

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

PEDRO YURI CUNHA

EFEITOS DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE SARS-COV-2 NO CÉREBRO

DE *Drosophila melanogaster*

UBERLÂNDIA

2025

PEDRO YURI CUNHA

EFEITOS DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE SARS-COV-2 NO CÉREBRO DE
Drosophila melanogaster

Projeto de pesquisa apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia
como requisito para aprovação na
disciplina de TCC II.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira
Vieira

Coorientadora: Me. Serena Mares
Malta

UBERLÂNDIA

2025

RESUMO

A pandemia de COVID-19, causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, trouxe à tona diversas manifestações clínicas além do comprometimento respiratório, incluindo efeitos neurológicos associados à ação de proteínas virais. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da expressão das proteínas acessórias Spike e Orf7a do SARS-CoV-2 em cérebro de *Drosophila melanogaster*, utilizando cruzamentos com o *driver* neural Elav-GAL4. Foram realizados testes de eclosão, sobrevivência e escalada para avaliar os impactos dessas proteínas sobre o desenvolvimento, longevidade e desempenho locomotor dos indivíduos. Os resultados revelaram que a proteína Spike pode afetar de forma negativa o desempenho motor de forma precoce (4º dia pós-eclosão), sugerindo uma possível alteração do tecido neural. Já a proteína Orf7a pode promover uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência, indicando um possível efeito tóxico progressivo. Esses dados apontam que ambas as proteínas podem interferir em vias celulares conservadas, reforçando o potencial da *D. melanogaster* como modelo experimental para o estudo de danos neuronais mediados por proteínas virais.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, Spike, Orf7a, *Drosophila melanogaster*, neurotoxicidade, modelo experimental, sistema nervoso.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, has revealed various clinical manifestations beyond respiratory impairment, including neurological effects associated with viral protein activity. This study aimed to investigate the effects of expressing the accessory proteins Spike and Orf7a of SARS-CoV-2 in the brain of *Drosophila melanogaster*, using crosses with the neural driver Elav-GAL4. Eclosion, survival, and climbing assays were conducted to evaluate the impacts of these proteins on development, longevity, and locomotor performance. The results showed that the Spike protein can negatively affect motor performance at an early stage (4th day post-eclosion), suggesting alterations in neural tissue. Meanwhile, the Orf7a protein may cause a significant decrease in survival rate, indicating a possible progressive toxic effect. These findings suggest that both proteins can interfere with conserved cellular pathways, reinforcing the potential of *D. melanogaster* as an experimental model for studying neuronal damage mediated by viral proteins.

Keywords: SARS-CoV-2, Spike, Orf7a, *Drosophila melanogaster*, neurotoxicity, experimental model, nervous system.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Covid-19 e o Sars-Cov-2.....	1
1.2 Spike e Orf7a.....	2
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.4 Sistema UAS/GAL-4	5
2. JUSTIFICATIVA	6
3. OBJETIVO.....	8
3.1. Objetivo Geral.....	8
3.2. Objetivos Específicos	8
4. METODOLOGIA.....	8
4.2 Ensaio de sobrevivência.....	10
4.3 Teste RING (Rapid Interactive Negative Geotaxis)	10
4.4 Análise de resultados	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
5.1. Teste de eclosão.....	11
5.2. Teste de sobrevivência	13
5.3. Teste de escalada	16
6. CONCLUSÃO	18
7. REFERÊNCIAS.....	19

TABELAS

Tabela 1: Cruzamentos realizados para obtenção de moscas com os genes de interesse	
.....	9

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** : Diferenças morfológicas entre macho e fêmea de *Drosophila melanogaster*: as fêmeas possuem corpo ligeiramente maior, abdômen alongado e pontiagudo com listras abdominais bem definidas. Já os machos têm corpo menor, abdômen mais curto, arredondado e com pigmentação escura contínua na extremidade ("ponta preta"), além da presença de pentes sexuais nas patas dianteiras. 5
- Figura 2:** Esquema do sistema UAS-GAL4 em *Drosophila melanogaster*. A linhagem "driver" expressa o fator de transcrição GAL4, enquanto a linhagem "responder" possui o gene de interesse acoplado a uma sequência UAS (*Upstream Activation Sequence*). Quando cruzadas, a progênie expressa o gene-alvo apenas nos tecidos onde o GAL4 é ativado, permitindo controle espacial e temporal da expressão gênica. 6
- Figura 3:** Representação dos genótipos obtidos nos cruzamentos utilizando o sistema UAS-GAL4. Nos cruzamentos Elav x Spike e Elav x Orf7a, os descendentes herdam o driver neural Elav-Gal4 e o transgene sob controle da sequência UAS, ativando a expressão específica da proteína viral no tecido neural. No cruzamento Elav x White (controle), não há gene viral associado ao UAS, portanto, nenhuma proteína viral é expressa, servindo como grupo controle. 10
- Figura 4:** Números médio de eclosão de cada linhagem cruzada com Elav (Gal-4) 11
- Figura 5:** Curva do Teste de sobrevivência 13
- Figura 6:** gráfico da diferença do desempenho motor de cada linhagem avaliada 16
- Figura 7:** Análise estatística do teste Tukey sobre todos os grupos participantes do teste de escalada. 17

ABREVIATURAS

D. melanogaster *Drosophila melanogaster*

Elav x White (BL#5146 a
P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4],
P{ry[+t7.2]=hsFLP}1) X (BL# 3605- w[1118]).

Elav x Spike (BL#5146 a
P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4],
P{ry[+t7.2]=hsFLP}1) X (BL#94267- y[1] w[]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=UAS-
SARS-CoV-2-S.HA}VK00037)

Elav x Orf7a (BL#5146 a
P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4],
P{ry[+t7.2]=hsFLP}1) X (BL#94229- y[1] w[]; PBac{y[+mDint2]w[+mC]=UAS-
SARS-CoV-2-ORF7a.HA}VK00037)

Dpe Dias pós-eclosão

MHC-I Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I

SarsCov-2 Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

UAS Sequência de Ativação a Montante.

ECA2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por guiar meus passos e por me conceder forças, saúde e inúmeras bênçãos ao longo da minha trajetória. Sem sua graça, até a maior das conquistas perderia qualquer sentido.

À minha base: meus pais, Márcio e Giany. Sou imensamente grato por todo o suporte incondicional, pelos ensinamentos, pela paciência e pela força transmitida em cada etapa deste percurso. Sei que cada uma das minhas conquistas é também de vocês, e carrego com orgulho tudo que aprendi com seus exemplos.

Ao LabGen da Universidade Federal de Uberlândia, meu sincero agradecimento. Foi nesse espaço de conhecimento, troca e crescimento que encontrei não apenas ferramentas para o desenvolvimento deste trabalho, mas também pessoas que marcaram minha formação. Em especial, agradeço aos meus coorientadores Me. (e futura Dra. Serena Malta) e Me. (e futuro Dr.) Matheus Henrique: suas orientações e conselhos sinceros (e puxões de orelha necessários!) foram fundamentais para que este projeto se concretizasse. Mais do que colegas, vocês se tornaram referências, me orgulho de dizer que tenho esses “pais” na minha jornada científica. Obrigado por compartilharem conhecimento com tanta generosidade e por acreditarem no meu potencial.

Ao Dr. Carlos Ueira, idealizador e orientador deste projeto, expressei minha profunda gratidão. Sua competência e capacidade de ensinar com clareza trouxeram em mim grande admiração pelo profissional e pessoa que você é. Obrigado por acreditar neste projeto e me guiar com sabedoria durante todo o processo.

Por fim, mas com um carinho especial, agradeço à minha companheira de vida, Laura Freitas. Sua presença constante, paciência e incentivo foram essenciais nos momentos bons e, principalmente, nos mais difíceis. Obrigado por estar ao meu lado, acreditando em mim mesmo quando eu duvidei.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero e eterno obrigado.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Covid-19 e o Sars-Cov-2

A COVID-19, surgiu no final de 2019 na cidade de Wuhan, na China, e rapidamente se disseminou, tornando-se uma pandemia global que impactou profundamente a saúde pública, a economia e a sociedade em escala mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional em janeiro de 2020, e, em março do mesmo ano, a classificou como pandemia. A rápida propagação do vírus, aliada à sua capacidade de transmissão muitas vezes assintomática, revelou a necessidade de instruções de saúde pública sem precedentes, como quarentenas, distanciamento social e desenvolvimento acelerado de vacinas (Taylor, Luke et al., 2021).

Até Outubro de 2024, o número oficial de casos registrados mundialmente ultrapassou 750 milhões, com mais de 7 milhões de mortes confirmadas segundo a OMS. No Brasil, os números também foram expressivos, chegando a mais de 37 milhões de casos confirmados, além de mais de 700 mil mortes acumuladas, rendendo várias ondas de infecção e colapsos do sistema de saúde em diferentes estados e cidades (da Silva, Severino Jefferson Ribeiro et al., 2021).

O SARS-CoV-2, vírus que causa a Covid-19, causa sintomas respiratórios, que variam de quadros leves, como febre e tosse, a condições graves, como síndrome respiratória aguda grave (SRAG). Pacientes com comorbidades como hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares estão em maior risco de desenvolver formas graves da doença, aumentando as taxas de hospitalização e mortalidade. Porém, existem evidências que a COVID-19 gera sequelas que causam efeitos neurológicos agudos e crônicos, podendo afetar a memória e diversas funções cognitivas e motoras (Gusev et al., 2022).

A neuroinflamação, caracterizada pela resposta imune exacerbada no sistema nervoso central, tem sido implicada na patogênese dessas complicações, e estudos recentes sugerem que a disfunção mitocondrial desempenha um papel crucial nesse processo. A disfunção mitocondrial, definida como a alteração na função normal das mitocôndrias, organelas responsáveis pela produção de energia celular e sinalização, pode

levar a um desequilíbrio na homeostase neuronal e contribuir para o desenvolvimento de sequelas neurológicas a longo prazo. (Seok, et al., 2021)

O vírus citado é pertencente à classe dos coronavírus e é reconhecido como um dos maiores vírus de RNA, consistindo em uma molécula de RNA de fita simples que codifica 29 proteínas, que são essenciais para diversas funções virais durante seu ciclo de replicação, dentre elas estão as proteínas acessórias ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF8, ORF9b, ORF9c, ORF10, que tem como função, por exemplo, a modulação da resposta imune e regulação da expressão gênica viral, além da proteína Spike, localizada no envelope do vírus, que também possui funções virais (Strong, Michael J. et al., 2023).

1.2 Spike e Orf7a

Para combater eficazmente o SARS-CoV-2, é fundamental explorar as funções das proteínas virais, suas interações com o organismo hospedeiro e o papel desses processos na patogenicidade em diversos níveis.

A proteína Spike (S) do SARS-CoV-2 é fundamental para a infecção viral e a patogenicidade, desempenhando um papel essencial na entrada do vírus nas células humanas. Esta proteína é clivada em duas subunidades principais, S1 e S2. A subunidade S1 contém o domínio de conexão ao receptor (RBD), responsável pela conexão ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) nas células humanas, enquanto a subunidade S2 facilita a fusão da membrana viral com a célula hospedeira. Essa interação com o ECA2 é um ponto crítico no ciclo de infecção, pois permite que o SARS-CoV-2 entre nas células e inicie o processo de replicação viral (Huang et al., 2020).

No artigo de Khan, S. et. al., 2020, é descrito os mecanismos pelos quais o SARS-CoV-2 pode causar danos neurológicos em pacientes com COVID-19. Inicialmente, a infecção afeta principalmente o sistema respiratório; no entanto, evidências sugerem que o vírus também invade o sistema nervoso central (SNC), possivelmente causando encefalopatias, encefalites e eventos cerebrovasculares. Esse dano pode ocorrer através de infecção direta do SNC pelo vírus ou por inflamação sistêmica e estado de hipercoagulabilidade induzida por infecção, que aumenta o risco de trombose e lesões cerebrais. Além disso, o estudo de Theoharides, T, et. al., 2022 também explora a possibilidade da proteína Spike do SARS-CoV-2 ser responsável pela síndrome de Long-COVID (sintomas de longo prazo causados pela Covid-19), caracterizada por sintomas persistentes como fadiga e problemas neuropsiquiátricos.

Ademais, a entrada de Spike no hospedeiro resulta na ativação tardia da micróglia, que é um tipo de célula imunológica residente no sistema nervoso central, e tem como principal função a identificação e resposta a sinais de danos ou infecção no tecido nervoso, desempenhando papel fundamental na defesa imunológica do cérebro, agravando perda de sinapses no hipocampo, gerando problemas cognitivos e de memória (Fontes-Dantas, et al, 2023).

Já a proteína acessória Orf7a desempenha várias funções relevantes para a infecção e replicação viral. Ela desempenha papel de antagonismo à resposta antiviral do interferon tipo I (IFN-I). Estudos indicam que a Orf7a bloqueia a resposta do IFN-I, facilitando a replicação viral ao interferir na capacidade do sistema imunológico de limitar a infecção. Esse antagonismo envolve a interrupção da produção de IFN-I e também da sinalização antiviral associada, o que contribui para a evasão imunológica e persistência do vírus no hospedeiro (Arshad, N. et al., 2022).

É encontrado na literatura, a sugestão de que a proteína ORF7a do SARS-CoV-2 interfere na expressão do MHC-I, uma molécula essencial para a apresentação de antígenos. Os resultados sugerem que a ORF7a compete com a $\beta 2m$ (microglobulina beta-2) para se ligar à cadeia pesada do MHC-I. Essa alteração impede que o MHC-I atinja a superfície celular, o que reduz a apresentação de antígenos e permite que o vírus escape da resposta imune do hospedeiro (Li, X.;. et al., 2022).

Ainda não é bem entendido o papel da Orf7a no sistema neural, porém, com o conhecimento exposto sobre ela, há uma expectativa de que haja efeitos patológicos nesta área. A micróglia, as células imunes residentes do cérebro, depende da sinalização do MHC-I para regular suas funções e distinguir entre células saudáveis e danificadas. Com a diminuição da expressão do MHC-I devido à ação do ORF7a, a micróglia pode ser ativada de maneira anômala, levando a uma resposta inflamatória local no cérebro. Essa ativação anômala está relacionada à neuroinflamação e neurodegeneração em condições como doença de Alzheimer e de Parkinson (Colonna, M. et al., 2017).

Além do mais, a retenção de MHC-I no retículo endoplasmático (ER) causada pela ORF7a pode resultar em acúmulo de proteínas mal dobradas, levando ao estresse do ER. O estresse do ER no SNC pode iniciar processos apoptóticos, danificando células neuronais e contribuindo para a neurotoxicidade. Esse mecanismo também está implicado em várias condições neurodegenerativas, onde o acúmulo de proteínas e o estresse celular causam danos neuronais progressivos (Hetz, C. et al, 2014).

1.3 *Drosophila melanogaster*

Embora os modelos *in vitro* ofereçam informações úteis, eles carecem do contexto fisiológico de um organismo completo. Atualmente, os organismos modelos usados para estudos sobre o SARS-CoV-2 são majoritariamente mamíferos, que podem apresentar desafios como ciclos reprodutivos longos, baixa produção de descendentes, questões éticas e custos elevados de manutenção. Esses fatores os tornam pouco adequados para investigações rápidas sobre as proteínas virais (Guichard, Annabel, et al., 2023).

Estudos sobre a ação dessas proteínas empregam modelos animais, como a *D. melanogaster*, devido ao seu sistema nervoso complexo e similaridades com humanos, incluindo um genoma totalmente sequenciado e manipulação genética possível. Este estudo investiga a ação das proteínas Spike e Orf7a inseridas no cérebro de *D. melanogaster*, buscando compreender suas variações fenotípicas, comportamentais e moleculares por meio de metodologias estabelecidas, como análises de sobrevivência e locomoção. (Guichard, Annabel, et al., 2023).

O sistema nervoso de *D. melanogaster* e o humano compartilham semelhanças significativas em termos genéticos e funcionais, apesar de suas diferenças em complexidade e estrutura. Ambos possuem processos neurobiológicos conservados, como a formação de sinapses e comunicação neuronal, o que permite que *D. melanogaster* seja utilizado como modelo para estudar doenças neurodegenerativas humanas, como Alzheimer e Parkinson por exemplo. Genes e vias de sinalização, como PI3K/Akt e TOR, que regulam processos celulares fundamentais em doenças neurais, são conservadas, facilitando a tradução de descobertas. No entanto, o sistema nervoso de *Drosophila* é menos complexo, com cerca de 100.000 neurônios, contra 86 bilhões em humanos, e carece de estruturas como o córtex cerebral. Essa simplicidade é vantajosa para estudos de triagem, destacando a importância de *Drosophila* na pesquisa neurocientífica (Hirth, F., 2019).

A identificação de variações comportamentais e histopatológicas nestes modelos é crucial para aprimorar nossa compreensão da doença e sua utilização em pesquisas futuras. Tal entendimento poderia levar a abordagens terapêuticas mais eficazes e ao desenvolvimento de novas estratégias de intervenção. Portanto, esse estudo não só contribui para a compreensão da patologia, mas também para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais direcionadas e eficazes contra a COVID-19, uma doença complexa e debilitante que ainda afeta milhares de pessoas em todo o mundo (van de Leemput et al., 2021).



Figura 1: : Diferenças morfológicas entre macho e fêmea de *Drosophila melanogaster*: as fêmeas possuem corpo ligeiramente maior, abdômen alongado e pontiagudo com listras abdominais bem definidas. Já os machos têm corpo menor, abdômen mais curto, arredondado e com pigmentação escura contínua na extremidade ("ponta preta"), além da presença de pentes sexuais nas patas dianteiras.

Fonte: *atlas of drosophila morphology*

1.4 Sistema UAS/GAL-4

O sistema UAS/GAL4 é uma técnica amplamente utilizada para controlar a expressão de genes em organismos modelo, como a *D. melanogaster*, por exemplo. Ele utiliza dois componentes principais: o GAL4, um fator de transcrição derivado de leveduras, e o UAS (*Upstream Activation Sequence*), uma sequência de DNA à qual o GAL4 se liga para ativar a expressão de genes (Hara, Chiho, et al., 2020). Esse sistema permite a expressão de genes endógenos ou transgênicos em células ou tecidos específicos da mosca, possibilitando a manipulação precisa da expressão genética. Essa tecnologia é essencial para estudos que requerem controle específico de genes em diferentes partes do organismo. O cruzamento de linhagens com expressão de GAL4 (*driver*) e UAS (*responder*) gera descendentes que expressam genes controlados pelo responder em locais e fases do desenvolvimento específicos, conforme direcionado pelo driver. (Chakraborty et al., 2011)

O uso do sistema de transativação GAL4-UAS para promover a expressão de genes de interesse em *D. melanogaster*, é uma poderosa ferramenta genética que viabiliza

o estudo em linhagens transgênicas. Esse sistema, adaptado da levedura, utiliza duas dessas linhagens: uma com o gene GAL4 acoplado a um promotor específico e outra com o gene alvo sob controle de uma sequência UAS. A expressão do gene de interesse ocorre apenas nas proles resultantes do cruzamento dessas linhagens, onde o GAL4 ativa o gene UAS-alvo gerando expressões de interesse não encontrado em modelos selvagens, resultando em alterações fenotípicas, comportamentais, proteicas, entre outras. (Phelps, C. B.; 1998).

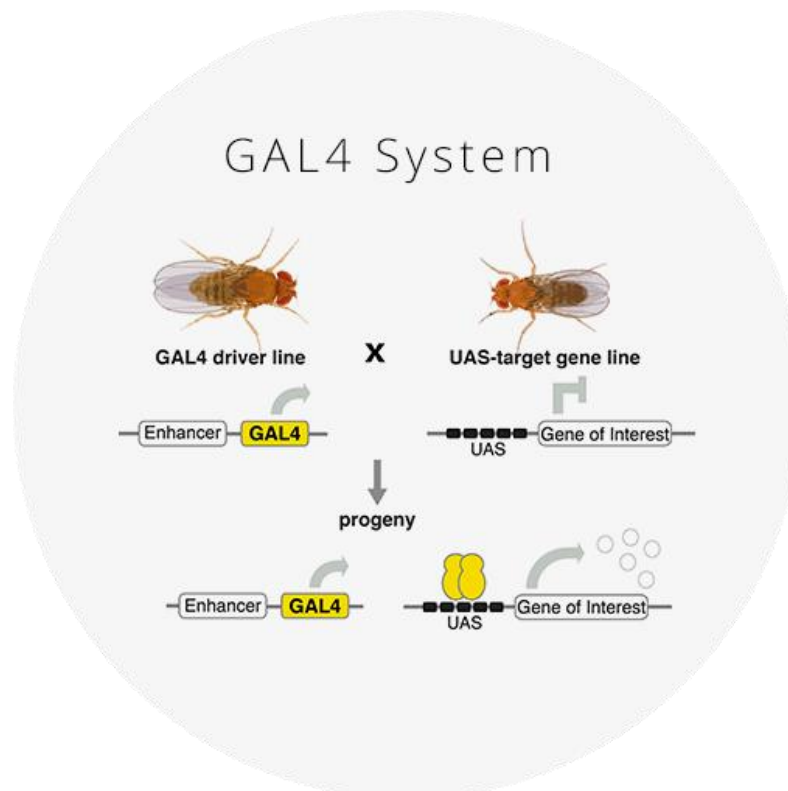


Figura 2 Esquema do sistema UAS-GAL4 em *Drosophila melanogaster*. A linhagem "driver" expressa o fator de transcrição GAL4, enquanto a linhagem "responder" possui o gene de interesse acoplado a uma sequência UAS (*Upstream Activation Sequence*). Quando cruzadas, a progênie expressa o gene-alvo apenas nos tecidos onde o GAL4 é ativado, permitindo controle espacial e temporal da expressão gênica.

Fonte: Laboratório Andrea Brand: <https://andreabrandlab.org/gal-4-system>

2. JUSTIFICATIVA

Em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou que o surto do novo Coronavírus representava uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), o mais alto nível de alerta previsto pelo Regulamento Sanitário Internacional da Organização.

A magnitude da pandemia de COVID-19, evidenciada pelos mais de 750 milhões de casos registrados mundialmente e pelas mais de 7 milhões de mortes confirmadas pela OMS até outubro de 2024, demonstra o impacto global desta crise de saúde. No Brasil, a situação não foi diferente, com mais de 37 milhões de casos confirmados e mais de 700 mil óbitos. Esse cenário, marcado por múltiplas ondas de infecção e colapsos do sistema de saúde em diversas regiões do país (da Silva, Severino Jefferson Ribeiro et al., 2021), sublinha a urgência e a relevância de pesquisas que busquem compreender, mitigar e solucionar problemas relacionados ao vírus Sars-Cov-2.

No cenário atual, há um amplo debate em torno das questões de saúde pública e da necessidade de continuar desenvolvendo e implementando tecnologias que auxiliem na gestão das questões que assolam a sociedade. Quando se trata de doenças neurodegenerativas, compreender seus mecanismos moleculares e aplicar ferramentas para explorar suas características torna-se essencial. Com o alto poder de virulência, e a alta incidência da Covid-19, pesquisas que visam combater sua disseminação são imprescindíveis, principalmente pelo trauma causado por sua virulência no mundo todo, o que gerou além de um impacto socioeconômico significativo, perdas inestimáveis de vidas. Portanto, é crucial encorajar pesquisas que gerem conhecimento científico capaz de expandir a compreensão desses temas.

Considerando o impacto significativo das complicações neurológicas pós-COVID-19 na qualidade de vida dos indivíduos e os desafios em compreender completamente os mecanismos envolvidos, torna-se crucial o desenvolvimento de pesquisas que investiguem os efeitos a longo prazo das proteínas virais no sistema nervoso. Este estudo contribui com a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a neurotoxicidade das proteínas Spike e Orf7a, utilizando a *D. melanogaster* como modelo experimental.

Este trabalho ainda visa contribuir para essa causa por meio de uma pesquisa de alto desempenho, utilizando *D. melanogaster* como modelo de estudo. A escolha de metodologias econômicas é fundamental para otimizar o uso dos recursos públicos. A execução deste projeto beneficia diversos públicos: a comunidade científica, por meio da divulgação dos resultados e das discussões geradas; os alunos envolvidos, que participam como executores e são incentivados na formação científica; e a comunidade em geral, conscientizando sobre a importância da ciência e promovendo a interação entre acadêmicos e não acadêmicos. Esta abordagem fortalece o vínculo essencial entre pesquisa e sociedade, contribuindo para o avanço coletivo.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos fisiopatológicos relacionados às proteínas Spike e Orf7a de Sars-Cov-2 em tecido neural utilizando *D. melanogaster* como modelo.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a expressão das proteínas Spike e Orf7a de Sars-cov-2 gera influência na expectativa de vida do organismo modelo.
- Avaliar se a expressão das proteínas Spike e Orf7a interfere na fertilidade e na taxa de eclosão dos descendentes das moscas.
- Determinar o impacto da expressão dos genes de interesse Spike e Orf7a na atividade locomotora das moscas.
- Analisar e comparar os resultados da taxa de eclosão e dos testes de sobrevivência e escalada para uma maior compreensão dos efeitos da Spike e da Orf7a no cérebro das *D. melanogaster*.

4. METODOLOGIA

Neste estudo, foram utilizadas como modelo animal, linhagens transgênicas de *D. melanogaster* que foram obtidas do centro de estoque Bloomington e compunham o estoque do Laboratório de Genética da UFU (LABGEN-UFU). As moscas foram mantidas em uma estufa a 25°C com ciclo claro/escuro de 12h/12h. A alimentação foi feita por regime *ad libitum* com meio de cultura padrão Bloomington. Para a obtenção dos indivíduos afetados pela expressão das proteínas acessórias do Sars-Cov-2 foi realizado o cruzamento das linhagens Spike (BL#94267- y[1] w[]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=UAS-SARS-CoV-2-S.HA}VK00037), Orf7a (BL#94229- y[1] w[]; PBac{y[+mDint2]w[+mC]=UAS-SARS-CoV-2-ORF7a.HA}VK00037) com Elav-GAL4 (BL#5146 a P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155], P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4], P{ry[+t7.2]=hsFLP}1). Como controle negativos, foram utilizadas moscas oriundas do cruzamento entre as linhagens Elav-Gal4 e w1118 (BL#3605- w[1118]).

Tabela 1: Cruzamentos realizados para obtenção de moscas com os genes de interesse

	Cruzamentos
Elav x Spike	(BL#94267- y[1] w[]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=UAS-SARS-CoV-2-S.HA}VK00037) × (BL#5146 a P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4], P{ry[+t7.2]=hsFLP}1)
Elav x Orf7a	(BL#94229- y[1] w[]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=UAS-SARS-CoV-2-ORF7a.HA}VK00037) × (BL#5146 a P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4], P{ry[+t7.2]=hsFLP}1)
Elav x White	(BL#3605- w[1118]) × (BL#5146 a P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4], P{ry[+t7.2]=hsFLP}1)

Os descendentes obtidos a partir de cada cruzamento (F1), foram identificados e selecionados a partir de características fenotípicas associadas ao genótipo de interesse (asa reta e olho redondo), que eram moscas contendo os genes associados à GAL4 e UAS e que expressavam a expressão das proteínas Spike e Orf7a no cérebro. Os ensaios utilizados para validação dos indivíduos como modelos, bem como a comparação entre eles a fim de identificar as possíveis diferenças, incluíram a taxa de eclosão, o ensaio de sobrevivência e o teste de escalada.

Cruzamento Elav x Spike:

- `elav-Gal4/+ ; +/w[+mC]=UAS-SARS-CoV-2-S.HA}VK00037 ; +/+ ; +/+`

Cruzamento Elav x Orf7a:

- `elav-Gal4/+ ; +/w[+mC]=UAS-SARS-CoV-2-Orf7a.HA}VK00037 ; +/+ ; +/+`

Cruzamento Elav x White:

- `Elav-Gal4/+ ; +/+ ; +/+ ; +/+`

Figura 3: Representação dos genótipos obtidos nos cruzamentos utilizando o sistema UAS-GAL4. Nos cruzamentos Elav x Spike e Elav x Orf7a, os descendentes herdam o driver neural Elav-Gal4 e o transgene sob controle da sequência UAS, ativando a expressão específica da proteína viral no tecido neural. No cruzamento Elav x White (controle), não há gene viral associado ao UAS, portanto, nenhuma proteína viral é expressa, servindo como grupo controle.

Fonte: elaborada pelo autor, 2025.

4.1 Taxa de eclosão

Foi avaliado o número de moscas eclodidas através de dois cruzamentos realizados em triplicata e em dias distintos. Em cada uma das três repetições para cada condição experimental, 20 fêmeas da linhagem *Elav-GAL4* foram cruzadas com 10 machos de uma das seguintes linhagens: uma linhagem 'responder' expressando a proteína Spike, uma linhagem 'responder' expressando a proteína Orf7a, ou uma linhagem controle. O número de moscas eclodidas foi quantificado durante um período de dois dias após a observação da primeira eclosão.

4.2 Ensaio de sobrevivência

Foi avaliada a taxa de sobrevivência dos indivíduos adultos de cada grupo em triplicata. Foram contabilizadas a quantidade de moscas a cada 2 dias até não haver mais sobreviventes. A finalidade dessa segregação por dias de vida foi avaliar o caráter progressivo do efeito sobre as moscas e para entender os impactos na longevidade das mesmas.

4.3 Teste RING (Rapid Interactive Negative Geotaxis)

Foi avaliada a performance locomotora das moscas que expressavam as proteínas virais Spike e Orf7a acompanhada de seus respectivos controles, conforme protocolo e parâmetros previamente descritos na literatura (Gargano et al., 2005). Nesse ensaio foram

utilizados somente indivíduos fêmeas. O ensaio consistiu em avaliar quantas moscas conseguiram escalar uma altura de 5 cm após quatro segundos. O ensaio foi aplicado em indivíduos com idades de 4, 11 e 18 dias pós-eclosão, esses dias foram escolhidos baseados no teste de sobrevivência.

4.4 Análise de resultados

Os resultados da taxa de eclosão, ensaio de sobrevivência e teste RING foram analisados por testes estatísticos adequados ao tipo dos dados obtidos com auxílio de softwares como Excel e GraphPad Prism.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de eclosão

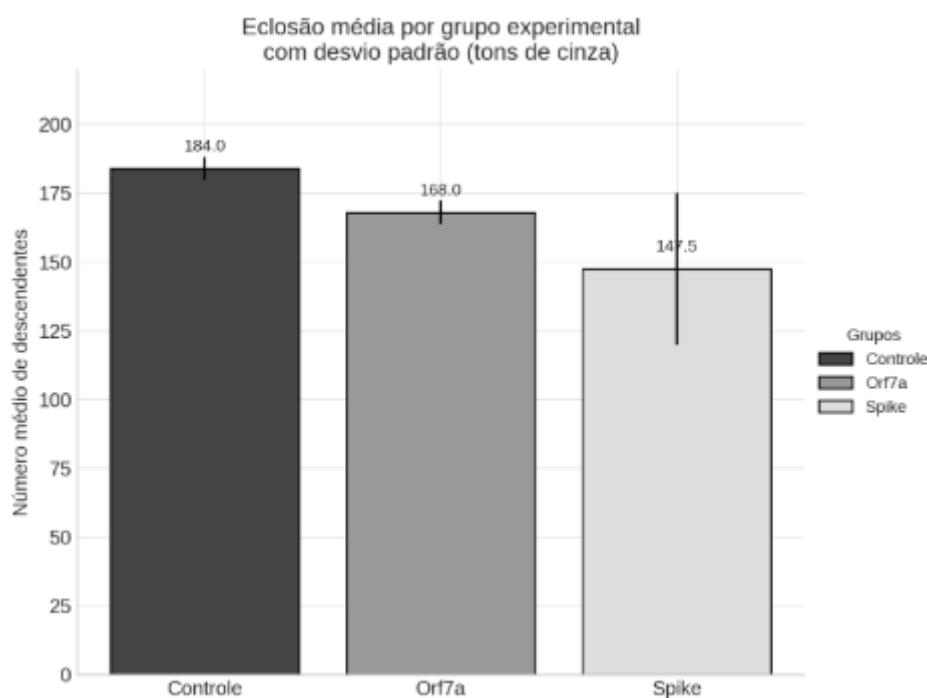


Figura 4: Números médio de eclosão de cada linhagem cruzada com Elav (Gal-4)

O grupo controle (Elav x White) apresentou o maior número, em números brutos, de descendentes em ambos os cruzamentos, com 181 indivíduos no Cruzamento 1 e 187

no Cruzamento 2, totalizando 368 descendentes. A média de eclosão foi de $184,00 \pm 4,24$ (média $\pm$ desvio padrão), indicando uma taxa reprodutiva estável, servindo como referência para comparação com os grupos experimentais.

No grupo experimental que expressa a proteína Orf7a (Elav x Orf7a), foram obtidos 165 descendentes no Cruzamento 1 e 171 no Cruzamento 2, somando 336 indivíduos. A média de eclosão foi de $168,00 \pm 4,24$. Em comparação ao controle, houve uma redução de 32 indivíduos, o que representa uma queda de aproximadamente 8,7% na taxa de descendência.

O grupo que expressa a proteína Spike (Elav x Spike) apresentou 167 descendentes no Cruzamento 1, mas uma redução acentuada no Cruzamento 2, com apenas 128 indivíduos. O total foi de 295 descendentes, resultando em uma média de eclosão de $147,50 \pm 27,58$. Isso representa uma redução de 73 indivíduos em relação ao controle, equivalente a cerca de 19,8%.

Para avaliar estatisticamente as diferenças entre os grupos, foram aplicados testes t para amostras independentes e o teste de Mann-Whitney. No entanto, como cada grupo teve apenas duas replicações ($n=2$), os resultados devem ser interpretados com cautela, como indicativos preliminares, e não conclusivos. A verificação da normalidade, essencial para o teste t, não pôde ser realizada adequadamente.

Na comparação entre o grupo controle e o grupo Orf7a, o teste t indicou $t = 3,77$ e $p = 0,064$, próximo ao nível de significância convencional ($p < 0,05$), enquanto o teste de Mann-Whitney U resultou em $U = 4,00$ e $p = 0,333$. Ambos sugerem uma possível tendência de redução na eclosão no grupo Orf7a, mas sem confirmação estatística robusta.

Comparando o grupo controle com o grupo Spike, o teste t apontou $t = 1,85$ e $p = 0,206$; o teste de Mann-Whitney U apresentou $U = 4,00$ e $p = 0,333$. Nenhum dos testes identificou diferença estatisticamente significativa, apesar da queda expressiva na média de eclosão.

Por fim, a comparação entre os grupos Orf7a e Spike resultou em $t = 1,04$ e $p = 0,408$ (teste t), e $U = 3,00$ e $p = 0,667$ (teste de Mann-Whitney), também sem diferenças significativas.

Em síntese, embora os dados brutos indiquem que a expressão das proteínas virais — especialmente a Spike — pode reduzir a taxa de descendência em *D. melanogaster*, os testes estatísticos não confirmaram essas diferenças como significativas. Novos experimentos com maior número de replicações são necessários para validar essas observações e investigar com maior precisão os possíveis mecanismos envolvidos.

Ainda que a diferença não tenha atingido significância estatística formal, o padrão observado é consistente com um efeito biológico que merece investigação em replicatas futuras. Tais dados reforçam a relevância de estudos com modelos alternativos para entender os efeitos colaterais das proteínas virais.

Vale destacar que das moscas eclodidas, a linhagem controle apresentou 40% de indivíduos do sexo masculino, enquanto a linhagem que expressava a proteína Spike apresentou uma proporção levemente inferior, com 38% de machos, enquanto a linhagem que expressava a proteína Orf7a apresentou apenas 28% de indivíduos do sexo masculino.

5.2. Teste de sobrevivência

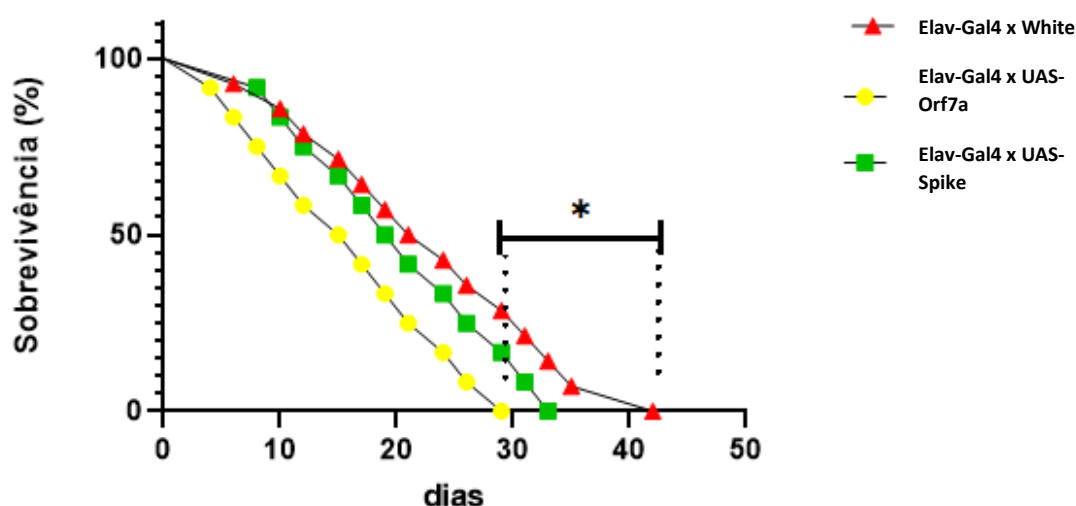


Figura 5: Curva do Teste de sobrevivência

A análise das curvas de sobrevivência dos grupos experimentais "Elav x White" e "Elav x Orf7a" revelou diferenças importantes no padrão de longevidade das moscas *D. melanogaster* sob estudo. O teste estatístico de Log-rank, com valor de $p = 0,0447$, indicou diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevivência, sugerindo que os dois grupos apresentam padrões distintos de mortalidade ao longo do tempo experimental. Este teste é amplamente utilizado em estudos de sobrevida por sua sensibilidade a diferenças globais nas curvas, e neste contexto, evidencia que os tratamentos geraram efeitos diferenciados na longevidade dos indivíduos.

Por outro lado, o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon, cujo "p" foi de 0,0843, não encontrou diferença estatisticamente significativa nas fases iniciais do experimento. Isso sugere que os efeitos entre os grupos podem não ser imediatos, mas tornam-se mais evidentes nas fases tardias do ciclo de vida das moscas. O teste de Wilcoxon dá maior

peso a eventos precoces (óbitos no início do experimento), e a ausência de significância neste teste reforça a hipótese de que a mortalidade diferenciada ocorre de forma mais tardia.

A partir da análise descritiva das medianas de sobrevida, observou-se que o grupo controle "Elav x White" apresentou uma maior sobrevida média (22,5 dias) quando comparado ao grupo "Elav x Orf7a", que teve uma sobrevida média de 16 dias. Essa diferença de 6,5 dias representa uma redução de aproximadamente 28,9% na longevidade média do grupo experimental, apontando para um possível efeito deletério associado à expressão da proteína relacionada a transgenia, potencialmente vinculado à patogenicidade ou disfunção neuronal.

Em conjunto, esses resultados podem sugerir que a diferença na sobrevivência entre os grupos ocorre de forma tardia, ou seja, os efeitos deletérios da manipulação genética podem se manifestar de maneira progressiva e acumulativa ao longo do tempo.

Já a análise estatística das curvas de sobrevivência entre os grupos "Elav x Spike" e "Elav x White" indicou ausência de diferença estatisticamente significativa na sobrevida global, de acordo com o teste de *Log-rank*. O valor de p obtido foi de 0,5551, com *Chi-square* = 0,3482 e 1 grau de liberdade, o que confirma que as curvas de sobrevivência não diferem significativamente ao longo do tempo experimental.

Ao observar a mediana de sobrevida, nota-se que o grupo "Elav x Spike" apresentou uma mediana de 20 dias, enquanto o grupo controle "Elav x White" atingiu 22,5 dias. Isso representa uma redução de 2,5 dias na sobrevida média, o que equivale a aproximadamente 11,1% a menos de longevidade no grupo experimental. A razão entre essas medianas é de 0,8889, que reflete a vantagem relativa de sobrevida do grupo controle. No entanto, o intervalo de confiança de 95% para essa razão (0,4111 a 1,922) inclui esse, indicando ausência de significância estatística nessa diferença, mesmo havendo uma tendência maior de morte precoce da linhagem transgênica.

Como falado, o grupo Elav x Spike, mesmo com menor sobrevida mediana e maior razão de risco, não possui robustez estatística suficiente para afirmar que essas diferenças não ocorreram ao acaso. Portanto, embora existam indícios numéricos de maior vulnerabilidade no grupo experimental, os resultados não permitem concluir com segurança que há um impacto estatisticamente relevante na sobrevida das moscas, nas condições deste experimento.

O grupo que expressou a proteína Orf7a mostrou uma queda acentuada na sobrevivência de maneira tardia após dias de análise. A queda precoce e abrupta na taxa

de sobrevivência sugere que a Orf7a pode estar promovendo efeitos deletérios severos no sistema nervoso da *D. melanogaster*. Estudos prévios indicam que essa proteína atua como antagonista da via do interferon tipo I (IFN-I) e compromete a expressão de MHC-I, o que pode levar à ativação anômala da micróglia e desencadear processos de neuroinflamação (ARSHAD et al., 2022), vale destacar que a *D. melanogaster* não apresenta MHC-I em seu organismo, porém, nada impede que a Orf7a também tenha algum fator inibitório sobre proteínas que desempenham funções de defesa celular da *D. melanogaster*, uma vez que a mesma possui células gliais que desempenham papéis fundamentais na defesa do sistema nervoso central (Kim et al., 2020).

No grupo que expressou a proteína Spike mesmo não possuindo significância estatística, está associada à ativação tardia da micróglia e à perda sináptica, processos que podem provocar danos cumulativos no sistema nervoso central, podendo ser por isso a tendência biológica perceptível de aumento da mortalidade (Fontes-Dantas, et al., 2023).

Na literatura científica, a maior parte dos estudos voltados à neurotoxicidade do SARS-CoV-2 concentra-se na proteína Spike, especialmente devido ao seu papel na inserção viral mediada pela ECA2, sua abundante expressão nas linhagens recombinantes e sua capacidade de ativar a micróglia, promover inflamação e contribuir para perda sináptica em regiões como o hipocampo (Fontes-Dantas et al., 2023; Huang et al., 2020). Por consequência, seria razoável esperar que a expressão da Spike em um modelo transgênico levasse a um comprometimento mais acentuado da sobrevivência. No entanto, nossos dados demonstraram o oposto: as moscas que expressavam a proteína Orf7a apresentaram uma expectativa de vida significativamente menor do que aquelas que expressavam a Spike. Essa discrepância sugere que, embora a Spike seja mais estudada e tenha ação conhecida sobre estruturas neurais, a Orf7a pode estar envolvida em mecanismos patogênicos ainda subestimados ou menos compreendidos.

Adicionalmente, é importante considerar que o organismo modelo *D. melanogaster* pode revelar sensibilidades distintas daquelas observadas em mamíferos. A alta conservação de vias celulares e de estresse entre humanos e moscas não garante uma equivalência direta nos alvos e nos efeitos; ao contrário, isso pode fazer com que proteínas como a Orf7a atuem de maneira ainda mais danosa em organismos com menor redundância genômica, como a mosca.

5.3. Teste de escalada

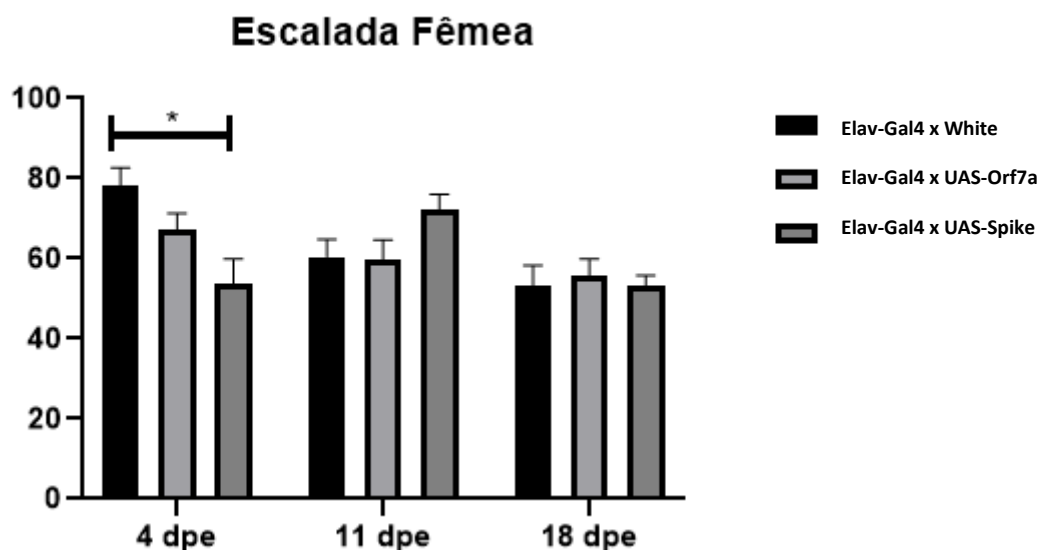


Figura 6: gráfico da diferença do desempenho motor de cada linhagem avaliada

O teste de escalada foi aplicado para avaliar a integridade motora e a possível presença de déficits neurológicos em fêmeas adultas de *D. melanogaster* expressando proteínas virais específicas do SARS-CoV-2 (Spike e Orf7a), comparadas ao grupo controle (Elav x White). A escalada foi mensurada em três momentos distintos: 4, 11 e 18 dias pós-eclosão (dpe), refletindo o desempenho locomotor ao longo do tempo.

No 4º dia pós-eclosão (4 dpe), o grupo controle (Elav x White) apresentou a maior média de desempenho. Já os grupos experimentais (Elav x Orf7a e Elav x Spike) demonstraram um leve comprometimento motor, com desempenho inferior ao do controle, indicando um possível efeito precoce das proteínas virais na capacidade locomotora das moscas.

No 11º dpe, observou-se uma tendência de melhora relativa nos grupos experimentais. O grupo Elav x Spike apresentou desempenho levemente superior ao controle, enquanto o grupo Elav x Orf7a permaneceu com valores próximos, mas ainda inferiores. Essa oscilação pode ser devido a um “n” menor da linhagem Spike, por conta das mortes das moscas durante o experimento, fazendo com que essa linhagem tivesse um número menor de indivíduos.

Já no 18º dpe, todos os grupos apresentaram declínio de desempenho, o que é esperado com o envelhecimento fisiológico.

O teste de Shapiro-Wilk foi executado e indicou que os dados das linhagens E x White ($W = 0.9423$; $p = 0.5368$) e Elav x Orf7a ($W = 0.9775$; $p = 0.7121$) seguem uma distribuição normal. Por outro lado, os dados da linhagem Elav x Spike apresentaram violação da normalidade ($W = 0.7646$; $p = 0.0326$), o que pode sugerir variabilidade acentuada ou presença de valores atípicos no desempenho locomotor das fêmeas deste grupo.

Tempo (dpe)	Comparação	Diferença Média	IC de 95% da Diferença	Significante?	Resumo	Valor P Ajustado
4	E x White vs. E x Orf7a	11.11	-8.511 a 30.73	Não	ns	0.2932
	E x White vs. E x Spike	24.69	4.521 a 44.86	Sim	*	0.0197
	E x Orf7a vs. E x Spike	13.58	-13.02 a 40.19	Não	ns	0.3588
11	E x White vs. E x Orf7a	6.178	-22.67 a 23.90	Não	ns	0.9968
	E x White vs. E x Spike	-11.73	-37.72 a 14.26	Não	ns	0.3795
	E x Orf7a vs. E x Spike	-12.35	-33.83 a 9.140	Não	ns	0.2411
18	E x White vs. E x Orf7a	-2.220	-17.11 a 12.67	Não	ns	0.9060
	E x White vs. E x Spike	1.111	-16.95 a 16.96	Não	ns	>0.9999
	E x Orf7a vs. E x Spike	2.221	-10.48 a 14.92	Não	ns	0.8416

Figura 7: Análise estatística do teste Tukey sobre todos os grupos participantes do teste de escalada.

Essa análise estatística foi conduzida por meio de um modelo de efeitos mistos com comparações múltiplas pelo teste de Tukey, permitindo avaliar diferenças significativas entre os genótipos ao longo do tempo.

No 4º dpe, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos “Elav x White” e “Elav x Spike”. Esse resultado indica que a expressão da proteína Spike promoveu uma redução significativa na capacidade motora precoce das fêmeas, em comparação ao grupo controle. Já a comparação entre os grupos “Elav x White” e “Elav x Orf7a” não atingiu significância estatística ($p = 0,2932$).

No 11º dpe, nenhuma das comparações entre os grupos demonstrou diferença estatisticamente significativa. A comparação entre “Elav x White” e “Elav x Orf7a” e “Elav x White” e “Elav x Spike” indicam uma aparente estabilização no desempenho motor entre os grupos durante esse período intermediário do experimento.

No 18 dpe, novamente não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Um limitante relacionado a esse experimento foi que este não pôde ser realizado com machos devido à quantidade insuficiente de moscas desse sexo viáveis obtidos após os cruzamentos genéticos. Como o teste de escalada requer um número de indivíduos

plausível para garantir a padronização e confiabilidade dos dados, a escassez de machos inviabilizou a coleta de resultados representativos. Essa limitação comprometeu parcialmente a avaliação funcional do impacto da expressão das proteínas virais, restringindo a análise aos dados reprodutivos. A inclusão do teste de escalada em estudos futuros será fundamental para verificar se as alterações observadas na taxa de eclosão também se refletem em aspectos do comportamento locomotor e da saúde neuromuscular dos indivíduos adultos.

No, mais a única diferença estatisticamente significativa foi observada no 4º dpe, onde as moscas do grupo “Elav x Spike” apresentaram desempenho locomotor significativamente inferior ao grupo controle (Elav x White). Esse resultado pode sugerir um impacto precoce da proteína Spike sobre a função neuromuscular ou neuronal, interferindo diretamente na capacidade de locomoção dos indivíduos recém-emergidos.

Embora *D. melanogaster* não possua ECA2, que desencadeia mecanismos neuro inflamatórios em humanos quando há a interação com a Spike, não é descartada a hipótese que a proteína possa interagir com vias celulares conservadas entre espécies, o que pode justificar a disfunção observada. A queda precoce na capacidade de escalada pode estar relacionada a processos neurotóxicos iniciais ou à interferência direta da proteína com a sinalização sináptica celular.

A ausência de diferenças estatísticas nos tempos posteriores (11 e 18 dpe) pode indicar uma possível adaptação fisiológica ao estresse causado pela expressão das proteínas virais, ou ainda uma diminuição da toxicidade com o envelhecimento dos indivíduos. Alternativamente, a redução da diferença entre os grupos ao longo do tempo pode refletir o declínio natural da função locomotora com a idade (Jones, et. al., 2011).

Assim, os resultados obtidos abrem espaço para futuros experimentos que validem a hipótese da proteína Spike, isoladamente, ser capaz de comprometer a função locomotora de forma significativa em estágios iniciais da vida adulta, o que pode refletir em um início precoce de danos neuronais. Estudos adicionais, com maior número de réplicas biológicas e análises complementares (como marcação de neurônios dopaminérgicos ou testes de apoptose), são necessários para elucidar os mecanismos celulares envolvidos nessa disfunção observada.

6. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados obtidos apontam que tanto a proteína Spike quanto a Orf7a podem induzir alterações fenotípicas e funcionais no sistema nervoso da *D. melanogaster*, cada uma com características distintas: a Spike afetando de forma aguda e precoce a função locomotora, enquanto a Orf7a impacta de forma mais progressiva a sobrevivência. Essas observações reforçam a utilidade da *Drosophila* como modelo para o estudo de proteínas virais e os possíveis mecanismos de toxicidade no tecido neural associados à infecção por SARS-CoV-2.

Ademais, os resultados obtidos neste estudo reforçam a *D. melanogaster* como um modelo experimental valioso para investigar os efeitos neurotóxicos de proteínas virais, como a Spike e a Orf7a do SARS-CoV-2. A capacidade de manipular geneticamente a *D. melanogaster* de forma eficiente, combinada com a conservação de vias celulares fundamentais entre moscas e humanos, permitiu avaliar como essas proteínas podem interferir em processos biológicos essenciais, levando a alterações no desenvolvimento, sobrevivência e função locomotora.

7. REFERÊNCIAS

ARSHAD, N. et al. SARS-CoV-2 accessory proteins ORF7a and ORF3a use distinct mechanisms to down-regulate MHC-I surface expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 1, 27 dez. 2022.

COLONNA, M.; BUTOVSKY, O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. **Annual Review of Immunology**, v. 35, n. 1, p. 441–468, 26 abr. 2017.

DA SILVA, S. J. R.; PENA, L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. **One Health**, v. 13, p. 100287, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100287>.

DINNON III, K. H. et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 560–566, out. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2708-8>. DOI: 10.1038/s41586-020-2708-8.

FONTES-DANTAS, F. L. et al. SARS-CoV-2 Spike protein induces TLR4-mediated long-term cognitive dysfunction recapitulating post-COVID-19 syndrome in mice. **Cell Reports**, v. 42, n. 3, p. 112189, mar. 2023.

GARGANO, J. W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 5, p. 386–395, maio 2005. DOI: 10.1016/j.exger.2005.02.005.

GUICHARD, A. et al. A comprehensive *Drosophila* resource to identify key functional interactions between SARS-CoV-2 factors and host proteins. **Cell Reports**, v. 42, n. 8, p. 112842, 1 ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112842>.

HARA, C. et al. Refinement of ectopic protein expression through the GAL4/UAS system in *Bombyx mori*: application to behavioral and developmental studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 18 set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12102-2>.

HETZ, C.; MOLLEREAU, B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 233–249, 12 mar. 2014.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 504–523, 1 ago. 2010. DOI: 10.2174/187152710791556104.

JONES, M. A.; GROTEWIEL, M. *Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors. **Experimental Gerontology**, v. 5, maio 2011. DOI: 10.1016/j.exger.2010.08.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0531556510002378>.

JONES, W. D. The expanding reach of the GAL4/UAS system into the behavioral neurobiology of *Drosophila*. **BMB Reports**, v. 42, n. 11, p. 705–712, 30 nov. 2009.

KHAN, S.; GOMES, J. **Neuropathogenesis of SARS-CoV-2 infection**. eLife, v. 9, [s.d.].

KIM, T.; SONG, B.; LEE, I. Drosophila glia: models for human neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4859, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7402321/>.

LI, X. et al. SARS-CoV-2 antagonizes type I interferon signaling by suppressing MAVS-STING interaction via ORF7a. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 48, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2209042119>.

LIU, J. M. et al. Evidence of central nervous system infection and neuroinvasive routes, as well as neurological involvement in the lethality of SARS-CoV-2 infection. **Journal of Medical Virology**, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.26570>.

PHELPS, C. B.; BRAND, A. H. **Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system**. Methods, v. 14, n. 4, p. 367–379, abr. 1998.

SEOK, S. H.; KIM, Y. S. Mitochondrial dysfunction in COVID-19-associated neuroinflammation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 4, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/4/1415>.

STANFORD. **Stanford researchers find signs of inflammation in brains of people who died of COVID-19**. 2021. Disponível em: <https://med.stanford.edu/news/all-news/2021/06/signs-of-inflammation-in-brains-of-covid-19.html>.

STRONG, M. J. SARS-CoV-2, aging, and post-COVID-19 neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 165, n. 2, p. 115–130, 1 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.15736>.

TAYLOR, L. Brazil fears COVID collapse. **New Scientist**, v. 250, n. 3328, p. 7, abr. 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0262-4079\(21\)00535-2](https://doi.org/10.1016/s0262-4079(21)00535-2).

THEOHARIDES, T. C. **Could SARS-CoV-2 spike protein be responsible for long-COVID syndrome?** Molecular Neurobiology, 13 jan. 2022.

VAN DE LEEMPUT, J.; HAN, Z. Drosophila, a powerful model to study virus-host interactions and pathogenicity in the fight against SARS-CoV-2. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, 13 jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00621-5>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus (COVID-19)** Dashboard.
Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19>.

YOUNES, S. et al. Drosophila as a model organism in host–pathogen interaction studies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 23 jun. 2020.

YU, S. et al. Drosophila innate immunity involves multiple signaling pathways and coordinated communication between different tissues. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 905370, 2022. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9336466/>.