

território legalmente protegido por unidades de conservação e desse total, 2,85% são unidades de conservação de proteção integral e 5,36%, de unidades de conservação de uso sustentável (BRASIL, 2019). Com a taxa atual de perda de território, esse ecossistema poderá se extinguir até 2030 (MARRIS, 2005; SILVA; FONSECA, 2016). Entre outras consequências, a mais devastadora é a perda do potencial terapêutico de sua biodiversidade vegetal, amplamente explorado pela sabedoria popular, mas de tímida expressão científica (Braga, 2016).

Uma das espécies que têm se destacado no Cerrado é a do pequi, *Caryocar brasiliense* Cambess (Malpighiales: Caryocaraceae), uma frutífera de grande importância, principalmente para o extrativismo, já que seus frutos são destinados à alimentação, além de representarem fonte alternativa de renda para as populações das regiões de ocorrência da espécie (ARAUJO, 1995, KERR; SILVA; TCHUCARRAMAE, 2007). Considerada como uma espécie de base econômica extrativista, o pequi oferece diversas aplicações desde fonte de alimentação, matriz energética, prospecção de moléculas com efeitos farmacológicos, reflorestamento, madeireiro entre outros usos (SANTOS et al., 2013).

Os frutos e as folhas são utilizados tanto para fins de alimentação quanto terapêuticos (VIEIRA; MARTINS, 2000). Para ser consumido, o fruto é cozido e a polpa é empregada em diversas preparações, tais como arroz com pequi, frango com pequi, farofas, paçocas, licores, entre outras (CARRAZA; ÁVILA, 2010; SILVA; FONSECA, 2016).

A exploração intensiva do cerrado para produção de carvão vegetal nativo, pastagens e urbanização têm posto em risco a preservação e a variabilidade dos pequizeiros (JÚNIOR et al., 2004). O extrativismo intensivo pode gerar perdas de material genético e de genes de interesse agrônomo, em razão da coleta, consumo e/ou comercialização dos pequis de melhor qualidade, oriundos de genótipos superiores, o que impede a reprodução natural a partir das sementes desses frutos (SANTOS et al., 2006) para garantir a produção de mudas.

Pesquisas sobre características básicas, como a biometria de frutos, permitem identificar expressões do genótipo da espécie resultantes da seleção de adaptações dos indivíduos às condições ambientais locais. Saber como os pequizeiros respondem à variação ambiental, por meio de estudos da variabilidade

fenotípica, é útil para programas de manejo, conservação e melhoramento da espécie.

A ocorrência do pequizeiro que produz frutos sem espinho no endocarpo, para os quais ainda não existem estudos de biometria permite acrescentar dados que contribuirão para a seleção de genótipos superiores. Além disso, são propostas dessa pesquisa, a avaliação do potencial dos frutos como alternativa para tratamento de inflamação e sintomas relacionados ao estresse oxidativo.

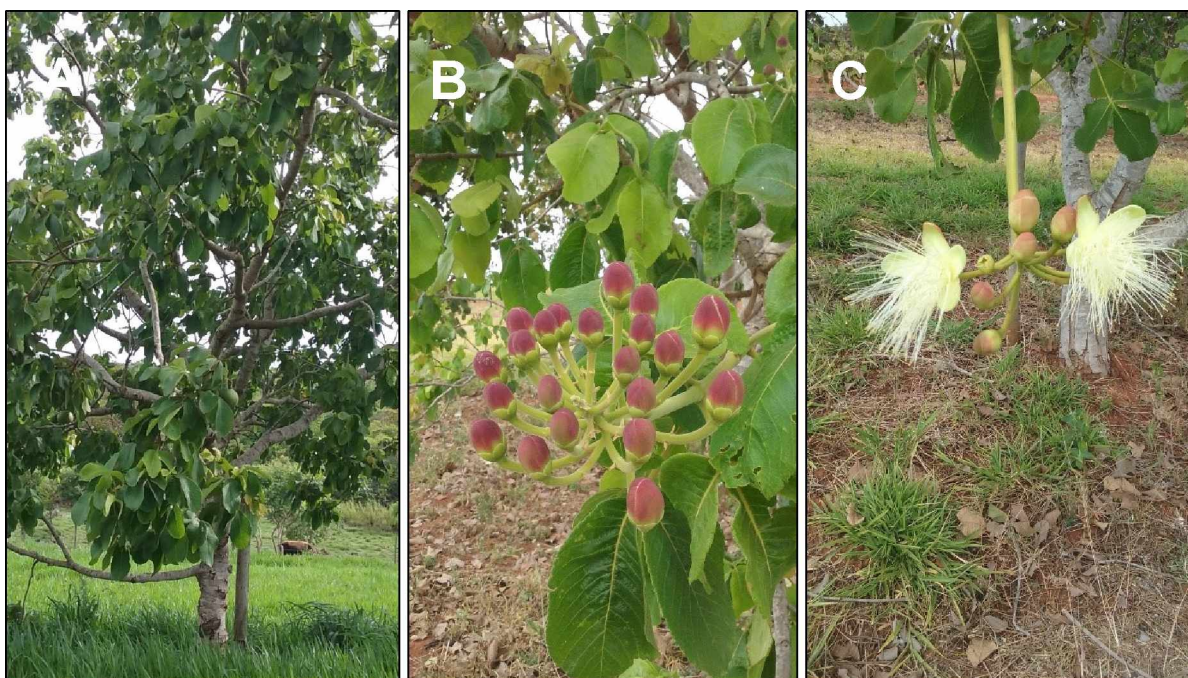
### 1.1.2 Caracterização do pequizeiro

A árvore popularmente conhecida como pequizeiro pertence à família Caryocaraceae, ordem Theales (CRONQUIST, 1989) e apresenta 26 espécies distribuídas em dois gêneros: *Anthodiscus* G. F. W. Meyer (10 espécies) e o *Caryocar* L. (16 espécies) (PRANCE, 1990). No Brasil ocorrem 10 espécies do gênero *Caryocar* e três do gênero *Anthodiscus* (SOUZA, 2005). A espécie prevalente no território brasileiro é a *Caryocar brasiliense*, porém *C. villosum*, *C. coriaceum*, *C. barbinerve*, *C. crenatum* e *C. edulis* são, também, encontrados no país (BORGES, 2011).

O pequizeiro é uma planta perene, que pode ser caracterizada como frutífera ou oleaginosa (OLIVEIRA et al., 2008). O processo de floração ocorre no começo do período chuvoso, entre os meses de agosto a novembro, com a maturação dos frutos no início de novembro e encontrados até fevereiro (ARAÚJO, 1995; ALMEIDA et al., 1998; GUEDES et al., 2017).

Estudos realizados com *C. brasiliense* e *C. villosum* indicam que as espécies do gênero são alógamas (GRIBEL; HAY, 1993; MARTINS; GRIBEL, 2007) e pequenos morcegos nectarívoros (*Glossophaga socicina* e *Anoura geoffroyi*) são os principais polinizadores. A protandria (amadurecimento dos órgãos sexuais masculinos antes dos femininos) e a hercogamia (separação espacial de anteras e estigmas) funcionam como principais mecanismos contra a autogamia, porém, a autopolinização pode ocorrer em pequena proporção (GRIBEL; HAY, 1993; MARTINS; GRIBEL, 2007).

Os pequizeiros da espécie *Caryocar brasiliense* (Figura 1) são árvores de porte médio a grande, podendo alcançar mais de 10 metros de altura. Possui tronco resistente com diâmetro de até 2 metros, revestido por uma casca escura e gretada (LOPES et al., 2002). A copa é larga e os galhos estendem-se pela lateral, inseridos de forma oposta, são longos, grossos e pouco inclinados, com ramificação basal (BORGES, 2011).



**Figura 1:** Pequizeiro cultivado na Estação Experimental Fazenda Água Limpa - UFU, Uberlândia – MG, 2017. **A)** pequizeiro adulto **B)** vista superior dos botões florais **C)** flor do pequizeiro. **Fonte:** Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes.

As folhas do pequizeiro são opostas, longas, pecioladas, trifolioladas e apresentam margens serradas, crenadas, dentadas ou raramente inteiras (PRANCE, 1990). Os pedicelos são articulados próximos às flores que são hermafroditas, cíclicas, grandes e actinomorfas. O cálice é caracterizado por ser penta-lobado, imbricado e a flor apresenta cinco pétalas, soldadas na base e caem após a antese, juntamente com os estames. As anteras são biloculares, oblongas, longitudinalmente deiscentes (JOLY, 1985).

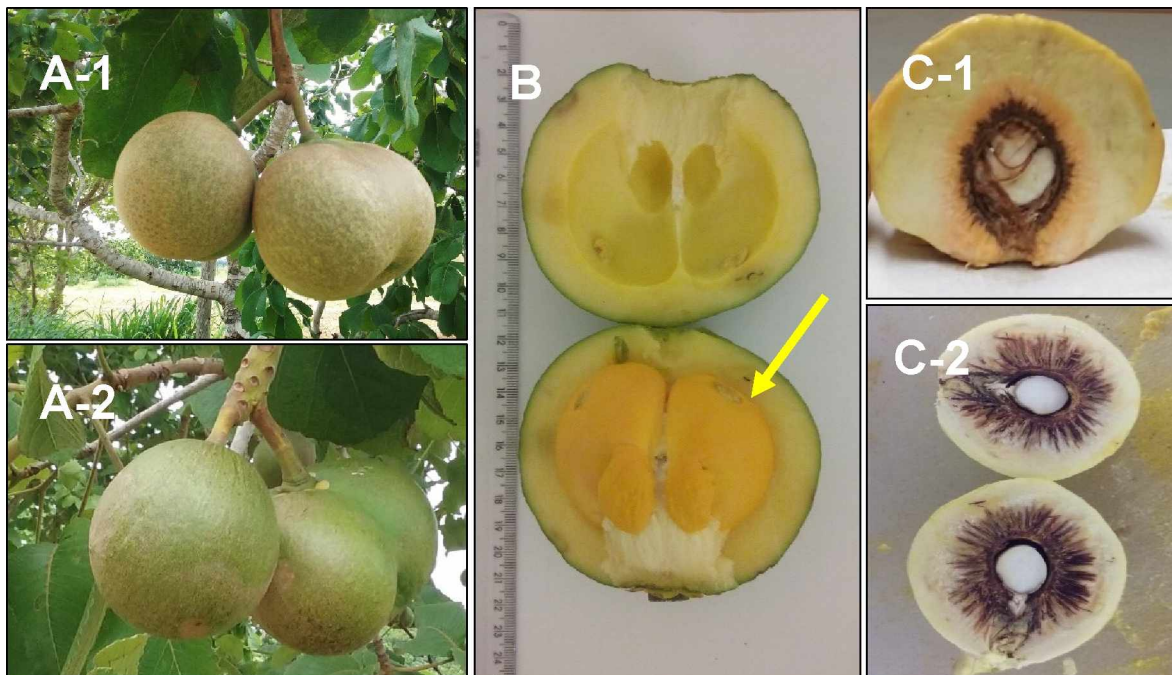
Os botões florais (Figura 1B) dão origem a flores exuberantes (Figura 1C) com coloração amarela ou branca, que medem aproximadamente oito centímetros

de comprimento, são compostas por cinco pétalas individuais esbranquiçadas, com abundantes estames (OLIVEIRA; PIE, 1998; BRAGA, 2016).

Morfológicamente, o fruto pequi (Figura 2) é composto por exocarpo, mesocarpo externo, mesocarpo interno, endocarpo espinhoso. O exocarpo compreende a porção externa da casca, com coloração esverdeada que pode variar ao marrom por consequência do amadurecimento do fruto. O mesocarpo externo está intimamente ligado ao exocarpo e constituído por espessa polpa branca que fica aderida ao mesocarpo interno, oleoso e de coloração que varia de amarelo claro ao alaranjado, devido à presença de carotenoides.

O endocarpo, duro e lenhoso, é formado por inúmeros espinhos finos e pequenos e dentro dele se aloja uma amêndoa branca, oleaginosa e comestível, envolvida por uma fina película marrom. A amêndoa (*putâmen*) é a unidade de dispersão que se constitui pela semente envolta pelo endocarpo (SILVA et al., 2009) e pelo mesocarpo interno que recobre o endocarpo (BRAGA, 2016; ALMEIDA et al., 1998; JÚNIOR et al., 2004).





**Figura 2-** Pequi (Fruto do pequizeiro). **A-1 e A-2)** Frutos na árvore. **B)** Disposição dos pirênios (seta) no fruto. **C-1)** Detalhes do endocarpo sem e **C-2)** com espinho. Escala em centímetros. **Fonte:** Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes.

Os espinhos podem estar presentes no endocarpo (KERR; SILVA; TCHUCARRAMAE, 2007) e quando presentes, são pretos ou avermelhados, dispostos em grupo, apontados em direção à polpa (JÚNIOR et al., 2004; VILAS BOAS, 2004; VALENTE, 2012). São delgados, rígidos com 2 a 5 mm de comprimento e servem como proteção para a semente (amêndoa) (JÚNIOR et al., 2004).

Uma única matriz de pequizeiro que não produz espinho no endocarpo foi relatada por Kerr; Silva e Tchucarramae (2007) em São José do Xingu – MT e seus frutos foram trazidos para a Universidade Federal de Uberlândia para produção de mudas. Atualmente, as matrizes são cultivadas na Estação Experimental Fazenda Água Limpa da Universidade Federal de Uberlândia, localizada no município de Uberlândia – MG.

### **1.1.3 Constituintes químicos, importância nutricional e farmacológica do fruto pequi**

Os pequizeiros são fontes importantes de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, principalmente, em suas folhas (MEDEIROS; HARIDASAN, 1985). Nas amêndoas há grande quantidade de manganês, zinco, cobre, magnésio, fósforo, sódio, ferro e cálcio, estando estes três últimos, em grande quantidade, também, na polpa (SILVA et al., 2009, ALMEIDA et al., 1998).

O teor proteico e lipídico do pequi se destaca em relação a outras espécies nativas do Cerrado (ALMEIDA, 1998).

A quantidade de lipídios presente na polpa e na semente de seus frutos (ARAUJO, 1995) tem elevados valores energéticos. As calorias obtidas pela polpa e óleo de pequi correspondem a 18% das necessidades calóricas de um adulto com uma dieta de 2.000 Kcal (LIMA, 2008).

A polpa e a amêndoa apresentam, predominantemente, ácidos graxos insaturados. O óleo do fruto contém ácido mirístico, ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico, vitamina A e carotenoides (PECHNIK; GUIMARÃES, 1957, GUEDES et al., 2017). O ácido palmítico presente no pequi (MIRANDA-VILELA et al., 2009), torna o fruto adequado para aplicações como margarina e gordura (GUEDES et al., 2017).

A polpa possui de 36% a 66% de óleo (FARIA-MACHADO et al., 2015) e minerais (SILVA et al., 2009). O óleo da polpa do pequi contém de 54% a 60% de ácido oleico (MIRANDA-VILELA et al., 2009) que tem importante função no uso alimentar, cosmético e oleoquímico, devido a sua alta estabilidade oxidativa (GUEDES et al., 2017; LIMA et al., 2007; SILVA; FONSECA, 2016). Apresenta, em menores quantidades, ácido palmitoleico (0,67%), linoleico (1,36%), linolênico (0,51%), esteárico (1,28%) e araquidônico (0,12%) (MIRANDA-VILELA et al., 2009). O óleo da polpa tem alto teor de carotenoides com concentrações de até 246 mg /g e triacilgliceróis (AQUINO et al., 2009).

Os principais triacilgliceróis presentes no óleo de polpa são o 3-dipalmitoil-2-oleil-glicerol, 1,2-dioleil-3-palmitoilglicerol e palmitoil-oleil-estearoilglicerol (FACIOLI; GONÇALVES, 1998; GUEDES et al., 2017). Os ácidos graxos têm como funções principais a conformação das membranas celulares, sendo também precursores de substâncias como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.

Apesar da riqueza de substâncias, o consumo de grande quantidade de pequi, na forma de polpa ou de óleo, não é indicado, pois estudos demonstraram sua capacidade de elevar o colesterol sanguíneo (RIGUEIRA, 2003).

A polpa do pequi sem espinho no endocarpo apresenta maior quantidade de carboidratos, lipídeos e vitamina C quando comparada à polpa do pequi com espinho no endocarpo. Foi observada maior quantidade de carboidratos, lipídeos e proteínas na amêndoa do pequi sem espinho (GOMES et al., 2019).

O *C. brasiliense* possui alta concentração de fenóis como, flavonoide, quercetina e quercetina 3-O-arabinose, além de componentes ácidos como, ácido gálico e ácido quínico no fruto e na casca (KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2008; MIRANDA-VILELA et al., 2009).

O ácido ascórbico (vitamina C) participa dos processos celulares de oxirredução e na biossíntese das catecolaminas. Variação nos teores de vitamina C é observada entre os frutos do Cerrado e, novamente, o pequi se destaca entre as espécies nativas por apresentar 78,72 mg 100/g de vitamina C, valor superior ao de frutas tradicionalmente cultivadas e consumidas pela população brasileira, como a laranja (40,9 mg 100/g) e o limão (26,4 mg 100/g) (MANELAAZULAY, 2003; RIGUEIRA, 2003).

Com relação aos carotenoides do fruto, foram identificados e quantificados os principais carotenoides presentes no mesocarpo interno, antes e depois do cozimento convencional. Antes do cozimento,  $\beta$ -caroteno (9,35 mg /g), z-caroteno (17,79 mg /g), criptoflavina (12,14 mg /g),  $\beta$ -criptoxantina (93,67 mg /g), anteraxantina (79,14 mg /g), zeaxantina (4,32 mg /g) e mutatoxantina (14,68 mg /g). Após o cozimento os valores carotenoides foram  $\beta$ -caroteno (12,17 mg /g), z-caroteno (8,17 mg /g), criptoflavina (12,65 mg /g),  $\beta$ -criptoxantina (7,99 mg /g), anteraxantina (31,28 mg /g), zeaxantina (79,73 mg /g) e mutatoxantina (2,07 mg /g) (RAMOS et al., 2001). Os  $\alpha$  e  $\beta$  carotenos juntos representam 10% dos pigmentos carotenóides totais na polpa do pequi (DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ PAREDES-LÓPES, 2000; GOMES et al., 2005; LIMA et al., 2007).

A polpa do pequi apresenta grande quantidade de fibra, aproximadamente 13% (LIMA et al., 2007). O consumo regular de fibras na dieta está relacionado com a redução do risco de diversas doenças, inclusive na redução dos níveis de glicemia

pós-brandial (LIMA et al., 2007). A presença considerável de pectina na polpa (BORGES, 2011) torna o fruto viável para o processamento.

Outro aspecto interessante do estudo de pequi é a investigação de seu potencial para preparação de produtos que possam ser utilizados na indústria farmacêutica. A busca por novos fármacos que tratem com eficácia e baixa toxicidade as doenças inflamatórias têm despertado o interesse dos pesquisadores e das grandes empresas farmacêuticas.

A resposta inflamatória e a morte celular são processos essenciais para a manutenção da homeostase do organismo, mas precisam ser modulados de maneira cuidadosa pelo sistema imune para não se tornarem prejudiciais, causando lesões e danos irreversíveis aos tecidos (MAHER et al., 2014).

O desenvolvimento de fármacos com possibilidade de associação à via TNF- $\alpha$  é importante alvo para tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. 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).

O pequi é um fruto rico em substâncias químicas que possuem atividade antioxidante (MOURA; CHAVES; NAVES, 2013). Apresenta alta concentração de ácido gálico, ácido quínico, polifenóis como flavonoide, quercetina e quercetina 3-O-arabinose, tanto no fruto quanto na casca, especialmente quando em extrações etanólicas (ROESLER et al., 2008).

Ácidos elágico e gálico foram encontrados em extratos e frações de pequi. O ácido elágico pode apresentar várias funções biológicas como antimutagênese, anticarcinogênese, inibidor das enzimas topoisomerasas, diminuição da peroxidação lipídica e aumento da expressão da enzima glutathione peroxidase, justificando assim, sua elevada atividade antioxidante (LIMA et al., 2007).

A polpa do pequi possui 209 mg de fenólicos totais em 100g de polpa, valores superiores aos encontrados na maioria das polpas de frutas consumidas no Brasil (LIMA et al., 2007). Um valor ainda superior foi encontrado por Gomes e colaboradores (2019), que descreveram 902,12 mg de compostos fenólicos por 100 g de polpa de pequi com espinho e 566,69 mg, para a polpa dos frutos sem espinho. Além disso, a casca dos frutos sem espinho apresentou 531,68 mg de compostos

fenólicos e 602,30 mg por 100 g de casca de pequi com espinho (GOMES et al., 2019).

Os compostos fenólicos compõem a grande classe dos fitoquímicos alimentares, que possuem diversas funções como, antioxidantes, bloqueadores da ação de enzimas que causam inflamação, inibição da aglomeração plaquetária e a ativação de carcinógenos (MANACH et al., 2004; LIU, 2006).

Segundo Lima et al. (2007), o pequi é um fruto encontrado em regiões onde as árvores recebem alta incidência de raios solares, favorecendo a geração de radicais livres, com a consequente biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes (compostos fenólicos e carotenoides totais). Diversos trabalhos já relataram que a capacidade antioxidante do pequi está diretamente relacionada aos compostos fenólicos (KUSKOSKI et al., 2005; LIMA et al., 2007; ROESLER et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; MOURA et al., 2017, DUAVY et al., 2019).

As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas a sua capacidade protetora na manutenção da integridade celular e ação contra radicais livres, mecanismos relacionados ao envelhecimento celular (BRAGA, 2007).

Oliveira (2013) investigou a atividade antinoceptiva e anti-inflamatória do óleo de pequi na artrite induzida por zymosan em ratos e sugeriu que o óleo do pequi exibe efeito anti-inflamatório, que pode estar associado à inibição de citocinas pró-inflamatórias.

O potencial antioxidante do extrato aquoso de folhas de *C. coriaceum* e o óleo da polpa do seu fruto foi avaliado em *Drosophila melanogaster* com objetivo de utilização para tratamento de doenças humanas relacionadas ao estresse oxidativo (DUAVY et al., 2019). As duas frações do pequizeiro avaliadas não causaram a morte das moscas, um importante sinal de pouca ou nenhuma toxicidade das plantas.

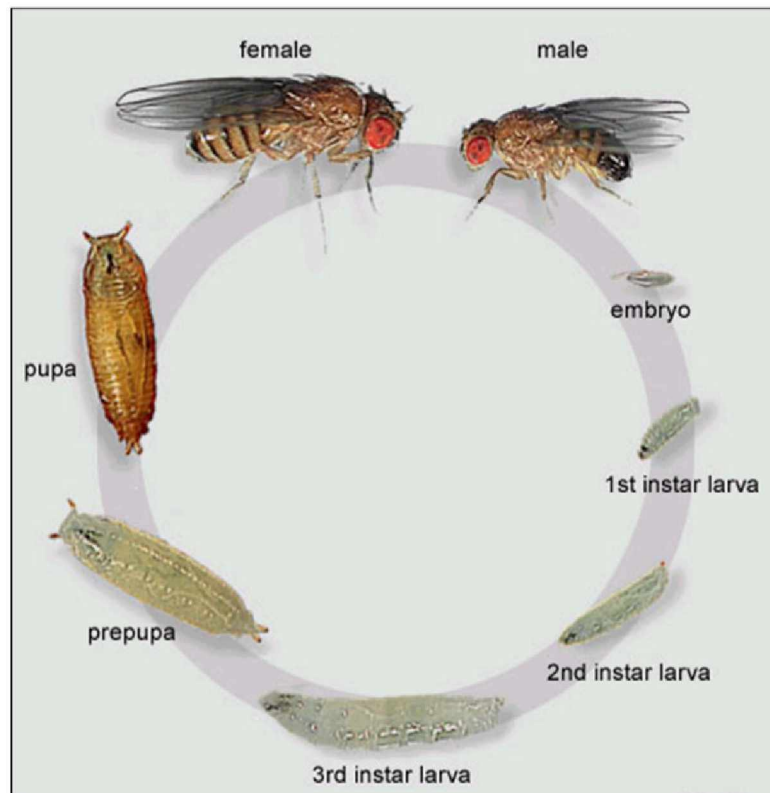
Um dos objetivos dessa investigação foi avaliar o potencial do extrato etanólico da casca e da polpa do pequi sem espinho no endocarpo e do pequi com espinho de frutos de *C. brasiliense*, para atuar na resposta inflamatória e na via de morte celular induzida por TNF- $\alpha$ . Para isso foi utilizado o organismo modelo, *Drosophila melanogaster*, linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, que apresenta superexpressão do gene eiger, ortólogo de TNF- $\alpha$  humano, direcionado para o

tecido do olho da mosca, onde produz o fenótipo de olho reduzido devido à processo inflamatório.

## **1.2. Sobre *Drosophila melanogaster*, organismo modelo utilizado para o teste de potencial farmacológico do pequi**

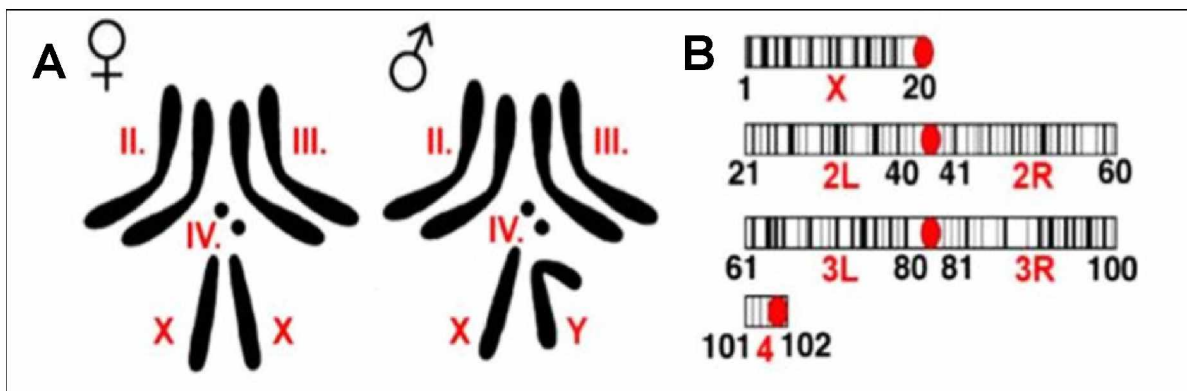
*Drosophila melanogaster* é um inseto holometábolo, pequeno (2-3 milímetros de comprimento) encontrado nas frutas, especialmente banana, em processo de decomposição, sendo por isso conhecida, popularmente, como “mosca da fruta” (LYNCH et al., 2012).

A *Drosophila melanogaster* possui ciclo de vida rápido (Figura 3). 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, o de pupa.



**Figura 3-** Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. **Fonte:** ROOTE; PROKOP, 2013.

À 25°C, o ciclo de vida se completa em cerca de 10-12 dias, quando a pupa eclode em adultos (GRAF et al., 1996; JENNINGS, 2011). As moscas produzem grande número de descendentes a partir de 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 4), sendo três pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais.



**Figura 4-** 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; HEISENBERG, 1996.

A *Drosophila melanogaster* vem sendo utilizada nas ciências biológicas para o desenvolvimento de estudos científicos, desde que Thomas Hunt Morgan investigou e comprovou a Teoria Cromossômica da Herança (ADAMS et al., 2000; SILVA et al., 2015).

Foi um dos primeiros organismos a ter seu genoma sequenciado e 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.

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, sinalização (CADIGAN e PEIFER, 2009), ciclo celular (LEE; ORR-WEAVER, 2003), desenvolvimento, função e comportamento do sistema nervoso (BELLEN et al., 2010; WEINER, 2000) 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;



TAYLOR, 2010; REITER et al., 2001) e triagem de moléculas biologicamente ativas com potencial farmacológico.

### 1.2.1 Construção da 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 (*knockdown*) foram cruciais para desvendar a importância científica da mosca da fruta (KELLER, 1996; ROOTE; PROKOP, 2013; TOBA, 1999).

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

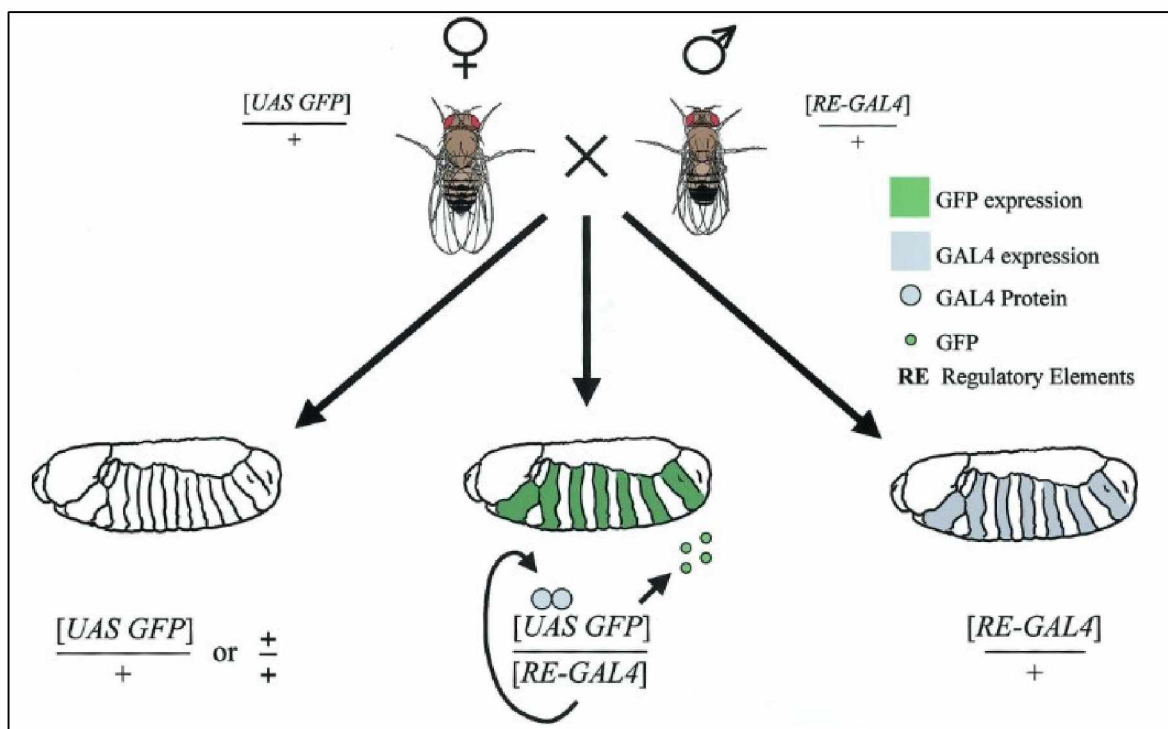
Centros de estoque de *Drosophila melanogaster*, como o *Bloomington* (Estados Unidos), mantêm disponível o acesso aos transgênicos. Os indivíduos transgênicos são mantidos e classificados conforme sua aplicação e construção gênica (COOK et al., 2010; ST. PIRRE et al., 2019).

### 1.2.2 Sistema GAL4 / UAS

A utilização do sistema GAL4/UAS em *Drosophila* para estudo de expressão gênica começou em 1993 (ELLIOTT; BRAND, 2008). GAL4 é um fator de transcrição identificado na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e UAS é um promotor gênico (ELLIOTT; BRAND, 2008; ROOTE, 2013).

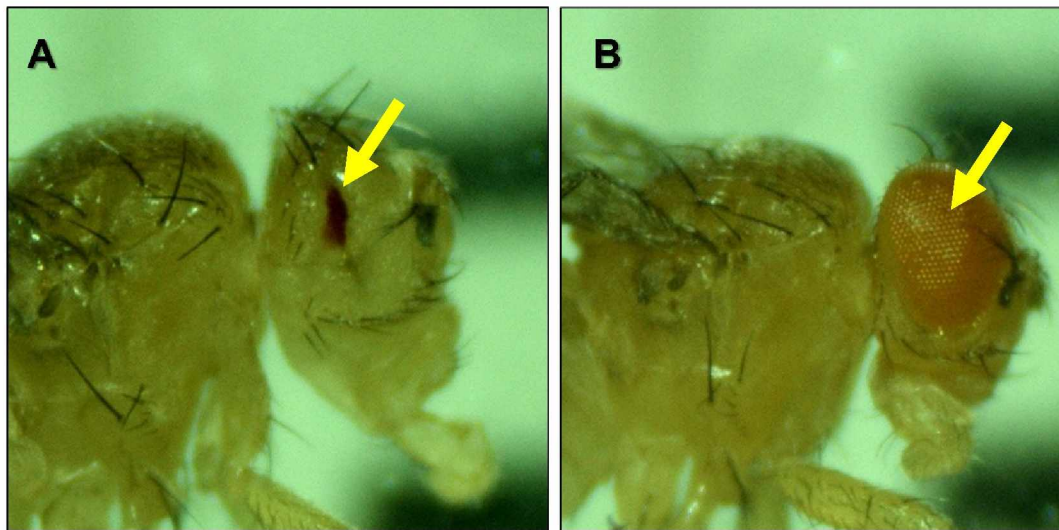
A ativação do sistema acontece pelo cruzamento entre linhagens expressando GAL4 (*driver*) com linhagens contendo o elemento UAS (*responder*). Como resultado do cruzamento (Figura 5) a progênie expressa o gene ligado ao UAS sob um padrão de expressão dirigido por GAL4 (ELLIOTT; BRAND, 2008; ROOTE, 2013). 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 (UASGFP) 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).

Nessa pesquisa, o sistema GAL4/UAS foi utilizado para a construção de *D. melanogaster* **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, que é o ortólogo de TNF- $\alpha$  humano, em *Drosophila melanogaster* e é direcionado para o olho da mosca. Essas moscas 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 transgênico GMR-GAL4 > UAS-eiger, com olho reduzido (seta). **B)** Indivíduo da linhagem selvagem *Canton S*, apresentando olho de tamanho normal (seta). **Fonte:** Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes.

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

Em *Drosophila melanogaster* e nos mamíferos, foi visto que a morte celular é regulada por mecanismos extrínsecos, o chamado controle social da morte celular (RAFF, 1992). A *D. melanogaster* é considerado modelo genético para o estudo *in vivo* da morte celular e sua regulação fisiológica.

Os componentes da família do fator de necrose tumoral (TNF) estão envolvidos na regulação da infecção, inflamação, morte celular, doenças autoimunes, sobrevivência celular, proliferação e homeostase dos tecidos (AL-SADI et al., 2016; DEORA et al., 2017; LEE et al., 2015; LI et al., 2019; LOCKSLEY et al., 2001; PEDIGO et al., 2016).

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

As funções do fator de necrose tumoral estão relacionadas a moléculas pleiotrópicas, como o fator de transcrição do Fator Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a c-Jun N-terminal cinase (JNK) e a proteína cinase ativada por mitogênio (p38-MAPK) (LI et al., 2019). No entanto, ainda há muitos mecanismos que necessitam ser esclarecidos a respeito da sinalização de TNF (LI et al., 2019).

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.

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

O gene *eiger* foi identificado como um novo gatilho de morte celular em *Drosophila melanogaster*, sendo o primeiro e, até então, único homólogo de TNF- $\alpha$  de mamíferos identificado na mosca da fruta (IGAKI et al., 2002). Esse gene 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- $\alpha$  humano se dá na porção C-terminal, com 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).

```

MTAETLKPFITPTSANDDGFPKATSTATAQRRTRQLIPLVLGFIGLGLVVAILALTIWQTTRVSHLDKELKSLK
RVVDNLQQRLGINYLDEFDEFQKEYENALIDYPKKVDGLTDEEDDDDDGGLDSIADDEDDDDVSYSSVDDV
GADYEDYDMLNKLNNNAHTGTTPTSETTAEGEGETDSASSASNDNDNVFDDFTSYNAHKKKQERKSRSIAD
VRNEEQNIQGNHTELQEKSSNEATSKESPAPLHRRRRMHRRHLLVRKGESLLSARSEDSRPAAHFHLS
SRRRHQGSMDYHGDYIGNDNERNSYQGHFQTRDGVLTVTNTGLYYVYAQICYNNSHDQNGFIVFQGDT
PFLQCLNTVPTNMPHKVHTCHTSGLIHLERNERHLKDIHNDRNAVLREGNNRSYFGIFKV

```

**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.

Eiger tem como receptores Wengen e, mais recentemente, Grindelwald, que interagem fisicamente através de seus domínios de homologia com TNF e TNFR, respectivamente, resultando na indução de apoptose celular via JNK (ANDERSEN et al., 2015; CHA et al., 2003).

O fenótipo de olho reduzido induzido por expressão do gene eiger depende da via de sinalização de JNK (Figura 8).



levando à morte celular e à formação de olhos reduzidos em adultos de *D. melanogaster* (IGAKI et al., 2002).

Porém, a morte celular induzida por GMR > eiger pode não ser apoptótica porque seu fenótipo de redução ocular não pode ser suprimido por P35 que é um inibidor das caspases efetoras DrICE e Dcp-1 (HAY, WOLFF; RUBIN, 1994; LI et al., 2019). Entretanto, a expressão de olhos reduzidos provocados por GMR > eiger pode ser suprimida pela inibição do iniciador de caspase Dronc (MORENO, YAN; BASLER, 2002; MA et al, 2012).

Ainda não foi possível determinar como o eiger pode induzir a morte celular apoptótica e não apoptótica (LI et al., 2019).

O pequi, apresenta substâncias antioxidantes já aplicadas em diferentes aspectos, que podem ser importantes para o tratamento de doenças relacionadas ao processo de inflamação.

Existem características morfológicas que distinguem os frutos sem e com espinhos de *Caryocar brasiliense* que precisam ser avaliadas Da mesma forma, há necessidade de se realizar a avaliação *in vivo* dos extratos dos frutos para a determinação do potencial das substâncias provenientes de seu metabolismo em fármacos relacionados ao tratamento da inflamação

Sendo assim, nossas hipóteses são que os frutos sem e com espinho apresentam características morfológicas externas que podem facilitar sua diferenciação e melhoramento, as quais precisam ser validadas, assim como seu potencial farmacológico.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar as características morfológicas e o potencial farmacológico de frutos (pequi) sem e com espinho no endocarpo de *Caryocar brasiliense*

### 2.1. Objetivos Específicos

- Analisar as características morfológicas externas e internas dos frutos sem e com espinho no endocarpo de *Caryocar brasiliense*.
- Determinar características morfológicas que auxiliem na identificação de pequizeiros e dos frutos sem e com espinho.
- Avaliar, por meio de Teste de Sobrevivência, o efeito do extrato etanólico de polpa e de casca de pequi sem e com espinho no endocarpo no desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*,
- Avaliar, por mensuração da área dos olhos, a ação anti-apoptótica de diferentes concentrações de extratos de pequi;
- Quantificar, por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT- qPCR), os níveis de transcritos dos genes *eiger* e *wengen* em *Drosophila melanogaster* não tratadas e tratadas com os extratos etanólicos de pequi;
- Validar, em *Drosophila melanogaster* modelo de inflamação, o potencial farmacológico do extrato etanólico de polpa e de casca do pequi.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética (LABGEN), Laboratório de Nanobiotecnologia (LABNANO), Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Melhoramento de Plantas (LACTEV), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

#### 3.1. Coleta de frutos, amostragem e armazenamento

As análises foram realizadas em frutos de *Caryocar brasiliense*, com e sem espinho no endocarpo, cultivados na Estação Experimental Fazenda Água Limpa (19° 05' 57,92" S e 48° 20' 49,79" W) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) localizada no município de Uberlândia, Minas Gerais, em área de Cerrado sentido amplo.

A população de pequizeiros estudada tem 123 indivíduos sendo que, até o momento, foram identificadas 63 árvores produtoras de frutos com espinho e 25 produtoras de frutos sem espinho. A coleta dos frutos foi realizada nos meses de dezembro de 2016 e janeiro de 2017, para as análises de biometria e em janeiro de 2018, para as análises em *Drosophila melanogaster*.

Os frutos foram coletados em estágio de maturação completa. Após a coleta foram armazenados em sacos plásticos devidamente identificados e transportados até o Laboratório, onde foram armazenados até o momento das análises. Os frutos destinados às análises moleculares foram armazenados em *freezer* (Electrolux) à temperatura de -20°C.

Amostras de um pequizeiro produtor de frutos sem espinho e de um pequizeiro produtor de frutos com espinho no endocarpo foram depositados no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU) com os números de registro HUFU 76.866 e HUFU 76.867, respectivamente.

### 3.2. Análise biométrica dos frutos

Para as análises de biometria, foram colhidos, aleatoriamente, 20 frutos em cada árvore, 9 (nove) produtoras de frutos sem espinho no endocarpo, aqui identificadas como **7D, 23C, 20C, 8A, 28B, 26B, 18C, 15B, 14B** e 6 (seis) produtoras de frutos com espinho no endocarpo, a saber **3C, 23B, 29B, 21B, 17C, 7A**, em total de 300 frutos.

Na análise biométrica foram aferidas massa (g), altura (cm) e largura do fruto (cm). Após as medições das variáveis externas, os frutos foram abertos com auxílio de uma faca, para determinar o número de pirênios (caroços) e realizar as medições de massa (g), largura (cm) e comprimento (cm) de cada caroço. Posteriormente, cada caroço foi, também, aberto para medida da espessura da polpa (cm) e da largura da castanha (cm). A abertura de cada caroço permitiu verificar a presença ou ausência dos espinhos no endocarpo.

As variáveis de massa foram obtidas com auxílio de uma balança digital (Bel) e resultados expressos em gramas. As medidas de dimensões foram obtidas com paquímetro e anotadas em centímetros. Todos os dados obtidos foram anotados em planilhas previamente preparadas para as análises morfológicas.

### 3.3. Preparação do extrato etanólico

Para o processo de extração, foram pesados 50g de material vegetal *in natura*, aplicando-se o método adaptado de maceração dinâmica (FRANCO et al, 2019). O material permaneceu imerso em 250 mL de etanol (Dinâmica, 98 %) (proporção de 1:5 m/v) durante 4 dias. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido em rotaevaporador sob pressão reduzida, a 30° C. O resíduo do material vegetal foi remacerado por mais duas vezes, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. O extrato gerado foi congelado e liofilizado para a remoção da água e posteriormente, armazenado em freezer à -20°C.

### **3.4. Material biológico e grupos para análise do potencial farmacológico do pequi**

Para realizar os experimentos foram utilizados larvas, pupas e adultos de indivíduos transgênicos GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* e, para Controle, a linhagem selvagem *Canton S*.

Os indivíduos transgênicos 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 Federal de Uberlândia (UFU).

A seguir estão descritos os ensaios e os grupos experimentais em cada uma das metodologias, conforme identificados por RODRIGUES, T. S. (2017):

**a)** Ensaio de Sobrevivência: análise de larvas, pupas e moscas adultas GMR-GAL4 > UAS-eiger de *D. melanogaster*, grupos tratados com o extrato etanólico de 1) casca do pequi com e sem espinho nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) polpa de pequi com e sem espinho nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml e 3) Grupo não tratado (Controle Negativo, água);

**b)** Quantificação da Área do Olho: mensuração de olho de moscas adultas GMR-GAL4 > UAS-eiger de *D. melanogaster*, de grupos tratados com os mesmos extratos etanólicos e concentrações descritos no item **3.4.a**;

**c)** Análise de Expressão Gênica: RNA extraído de pupas de GMR-GAL4 > UAS-eiger de *D. melanogaster*, de grupos tratados com extrato de polpa sem e com espinho nas concentrações 25 e 50 mg/ml e de casca sem e com espinho nas concentrações 12,5 e 6,25 mg/ml, para síntese de cDNA e análise por RT-PCR em Tempo Real.

Para o tratamento com o extrato etanólico de casca e polpa do pequi com e sem espinho foram utilizadas larvas de terceiro estágio (L3) de *D. melanogaster*.

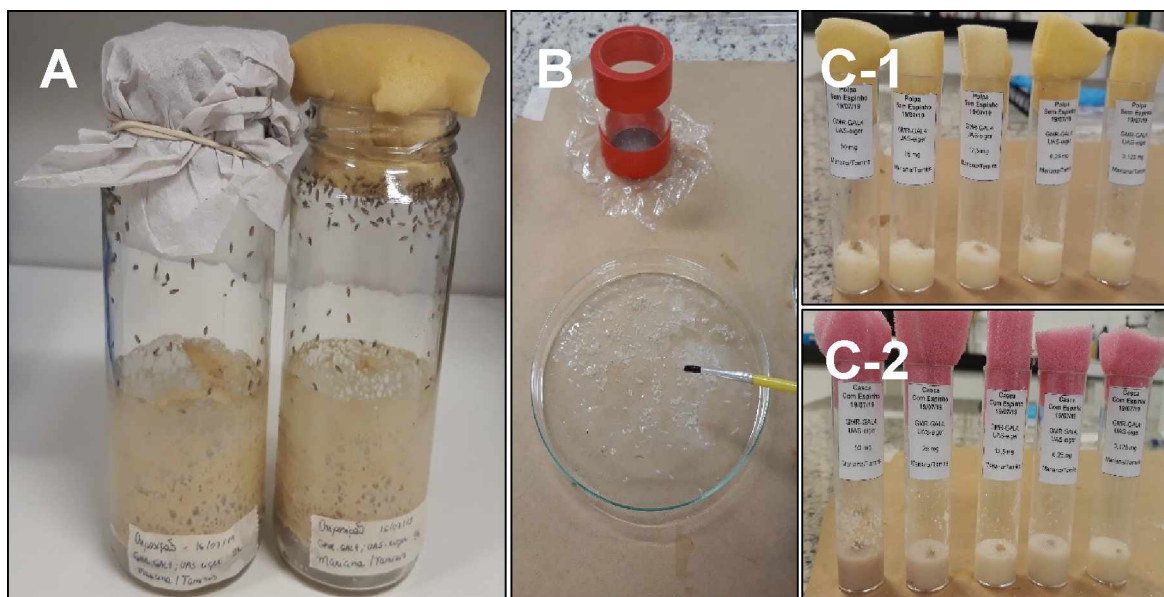
Os indivíduos em estudo foram mantidas em estoque no Laboratório de Genética (LABGEN) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em frascos contendo ¼ de meio de cultura à base de fubá (1500 ml de água; 27 g de levedura; 15 g de farinha de soja; 109,5 g de fubá; 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).

### **3.5. Testes para estudo de ação anti-inflamatória e anti-apoptótica dos extratos de pequi em *Drosophila melanogaster***

#### **3.5.1 Obtenção da progênie de *Drosophila melanogaster***

Moscas adultas (machos e fêmeas de GMR-GAL4 > UAS-eiger) foram mantidas em frascos por 8 horas contendo meio de cultura à base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose (açúcar refinado), para cruzamento e oviposição. Após esse período, as moscas foram retiradas dos frascos, ficando apenas os ovos no meio com fermento (Figura 9). Larvas de terceiro estágio (L3) foram coletadas após  $72 \pm 4$  horas e em seguida lavadas com água ultrapura (Direct-Q Millipore) e recolhidas com auxílio de peneira de malha fina. Foram colocadas 20 larvas em vials transparentes (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 extrato etanólico de casca ou de polpa de pequi com e sem espinho (concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml de extrato etanólico) (Figura 9 C-1 e C-2).



**Figura 9** – Obtenção da progênie de *Drosophila melanogaster*. **A)** Frascos com meio para oviposição e adultos **B)** Coleta de larvas (L3) **C-1 e C-2)** Vials com larvas para tratamento. **Fonte:** Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes.

Larvas do grupo Controle foram manipuladas da mesma forma e tratadas com água ultrapura.

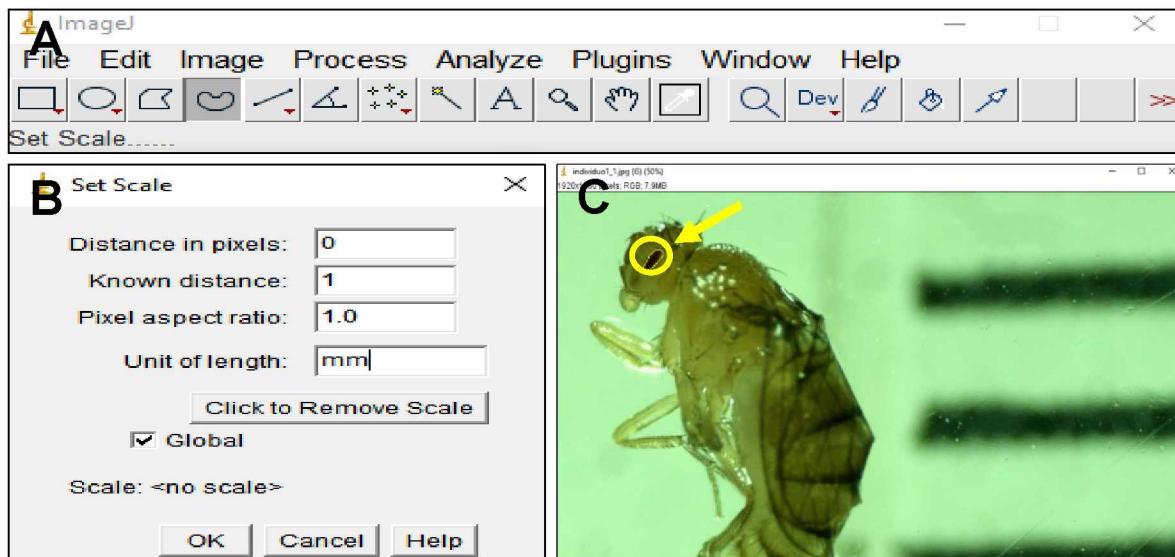
Todas as larvas foram submetidas a tratamento crônico por 48 horas, até completarem o processo de metamorfose para pupa.

Para o ensaio de sobrevivência foram tratadas 20 (vinte) larvas em cada uma das concentrações. Registrou-se o número de larvas que se tornaram pupas e o número de pupas que eclodiram em adultos.

### 3.5.2 Análise de imagem

Após a eclosão, as moscas adultas GMR-GAL4 > UAS-eiger tratadas com extrato etanólico de casca ou de polpa de pequi com e sem espinho e as do Controle foram anestesiadas com éter etílico, fixadas em etanol 70% para visualização em microscópio estereoscópico (Nikon SMZ 800, aumento de 2,0X) e fotografadas com câmera fotográfica digital (Canon) para análise da área do olho.

As imagens obtidas foram analisadas pelo Software Mac Biophotonics Image J. A área de cada olho foi selecionada e quantificada em mm<sup>2</sup> (Figura 10) para análise.



**Figura 10** - Quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster* pelo Software Image J. **A)** Layout do software Image J. **B)** Janela de calibração. **C)** Olho a ser analisado (seta). Fonte: Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes.

### 3.5.3 Análise da expressão gênica

#### 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, com 500 µL de Trizol para cada 20 pupas, para cada concentração de tratamento.

O tecido foi agitado em vortex e incubado a 30°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 500 µL de Trizol, agitado por 15 segundos em vortex e centrifugado a 12000 g à 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um microtubo de 1,5 mL onde foram adicionados 500 µL de isopropanol. Após rápida agitação, o material foi incubado em ultrafreezer (PANASONIC, -80°C) por 10 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000 g à 4°C por 10 minutos e o *pellet* lavado com 1 ml de etanol 75% gelado. Uma nova

centrifugação foi realizada a 7500 g, 4°C, por 5 minutos. Depois de seco à temperatura ambiente, o RNA foi ressuspendido em *Água Nuclease Free*.

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.

### **Síntese de cDNA**

Para a síntese de cDNA (RT) foi utilizada a enzima *M-MLV transcriptase reverse* (*Promega*) e Oligo dT (15) (*Invitrogen*) seguindo as 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. Foram 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 *Nuclease Free*. 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 utilizado 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	Primers	Tamanho do Fragmento (pb)	TA (°C)
Ortólogo do TNF- $\alpha$ em Humanos	Eiger	F: ATCGTCATCATCATCATCGTCG R: TGGCACTCGTTGGCGTTAT	138 pb	59
Ortólogo do Receptor de TNF- $\alpha$ em Humanos	Wengen	F: ACCTGGCTCTGCTACTGCTGTC R: GCAGCGGAGGATGAAGAGG	72	59
Proteína ribossomal L32	RPL32	F: GACCATCCGCCCAGCATAC R: CGGCGACGCACTCTGTT	138 pb	59

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.



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

As reações de qPCR foram realizadas simultaneamente para os genes alvo e 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.

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 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.

Nessa análise foi utilizado como amostra calibradora um *pool* de amostras de pupa.

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*).

### 3.6. Análise estatística

#### 3.6.1 Biometria dos frutos

Cada cinco frutos (de cada árvore) consistiu em uma repetição, foram realizadas quatro repetições. Os resultados originaram dois grupos: (1) grupo de frutos sem espinho no endocarpo e (2) grupo de frutos com espinho no endocarpo. A partir da planilha, os dados foram submetidos à estatística descritiva (valores mínimo e máximo, média, coeficiente de variação).

Foram utilizadas técnicas multivariadas (análise de agrupamento e medida de dissimilaridade) para os dados morfológicos de frutos de pequizeiro com e sem espinho.

As medidas de dissimilaridade foram determinadas segundo o modelo de análise multivariada, para obtenção da matriz de dissimilaridade. Utilizando a matriz de dissimilaridade, foi aplicado o método de agrupamento de otimização de Tocher e o método de agrupamento da ligação média entre grupos ou UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizando a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) como medida de dissimilaridade.

O critério de Singh (1981) foi empregado para quantificar a contribuição relativa das características avaliadas para a divergência genética. As médias das características foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (1974) para os resultados nos dois grupos, pequi sem e com espinho.

Foram estimados os coeficientes de correlação fenotípica e genotípica entre as características. A significância da correlação fenotípica foi estimada pelo Teste t com  $(n-2)$  graus de liberdade, em que n corresponde ao número de matrizes de pequizeiro avaliado. A significância das correlações genotípicas foi avaliada pelo *bootstrapping* com 5.000 simulações.

As análises foram realizadas utilizando o programa Computacional *Genes*, versão 2008 (CRUZ, 2008).

### 3.6.2 Testes com extrato etanólico de pequi sem e com espinho

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* (Version 6.00). Na 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. Resultados de análise morfológica de fruto (pequi) de pequizeiro

A análise descritiva dos dados obtidos a partir da avaliação física dos frutos de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess.) mostrou variações fenotípicas entre frutos sem e com espinho no endocarpo. As características físicas de frutos sem espinho mostraram, quase sempre, médias superiores aos dos frutos com espinho.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na avaliação dos frutos. Com relação à massa dos frutos, foi encontrada uma média de 352,94 g para os frutos sem espinho e de 258,17 g para os frutos com espinho

O valor mínimo de altura nos frutos sem espinhos foi de 5,90 cm e máximo, de 12,10 cm, enquanto nos frutos com espinho, essa característica teve como valor mínimo 5,30 cm e máximo 9,90 cm.

A largura dos frutos seguiu o mesmo padrão, sendo de 8,71 cm a média dos frutos sem espinho e 8,20 cm nos frutos com espinho.

As medidas de massa, comprimento e largura dos pirênios foram superiores nos frutos sem espinho. Os frutos sem espinho apresentaram uma média de 72,04 g, variando entre 7,10 e 129,00 g e nos frutos com espinho média de 49,46 g, com mínimo de 21,10 g e máximo de 217 g, para a característica pirênio. Para comprimento dos pirênios foi encontrada média de 6,10 cm nos frutos sem espinho e 4,98 cm nos frutos com espinho. Para a largura dos pirênios a variação ficou entre 2,90 e 7,70 cm nos frutos sem espinho e entre 2,20 e 4,40 cm em frutos com espinho.

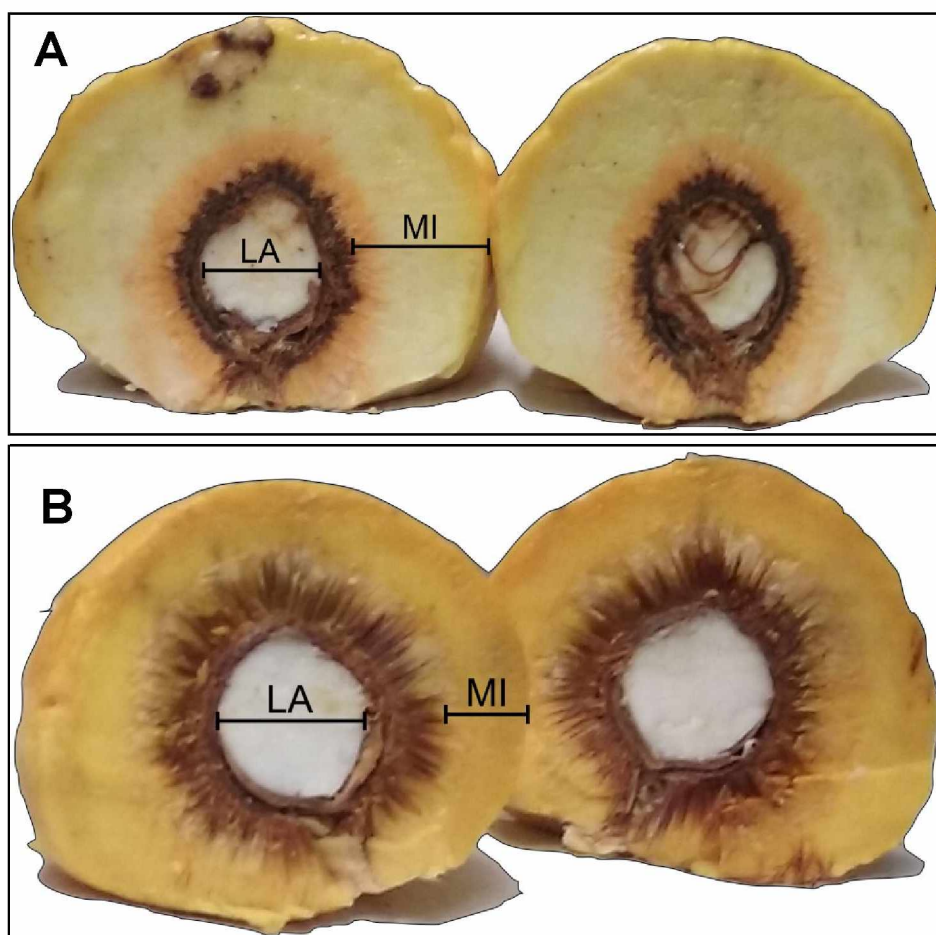
**Tabela 2:** Características descritivas de frutos de *Caryocar brasiliense* Cambess. sem e com espinho no endocarpo.

Característica	Sem espinhos					Com espinhos				
	Média	Mínimo	Máximo	D.P.	C.V. (%)	Média	Mínimo	Máximo	D.P.	C.V. (%)
MF (g)	352,94	56,30	986,00	141,50	40,09	258,17	133,00	788,60	108,49	42,02
AF (cm)	8,18	5,90	12,10	1,33	16,29	6,85	5,30	9,90	0,82	11,81
LF (cm)	8,71	1,20	13,5	1,49	17,09	8,20	1,40	12,80	1,82	22,21
MP (g)	72,04	7,10	129,00	16,66	23,12	49,46	21,10	217,00	21,21	42,88
CP (cm)	6,10	4,90	7,50	0,53	8,64	4,98	3,80	6,10	0,48	9,71
LP (cm)	3,82	2,90	7,70	0,52	13,51	3,51	2,20	4,40	0,34	9,68
EPO (cm)	1,34	0,70	2,10	0,26	19,71	1,09	0,60	1,50	0,20	18,21
LA (cm)	1,45	0,60	2,20	0,33	23,02	1,23	0,60	1,80	0,21	17,19

MF – Massa de Fruto; AF – Altura de Fruto; LF- Largura do Fruto; MP – Massa do Pirênio; AP – Altura do Pirênio; CP – Comprimento do Pirênio; LP – Largura do Pirênio; EPO – Espessura da Polpa; LA – Largura da Amêndoa. D.P. – Desvio Padrão; C.V. – Coeficiente de Variação.

Na Figura 11, é possível observar que a espessura da polpa de frutos sem espinho no endocarpo é maior quando comparada à de frutos com espinho, com média de 1,34 cm nos frutos sem espinho e de 1,09 cm, na polpa de frutos com espinho (Tabela 2).

A largura da amêndoa, parte interna do endocarpo (Figura 11) sem espinho no endocarpo apresentou média superior a encontrada para os frutos com espinhos, sendo de 1,45 cm e 1,23 cm, respectivamente. A medida de valor mínimo foi semelhante para os dois tipos de frutos, 0,60 cm.



**Figura 11-** Frutos do pequi em corte longitudinal. **A)** Pequi sem espinhos no endocarpo. **B)** Pequi com espinhos no endocarpo. **MI** – Mesocarpo Interno; **LA**-amêndoa. Escala em centímetros. **Fonte:** Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes

Pela análise da média das características, comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (1974), as amostras dos grupos de frutos sem e com espinho no caroço foram agrupadas em 2 a 6 grupos distintos (Tabela 3). O padrão de medidas se manteve em 87,5% das características avaliadas, nas quais a média dos frutos sem espinho no endocarpo foi superior à média dos frutos com espinho, exceto para a altura do fruto, cuja média foi igual para os dois grupos analisados, com valor de 8,21 cm (Tabela 3).

**Tabela 3:** Média estimada das características avaliadas em frutos sem e com espinho no caroço de *Caryocar brasiliense*

Grupos	Amostras (Pequizeiro)	Características							
		MF (g)	AF (cm)	LF (cm)	MP (g)	CP (cm)	LP (cm)	EPO (cm)	LA (cm)
Sem espinho	D7	424,14 <sub>b</sub>	8,69 <sub>c</sub>	9,39 <sub>a</sub>	66,04 <sub>a</sub>	5,96 <sub>a</sub>	4,40 <sub>a</sub>	1,08 <sub>c</sub>	1,91 <sub>a</sub>
	C23	259,79 <sub>c</sub>	7,39 <sub>e</sub>	7,23 <sub>b</sub>	67,02 <sub>a</sub>	5,75 <sub>a</sub>	3,64 <sub>b</sub>	1,20 <sub>c</sub>	1,65 <sub>b</sub>
	C20	286,24 <sub>c</sub>	7,20 <sub>f</sub>	7,77 <sub>b</sub>	68,53 <sub>a</sub>	5,83 <sub>a</sub>	3,73 <sub>b</sub>	1,34 <sub>b</sub>	1,43 <sub>c</sub>
	A8	349,13 <sub>c</sub>	7,77 <sub>e</sub>	9,26 <sub>a</sub>	77,14 <sub>a</sub>	6,28 <sub>a</sub>	3,87 <sub>b</sub>	1,52 <sub>b</sub>	1,36 <sub>c</sub>
	B28	535,86 <sub>b</sub>	10,34 <sub>a</sub>	9,87 <sub>a</sub>	70,36 <sub>a</sub>	6,52 <sub>a</sub>	3,73 <sub>b</sub>	1,27 <sub>c</sub>	1,26 <sub>c</sub>
	B26	498,76 <sub>b</sub>	10,55 <sub>a</sub>	9,26 <sub>a</sub>	75,48 <sub>a</sub>	23,05 <sub>b</sub>	4,32 <sub>a</sub>	1,43 <sub>b</sub>	1,56 <sub>b</sub>
	C18	331,50 <sub>c</sub>	7,42 <sub>e</sub>	8,86 <sub>a</sub>	61,14 <sub>b</sub>	6,06 <sub>a</sub>	3,80 <sub>b</sub>	1,12 <sub>c</sub>	1,24 <sub>c</sub>
	B15	332,10 <sub>c</sub>	8,35 <sub>d</sub>	8,91 <sub>a</sub>	97,62 <sub>a</sub>	6,57 <sub>a</sub>	4,13 <sub>a</sub>	1,70 <sub>a</sub>	1,22 <sub>c</sub>
	B14	350,62 <sub>c</sub>	7,45 <sub>e</sub>	9,08 <sub>a</sub>	83,27 <sub>a</sub>	6,12 <sub>a</sub>	4,08 <sub>a</sub>	1,63 <sub>a</sub>	1,26 <sub>c</sub>
Média do Grupo		354,41	8,21	8,63	71,95	7,74	3,92	1,34	1,41
Com espinho	C3	175,92 <sub>d</sub>	6,93 <sub>f</sub>	6,69 <sub>b</sub>	52,94 <sub>b</sub>	5,23 <sub>a</sub>	3,53 <sub>b</sub>	1,09 <sub>c</sub>	1,22 <sub>c</sub>
	B23	311,62 <sub>c</sub>	7,05 <sub>f</sub>	9,06 <sub>a</sub>	42,42 <sub>c</sub>	4,96 <sub>a</sub>	3,51 <sub>b</sub>	1,09 <sub>c</sub>	0,97 <sub>d</sub>
	B29	197,87 <sub>d</sub>	6,28 <sub>g</sub>	7,56 <sub>b</sub>	50,92 <sub>b</sub>	4,90 <sub>a</sub>	3,47 <sub>b</sub>	1,15 <sub>c</sub>	1,20 <sub>c</sub>
	B21	284,55 <sub>c</sub>	6,6 <sub>g</sub>	9,21 <sub>a</sub>	50,83 <sub>b</sub>	5,07 <sub>a</sub>	3,58 <sub>b</sub>	1,19 <sub>c</sub>	1,24 <sub>c</sub>
	C17	274,10 <sub>c</sub>	7,10 <sub>f</sub>	9,00 <sub>a</sub>	53,78 <sub>b</sub>	4,39 <sub>a</sub>	3,28 <sub>b</sub>	0,81 <sub>d</sub>	1,41 <sub>c</sub>
	A7	648,76 <sub>a</sub>	9,6 <sub>b</sub>	7,1 <sub>b</sub>	48,86 <sub>b</sub>	5,02 <sub>a</sub>	3,74 <sub>b</sub>	0,80 <sub>d</sub>	1,52 <sub>b</sub>
Média do Grupo		343,38	8,21	8,39	49,36	4,87	3,51	1,01	1,27

Média das características comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (1974) entre os dois grupos de pequi, sem e com espinho no endocarpo. Cada tratamento corresponde a um pequizeiro (planta). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

O teste de medida de dissimilaridade expressa pela distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) entre os pequizeiros produtores de frutos sem e com espinho no endocarpo oscilou de 2,04 a 172,23 para as amostras B21-B29 e A7-B15, respectivamente (Tabela 4).



**Tabela 4:** Matriz de Dissimilaridade Genética com base na estatística  $D^2$  de Mahalanobis de 15 pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Cambess.) sem e com espinho no endocarpo.

Tratamento (Pequizeiros)	D7	C23	C20	A8	B28	B26	C18	B14	B15	C3	B23	B29	B21	C17	A7
D7	-	21,71	33,62	42,93	64,60	45,03	31,67	66,42	57,44	43,26	59,95	57,45	50,49	33,57	64,04
C23		-	4,76	17,56	93,61	70,85	16,58	41,30	25,50	14,83	38,51	16,74	17,68	15,72	114,75
C20			-	5,87	88,01	70,54	9,50	23,78	9,11	10,46	24,22	8,23	7,32	17,68	129,96
A8				-	68,22	54,98	11,38	7,51	<b>2,31</b>	17,07	21,38	16,67	11,54	29,32	142,89
B28					-	10,87	60,08	60,87	86,65	79,39	63,51	110,97	97,22	84,70	75,39
B26						-	56,75	51,30	72,90	72,64	70,81	101,49	89,54	79,71	79,06
C18							-	25,61	17,32	5,66	6,13	9,87	6,26	8,32	108,28
B15								-	8,63	31,33	32,10	36,43	30,71	53,29	<b>172,23</b>
B14									-	24,03	26,49	18,70	13,65	40,16	163,86
C3										-	10,77	5,32	7,75	8,13	135,37
B23											-	14,48	10,37	17,59	132,23
B29												-	2,04	12,70	162,91
B21													-	12,51	151,82
C17														-	115,72
A7															-

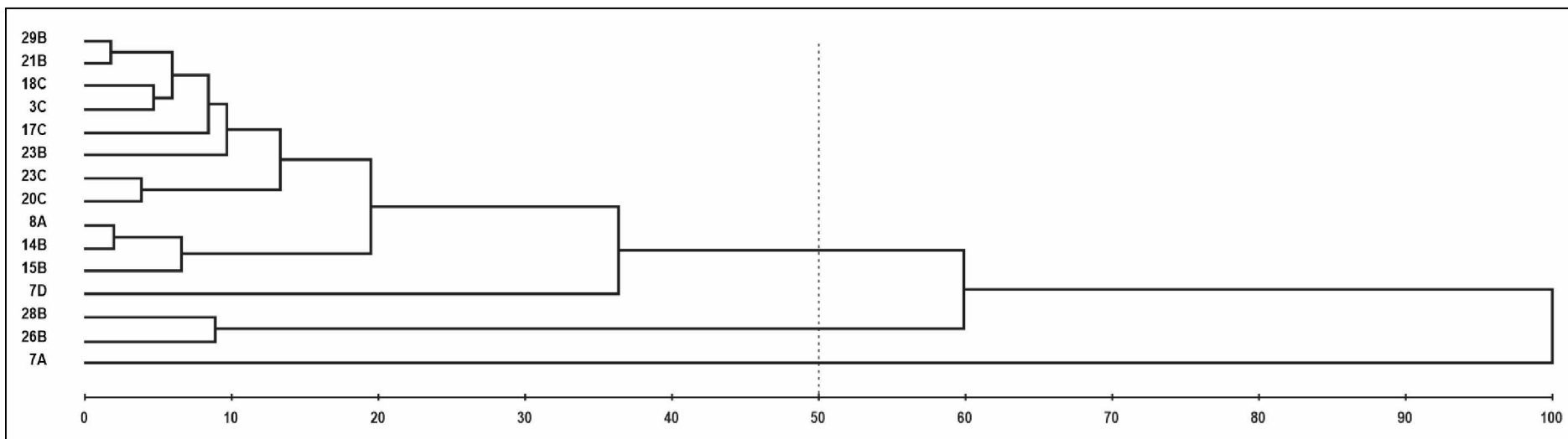
Valores em negrito correspondem a menor (2,31) e maior (172,23) distância genética.

O método de Tocher dividiu as amostras em três grupos (Tabela 5). No grupo I reuniram-se doze amostras, incluindo pequizeiros produtores de frutos sem e com espinho; o grupo II concentrou duas árvores produtoras de frutos sem espinho e o grupo III apresentou apenas uma amostra, produtora de frutos com espinho (Tabela 5).

**Tabela 5:** Agrupamento Tocher obtido a partir da estatística  $D^2$  de Mahalanobis

<b>Grupo</b>	<b>Amostras (pequizeiros)</b>											
I	D7	C23	C20	A8	C18	B14	B15	C3	B23	B29	B21	C17
II	B28	B26										
III	A7											

A partir da matriz de dissimilaridade (Tabela 4) foi gerado um dendrograma utilizando o método UPGMA (Figura 12). Ao adotar o corte em 50% das distâncias genéticas, quando foi observada a formação do menor número de grupos amostrais, no dendrograma as amostras foram distribuídas em três grupos, semelhante aos apresentados no método de Tocher. No grupo I estão doze pequizeiros, sendo sete produtores de pequi sem espinho no endocarpo e 5, com espinho; o grupo II tem duas árvores produtoras de frutos sem espinho e o grupo III apresenta uma árvore produtora de frutos com espinho no endocarpo (Tabela 5).



**Figura 12** - Dendrograma da análise de 15 pequizeiros pelo método de ligação média entre grupo (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) obtido a partir da matriz de dissimilaridade para os oito caracteres morfológicos dos frutos.

A contribuição relativa de cada característica do fruto na divergência genética, determinada pelo método de Singh (1981), consta na Tabela 6. Verificou-se que as características altura do fruto, massa do fruto e espessura da polpa foram as mais importantes para a diversidade genética, contribuindo com 44,04%, 18,97% e 17,49%, respectivamente.

**Tabela 6:** Contribuição relativa de oito características de frutos sem e com espinho no endocarpo de *Caryocar brasiliense* Cambess para a divergência genética (Singh, 1981) baseada na distância generalizada de Mahalanobis.

Variável	Contribuição Relativa	
	S.j.	Valor (%)
Massa do Fruto	954,21	18,97
Altura do Fruto	2215,49	44,04
Largura do Fruto	201,28	4,00
Massa do Pirênio	80,90	1,61
Comprimento do Pirênio	19,54	0,39
Largura do Pirênio	80,36	1,60
Espessura da polpa	880,13	17,49
Largura da castanha	598,50	11,90

S.j.: Diversidade genética

Na estimativa dos coeficientes de correlação fenotípica e genotípica (Tabela 7), observou-se que, para a maioria das características, as correlações genotípicas foram superiores às fenotípicas. Verificou-se ainda a ocorrência de sete correlações significativas pelo Teste t e treze correlações acima de 0,70.

**Tabela 7:** Correlações genética (abaixo da diagonal) e fenotípica (acima da diagonal) entre as características morfológicas de pequis sem e com espinho no endocarpo.

Características	MF	AF	LF	MP	CP	LP	EPO	LA
<b>MF</b>	-	0,88**	0,29	0,14	0,97	0,59	-0,08	0,37
<b>AF</b>	0,91	-	0,42	0,38	1,57 <sup>++</sup>	0,72	0,11	0,41
<b>LF</b>	0,23	0,32	-	0,55	1,04 <sup>++</sup>	0,72	0,54	0,20
<b>MP</b>	0,14	0,35	0,35	-	1,09 <sup>++</sup>	0,92	0,86**	0,18
<b>CP</b>	0,35	0,60*	0,25	0,32 <sup>+</sup>	-	0,94 <sup>+</sup>	0,32	0,26
<b>LP</b>	0,46	0,58*	0,39	0,68**	0,55*	-	0,56*	0,50
<b>EPO</b>	-0,75	0,11	0,35	1,01 <sup>++</sup>	0,86	0,67	-	-0,16
<b>LA</b>	0,35	0,40	-0,61	0,20	0,68	0,63	-0,17	-

\*\*e\* Significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste t;

<sup>++</sup> e<sup>+</sup> Significativo a 1% e 5% pelo método de *Bootstrap* com 5000 simulações.

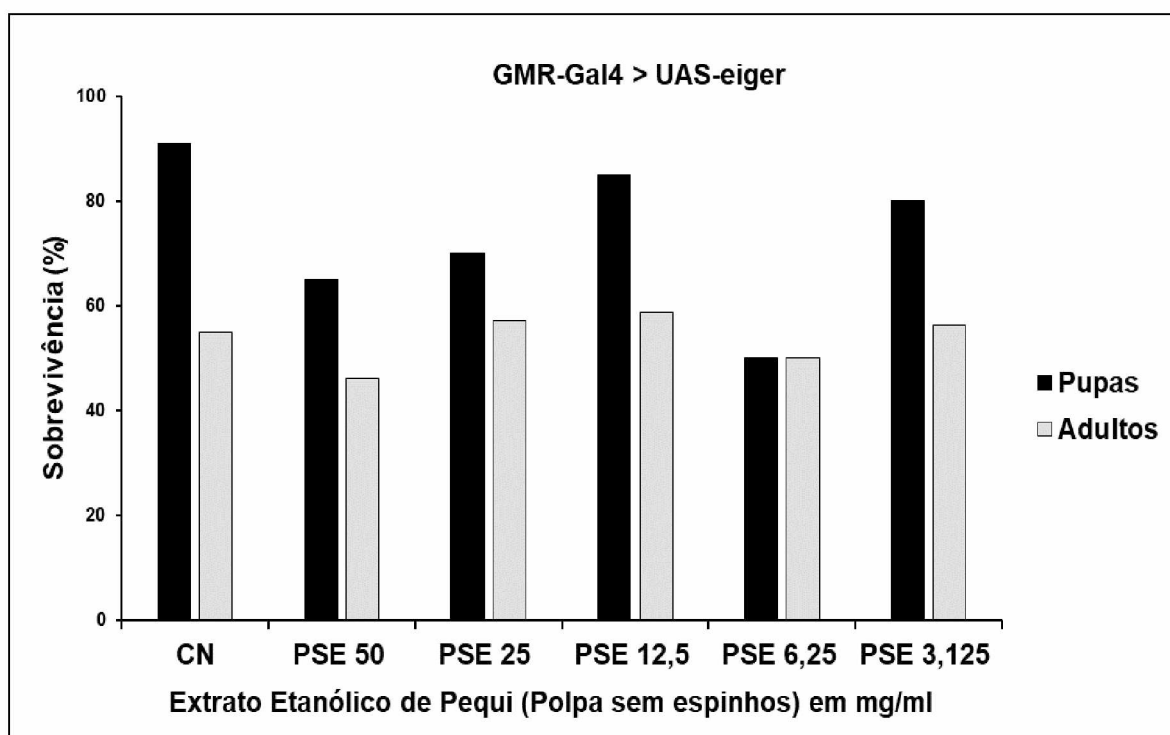
## 4.2 Resultados da Análise dos Efeitos do Extrato Etanólico dos Frutos (pequi) de Pequizeiro

### Teste de Sobrevivência

As concentrações dos extratos etanólicos da casca e da polpa dos frutos de *Caryocar brasiliense* sem e com espinho no endocarpo foram avaliadas em *Drosophila melanogaster*.

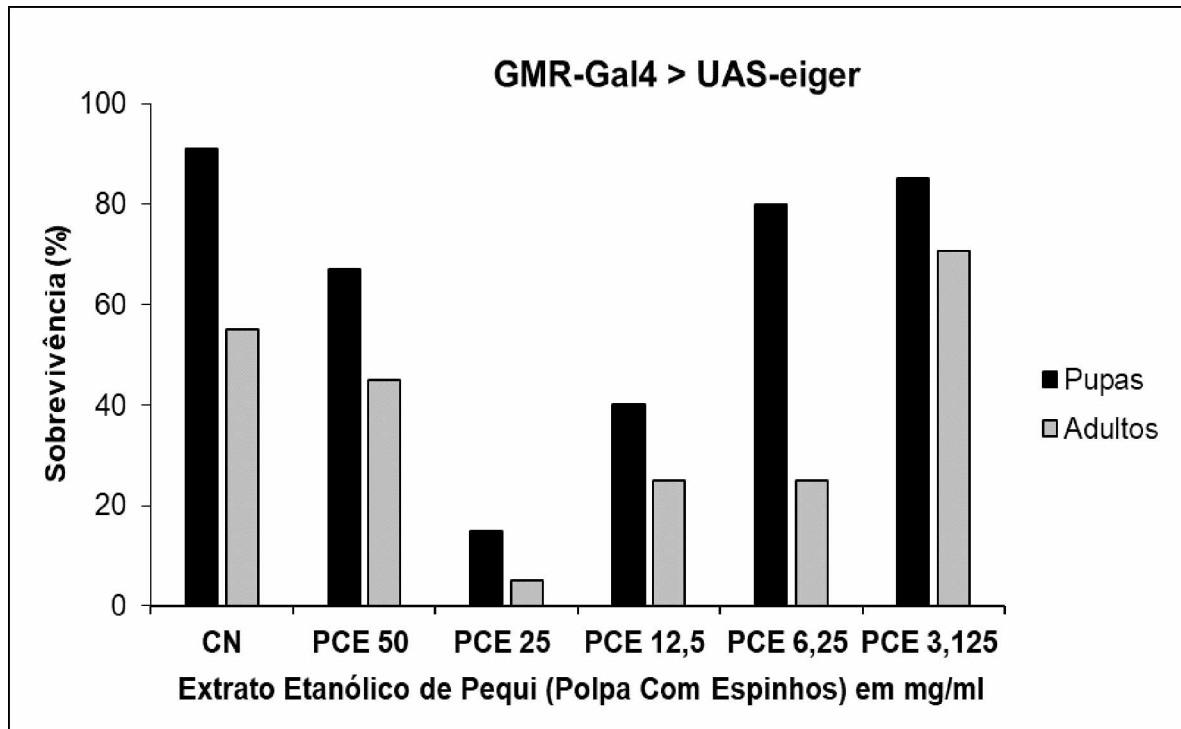
Larvas (L3) de *D. melanogaster* GMR-GAL-4; UAS-eiger foram tratadas com extrato etanólico de Polpa de Pequi Sem Espinho (PSE) nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 mg/ml. Os resultados do Teste de Sobrevivência são apresentados na Figuras 13-14.

As concentrações 25,0; 12,5 e 3,125 mg/ml de polpa de pequi sem espinho, proporcionaram a maior taxa de metamorfose, ou seja, um maior número de pupas transformadas em adultos. Na concentração de 6,25 mg/ml todas as pupas passaram para o estágio adulto (Figura 13).



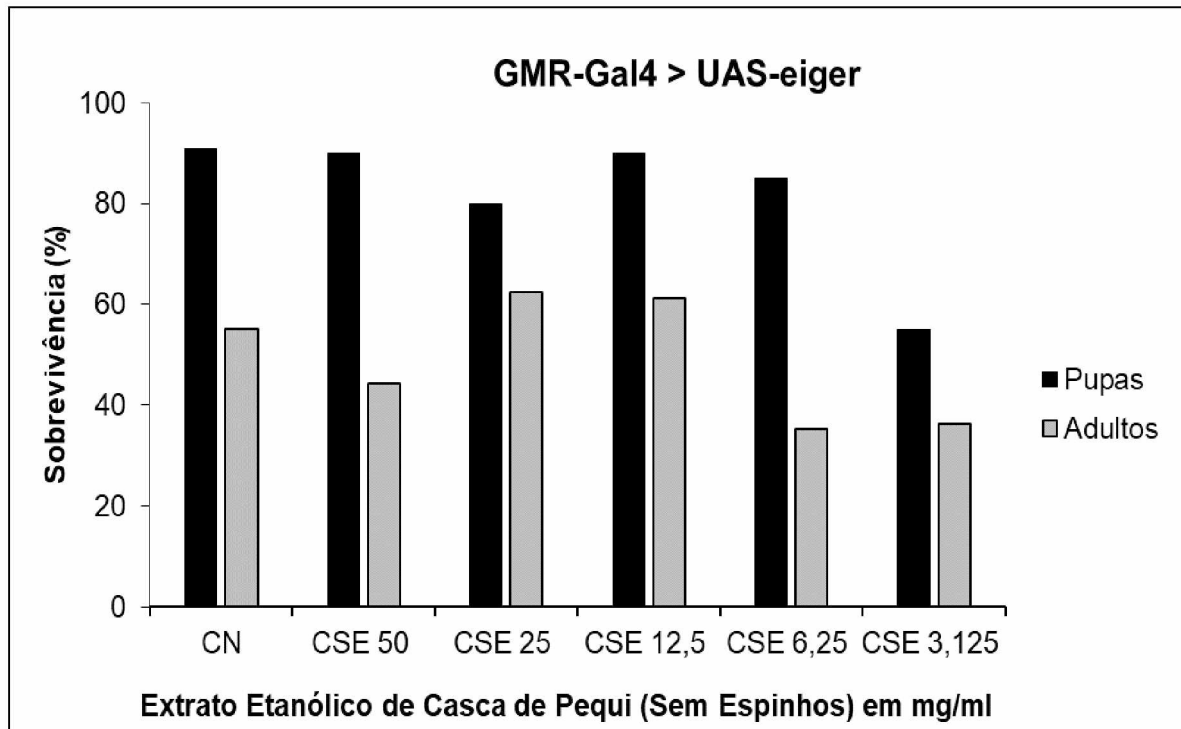
**Figura 13** - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* tratadas com extrato etanólico da Polpa De Pequi Sem Espinho (PSE) e CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml.

Com o extrato de Polpa de Pequi Com Espinho (PCE), a concentração de 3,125 mg/ml proporcionou a maior taxa de metamorfose das pupas que se transformaram em adultos (Figura 14).



**Figura 14** - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* tratadas com extrato etanólico da polpa de pequi com espinho (PCE). CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml.

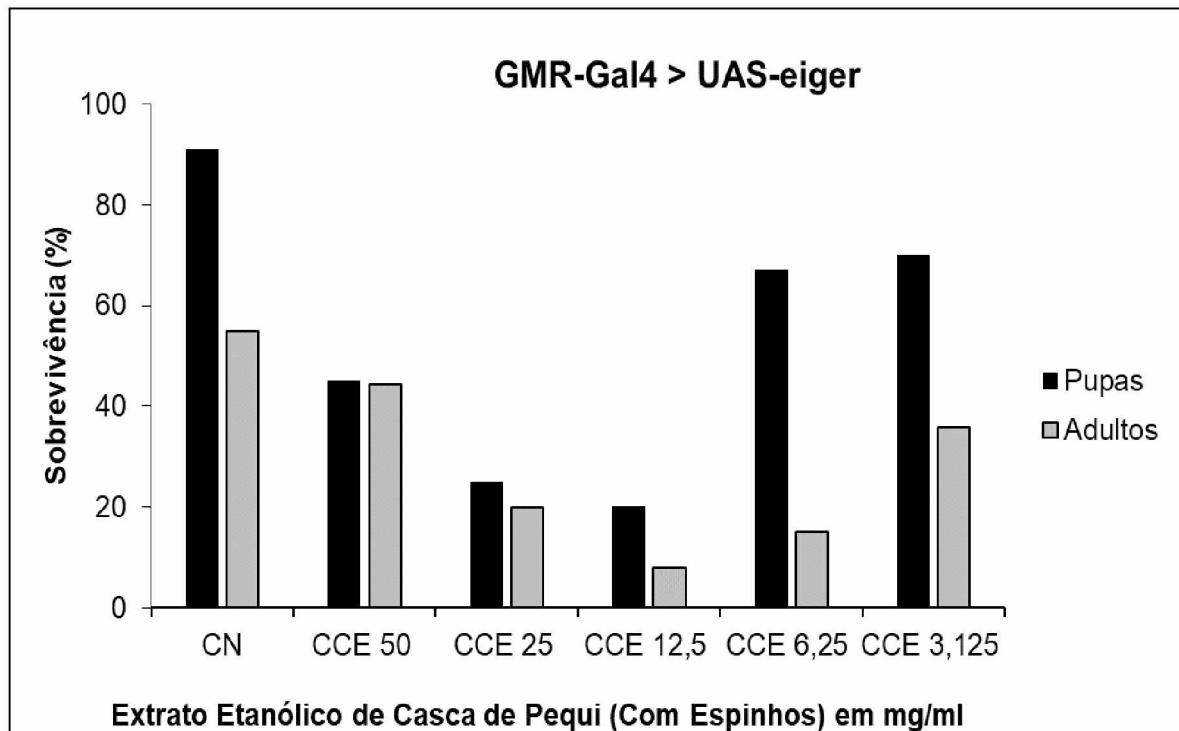
Para o extrato de Casca de Pequi Sem Espinho (CSE) nas concentrações de 25 e 12,5 mg/ml ocorreu aumento de sobrevivência quando comparado ao Controle (Figura 15).



**Figura 15** - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* tratadas com extrato etanólico da casca de pequi sem espinho (CSE). CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml.



As concentrações de extrato de Casca de Pequi Com Espinho (CCE) reduziram a metamorfose das pupas para o estágio adulto comparadas à taxa de sobrevivência observada para o Controle (Figura 16).



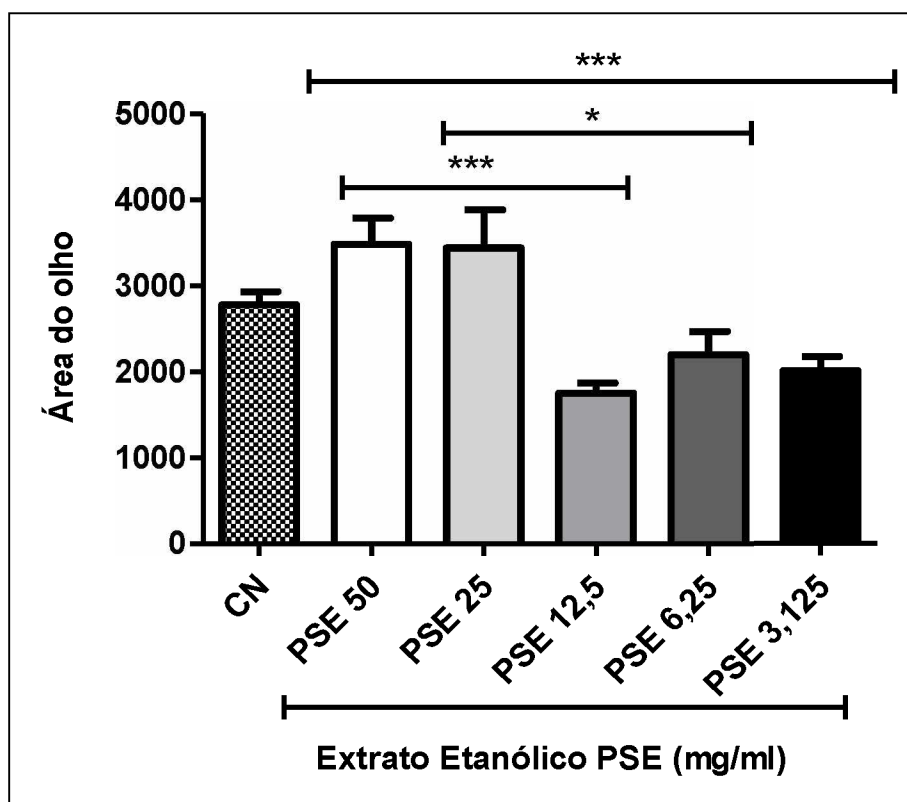
**Figura 16** - Resultado do Teste de Sobrevivência da progênie de GMR-GAL4 > UAS-eiger de *Drosophila melanogaster* tratadas com extrato etanólico da casca de pequi com espinho (CCE). CN = controle (água). Concentrações do extrato etanólico em mg/ml.

## **Quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster* tratada com Extrato de Pequi**

A partir do Teste de Sobrevivência, larvas de terceiro estágio (L3) de *Drosophila melanogaster* com fenótipo de olho reduzido (GMR-GAL4 > UAS - eiger) foram tratadas com os extratos etanólicos de casca e de polpa de frutos de *Caryocar brasiliense*, nas concentrações 50,0; 25,0; 12,5; 6,25 e 3,125 mg/ml. Ao se transformarem em adultos, as moscas foram coletadas e armazenadas em etanol 70% para posterior análise da área do olho.

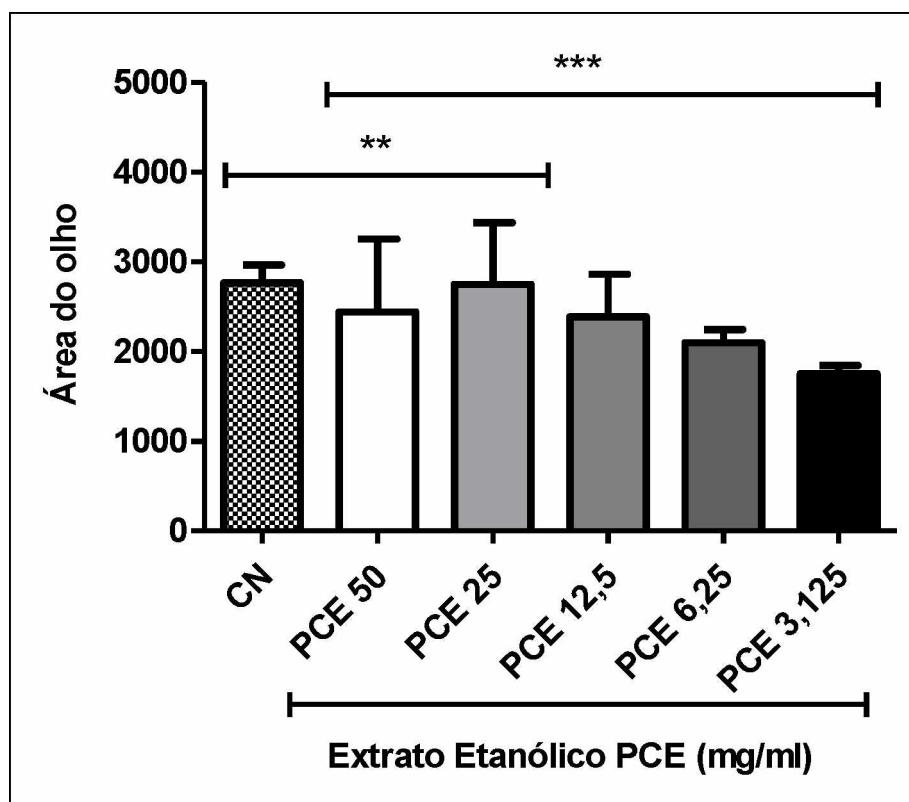
Foram realizados três experimentos independentes, os quais apresentaram resultados concordantes, com boa reprodutibilidade e os dados foram agrupados, perfazendo um total de vinte moscas analisadas por concentração do extrato de tratamento.

Verificou-se que para o extrato de Polpa de Pequi Sem Espinho (PSE) as concentrações de 50,0 e 25,0 mg/ml promoveram aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da área do olho quando comparado ao Controle (Figura 17).



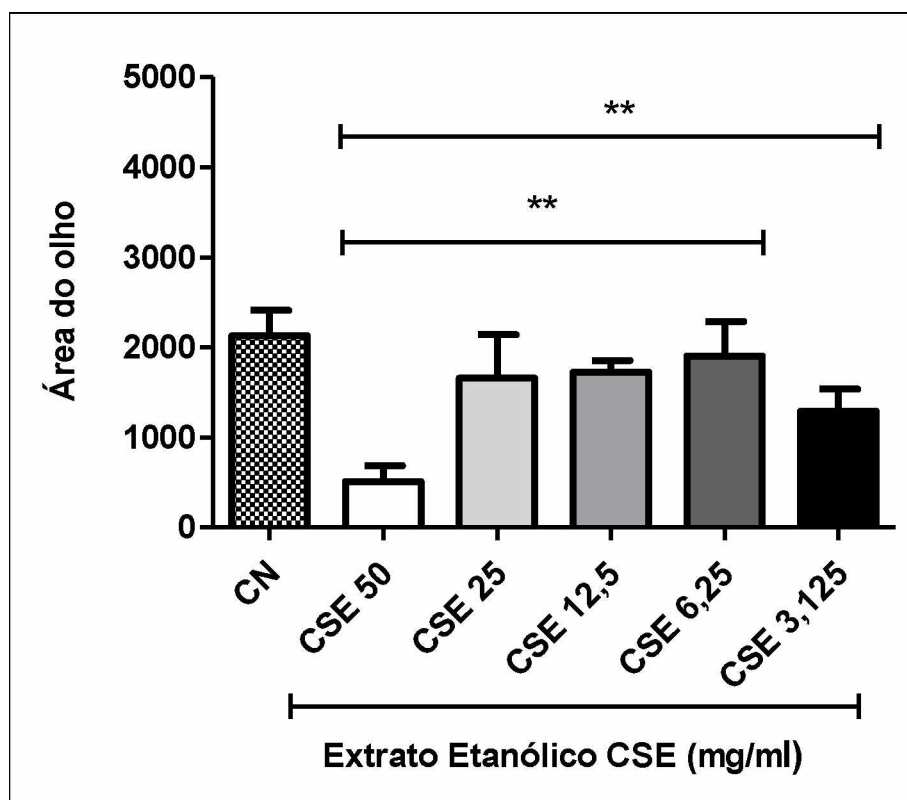
**Figura 17** - Resultado da quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster* GMRGAL4 > UAS-eiger, tratada com o extrato etanólico da Polpa De Pequi Sem Espinho-PSE (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$  teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

O aumento da área do olho foi, também, significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) do que no controle para as concentrações de 50 e 25 mg/ml do extrato de Polpa de Pequi Com Espinho (PCE) (Figura 18).



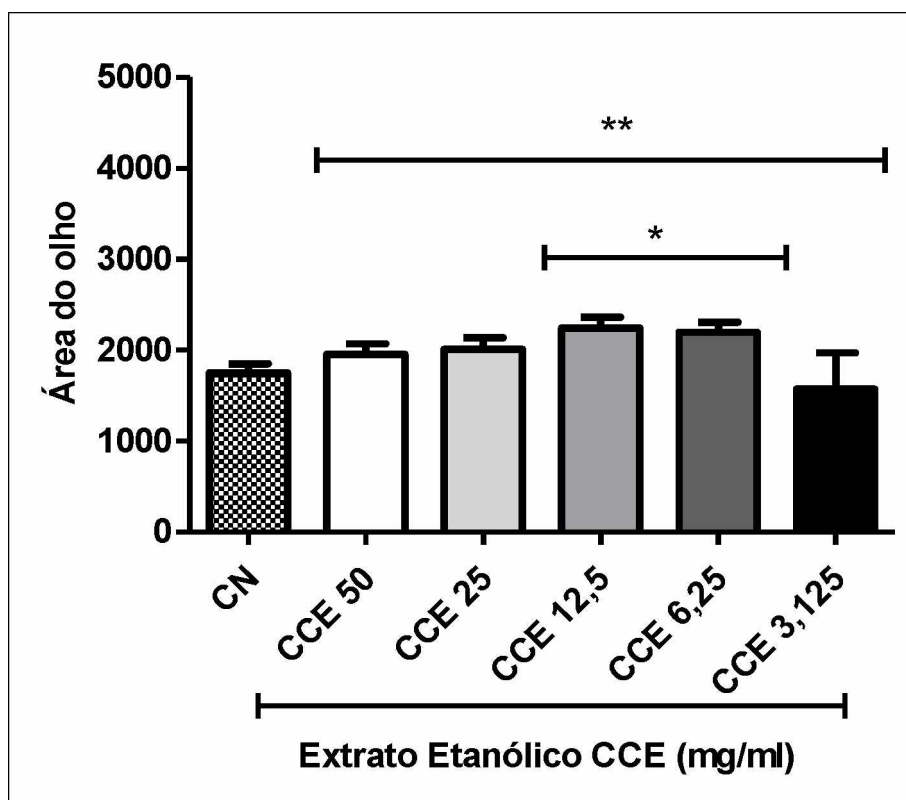
**Figura 18** - Resultado da quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster* GMRGAL4 > UAS-eiger tratada com o extrato etanólico da Polpa De Pequim Com Espinho-PCE (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$  teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

Comparadas entre si, o grupo de indivíduos tratados com o extrato de Casca de Pequim Sem Espinho (CSE) na concentração de 6,25 mg/ml foi a que apresentou o melhor e significativo ( $p \leq 0,05$ ) resultado para aumento da área do olho (Figura 19).



**Figura 19** - Resultado da quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster*, linhagem GMRGAL4 > UAS-eiger, tratada com o extrato etanólico da Casca De Pequii Sem Espinho-CSE (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$  teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

Para o tratamento com extrato de Casca de Pequii Com Espinho (CCE), ocorreu aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da área do olho nas concentrações de 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25 mg/ml quando comparado ao Controle (Figura 20).



**Figura 20** - Resultado da quantificação da área do olho de *Drosophila melanogaster*, linhagem GMRGAL4 > UAS-eiger, tratada com o extrato etanólico da Casca De Pequi Com Espinho-CCE (concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/ml) e não-tratada (CN, controle, tratado com água). Diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$  teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

A Figura 21 mostra a mudança na área do olho das moscas tratadas com extrato de pequi, de acordo com os resultados de mensuração da área, apresentados nas figuras anteriores (Figuras 17-20).



**Figura 21** - Imagens de *Drosophila melanogaster* GMRGAL4 > UAS-eiger mostrando a área do olho (setas) nos diferentes grupos tratados e no controle. **A)** Controle (água); **B)** Tratada com extrato de Casca de Pequi Sem Espinho (CSE); **C)** Tratada com extrato de Polpa de Pequi Sem Espinho (PSE); **D)** Tratada com Polpa de Pequi Com espinho (PCE). **Fonte:** Elaborado por Mariana Gonçalves Mendes.

### **4.3 Resultados da Análise da Expressão dos Transcritos dos Genes Codificadores de Eiger e Wengen em *Drosophila melanogaster***

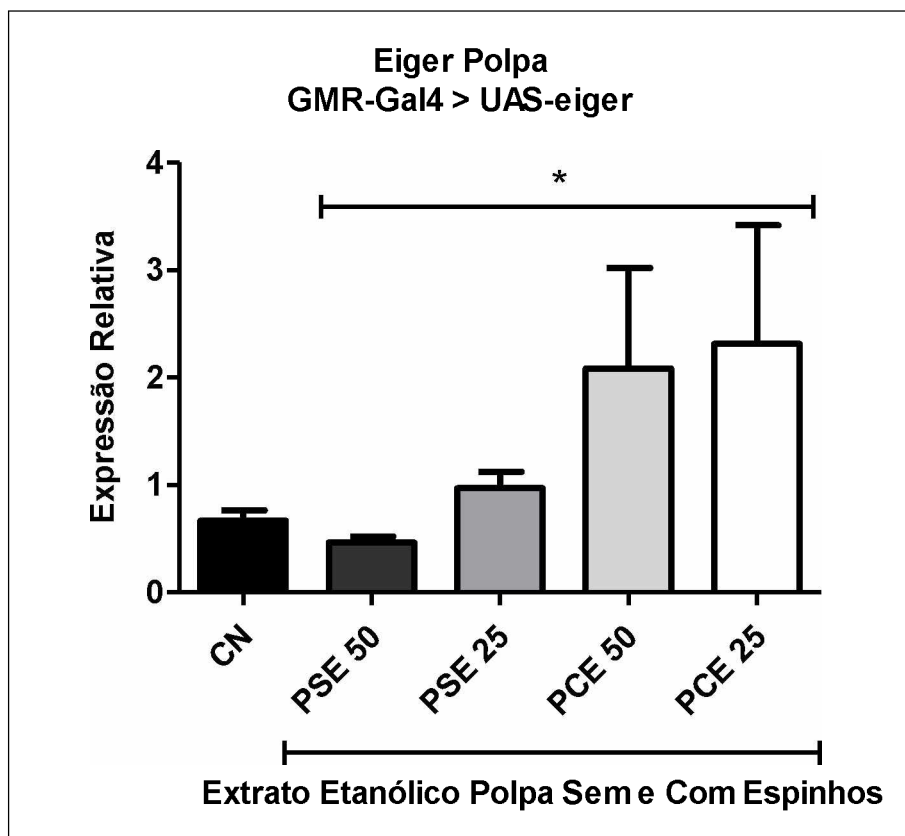
#### **4.3.1 Níveis de Transcritos do gene *eiger* em *Drosophila melanogaster***

O gene *eiger* em *Drosophila melanogaster* codifica a proteína ortóloga do TNF- $\alpha$  humano (Eiger). Foram selecionadas as concentrações do extrato etanólico de polpa e casca de Pequi, sem e com espinho no endocarpo, que promoveram aumento da área do olho das moscas adultas, conforme mostrado pelos resultados da quantificação da área do olho.

Nas pupas GMR-GAL4 > UAS-eiger de *D. melanogaster* tratadas com extrato de polpa de pequi sem e com espinho nas concentrações de 50 e 25 mg/ml (PSE 50, PSE 25, PCE 50 e PCE 25) e de casca, nas concentrações de 12,5 e 6,25 mg/ml (CSE 12,5, CSE 6,25, CCE 12,5 e CCE 6,25) os transcritos do gene *eiger* apresentaram diferentes expressões relativas.

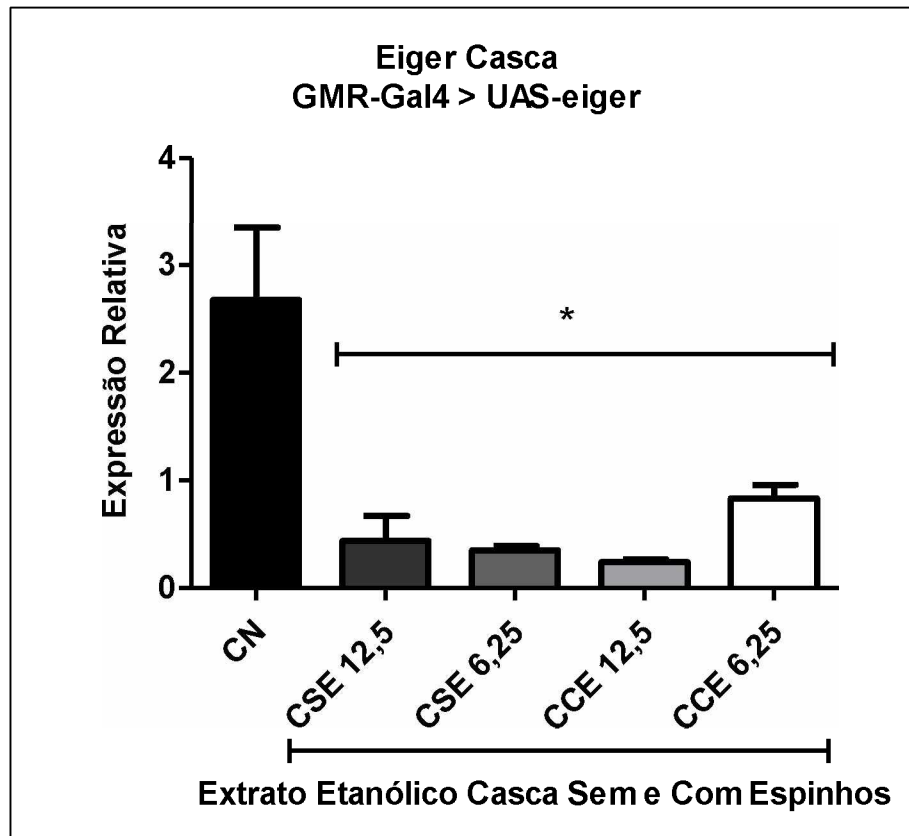
A expressão relativa de *eiger* na concentração de PSE 50 mg/ml foi menor do que a encontrada para o controle negativo. Ocorreu aumento na expressão relativa de *eiger* na concentração de PSE 25. O maior aumento de expressão de transcritos gênicos foi verificado nos indivíduos tratados com o extrato nas concentrações de PCE 50 e PCE 25 (Figura 22).





**Figura 22** - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa de expressão de transcritos do gene *eiger* obtida por RT-qPCR em *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada (**CN**) com o extrato etanólico da Polpa de Pequi Sem (**PSE**) e Com Espinho no endocarpo (**PCE**).

Com os extratos de casca de pequi sem e com espinho, a expressão relativa de *eiger* foi menor do que a observada para o controle em todas as concentrações analisadas, com acentuada diferença para os extratos nas concentrações CSE 6,25 e CCE 12,5 mg/ml (Figura 23).

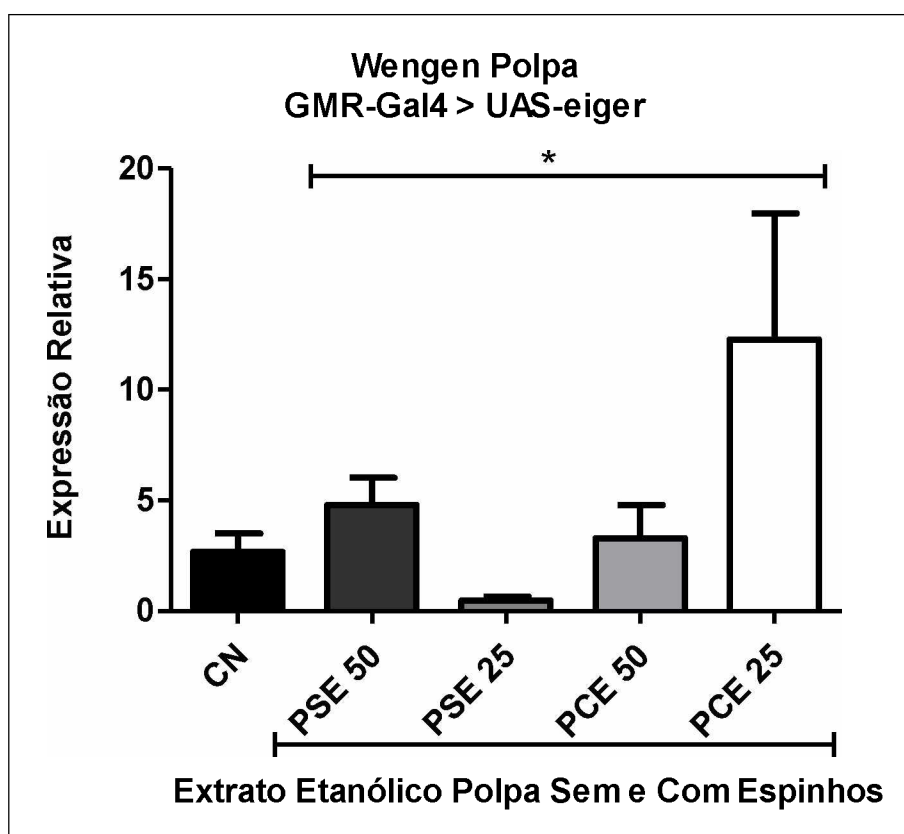


**Figura 23** - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene *eiger* obtida por RT-qPCR em *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada (CN) com extrato etanólico da Casca de Pequi Sem(CSE) e Com Espinho no endocarpo (CCE).

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

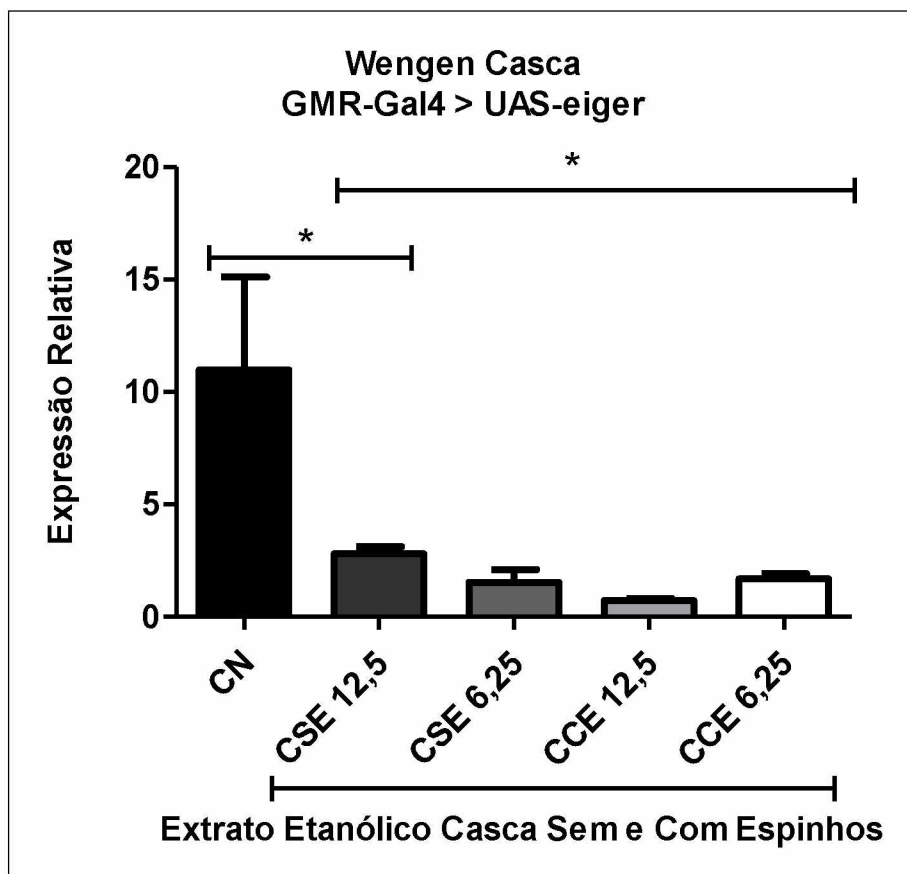
O gene *wengen* em *Drosophila melanogaster* codifica a proteína ortóloga do receptor de TNF- $\alpha$  humano (Wengen). Em pupas de GMR-GAL4 < UAS-eiger tratadas com extratos etanólicos de Polpa e Casca de pequi sem (PSE) e com espinhos (PCE) no endocarpo foram observadas diferentes expressões relativas dos transcritos do gene *wengen*.

Para os extratos de polpa, as concentrações PSE 25 apresentou expressão relativa menor do que a observada para o controle. O tratamento com as concentrações PSE 50 e PCE 25 promoveram a maior expressão de transcritos de *wengen* quando comparado ao controle, com destaque para PCE 25 (Figura 24).



**Figura 24** - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa do gene wengen obtida por RT-qPCR em *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada (CN) com os extratos etanólicos da Polpa de Pequi Sem (**PSE**) e Com Espinho (**PCE**) no endocarpo.

Para o tratamento com extratos de casca, foi observada redução da expressão relativa em todas as concentrações analisadas (Figura 25). As concentrações de CSE 6,25 e CCE 12,5 foram as que resultaram em menor expressão relativa quando comparadas ao controle.



**Figura 25** - Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos transcritos do gene wengen obtida por RT-qPCR em *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger tratada e não-tratada (CN) com o extrato etanólico da Casca de Pequii Sem (**CSE**) e com espinhos (**CCE**) no endocarpo.

## 5. DISCUSSÃO

A caracterização morfológica de pequi pode fornecer informações sobre a espécie, além das informações sobre o fruto, visando avaliação genética para o plantio comercial. A massa dos frutos é uma característica importante para a comercialização, uma vez que os frutos de maior polpa são mais interessantes (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Verificou-se que há ampla variação quanto à massa dos frutos sem e com espinho no endocarpo. Nossos dados mostraram massa dos frutos de pequi sem e com espinho maiores do que os descritos por Moura, Chaves e Naves (2013) que observaram média de 180,89 g para pequis com espinho no endocarpo, em oito regiões diferentes do Cerrado. Luz et al. (2011) que estudaram a biometria de frutos e pirênios de *Caryocar brasiliense*, provenientes de três localidades do Norte de Minas Gerais, descreveram, também, média inferior à encontrada nesse estudo.

Oliveira et al. (2008) realizaram estudo sobre a biometria dos frutos de *Caryocar coriaceum* Wittm. na Chapada do Araripe, Ceará e verificaram que a massa dos frutos variou entre 40,26 g e 140,23 g, valores inferiores aos obtidos no presente estudo para frutos sem e com espinho no endocarpo de *C. brasiliense*.

Estudo realizado por Vera et al. (2007) em duas regiões do estado de Goiás, constatou que a média do comprimento dos frutos com espinho no endocarpo foi de 5,16 cm e 6,68 cm. Almeida et al. (1998) verificaram que o comprimento dos frutos pode variar de 4,20 a 6,40 cm. Em ambos os trabalhos, as medidas dos frutos foram inferiores às observadas, para essa característica, em nossa investigação.

A literatura mostra que a média de largura dos frutos com espinho no endocarpo é de 6,50 cm (VERA et al. 2005 e 2007) de 6,17 cm (LUZ et al. 2011) e de 5,18 cm (MOURA; CHAVES; NAVES, 2013), valores inferiores aos observados para os frutos sem e com espinho avaliados neste trabalho.

Os pirênios, popularmente conhecidos como caroços, contêm a parte comestível do pequi, a polpa, apreciada na culinária (OLIVEIRA et al, 2008). A massa dos pirênios de pequi com espinho no endocarpo, avaliados por Vera e colaboradores (2007) variou entre 11,46 e 13,80 gramas. Na amostra de pequis com espinho analisados por Luz et al. (2011) a massa dos pirênios foi em média 60,44 gramas.

Os pirênios de frutos sem espinho no caroço, avaliados nesse estudo, apresentaram massa maior do que a massa de pirênios de pequi com espinho e, em ambos, maior dos que já descrito na literatura. Essa é uma característica importante para o consumo desses frutos, pois a medida de massa elevada pressupõe maior quantidade de polpa (GOMES, 2018) que representa fonte maior de carboidratos, lipídeos e vitamina C (GOMES et al., 2019).

As amêndoas dos frutos sem espinho no endocarpo são maiores (1,41 cm) do que as amêndoas dos pequis com espinho (1,27 cm) conforme dados aqui obtidos, o que é diferente dos resultados de Vera et al. (2005; 2007) que obtiveram valores entre 2,46 e 3,22 cm para as amêndoas de pequis com espinho de duas regiões do estado de Goiás.

Frutos com amêndoas maiores representam maior retorno econômico na exploração das amêndoas e na extração de óleo. Oliveira (1998) concluiu que o maior tamanho de amêndoa é importante para a formação e sobrevivência de mudas de pequizeiro em viveiros, um fator importante para a pesquisa relacionada ao pequizeiro produtor de frutos sem espinhos no endocarpo. Essa característica deve sofrer melhoramento nos frutos de pequizeiros de nossa região.

Além disso, as amêndoas do pequi sem espinho apresentam um índice elevado de carboidratos, lipídeos e proteínas em sua composição (GOMES et al., 2019) o que as torna um componente de elevado potencial para incorporação na culinária regional.

Para todos os caracteres avaliados, observou-se que os pequizeiros produtores de frutos sem espinho no endocarpo tiveram médias superiores aos pequizeiros que produzem frutos com espinho. Esses resultados evidenciam o potencial do pequizeiro produtor de frutos sem espinho para o cultivo comercial, tanto *in natura* quanto industrializado.

O teste de agrupamento de Scott-Knott (1974) permite avaliar se existem diferenças significativas entre as características avaliadas. As amostras **B26** e **B28**, de pequizeiros produtores de frutos sem espinho, foram diferentes das demais com relação às características de massa e comprimento dos frutos, apresentando medidas superiores quando comparadas às demais amostras.

A análise de distância genética de Mahalanobis auxilia na determinação dos melhores genitores que podem ser utilizados em futuros cruzamentos, reduzindo

assim, tempo, mão de obra e recursos financeiros em pesquisas futuras (SANTOS et al, 2017).

O menor valor para a distância genética observado entre as amostras A8 e B15, produtoras de frutos com espinho, representa uma proximidade genética, ou seja, maior similaridade. O valor 3 verificado entre as plantas **A7** (produtora de frutos com espinho) e **B15** (produtora de frutos sem espinho) indica que essas duas amostras são as mais distantes geneticamente. Esse dado é interessante para programa de melhoramento via seleção massal ou por transgenia.

A partir da matriz de dissimilaridade são realizadas as análises de agrupamento (SANTOS et al., 2018), como Tocher e UPGMA. Na matriz de dissimilaridade, a amostra A7, um pequizeiro produtor de frutos com espinho, apresentou grande distância genética das demais amostras, representando o único grupo individual pelos métodos de Tocher e UPGMA.

O outro grupo formado pelo método de Tocher e observado no dendrograma elaborado a partir do método UPGMA, foi constituído pelas amostras B26 e B28, que apresentaram as maiores medidas para características externas dos frutos. As duas amostras de pequizeiros produtores de frutos sem espinho apresentaram pequena distância genética entre si, indicando que podem apresentar genótipos semelhantes (SILVA et al., 2015), possivelmente clones. As demais amostras analisadas formaram um único grupo de acordo com as distâncias genéticas.

O método de agrupamento UPGMA com base em análises biométricas de pequis com espinho foi utilizado por Ramos (2010) para pequi com espinho e por Gomes (2018) para pequi sem e com espinho. Foram obtidos grupos distintos para as populações estudadas, indicando ser um método eficiente para discriminação de amostras de pequizeiro.

Altura do fruto, massa do fruto, espessura da polpa e largura da castanha foram as características que apresentaram maior contribuição relativa para a divergência genética dos frutos de pequizeiros analisados aqui e estão relacionados com a formação dos grupos observados nas análises por Tocher e UPGMA.

A altura do fruto apresentou alto grau de associação fenotípica com a característica massa do fruto. Da mesma forma, a característica espessura da polpa mostrou-se altamente associada à massa do pirênio, para frutos sem e com



espinho no endocarpo. Essas características podem ser utilizadas para futura seleção de frutos do pequiizeiro.

As correlações genotípicas acima de 0,70 são consideradas altas, mas é possível realizar seleção indireta quando são encontradas a partir de 0,50 (LOPES et al., 2002). A altura do fruto mostrou correlação genética significativa (5% de probabilidade pelo teste t) com o comprimento e largura do pirênio, assim como a massa do pirênio, que apresentou correlação genotípica significativa (1% de probabilidade pelo teste t) com a largura do pirênio. Foi, também, significativa (1% de probabilidade pelo teste t) a correlação entre comprimento e largura do pirênio.

O estudo das correlações entre características de frutos favorece o conhecimento sobre alterações que podem ocorrer em um determinado caráter e que podem relacionar-se ou estar ligado a outro caráter, facilitando a seleção de características de interesse (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). Esse conhecimento também torna possível a obtenção e seleção de genótipos mais produtivos para diferentes fins (MOURA; CHAVES; NAVES, 2013).

A correlação fenotípica é determinada a partir dos dados mensurados e pode ser de origem genética ou ambiental. As correlações genéticas podem decorrer de ligações gênicas, que são um estado transitório, tendo em vista que o desequilíbrio de ligação pode ser perdido ao longo dos ciclos de reprodução aleatória. A pleiotropia, fenômeno pelo qual um gene influencia duas ou mais características fenotípicas, também pode estar relacionada às correlações (FALCONER; MACKAY, 1996).

Para a maioria das características, as correlações fenotípicas foram superiores às genotípicas. Isso pode ser explicado pelas características do ambiente sobre as amostras avaliadas como, índices de pluviosidade, tipo de solo, variações de temperatura e outras variantes que podem influenciar na expressão fenotípica das plantas, sem que seja alterado o genótipo delas. O meio pode favorecer características que, em outro local, não se manifestam (BOTEZELLI et al., 2000; SANTANA; NAVES, 2003; GUSMÃO et al., 2006; LUZ et al., 2011).

Os mecanismos epigenéticos podem, também, contribuir com a diversidade genética observada nas populações de pequiizeiros, assim como na formação dos frutos. Dessa forma, a influência epigenética na regulação gênica para a produção de frutos de pequiizeiro não deve ser descartada e merece avaliação mais profunda.

As análises de agrupamento realizadas por meio de diferentes métodos permitiram a separação das amostras em conjuntos distintos baseando-se na similaridade genética, avaliada a partir de características de frutos, pirênios e amêndoas.

Desde que Kerr, Silva e Tchucarramae (2007) encontraram pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Cambess) produzindo frutos sem espinho no endocarpo, tem sido objetivo de nosso grupo, selecionar marcadores morfológicos e moleculares que permitam identificar e diferenciar essas plantas e frutos sem espinho daqueles que possuem espinho no caroço.

A análise de características que se correlacionam, como as observadas no presente trabalho, permite orientação na seleção dos melhores parâmetros para aprimoramento dos genótipos e para o estabelecimento de programas de melhoramento, sobretudo para frutos apreciados pelo mercado consumidor, mas que ainda não foram domesticados (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992; VERA et al., 2005; MOURA et al., 2013) como é o caso do pequi sem espinho.

Nosso trabalho é o primeiro a realizar análises relacionando o potencial do extrato etanólico do pequi sem espinho e com espinho na resposta inflamatória, em *D. melanogaster*. As concentrações foram testadas primeiramente com relação à sobrevivência das moscas e verificou-se que os extratos dos dois tipos de pequi não foram tóxicos, apesar de algumas concentrações reduzirem a metamorfose, para as larvas expostas cronicamente (48 horas) por ingestão junto ao alimento (meio de fubá). Esse dado é a primeira evidência de ação positiva dos extratos do pequi na sobrevivência das moscas, o que pode estar relacionado aos componentes fitoquímicos dos frutos.

O gene *eiger* em *Drosophila melanogaster* é codificador da proteína ortóloga do TNF- $\alpha$  humano. A proteína Eiger caracteriza-se como uma citocina inflamatória independente de caspase. Eiger age em *Drosophila melanogaster* induzindo apoptose pela via de controle do ciclo celular dependente de quinase (JNK) (IGAKI, 2002; PEREZ-GARIJO, 2013; VIDAL, 2010).

A análise da expressão relativa de *eiger* permite avaliar se um tecido está afetado por um processo inflamatório, como é o caso da linhagem de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger de olho reduzido.

A concentração de 50 mg/ml de extrato etanólico da polpa de pequi sem espinho foi eficaz para reduzir a expressão de *eiger*, mostrando o potencial anti-inflamatório do fruto. Esse resultado molecular foi corroborado morfológicamente, pela quantificação da área do olho, que apresentou melhora significativa de tamanho nas moscas tratadas com essas mesmas concentrações de extrato de polpa de pequi sem espinho.

A presença de compostos fenólicos e carotenoides em concentrações elevadas na polpa e na casca do pequi (GOMES et al., 2019) podem ter contribuído para a reversão do fenótipo de olho reduzido em *D. melanogaster*, via redução dos níveis de transcritos de Eiger (ortólogo TNF- $\alpha$  humano) e não ativação da via JNK, inibindo a morte celular (IGAKI et al., 2002; LI et al., 2019; TANG et al., 2001).

O extrato etanólico da casca do pequi apresenta uma eficiente propriedade antioxidante (ROESLER et al., 2008), assim como a polpa, que contém níveis elevados de compostos fenólicos e carotenoides, ambos relacionados à ação antioxidante. Os extratos etanólicos tem capacidade para realizar a limpeza de radicais livres e alto potencial para inibir a peroxidação de lipídeos (LIMA et al., 2007; ROESLER et al., 2008) fatores que podem estar relacionados à redução dos processos das vias anti-inflamatórias e de morte celular.

A casca do pequi pode ser considerada uma fonte de antioxidante natural, pois seus componentes podem relacionar-se à prevenção de doenças induzidas por estresse oxidativo (ROESLER et al., 2008; MOURA et al., 2017; DUAVY et al., 2019). O ácido gálico, principal antioxidante presente na casca (ROCHA et al., 2015), está relacionado à via de sinalização de TNF- $\alpha$  (CHANG et al., 2015) e, em *D. melanogaster*, a Eiger é que faz a ativação da via JNK (LI et al., 2019).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que metabólitos secundários, como os compostos fenólicos presentes na polpa e na casca de pequi, sobretudo no pequi sem espinho no endocarpo, podem exercer papel protetor no processo de morte celular induzida pela ativação da via JNK, por meio da citocina TNF- $\alpha$ .

Conclui-se que, para o organismo modelo *D. melanogaster* e nas condições experimentais aqui processadas, os tratamentos com extratos de pequi mostraram-se eficazes para reduzir a morte de células durante o desenvolvimento do olho.

Os resultados obtidos confirmaram nossa hipótese de trabalho e contribuíram para acrescentar dados sobre as características morfológicas de

frutos (pequi) do pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) e sobre os efeitos do extrato etanólico de casca e polpa de pequi sem e com espinho em tratamentos relacionados à inflamação.

## 6. CONCLUSÃO

A análise morfológica e a investigação, em *Drosophila melanogaster*, do potencial farmacológico de frutos sem e com espinho de *Caryocar brasiliense* Cambess permitem as seguintes conclusões:

- Há ampla variabilidade de características morfológicas nos pequis sem e com espinho no endocarpo e isso permite avaliar a diversidade genética da população de pequizeiros.
- As características avaliadas em pequi sem espinho mostraram valores, em média, superiores aos dos frutos com espinho.
- As características altura do fruto, massa do fruto, espessura da polpa e largura da castanha são determinantes para distinguir os frutos sem espinho dos frutos com espinho.
- As características altura e massa do fruto estão positivamente correlacionadas entre si, portanto são importantes para a distinção rápida e eficiente de frutos sem e com espinho.
- As concentrações 25 e 12,5 mg/ml de extrato etanólico de casca e polpa de frutos sem espinho e de 3,125 e 50 mg/ml de pequi com espinho, foram as melhores na taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster*.
- Ocorreu recuperação da área dos olhos das moscas com as concentrações de 50 e 25 mg/ml de extrato da polpa de pequi sem e com espinho e do extrato de casca de pequi com espinho. Não houve recuperação da área dos olhos das

moscas tratadas com as diferentes concentrações do extrato da casca de pequi sem espinho.

- A expressão dos transcritos do gene *eiger* (órtologo de TNF- $\alpha$  humano) e do gene *wengen* (ortólogo do receptor de TNF- $\alpha$  humano) foram reduzidas em *D. melanogaster* tratadas com o extrato de polpa de pequi sem espinho (50 e 25 mg/ml) e com espinho (25 mg/ml)
- O extrato etanólico de casca de pequi sem espinho (6,25 mg/ml) e de pequi com espinho (12,5 mg/ml) reduziu a expressão de transcritos dos genes *eiger* e *wengen* em *D. melanogaster*.
- Os efeitos do extrato etanólico de casca e polpa de pequi sem e com espinho observados em *Drosophila melanogaster* podem representar um importante potencial do fruto em pesquisas relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo.

## 7. 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>

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>

ALMEIDA, S. P. de. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. DE (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 247–285. 1998.

ALMEIDA, S. P. de. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Embrapa Cerrados, 464p, 1998.

ANDERSEN, D. S. et al. The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. **Nature**, 522, p. 482–486, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14298>

AQUINO, L. P. et al. Influência da secagem do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na qualidade do óleo extraído. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 354–357, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200018>

ARAUJO, F. DE. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, v. 49, n. 1, p. 40–48, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF02862276>

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.

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>

BORGES, J. C. de A. **Características botânicas, aspectos nutricionais e efeitos terapêuticos do pequi (*Caryocar brasiliense*) Revisão da Literatura**. 2011. 31 f. Seminários (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal)- Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

BOTEZELLI, L.; CLAUDIO, A.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *dipteryx alata* vogel (baru). **Cerne**, v. 6, n. 1, p. 9–18, 2000.

BRAGA, K. M. S. **Atividade citotóxica do extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) em células de osteossarcoma canino *in vitro***. 2016. 50 f. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado> >. Acesso em: 20 set. 2019.

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. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002881>

CARRAZA, L.R.; ÁVILA, J.C.C. Manual Tecnológico de aproveitamento integral do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*). **Instituto Sociedade, População e Natureza**. 2ª edição, p.47, 2010.

CHA, G.-H. et al. Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila*



*melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. **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, Y. J. et al. Gallic Acid Induces Necroptosis via TNF- $\alpha$  Signaling Pathway in Activated Hepatic Stellate Cells. **PLoS One**, v.10, n.3, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120713>

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005

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>

CRONQUIST, A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. In: BEAMAN, J. H. (Ed.). **The Quarterly Review of Biology**. Stony Brook Foundation, Inc. v. 64. 497 - 499, 1989. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002881>

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2012. v. 1, 514 p.

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>

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 40,



p.173, 2000. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

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>

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. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>

DUAVY et al. Pequi enriched diets protect *Drosophila melanogaster* against paraquat-induced locomotor deficits and oxidative stress. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, [s. l.], v. 82, n. 11, p. 664–677, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1642277>

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. 2008. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_5)

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 16–19, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000100003>

FALCONER, D. S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**, 4.ed. Longmans Green, Harlow, Essex, UK, 1996, 464p.

FARIA-MACHADO, A. F. et al. Discrimination of Pulp Oil and Kernel Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense*) by Fatty Acid Methyl Esters Fingerprinting, Using GC-FID and Multivariate Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p. 10064–10069, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03699>

FERNANDES, P. A.; PESSÔA, V. L. S. O Cerrado e Suas Atividades Impactantes: Uma Leitura Sobre o Garimpo, a Mineração e a Agricultura Mecanizada. **Revista**

**Eletrônica de Geografia**, n. 37, p. 19–37, 2011.

**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 agosto 2019.

FRANCO, R.R. et al. Phytoscreening of Vochysiaceae species: Molecular identification by HPLC-ESI-MS/MS and evaluating of their antioxidant activity and inhibitory potential against human  $\alpha$ -amylase and protein glycation. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, n. December 2018, p. 103122, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103122>

GOMES, B. H. **Caracterização física e bioquímica de frutos de *Caryocar brasiliense* (pequizeiro) com e sem espinhos no endocarpo e abordagens biotecnológicas para a conservação e micropropagação in vitro.** 2018. 109 f. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal De Uberlândia, 2018.

GOMES et al. Chemical composition and nutritional of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) with and without thorns at the endocarp. **International Journal of Food Science and Nutrition**, p. 48–55, 2019.

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

GRIBEL, R.; HAY, J.D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.9, p.199-211, 1993. <https://doi.org/10.1017/S0266467400007173>

GUEDES, A. M. M. et al. Length-scale Specific Crystalline Structural Changes Induced by Molecular Randomization of Pequi Oil. **Journal of Oleo Science**, v. 66, n. 5, p. 469–478, 2017. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16192>

GUSMÃO, E.; JÚNIOR, É. M. DA F.; VIEIRA, F. Fruits and endocarps biometry of murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss). **Cerne**, v. 12, n. 1, p. 84–91, 2006.

HAY, B. A., WOLFF, T.; RUBIN, G. M. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. **Development**, v. 120, p. 2121–2129, 1994.

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>

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>

IGAKI, T.; MIURA, M. The *Drosophila* T. N. F. ortholog Eiger: emerging physiological roles and evolution of the TNF system. **Semin. Immunol**, v. 26, p. 267–274, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.003>

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)

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1985. p. 324-329.

JÚNIOR, A. F. de M. et al. Genetic structure of natural populations of pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, n. 66, p. 56–65, 2004.

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>

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.

<https://doi.org/10.2307/27757764>

KERR, W. E.; SILVA, F. R. DA; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.): informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 169–171, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000100035>

KHOURI, J. et al. Anticlastogenic potential and antioxidant effects af an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.442-48, 2007.

<https://doi.org/10.1590/s1415-47572007000300024>

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A. conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.147-155, 2005.

KUMAR, A. et al. The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factorkappaB, 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>

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, M. et al. Characterization of TNF-induced cell death in *Drosophila* reveals caspase-and JNK-dependent necrosis and its role in tumor suppression. **Cell Death**



**& Disease**, v. 10.8, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1862-0>

LIMA, A. DE et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695–698, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000300052>

LIMA, A. de. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*)**. 2008. 219 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIU, R. H. Health benefits of fruits: implications for disease prevention and health promotion. In: 19º Congresso Brasileiro de Fruticultura, **Palestras e resumos...** Cabo frio: RJ, p. 36-44, 2006.

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)

LOPES, A. C. A.; et al. Variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59 n. 2 p. 341-348, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000200021>

LUZ, R. R. et al. Caracterização física de frutos e putâmens e taxa de ataque por *Carmenta* sp. A pequizeiros (*Caryocar brasiliense* camb.) no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 746-756, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000088>

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>

MA, X. et al. NOPO modulates Egr-induced JNK-independent cell death in *Drosophila*. **Cell Res**, v. 22, p. 425–431, 2012. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.135>

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ajcn.2008.05.006>

MARRIS, E. Conservation in Brazil: The forgotten ecosystem. **Nature**, v. 437, p. 944–945, 2005.

MARTINS, R.L; GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n.1, p.37- 45, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042007000100005>

MEDEIROS, A. DE; HARIDASAN, R. M. Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminium accumulating and non-accumulating species of the cerrado region of central Brazil. **Plant and Soil**, v. 88, n. 3, p. 433–436, 1985. <https://doi.org/10.1007/BF02197499>

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by nmr spectroscopy. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2310–2313, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900013>

MORENO, E.; YAN, M.; BASLER, K. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNKdependent 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)

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J., NAVES, R. V. Caracterização física de frutos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) do cerrado. **Rev. Árvore** [online]. v.37, n.5, p.905-912. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622013000500013>

MOURA, L. R. et al . Ação do extrato etanólico da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*) na cardiotoxicidade crônica induzida por doxorubicina em ratos. **Pesquisa Veterinária brasileira**, v. 37, n. 7, p. 713–724, 2017. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000700011>

OLIVEIRA, K. A. K. B. **Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) do Estado de Goiás**. 1998. 105 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

OLIVEIRA, M. E. B. DE et al. **Aspetos Agronômicos e de Qualidade do Pequi**. Embrapa, v. 113, p. 33, 2008. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426706/1/Dc113.pdf>

OLIVEIRA, P. S.; PIE, M. R. Interaction between ants and plants bearing extrafloral nectaries in cerrado vegetation. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 2, p. 161–176, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0301-80591998000200001>

PECHNIK, E., GUIMARÃES, L. R. Alguns representantes do reino vegetal portadores do elevado potencial provitamínico A. **Arquivos Brasileiros de Nutrição**, v. 13, n.1, p. 9-19, 1957.

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 nonautonomous apoptosis through the TNF pathway. **eLife**, v. 2, p. e01004, 24 set.

2013. <https://doi.org/10.7554/eLife.01004>

PRANCE, G. T. The genus *Caryocar* L. (Caryocaraceae): an underexploited tropical resource. **Advances in Economic Botany**, v. 8, p. 177–188, 1990.

RAFF, M. C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, v. 356, p. 397–400, 1992. <https://doi.org/10.1038/356397a0>

RAMOS, K. M. C. **Variabilidade genética e uso dos frutos de pequi (*Caryocar Coriaceum wittm.*) Na região meio-norte do Brasil**. 2010. 102 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Pará, 2010.

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>

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253–260, 2006.

RIGUEIRA, J. A. **Pequi: cultivo, caracterização físico-química e processamento**. 2003. 62 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos) Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

RODRIGUES, T. S. **Avaliação da ação do peptídeo sintético pm26tgf-  $\beta$ 1, mimético de TGF- $\beta$ 1 humano, na apoptose induzida por *tnf- $\alpha$*  em *Drosophila melanogaster***. 2017. 85 f, Dissertação: Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia. 2017.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R., MALTA, L. G., EBERLIN, M. N., PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of



components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 711–717, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.048>

ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources : cytotoxicity and phototoxicity in vitro Fontes de antioxidantes do cerrado brasileiro: citotoxicidade e fototoxicidade in vitro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, n. 3, p. 814–821, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000300038>

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>

SANTANA, J. G.; NAVES, R. V. CARACTERIZAÇÃO DE AMBIENTES DE CERRADO COM ALTA DENSIDADE DE PEQUIZEIROS (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2003.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 293–296, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-2945200600020003>

SANTOS, F. S. et al. A cultura do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB), **Acta Iguazu**, v. 2, n. 3, p. 46-57, 2013.

SANTOS, F. W. et al. Diversidade genética em genótipos de milho para baixo nível tecnológico em Gurupi , TO Genetic diversity in maize genotypes for low technological level in Gurupi , Tocantins state. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, n. May, 2017.

SANTOS, F.W. et al. Seleção de genótipos de milho para obtenção de genitores potenciais Selection of maize genotypes to obtain potential parents. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, p. 27–30, 2018.

SANTOS, M. A. dos. **A influência da dinâmica demográfica e domiciliar no processo de ocupação do Cerrado Brasileiro: o caso do Programa de Assentamento Dirigido do Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil**. 2010. 168f. Tese (Demografia do Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.

<https://doi.org/10.2307/2529204>

SILVA, C. A. de A.; FONSECA, G. G. Brazilian savannah fruits: Characteristics, properties, and potential applications. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 1225–1232, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0195-3>

SILVA, K. L. et al. Divergência genética de genótipos de milho com e sem adubação nitrogenada em cobertura. **Revista Agro@Mambiente on-Line**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 102, 2015. <https://doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v9i2.2142>

SILVA, S. M. da et al. Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás - Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 771–777, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000400011>

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v.41, p.237-245, 1981.

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)

SOUZA, C.V. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseada em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. p.382-383.

TANG, G. et al. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB 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>

VALENTE, P. M. R. **Potencial fungicida de extrato foliar de *Caryocar villosum* (AUBL.) PERS (Caryocaraceae)**. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, 2012.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no melhoramento**. Ribeirão Preto: SBG, 1992. 496 p.

VERA, R. et al. Caracterização física de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.35, n.2, p.71-79, 2005.

VERA, R. et al. Caracterização física e química de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 2, p. 93-99, 2007.

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>

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do

Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 3, n. 1, p. 13–36, 2000.

VILAS BOAS, E. V. B. Frutos minimamente processados: pequi. 3º Encontro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. **Anais...**Viçosa. Viçosa: UFV, 2004.

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

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>