



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Roosevelt Antônio Benze Júnior

Caracterização do *locus Fhos* e sua participação na morte celular programada do intestino médio larval de *Drosophila melanogaster*

UBERABA – MG
2014

Roosevelt Antônio Benze júnior

Caracterização do *locus Fhos* e sua participação na morte celular programada do intestino médio larval de *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Simon

Coorientador: Dr. Lucas Anhezini de Araújo

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

B422c Benze Júnior, Roosevelt Antônio
Caracterização do *locus Fhos* e sua participação na morte celular programada do intestino médio larval de *Drosophila melanogaster* / Roosevelt Natônio Benze Júnior. -- 2014.
100 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2014
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Simon
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araújo

1. *Drosophila melanogaster*. 2. Morte celular. 3. Autofagia. I. Simon, Cláudio Roberto. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 595.773.4

ROOSEVELT ANTÔNIO BENZE JÚNIOR

Caracterização do *locus Fhos* e sua participação na morte celular programada do intestino médio larval de *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Simon
Coorientador: Dr. Lucas Anhezini de Araújo

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Roberto Simon - Orientador
Universidade Federal do Triangulo Mineiro

Prof. Dr. André Luiz Pedrosa
Universidade Federal do Triangulo Mineiro

Prof. Dr. Luiz Roberto Basso Júnior
Universidade de São Paulo

UBERABA / MG
2014

"O impossível sempre custa mais caro." (Rubén Magnano)

Aos meus pais
Aos meus irmãos
Aos meus mestres

AGRADECIMENTOS

Agradeço os meus pais Marluce e Roosevelt pelo amor e apoio incondicional. Eu sei que dariam a vida pelos meus sonhos. Tenho muito orgulho de vocês.

Ao meu avô Vitório por ser um exemplo de honestidade, retidão e vida pela família.

Aos meus irmãos Maxwell e Madson pelo companheirismo, pela convivência e principalmente pela amizade. Vocês são meus irmãos no sentido mais amplo da palavra.

Ao meu Professor e orientador Claudio Roberto Simon pelas oportunidades, atenção, empenho, exemplo e dedicação. Agradeço por todos os ensinamentos ao longo deste trabalho de mestrado.

Ao Dr. Lucas Anhezini pela amizade, solicitude, paciência, atenção, dedicação à ciência e principalmente pelos esforços em meu treinamento.

Ao Prof. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos por me acolher em seu laboratório e me oportunizar crescer com o rico ambiente científico. Agradeço especialmente o suporte técnico e científico e principalmente por tornar possível a realização deste trabalho.

Ao departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da USP-RP por ter me recebido e me permitido utilizar o espaço, laboratórios e instrumentos.

À Super técnica Mara Silvia Alexandre Costa, pela doçura, por ter me recebido com muito carinho e me auxiliado com prontidão em todas as vezes que necessitei. Sou muito grato pela atenção, amparo, gentileza e tempo dedicado.

Ao grande técnico e amigo Valdir Mazucato pela competência, seriedade e também pelas conversas matinais e o bom humor de sempre.

Agradeço à Dr. Ana Paula Saita pela colaboração em meu treinamento e empenho na pesquisa de *Fhos*.

Ao Doutorando Maiaro Cabral pela amizade e colaboração em grande parte dos experimentos. Agradeço por estar sempre aberto às discussões e problemáticas.

Ao Doutorando Carlos Couto também pela amizade, alegria e dedicação.

À minha amiga Damíli pelo início dos estudos do *Fhos* em intestino.

À Luana pelo companheirismo e amizade.

Agradeço a técnica Vani pela atenção e auxílio nos experimentos de histologia.

À professora Maria Luiza Paço-Larson e aos seus alunos pela colaboração e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório.

Aos professores e colaboradores do programa de Ciências Fisiológicas da UFTM pela contribuição em minha formação.

Agradeço ao professor Dr. Valdo José Dias por ser um grande exemplo do amor e dedicação à ciência e por todos seus esforços para melhorar o curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológica da UFTM.

Ao Dr. Luiz Roberto Basso e Professora Dr. Beatriz Murta pelas críticas e sugestões apontadas na qualificação deste trabalho.

Agradeço à secretária da pós-graduação Elisabete Perez Caramori Ambrosio (Bethe) pela gentileza e por ser uma facilitadora em vários momentos deste importante processo.

Aos alunos e técnicos da pós-graduação em Ciências Fisiológicas.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos que viabilizou a realização deste trabalho em Ribeirão Preto.

Agradeço a fundação de Amparo à Pesquisa FAPEMIG pelo auxílio financeiro, tornando possível nossa pesquisa.

Agradeço aos funcionários da Biblioteca Municipal de Uberaba.

Agradeço também aos meus primos-irmãos Diego, Erick, Ciro, Netinho e Fernandinho.

Aos meus amigos do basquete: Pedro, Lélío, Saleh, Luiz, Michell, Loreno, Gustavo, Cesar, Felipe e muitos outros.

Aos amigos Vinicius, Luiz e Tuião.

Agradeço a toda minha grande família, aos meus primos, primas, tios e tias.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DO *locus Fhos* E SUA PARTICIPAÇÃO NA MORTE CELULAR DO INTESTINO MÉDIO LARVAL DE *Drosophila melanogaster*.

Nos metazoários a morte celular fisiológica ou programada (MCP), nas suas diferentes formas, apoptótica, autofágica ou necrótica desempenha papel central na manutenção da homeostase. Várias doenças estão correlacionadas às disfunções da regulação da MCP, dentre elas podemos destacar doenças degenerativas, autoimunes e o câncer. Vários componentes da maquinaria da MCP foram conservados evolutivamente e apresentam grande semelhança mesmo entre organismos tão distintos quanto os insetos e seres humanos. Estas semelhanças, juntamente com a grande variedade de ferramentas experimentais disponíveis tornam a *Drosophila melanogaster* um modelo poderoso para a caracterização de novas funções gênicas relacionadas à MCP. Nosso grupo tem utilizado a MCP das glândulas salivares larvais como modelo experimental para o estudo de processos de morte celular fisiológicos durante o desenvolvimento de *Drosophila*. A MCP das glândulas salivares larvais é regulada pela ecdisona (hormônio esteróide). Embora a cascata de ativação transcricional induzida por ecdisona seja conhecida, em última instância, como esse sinal sistêmico (ecdisona), presente na hemolinfa do inseto, promove respostas estágio e tecido específicas ainda é pouco conhecido. Para responder essa pergunta, realizamos um “screen” genético com o intuito de identificar novos genes associados, à regulação ou execução da MCP de glândulas salivares. Neste “screening” identificamos uma mutação mapeada no *locus Fhos* que causa um fenótipo defeutivo de MCP, a persistência de glândulas salivares larvais. A caracterização genética desse *locus* demonstrou que sua função é essencial para a ocorrência da MCP de glândulas salivares. O *locus Fhos* codifica proteínas com alta similaridade à família de proteínas forminas as quais participam do remodelamento dinâmico do citoesqueleto em diferentes processos biológicos. Neste trabalho, realizamos análises transcricionais e *in silico* de uma das isoformas codificadas pelo *locus Fhos*, a isoforma *Fhos-C*, as quais revelaram ser esta fruto de uma fusão gênica entre *Fhos* e um gene flanqueador denominado “*desert*”. A análise transcricional de *Fhos-C* revelou que este transcrito é diferencialmente expresso e geralmente em baixos níveis. Iniciamos análises funcionais do *locus Fhos* através da utilização de linhagens transgênicas na tentativa de avaliar a potencial função deste *locus* na MCP do intestino larval o qual é também eliminado por MCP durante o desenvolvimento pupal. Após determinar o perfil de transcrição da isoforma biologicamente ativa (*Fhos-B*) na MCP do intestino larval foram realizados ensaios de superexpressão e de knockdown desta isoforma. Em conjunto nossos dados mostram que a isoforma *Fhos-C*, parece não participar da MCP durante a metamorfose do inseto. A indução da expressão ectópica e o “knockdown” tecido específico da isoforma *Fhos-B* não produziu fenótipo evidente quanto aquele observado na MCP de glândulas salivares.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE *Fhos locus* AND ITS PARTICIPATION IN THE LARVAL MIDGUT CELL DEATH OF *Drosophila melanogaster*.

Throughout metazoans physiological or programmed cell death (PCD), in its different fashion, apoptotic, autophagic and necrotic, plays a central role in maintaining homeostasis. Several diseases are associated with the misregulation of PCD, such as degenerative and autoimmune diseases as well as cancer. Several components of the PCD machinery were evolutionarily conserved even in such distinct organisms as insect and humans. In addition to these similarities, the variety of experimental tools available make *Drosophila* a powerful for the characterization of new cell death-related genetic functions. Our group has used the PCD of larval salivary glands as an experimental model to study physiological cell death processes during *Drosophila's* development. The PCD in larval salivary glands is regulated by ecdysone (steroid Hormone). Despite the extensive knowledge of the transcriptional cascade triggered by ecdysone, how, this systemic signal present in the hemolymph, ultimately promotes tissue and stage specific responses it is still unclear. To answer this question, we have carried out a genetic screen to identify new genes associated with regulation and execution of salivary gland PCD. In such screen we have identified a mutation mapped on the the *Fhos locus* which cause a cell death defective phenotype, the persistence of salivary glands. The genetic and functional characterization of the *locus* have shown that its function is essential for the proper PCD of salivary glands. The *Fhos locus* encodes proteins that share high similarity to the Formin family of proteins which have been shown to play a role in active cytoskeleton remodeling in distinct biological processes. In this work, we have performed the transcriptional analysis of one of the isoforms encoded by the *Fhos locus*, the *Fhos-C* isoform, that showed that this isoform is probably the fusion between *Fhos* and a flanking gene called "desert". The transcriptional analysis also revealed that the *Fhos-C* is differentially expressed during development in lower levels. We have also started functional analysis of the *Fhos locus* using transgenic lines aiming to evaluate the potential function of it in the PCD of the larval midgut that is also eliminated by PCD during development. After determining the transcriptional profile of the biologically active isoform in the midgut (*Fhos-B*) we carried out overexpression and knockdown assays of this particular isoform. Taken together, our results reveal that the isoform-C is not active in the PCD during insect metamorphosis. Either, overexpression or knockdown of the isoform *Fhos-B* did not produced any relevant phenotype differently of the drastic one seen in salivary glands.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Condições tempo/temperatura utilizadas na reação de transcrição reversa.....	38
TABELA 2 - Intervalos utilizados nas coletas dos embriões e fase de duração de cada estágio abordado na análise dos níveis de expressão	39
TABELA 3 - Quantidade de reagentes e condições utilizadas nas reações de PCR.....	42
TABELA 4 - Quantidade de reagentes e condições utilizadas nas reações de PCR <i>FhosA-E</i>	48
TABELA 5 - Quantidade de reagentes e condições utilizadas nas reações de PCR <i>Fhos-EagI</i>	50
TABELA 6 - Primers e condições utilizadas nas reações de PCR em tempo real.....	53
TABELA 7 - Composição da quantidade de nucleotídeos dos exons <i>Fhos-C</i>	58
TABELA 8 - Resultados das tentativas de clonagem do fragmento <i>Fhos-B</i>	71
TABELA 9 - Resultados das tentativas de clonagem do fragmento <i>pFhos-B-myc-tag</i>	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema das vias de morte celular programada.....	18
FIGURA 2 - Esquema da via de autofagia.....	19
FIGURA 3 - Esquema ilustrando dois possíveis destinos para evento autofágico.....	20
FIGURA 4 - Esquema ilustrando a concentração do hormônio ecdisona e o crescimento corporal e dos órgãos.....	22
FIGURA 5 - Esquema da resposta celular específica ao aumento da concentração de 20-hidroiecdisona durante metamorfose de <i>Drosophila</i>	22
FIGURA 6 - Esquema de importantes genes relacionados MCP da glândula salivar.....	23
FIGURA 7 - Histólise do intestino médio larval.....	25
FIGURA 8 - Fenótipo mutante da linhagem de inserção de elemento-P original (<i>Fhos</i>).....	26
FIGURA 9 - Representação da estrutura predita do gene <i>Fhos</i>	27
FIGURA 10 - Localização e participação dos fatores de nucleação de actina em células de mamíferos.....	29
FIGURA 11 - Esquema do processo de polimerização da actina mediada pelas proteínas forminas...30	
FIGURA 12 - Representação de uma formina convencional na conformação auto-inibitória e ativa..30	
FIGURA 13 - Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	36
FIGURA 14 - Estagiamento de larvas L3 utilizando padrão de tonalidade do corante azul de bromophenol presente no intestino.....	40
FIGURA 15 - Representação dos “primers” <i>Fhos-C</i>	41
FIGURA 16 - Fluxograma resumindo todo processo de construção do vetor de superexpressão utilizando amplificação do fragmento por PCR.....	44
FIGURA 17 - Esquema demonstrativo da construção do plasmídeo <i>pFhos</i> (LD24110).....	45
FIGURA 18 - Digestão diferencial para verificar a orientação de inserção de <i>Fhos</i>	48
FIGURA 19 - Esquema demonstrando de forma simplificada o sistema bipartido UAS-GAL4.....	54
FIGURA 20 - Localização e distribuição dos exons do transcrito <i>Fhos-C</i>	57
FIGURA 21 - Alinhamento entre as sequências dos transcritos do gene <i>Fhos</i> e o transcrito <i>Fhos-C</i> ..59	
FIGURA 22 - Alinhamento dos transcritos <i>Fhos-I</i> , <i>Fhos-J</i> e <i>Fhos-C</i>	60
FIGURA 23 - Localização dos genes <i>Fhos</i> e <i>desert</i>	61
FIGURA 24 - Divergência entre anotações do gene <i>Fhos</i>	62
FIGURA 25 - Peso molecular predito e gráfico de composição de aminoácidos	63
FIGURA 26 - Análise do perfil hidropático de <i>Fhos-C</i>	64
FIGURA 27 - Domínios preditos em sequência de aminoácidos de <i>Fhos-C</i>	64
FIGURA 28 - Investigação da presença de domínios em porção N-terminal de <i>Fhos-C</i>	65
FIGURA 29 - Homologia da sequência de aminoácidos de <i>Fhos-C</i>	66

FIGURA 30 - Análise semiquantitativa do perfil transcricional da isoforma <i>Fhos-C</i> durante o desenvolvimento embrionário e larval.....	69
FIGURA 31 - Análise semiquantitativa do perfil transcricional da isoforma <i>Fhos-C</i> durante o desenvolvimento de larvas no terceiro estágio e indivíduos adultos.....	69
FIGURA 32 - Análise qualitativa do perfil transcricional da isoforma <i>Fhos-C</i> durante o desenvolvimento de pré-pupas e pupas.....	69
FIGURA 33 - Gel teste para excisão do fragmento completo de <i>Fhos-B</i> e linearização em gel do pUAST	70
FIGURA 34 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o fragmento <i>FhosB</i> produzido pelo PCR e a linearização do vetor para clonagem <i>pUAST-myc-tag</i>	72
FIGURA 35 - Análise semiquantitativa do perfil transcricional de <i>Fhos</i> no intestino médio larval durante o desenvolvimento de larvas no terceiro estágio.....	73
FIGURA 36 - Análise do perfil transcricional de <i>Fhos</i> durante as primeiras horas da morte celular programada do intestino médio larval.....	74
FIGURA 37 - Análise do perfil transcricional de <i>Fhos</i> durante as primeiras horas da morte celular programada do intestino médio larval.....	75
FIGURA 38 - Padrão de expressão de GAL4 produzida pelo “driver” de intestino <i>drm-GAL4</i> revelado pela expressão de GFP.....	76
FIGURA 39 - Padrão de expressão de GFP induzida por choque de temperatura	77
FIGURA 40 - Análise fenotípica do impacto da expressão ectópica <i>Fhos</i> no intestino médio larval..	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFP:** Após a Formação do Pupário;
- BDGP:** Drosophila Genome Project Berkeley;
- BL:** Blue Gut;
- BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool;
- BR-C:** Broad-Complex;
- cDNA:** DNA complementar
- CG:** Clear Gut;
- CIP:** Calf Intestinal Phosphatase;
- COBL:** Cordon-bleu;
- CS:** Canton Special;
- CT:** Threshold Cycle
- DAAM:** Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis;
- DAD:** Diaphanous Autoregulatory Domain;
- DEPC:** Dietil Piro-Carbonato.
- DGRC:** Drosophila Genome Resources Center;
- Dia:** Diaphanous;
- DRFs:** Diaphanous-Related Formins ou Forminas Diaphanous-Relacionadas;
- EcR:** ecdysone receptor;
- Ectisona:** 20-hidroxiectidisona;
- FAAG:** EtOH a 80%, Formaldeído a 4%, Ácido Acético glacial a 5% e Gluteraldeído a 1%);
- FH:** Formin Homology;
- FHOD:** Formin-Homology Domain Proteins;
- FMN:** Formin;
- FRL:** Formin-Related Proteins in Leukocytes;
- GBD:** GTPase Binding Domain;
- GFP:** Green Fluorescent Protein;
- HBL:** Half Blue Gut;
- HE:** Hematoxilina e Eosina;
- INF:** Inverted Formin;
- JMY:** Junction-Mediating ou Regulatory Protein;
- L1:** 1º estágio larval;
- L2:** 2º estágio larval;
- L3:** 3º estágio larval;
- mDIA:** murine Diaphanous;

MCP: Morte Celular Programada;
NCBI: National Center for Biotechnology Information;
N-WASP: Neuronal-WASP;
PBS: phosphate buffered saline;
PCR: reação em cadeia da polimerase;
qRT-PCR: RT-PCR quantitativo;
Rho- RBD: Rho-Binding Domain;
RNA: ácido ribonucleico;
SH3: Src-Homology 3;
UAS: Upstream Activating Sequence;
Usp: ultraspiracle;
WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein;
WAVE: ASP-Family Verprolin Homologue;
YW: Yellow White¹¹¹⁸.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	17
1.2 A <i>Drosophila</i> e a morte celular programada.....	17
1.3 A MCP autofágica em <i>Drosophila Melanogaster</i>	21
1.3.1 A MCP do intestino médio larval.....	24
1.4 O locus <i>Fhos</i> e sua relação com a morte celular programada durante o desenvolvimento de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
1.5 Família das proteínas forminas.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Material biológico.....	33
4.1.1 Linhagens de <i>Drosophila</i> utilizadas.....	33
4.2 Meios de cultura de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
4.3 Meios de cultura de bactérias <i>E. coli</i>	34
4.4 Vetores.....	35
4.5 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
4.6 Estagiamento dos animais.....	37
4.7 Explante de tecidos de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
4.8 Extração de RNA total de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
4.9 Dosagem de ácidos nucleicos.....	38
4. 10 Síntese de cDNA.....	38
4.11 Estagiamento e extração.....	39
4.11.1 Estagiamento e extração de RNA de embriões.....	39
4.11.2 Estagiamento e extração de RNA total de larvas L1.....	39
4.11.3 Estagiamento e extração de RNA total de larvas L2.....	40
4.11.4 Estagiamento e extração de RNA total de larvas L3.....	40
4.11.5 Estagiamento e extração de RNA total de adultos.....	41

4.12 RT-PCR semiquantitativo do transcrito <i>Fhos-C</i>	41
4.13 Análises de bioinformática.....	42
4.13.1 Análise de sequência de nucleotídeos.....	42
4.13.2 Análise de sequência de aminoácidos.....	43
4.13.3 Análise do perfil de hidropaticidade de <i>Fhos</i>	43
4.14 Construção do vetor para super-expressar o transcrito <i>Fhos-B</i>	43
4.14.1 Construção do vetor <i>pFhosB</i>	44
4.14.1.1 Amplificação e purificação do plasmídeo LD24110.....	45
4.14.1.2 Amplificação e purificação do pUAS _t	46
4.14.1.3 Reações de restrição e preenchimento do cDNA LD24110.....	46
4.14.1.4 Linearização do pUAS _t e defosforilação do pUAS _t	47
4.14.1.5 Ligação e plaqueamento para clonagem <i>pFhosB</i>	47
4.14.2 Construção do vetor <i>pFhosB-myc-tag</i>	49
4.14.2.1 Amplificação e purificação do <i>pUAS_t-myc-tag</i>	49
4.14.2.2 Linearização do vetor <i>pUAS_t-myc-tag</i> e defosforilação.....	49
4.14.2.3 Amplificação do fragmento da isoforma B de <i>Fhos</i> , utilizando PCR.....	49
4.14.2.4 Ligação e plaqueamento para clonagem <i>pFhosB-myc-tag</i>	50
4.15 Análise da transcrição de <i>Fhos</i> na MCP do intestino-médio larval de <i>Drosophila melanogaster</i>	51
4.15.1 Extração de RNA total de intestino de <i>Drosophila melanogaster</i>	51
4.15.2 RT-PCR semiquantitativo.....	51
4.15.3 PCR em tempo real.....	52
4.16 Expressão ectópica e Sistema UAS-GAL4 EM <i>Drosophila</i>	53
4.17 Cruzamentos para a indução de GFP e transgenes.....	54
4.17.1 Cruzamentos teste para a indução de GFP com o “driver” de intestino <i>drm-GAL</i>	55
4.17.2 Cruzamentos teste para a indução de GFP por choque térmico (HS-GAL4).....	55
4.17.3 Cruzamentos para análise funcional de <i>Fhos</i> durante a MCP do intestino médio larval	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1 Análise <i>in silico</i> da localização e distribuição exônica do transcrito <i>Fhos-C</i>	57
5.2 Análise <i>in silico</i> da similaridade de sequência dos transcritos <i>Fhos</i> e <i>Fhos-C</i>	58
5.3 Alinhamento das sequências anotadas para os transcritos <i>Fhos-I</i> , <i>Fhos-J</i> e <i>Fhos-C</i>	59
5.4 Análise <i>in silico</i> da região inicial do transcrito <i>Fhos-C</i>	60

5.5	Análise <i>in silico</i> da proteína predita da isoforma <i>Fhos-C</i>	62
5.5.1	Análise <i>in silico</i> da composição de aminoácidos, peso molecular e perfil hidropático de <i>Fhos-C</i>	63
5.5.2	Análise dos domínios preditos para sequência de aminoácidos do transcrito <i>Fhos-C</i>	64
5.5.3	Análise <i>in silico</i> da homologia da sequência de aminoácidos codificada pelo transcrito <i>Fhos-C</i>	66
5.6	Caracterização do perfil de transcrição da isoforma <i>Fhos-C</i> durante o desenvolvimento.....	68
5.6.1	Transcrição da isoforma <i>Fhos-C</i> durante o desenvolvimento embrionário e larval inicial.....	68
5.6.2	Transcrição da isoforma <i>Fhos-C</i> durante o desenvolvimento de larvas no terceiro estágio e indivíduos adultos.....	68
5.6.3	Detecção da transcrição da isoforma <i>Fhos-C</i> durante o desenvolvimento de pré-pupas e pupas.....	70
5.7	Construção de vetores para super expressão <i>Fhos-B</i> durante a MCP do intestino médio larval.....	70
5.7.1	Construção do vetor <i>pFhosB</i>	70
5.7.2	Efetividade da ligação e verificação da Clonagem <i>pFhosB</i>	71
5.8	Construção do vetor <i>pFhosB-myc-tag</i>	71
5.8.1	Amplificação por PCR do inserto <i>Fhos-B</i> e linearização do <i>pUASTmyc-tag</i>	71
5.8.2	Efetividade da ligação e verificação da Clonagem <i>pFhosB-myc-tag</i>	72
5.9	Análise transcricional de <i>Fhos</i> durante a MCP do intestino médio larval.....	73
5.9.1	Análise transcricional de <i>Fhos</i> no intestino médio larval ao final do terceiro estágio larval (L3).....	73
5.10	Análise quantitativa da transcrição de <i>Fhos</i> durante a MCP do intestino larval.....	74
5.11	Padronização dos ensaios funcionais utilizando linhagens transgênicas.....	75
5.12	Análise fenotípica do impacto da expressão ectópica <i>FHOS</i> no intestino médio larval.....	78
6	DISCUSSÃO.....	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO.

Desde os estudos de Thomas Hunt Morgan no início do século passado, a *Drosophila melanogaster* se desenvolveu como um oportuno modelo de estudo genético (Watson *et al.*, 2006). Este organismo se destaca, entre outras características, por apresentar um ciclo de vida curto, fácil cultivo e pela grande variedade de ferramentas de investigação *in vivo* que permitem o estudo de eventos biológicos fundamentais como: proliferação, diferenciação e morte celular. Ainda, podemos destacar a conservação evolutiva desses processos entre insetos e humanos. A *Drosophila*, dentre organismos multicelulares, foi o primeiro a ter seu genoma sequenciado por completo (Venter *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2000; Yamamoto, 2010). Atualmente continua sendo extensamente utilizada na caracterização de novas funções gênicas.

1.2 A *Drosophila* E A MORTE CELULAR PROGRAMADA.

A Morte Celular Programada (MCP) é observada como um processo celular fundamental. Estudos em *Drosophila* têm permitido grande avanço no entendimento deste processo (Baehrecke, 2002; Simon *et al.*, 2004; Ryoo e Baehrecke, 2010).

Os tecidos dos organismos multicelulares são compostos por uma grande variedade de células, diferenciadas e organizadas em um padrão preciso e equilibrado. Esta organização é fundamental tanto na embriogênese quanto na vida adulta dos organismos multicelulares (Alberts, 2002; Altieri *et al.*, 2010).

Um dos eventos essenciais na manutenção da homeostase dos tecidos é a MCP que permite a eliminação de células supranumerárias, infectadas por micro-organismos, com instabilidade genômica ou contendo danos irreparáveis ao DNA. A possibilidade de eliminar células de maneira específica é tão relevante durante a morfogênese animal quanto proliferação e diferenciação celular (Meier, Finch e Evan, 2000; Smith e Smith, 2013). Muito importante é destacar que uma grande variedade de doenças, apresentam frequentemente, relação com disfunções na regulação dos processos de MCP (Galluzzi *et al.*, 2007, Hotchkiss *et al.*, 2009).

A morte celular pode ser classificada de acordo com vários critérios: características morfológica, critérios enzimológicos (envolvimento de nucleases, classes distintas de proteases, como caspases ou catepsinas), aspectos funcionais e imunológicos (Galluzzi *et al.*, 2007). Com o avanço da biologia e da genética molecular, tornaram-se mais claras as peculiaridades das diferentes modalidades de morte celular. Sob o ponto de vista morfológico (FIGURA 1), a MCP pode ser dividida em três tipos: apoptose, autofagia e necrose (Galluzzi *et al.*, 2007; Galluzzi *et al.*, 2012; Simon, 2002; Fink e Cookson, 2005); ou alternativamente como tipo I (apoptose), tipo II (autofagia) e tipo III (necrose) segundo Schweichel e Merker em 1973.

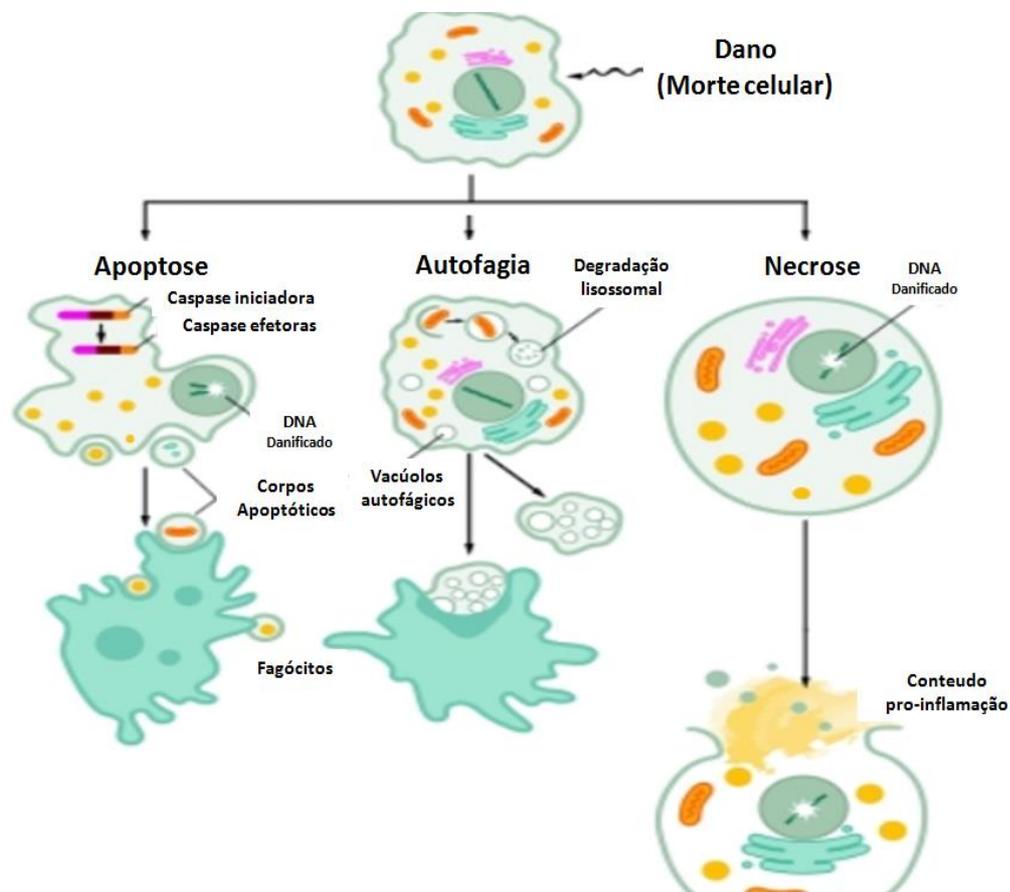


FIGURA 1 – Esquema das vias de morte celular programada. O esquema mostra três possibilidades de via de resposta a um dano causador de morte celular. Na via de apoptose, o dano promove a ativação molecular das vias de caspases, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos. A via de autofagia destaca-se por extensa degradação lisossomal e um grande número de vacúolos autofágicos. Na necrose como demonstrado, é observado um grande inchaço e resposta inflamatória; devido a extravasamento do conteúdo citoplasmático (figura modificada de Fink e Cookson, 2005).

A morte celular tipo I (ou apoptose) é a morte celular fisiológica melhor caracterizada. É comumente considerada como o preferencial mecanismo pelo qual células são fisiologicamente eliminadas nos metazoários (Edinger e Thompson, 2004). A apoptose é

essencialmente caspase-dependentes para a sua execução (Denton, Nicolson e Kumar, 2012).

Do ponto de vista morfológico, a apoptose é estereotipicamente caracterizada por: diminuição do volume celular, picnose nuclear (condensação de cromatina), *karyorhexis* (fragmentação nuclear) e clivagem do DNA cromossomal em fragmentos internucleossomais. Em um segundo momento, elementos nucleares e citoplasmáticos são encapsulados em pequenos corpos de membranas intactas (corpos apoptóticos). Esses corpos são fagocitados por células vizinhas e degradados nos lisossomos, resultando num processo livre de resposta inflamatória (Edinger e Thompson, 2004; Galluzzi *et al.*, 2007).

A morte celular do tipo II (ou autofágica) é especificamente um fenômeno celular de autodigestão enzimática (Edinger e Thompson, 2004). Para descrevermos este processo de MCP, é necessário detalhar primeiramente o evento autofágico ou processo de macroautofagia. Trata-se de um processo citoplasmático, catabólico, presente em todas as células eucarióticas, possuindo uma grande conservação evolutiva; podendo ser observado de levedura até mamíferos (Klionsky, 2005; McPhee e Baehrecke, 2009). Geralmente esta via é ativada quando a célula é submetida a estresse celular, como por exemplo: restrição de nutrientes, hipóxia moderada, metabolismo incomumente aumentado, privação de fatores de crescimento, entre outros (Denton *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2007). A autofagia é um processo lento, caracterizado pela formação de autofagossomos e subsequente degradação em autofagolisossomos (FIGURA 2). No interior desses autofagolisossomos, ocorre a degradação enzimática e a reciclagem de macromoléculas (Klionsky, 2005; McPhee e Baehrecke, 2009).

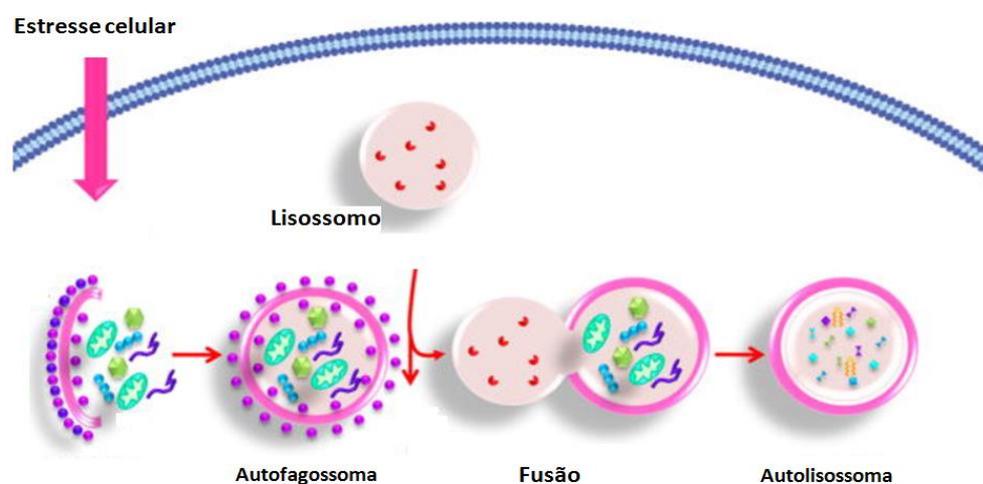


FIGURA 2 – Esquema da via de autofagia. A via é iniciada em resposta a um tipo de estresse, como por exemplo: falta de nutriente, hipóxia, patógeno, dano ao DNA e etc. Em seguida, ocorre o sequestro de macromoléculas por dupla-membrana e degradação via hidrolase lisossomal. Esta fusão conduz a degradação de elementos citosólicos, gerando elementos como aminoácidos e ácidos graxos para serem reciclados (figura modificada de Rodriguez-Rocha *et al.*, 2011).

O conceito de morte celular autofágica foi inicialmente estabelecido através de observações no aumento dos marcadores autofágicos (autofagossomas) em processos de morte celular. A observação deste fenômeno, deu origem ao termo "morte celular autofágica", para descrever um modo de morte celular distinto da apoptose (Lee e Baehrecke, 2001). A morte celular autofágica é caracterizada por autofagia em grande escala (FIGURA 3), conferindo à célula uma aparência característica. Ocorre também um intenso aumento dos marcadores de autofagia e ausência de condensação da cromatina (Kroemer e Levine, 2009; Denton *et al.*, 2012).

No contexto do desenvolvimento, a MCP por autofagia parece ser ativada quando existe a exigência de remoção maciça de um conjunto de células (Kucharova-Mahmood *et al.*, 2002). Segundo proposto por Shen e Codogno (2011), a MCP por autofagia deve apresentar os seguintes critérios: a morte celular deve ocorrer independente de apoptose, deve-se observar um considerável aumento no fluxo autofágico (não simplesmente um aumento dos marcadores de autofagia) e por fim, a possibilidade de supressão da via autofágica (por abordagens genéticas ou farmacológicas) deve ser suficiente na prevenção ou no resgate da morte celular.

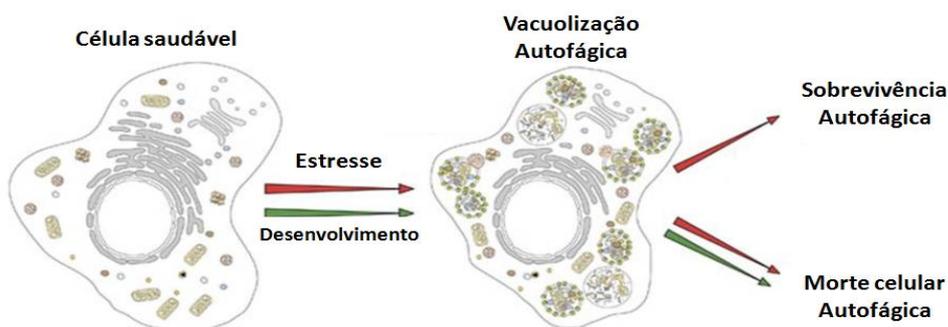


FIGURA 3 – Esquema ilustrando dois possíveis destinos para evento autofágico. Mostra célula saudável em seu contexto fisiológico apresentando a via de autofagia quando exposta a algum tipo de estresse ou sinalização de morte celular durante o desenvolvimento. Em resposta ao estresse a via de autofagia é frequentemente ativada, em grande parte das vezes, a autofagia exerce um papel citoprotetor e a célula consegue recobrar a homeostase. Porém, em alguns casos não é possível reverter os danos causados e a via transcorre para a morte celular. A morte celular programada durante o desenvolvimento assume grande importância na eliminação de conjuntos de células destinadas a serem extintas (Figura modificada de Galluzzi *et al.*, 2012).

A morte celular do tipo III (ou necrose) é geralmente definida como uma forma acidental de MCP (Galluzzi *et al.*, 2007) caracterizada por aumento considerável de volume celular, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo citoplasmático celular para o espaço extracelular, causando intensa resposta inflamatória (Kiess e Gallaher, 1998; Heekim *et al.*, 2011). Existem dificuldades consideráveis para a caracterização da morte celular por necrose, principalmente no nível molecular e bioquímico (White, 2008,

Vanlangenakker *et al.*, 2012). Recentemente ocorreu a observação de eventos necróticos regulados em processos fisiológicos e patológicos (Vandenabeele *et al.*, 2010). Este tipo de MCP mostrou-se, por exemplo, importante para o mecanismo de defesa celular (Vanlangenakker *et al.*, 2012) e regulação das doenças inflamatórias (Chan, 2012). A MCP por necrose, também chamada de necroptosis, em modelos animais, tem sido relacionada às lesões isquêmicas cardíacas e cerebrais, pancreatite aguda e choque séptico (Cho *et al.*, 2009).

1.3 A MCP AUTOFÁGICA EM *Drosophila Melanogaster*.

Durante o desenvolvimento de *Drosophila*, especialmente durante a metamorfose, vários dos tecidos larvais são eliminados por MCP autofágica. Dentre esses tecidos podemos destacar as glândulas salivares e o intestino larval (McPhee e Baehrecke, 2009).

Estudos genéticos utilizando a *Drosophila*, demonstraram a importância da MCP autofágica. Mutações que ocasionam a perda de função em genes essenciais para MCP autofágica geram uma elevada letalidade embrionária e fenótipo defeituoso de morte celular, como a persistência de glândulas salivares larvais (Anhezini *et al.*, 2012; Meléndez e Neufeld, 2008). A MCP autofágica pode ser induzida tanto em resposta à escassez de nutrientes, quanto à presença do hormônio 20-hidroxiecdisona (daqui por diante referidos apenas como ecdisona) durante a metamorfose (McPhee e Baehrecke, 2009; Lee *et al.*, 2002; Lee e Baehrecke 2001; Talbot *et al.*, 1993).

Pulsos de ecdisona estágios-específicos controlam uma série de eventos do desenvolvimento (Baehrecke, 2000). Os hormônios esteróides são pequenas moléculas hidrofóbicas, de ação sistêmica, que sinalizam através de interações com receptores nucleares, coordenando assim eventos importantes, como a transição juvenil-adulto em variados organismos, como por exemplo, mamíferos e insetos (Rewitz *et al.*, 2011). A ligação destes hormônios em seus respectivos receptores, proporciona a regulação de vias complexas de sinalização, regulando eventos como: diferenciação, crescimento (FIGURA 4), homeostase, desenvolvimento e morte celular programada (Chittaranjan *et al.*, 2009).

Os hormônios esteróides são importantes reguladores da MCP (Baehrecke, 2000). Em *Drosophila*, variações pontuais bem estabelecidas na titulação do hormônio ecdisona são conhecidas por desencadear a metamorfose, resultando na transição larva-adulto. Durante este período, existe grande prevalência de morte celular dos tecidos larvais obsoletos (Ihry *et al.*, 2012).

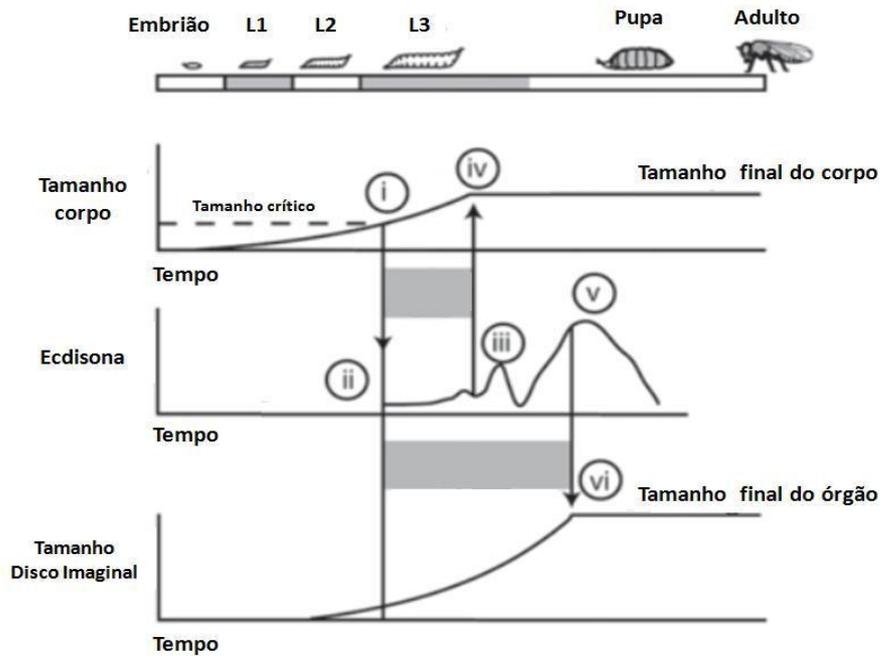


FIGURA 4 – Esquema ilustrando a concentração do hormônio ecdisona e o crescimento corporal e dos órgãos. Após a eclosão do embrião a larva recém eclodida alimenta-se e cresce até atingir certo “ponto de crescimento”. Este tamanho limítrofe encontra-se no início do terceiro estágio larval (representado por “i” na ilustração). Após alcançar este tamanho inicia-se uma cascata hormonal que desencadeia a liberação de ecdisteróides (representado por “ii”). Quando a concentração de esteróides ultrapassa certo nível, representado por “iii”, a larva pára de alimentar-se e passa a se locomover procurando um lugar adequado para pupar. Poucas horas após este primeiro pico, a larva passa para o estágio de pré-pupa. Representada na figura como “iv”, este é o momento em que o crescimento corporal é cessado. O pico seguinte de esteróide está representado por “v” e a interrupção do crescimento dos órgãos como “vi”. Marcado pela faixa cinza o intervalo de crescimento do tamanho corporal e órgãos (figura modificada de Shingleton, 2010).

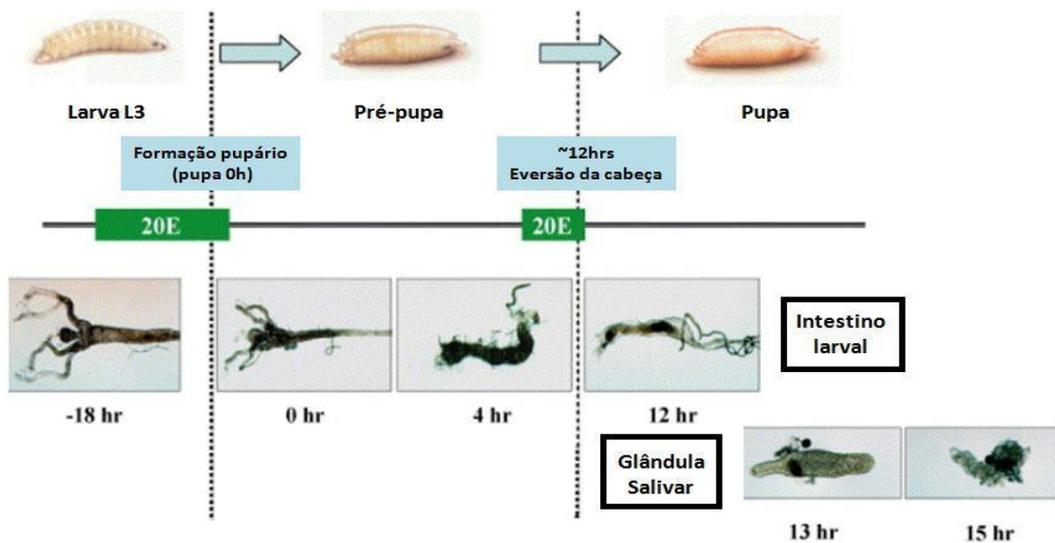


FIGURA 5 – Esquema da resposta celular específica ao aumento da concentração de 20-hidroxiecdisona durante metamorfose de *Drosophila*. Na parte superior da figura, são ilustradas três fases distintas do desenvolvimento. As “barras” representadas em verde representam os pulsos de ecdisona. O primeiro pulso desencadeia a transição da fase larval para a pré-pupa. Quando a pré-pupa é formada, usualmente inicia-se a contagem de horas, sendo conhecido este período como pupa 0 hora. O segundo pulso acontece no intervalo de aproximadamente 10 horas após o pulso que originou a formação do pupário. Aproximadamente 12 horas após o primeiro pulso acontece a transição de pré-pupa para o estágio de pupa. O intestino médio larval começa a sofrer sua morte celular ainda no início da formação da pré-pupa, em resposta ao primeiro pico de ecdisona. Como mostrado, no intestino com 12 horas após o primeiro pulso, as células do intestino médio larval foram condensadas, envolvidas e posicionadas no interior do intestino adulto já formado. Já a glândula salivar como mostrado, tem sua morte rapidamente em resposta ao segundo pico de ecdisona (figura modificada de Yin e Thummel, 2005).

O início da formação do pupário e a metamorfose em *Drosophila melanogaster*, são desencadeados pelo aumento na titulação da ecdisona no final do terceiro estágio larval (Riddiford, 1993). Após esse primeiro aumento, no intervalo de 4 a 6 horas AFP (após a formação do pupário), a concentração dos níveis hormonais apresenta-se mais baixa. Passadas aproximadas 12 horas AFP, observa-se uma nova elevação, um segundo “pico” hormonal, que desencadeia a eversão da cabeça e inicia o desenvolvimento pupal (Baehrecke, 2000); (FIGURA 5).

Molecularmente, a cascata de ativação induzida pela ligação do hormônio ecdisona no seu receptor depende da formação de um heterodímero. Este é composto pela interação das macromoléculas “ecdysone receptor” (EcR) e “ultraspiracle” (usp). A formação deste complexo receptor-ligante, possui uma forte afinidade de ligação ao DNA (Yao *et al.*, 1992). Esta ligação incita uma cascata de ativação transcricional de dois grupos de genes. Primeiramente ocorre a ativação dos genes de resposta primária (ou “early genes”), em especial: *Broad-Complex (BR-C)*, *E74A* e *E75*; todos codificadores de fatores de transcrição.

Esses fatores de transcrição regulam a transcrição de um grande número de genes de resposta tardia (“late genes”) à presença do hormônio. Essa ativação transcricional tardia é responsável pela indução de uma grande variedade de respostas celulares e teciduais (Thummel, 2001; Baehrecke, 2000).

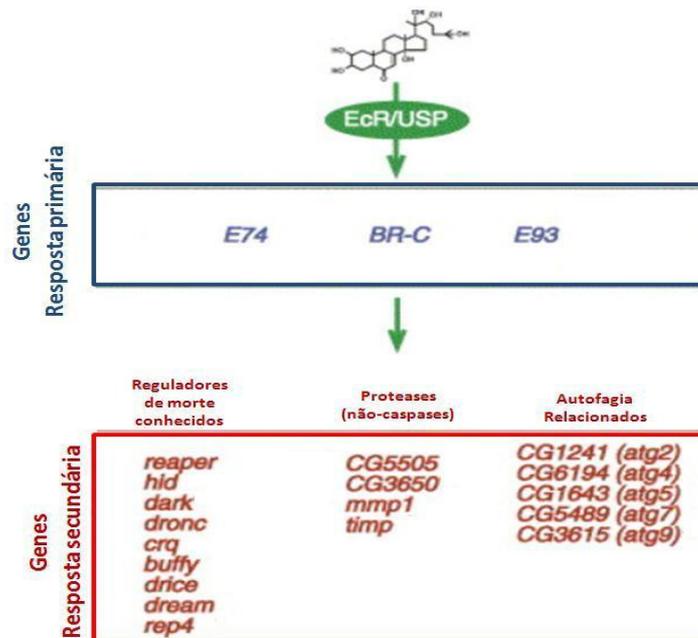


FIGURA 6 – Esquema de importantes genes relacionados MCP da glândula salivar. A cascata de ativação genética que dirige a MCP da glândula salivar larval inicia-se com a ligação da ecdisona e o heterodímero receptor EcR/usp. Esta ligação, induz diretamente genes de resposta primária, entre esses genes incluem-se E74, BR-C e E93. Em uma resposta secundária são transcritos os genes evidenciados em vermelho. Destacam-se genes reguladores de morte já caracterizados, proteases não-caspases e genes relacionados à autofagia (Figura modificada de Yin e Thummel, 2005).

Dentre um dos tecidos estereotipicamente alterados pela elevação nos títulos de ecdisona, podemos destacar as glândulas salivares larvais de *Drosophila* as quais são induzidas a sofrer MCP do tipo autofágica, especificamente como resposta ao segundo pulso de ecdisona da metamorfose (McPhee e Baehrecke, 2009; Berry e Baehrecke, 2007; Kucharova-Mahmood *et al.*, 2002; Lee e Baehrecke 2001); (FIGURA 5). A maioria dos genes envolvidos na via de autofagia e caspases, são coordenadamente induzidos no momento da morte de células de glândula salivar (FIGURA 6). As células da glândula salivar destinadas a morrer, apresentam grande quantidade de autofagossomas e a autodegradação ocorre na ausência de fagócitos (Berry e Baehrecke, 2007).

Outro tecido cuja MCP é também induzida por elevação nos títulos de ecdisona, é o intestino larval, que em sua região média é destinado a morrer em resposta ao primeiro pulso de ecdisona, o mesmo que promove a formação do pupário (FIGURA 5).

1.3.1 A MCP do intestino médio larval.

Assim como a glândula salivar larval, o intestino larval também sofre processo de morte celular programada durante a metamorfose (Baehrecke, 2000). A morte do intestino médio larval também é autofágica, embora seja acompanhada de fragmentação do DNA, indução de caspases e de reguladores de caspases. Este fato pode ser um indicativo de que mecanismos similares podem estar regulando a morte celular programada do intestino médio e da glândula salivar (Denton *et al.*, 2009). Também a exemplo do ocorrido na glândula, o intestino possui sua regulação de morte “disparada” por aumento nos títulos de ecdisona na hemolinfa (Lee, Cooksey e Baehrecke, 2002). Como comentado anteriormente, o primeiro pulso de ecdisona desencadeia a morte celular do intestino médio larval.

Ao final do terceiro estágio larval L3 (FIGURA 7 -A), aproximadamente faltando 18 horas para a formação do pupário, o intestino encontra-se expandido devido à intensa atividade alimentar deste período larval. No início da formação do pupário, até duas horas após a sua formação (FIGURA 7-B e C), ocorre uma condensação do intestino e o encurtamento dos cecos gástricos. Aproximadamente no intervalo de 4 horas AFP (FIGURA 7-D), o proventículo e os cecos gástricos já não são detectáveis e o intestino encontra-se bastante contraído. Com 6 horas AFP (FIGURA 7-E), o intestino encontra-se mais alongado e neste período ocorre intensa proliferação celular. Por fim, com 12 horas AFP (FIGURA 7-F) é possível observar claramente o intestino adulto já formado. Neste período, também podemos

notar no interior do intestino adulto recém-formado uma massa condensada composta pelas células do antigo intestino larval. Esta massa possui uma coloração amarelada e será posteriormente expelida como uma secreção denominada mecônio (Jiang *et al.*, 1997).

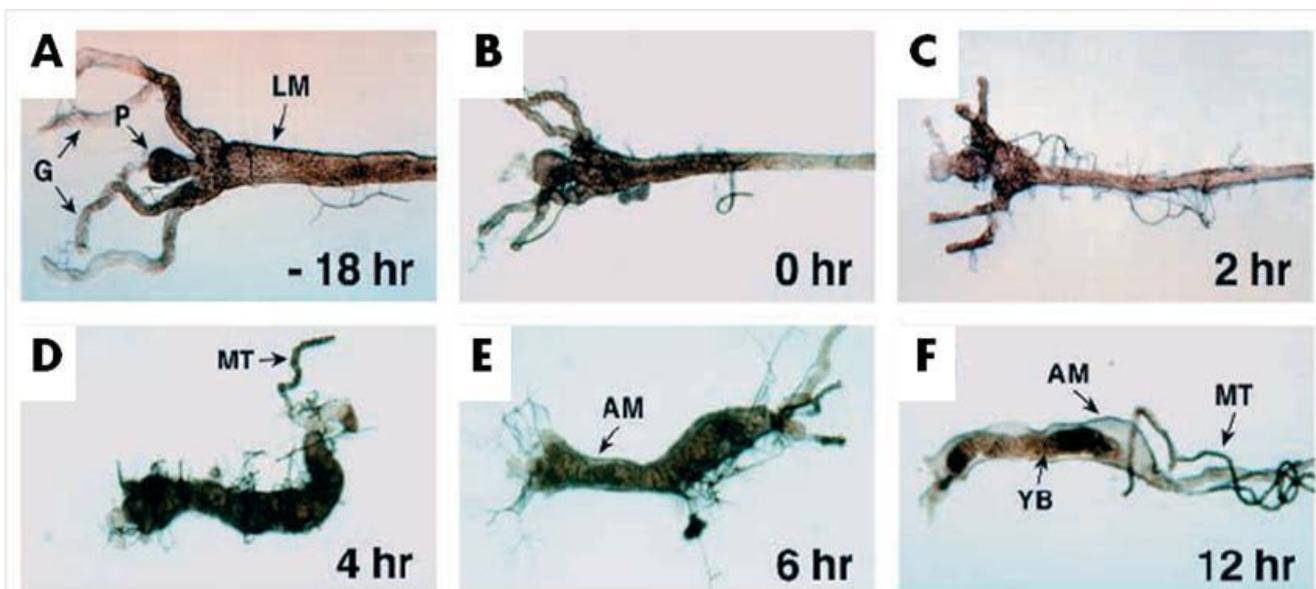


FIGURA 7 – Histólise do intestino médio larval. Intestinos dissecados de pupas e pré-pupas. A hora indicada é referente à horas antes ou após a formação do pupário. Indicado nas setas as seguintes regiões: (P) proventrículo, (G) cecos gástricos, (LM) intestino médio larval, (MT) túbulos de malpighi, (YB) corpo amarelo e (AM) intestino médio do adulto. Figura modificada de Jiang *et al.*, 1997.

Os intestinos médios larval e adulto de *Drosophila* são derivados a partir de duas populações de células progenitoras da endoderme, estas populações são separadas uma da outra no embrião inicial (Takashima *et al.*, 2011). As células que darão origem ao intestino adulto encontram-se dispersas no intestino larval e parecem proliferar-se utilizando como substrato para o seu desenvolvimento as células do intestino médio larval destinadas à morte.

1.4 O LOCUS *Fhos* E SUA RELAÇÃO COM A MORTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE *Drosophila melanogaster*.

Em um “screening” genético para a identificação de mutações que afetassem o processo de eliminação das glândulas salivares larvais realizado pelo Prof. Dr. Cláudio Roberto Simon, durante seu pós-doutoramento no laboratório do Dr. Eric H. Baherecke (Universidade de Maryland, EUA), o locus *Fhos* foi identificado. A mutação original neste locus é derivada de uma inserção de elemento-P $l(3)01629^{[01629]}$ (FIGURA 8) e promove a paralisação da MCP levando à persistência das glândulas salivares larvais e letalidade tardia do animal, fenótipo este bastante drástico. Por si só, este fenótipo demonstra ser esse um locus

de grande importância para o desenvolvimento do inseto. Utilizando-se de PCR inverso e de ferramentas de bioinformática disponíveis à época da realização do “screening” foi possível mapear o *locus* gênico afetado pela mutação. Este *locus* foi inicialmente anotado como CG32030 pelo *Drosophila Genome Project Berkeley* (BDGP) e inicialmente por nós nomeado *Jazigo* (*jaz*). Devido à sua grande homologia com o gene codificador da proteína FHOS de mamíferos, *Jazigo* foi “rebatizado” como *Fhos*. As isoformas proteicas codificadas pelo *locus* pertencem à família de proteínas denominadas forminas (também referida como proteínas FH ou “Formin Homology”), as quais são envolvidas no remodelamento dinâmico do citoesqueleto de actina em diferentes processos celulares (Anhezini *et al.*, 2012; Anhezini, 2011; Campellone e Welch, 2010; Saita, 2008).

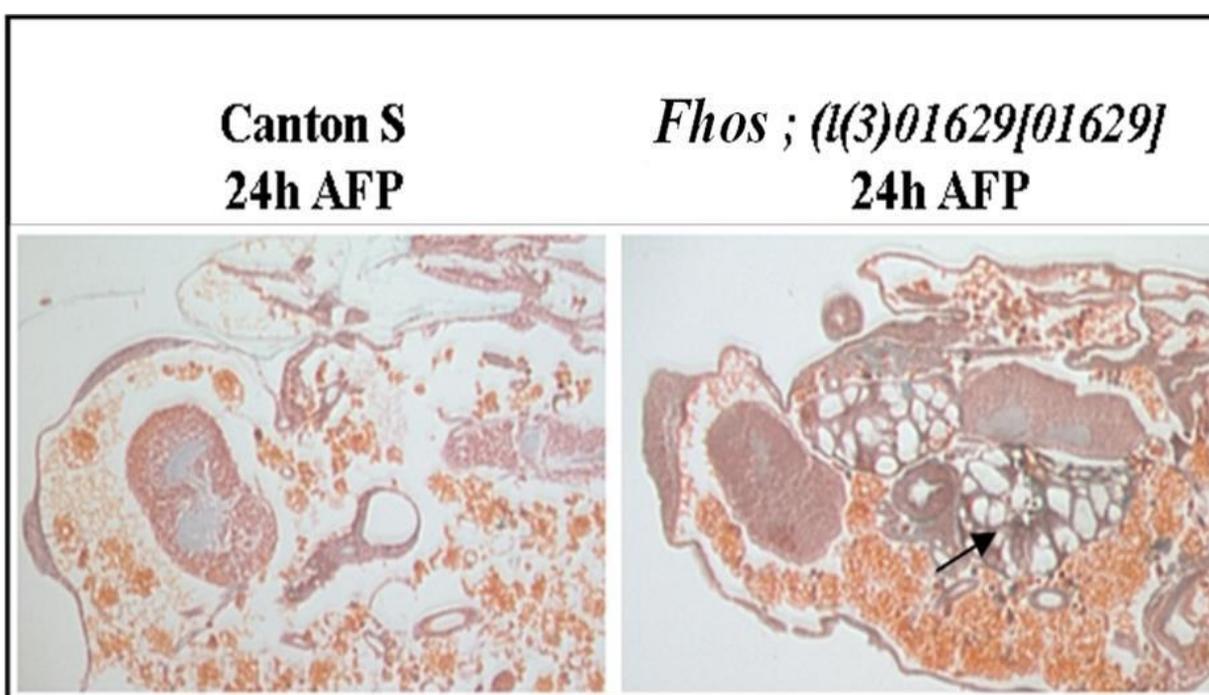


FIGURA 8 - Fenótipo mutante da linhagem de inserção de elemento-P original (*Fhos*). Cortes histológicas de pupas 24 horas após a formação do pupário (AFP). Foram utilizados animais selvagens (*Canton S*) e animais homocigotos para mutação por inserção de elemento P (*l(3)01629^[01629]*) cujo gene afetado foi denominado *Fhos*. Cortes de 7,5µm em parafina e corados com tricrômico de Harris e hematoxilina de Meyer. Como podemos observar nos animais mutantes *Fhos*, a glândula salivar ainda está presente cerca de 8 horas após o período em que deveriam ter sido destruídas no desenvolvimento selvagem (seta). Esta observação sugere que a mutação provoca um defeito no processo de morte celular programada de glândulas salivares nesses animais. As células de glândula salivar se apresentam ainda com grandes vacúolos, o que indica que o processo de morte celular foi interrompido em estágios iniciais (Anhezini, 2011).

O gene *Fhos* está localizado no braço esquerdo do cromossomo 3 e possui a extensão de 45,1kb. Inicialmente, segundo anotação e descrição promovida por Flybase (<http://flybase.org/>), um banco de dados do genoma de *Drosophila*, foram inicialmente anotadas três isoformas preditas: *Fhos-a*, *Fhos-b* e *Fhos-c*.

Posteriormente, em uma atualização mais recente disponibilizada por este mesmo banco de dados, foram anotadas mais duas isoformas, somando um total de cinco isoformas preditas para o locus (FIGURA 9) *Fhos-a*, *Fhos-b*, *Fhos-c*, *Fhos-d* e *Fhos-e* (Anhezini *et al.*, 2012).



FIGURA 9 – Representação da estrutura predita do gene *Fhos*. Localizado na porção superior da ilustração, a linha pontilhada indica a sequência de DNA contendo o intervalo genômico completo do *Fhos* de *Drosophila* (CG32030). No mesmo segmento estão representados, em cor laranja, os 23 exons. Na parte inferior, são mostrados em preto os 5 transcritos preditos (Anhezini *et al.*, 2012).

Dados obtidos por análise bioinformática, utilizando como base principalmente a observação da similaridade entre sequências de aminoácidos, demonstraram que as isoformas descritas para *Fhos* apresentam uma semelhança expressiva entre si. Também foi observada similaridade com um grande número de outras proteínas da família das forminas. Todos os transcritos anotados possuem os domínios característicos de forminas FH1 e FH2. Além destes domínios existe também uma região amino-terminal conservada, que possivelmente abriga o sítio de ligação para Rho-GTPases, que trata-se de um domínio essencial para a ativação das forminas (Watanabe *et al.*, 1997; Westendorf *et al.*, 1999; Anhezini *et al.*, 2012). Interessantemente, ao analisarmos a similaridade de FHOS com forminas de mamíferos, notamos as maiores similaridades com aquelas pertencentes à sub-família de forminas FHOS/FHOD de mamíferos FHOD 3/camundongo (73,5%), FHOD3 /humana (63,5%), FHOD1/camundongo (59%) e FHOD1/humana (57,7%); (Anhezini *et al.* 2012; Ménard *et al.*, 2006). É importante também destacar que Ménard e colaboradores (2006) descreveram a participação de *FHOD1* na apoptose induzida em cultura de células HeLa. Este dado é interessante, pois sugere a hipótese de que as forminas pertencentes à subfamília FHOS/FHOD poderiam ser especializadas na execução de eventos de MCP. Entretanto, essa hipótese necessita ser comprovada experimentalmente.

Com relação à transcrição de *Fhos*, estudos publicados recentemente por nosso grupo, demonstraram que a isoforma de 4,3 kb de *Fhos* (*Fhos-B*), é a única isoforma transcrita durante a MCP de glândulas salivares. Esta indução ocorre pela elevação dos títulos de ecdisona referente ao segundo pulso de ecdisona da metamorfose, num padrão bastante similar ao de outros genes de morte celular caracterizados em *Drosophila* (ver FIGURA 5). Foi demonstrado também que esta ativação estágio e tecido específica é modulada pelo gene de resposta primária à ecdisona *E93*. Este tem sua expressão induzida em glândulas salivares apenas em resposta ao segundo pulso de ecdisona, que coincide com a ativação da MCP autofágica de glândulas salivares. Isso foi demonstrado pelo fato de que mutações de perda de função do *E93* bloqueiam a transcrição de *Fhos* e também levam à letalidade e persistência de glândulas salivares (Anhezini *et al.*, 2012).

1.5 FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS FORMINAS

As forminas são proteínas bastante conservadas entre os eucariotos (Higgs e Peterson, 2005). A maioria dos componentes dessa família de proteínas possui várias isoformas, sugerindo uma vasta diversidade em funções celulares (Higgs, 2005). Estudos em variados organismos modelo (fungos, nematóides, insetos, plantas e vertebrados) evidenciam uma conservada participação das forminas em diversos processos, entre eles: polarização celular, montagem do filamento de actina, tráfego de vesículas, desenvolvimento embrionário e citocinese (Liu *et al.*, 2010; Campellone e Welch, 2010); (FIGURA 10).

As forminas foram inicialmente observadas e caracterizadas por Castrillon e Wasserman (1994). Em seu trabalho, os autores demonstraram que o gene de *Drosophila diaphanous* (*dial*) era essencial para a citocinese e que alelos nulos gerados para este gene eram letais. Ainda neste trabalho, identificaram duas importantes regiões homólogas (“domínios compartilhados”), com o gene *Limb deformity* de camundongo e *Bni1p* de levedura. A citada *Bni1p* é bem caracterizada por ser necessária para a citocinese em células de levedura. Esses domínios foram denominados FH1 e FH2 (Castrillon e Wasserman, 1994).

O domínio FH1 é posicionado adjacente ao domínio FH2. Estruturalmente é caracterizado por ser composto por um trecho rico em repetições de resíduos de L-prolina. Este trecho é conhecido pela interação com proteínas que possuem o domínio Src-Homology 3 (SH3), este comumente encontrado em produtos de proto-oncogenes (Macias, Wiesner e Sudol, 2002). Além disso, o domínio FH1 também possui uma grande afinidade molecular

pela profilina. A interação FH1-PROFILINA parece acelerar a polimerização do filamento, provavelmente por aumentar a concentração da actina globular nas proximidades do domínio FH2 (FIGURA 11). A maioria das forminas possuem ambos os domínios (FH1 e FH2) (Campellone e Welch, 2010; Paul e Pollard, 2009).

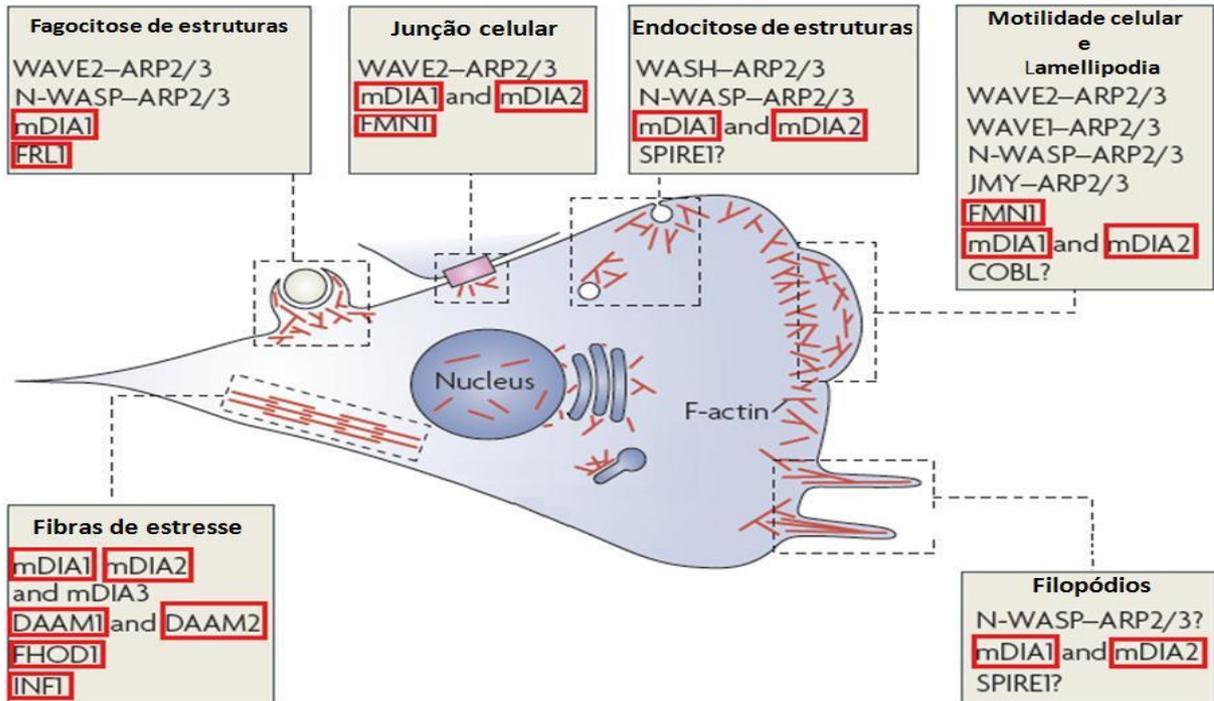


FIGURA 10 – Localização e participação dos fatores de nucleação de actina em células de mamíferos. No esquema da ilustração (mostrados na cor vermelha) os filamentos de actina (F-actina) e sua localização em eventos celulares. Estes filamentos são nucleados e organizados em redes ramificadas pelo complexo de proteínas actina-relacionadas ou “actin-related protein 2/3” (ARP2/3). As formas não ramificadas são nucleadas por proteínas homólogas WASP (contendo o domínio nucleador WH2) e pelos membros da família das proteínas forminas. Em destaque nos quadros em cinza, relação dos diversos fatores de nucleação e seus papéis funcionais já observados; no caso da ilustração em uma célula genérica de mamíferos. Marcado em vermelho no “quadro” citado, estão destacadas as proteínas da família de forminas. As proteínas ilustradas são: “cordon-bleu”(COBL), “Dishevelled-associated activator of morphogenesis” (DAAM), “formin homology domain” (FHOD), “formin-related in leukocytes” (FRL),” inverted formin” (INF), “murine Diaphanous” (mDIA),” junction-mediating” “regulatory protein” (JMY), “Wiskott–Aldrich syndrome protein “(WASP), “neuronal-WASP” (N-WASP), “ASP-family verprolin homologue” (WAVE). Pontos de interrogação indicam que não é muito claro o papel desempenhado por este membro. Figura modificada de Campellone e Welch, 2010.

O domínio FH2 é o domínio que define a família de forminas, contém uma sequência de aproximadamente 400 aminoácidos e é suficiente para a nucleação de filamentos de actina *in vitro* (Xu *et al.*, 2004; Campellone e Welch, 2010). Todas as forminas possuem o FH2 (Liu *et al.*, 2010), este domínio controla a dinâmica de polimerização da actina por três mecanismos: (i) acelerando a nucleação de filamentos, (ii) evitando a ligação de proteínas de capeamento que bloqueiam a adição de monômeros de actina na extremidade crescente do filamento e (iii) alterando a taxa de polimerização e despolimerização dos filamentos de actina (Higgs, 2005).

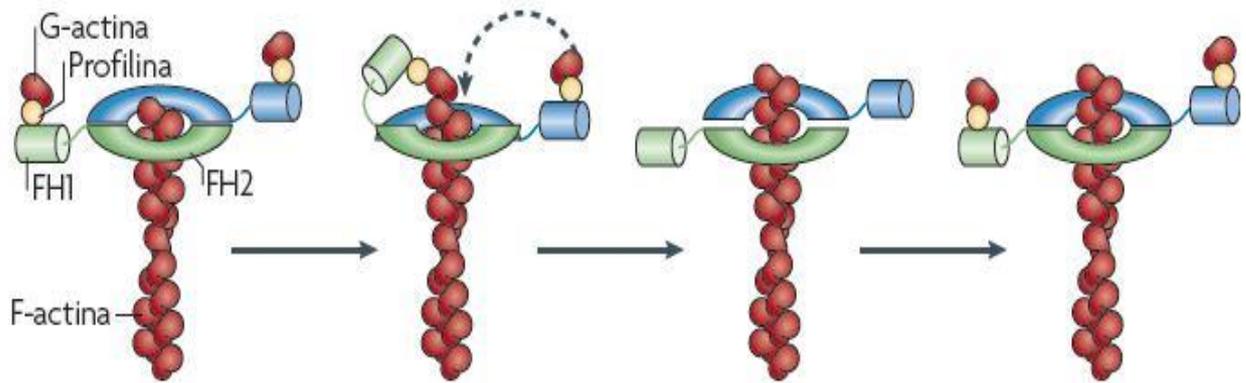


FIGURA 11 – Esquema do processo de polimerização da actina mediada pelas proteínas forminas. Modelo simplificado proposto para a nucleação do filamento de actina. Como indicado, o dímero formado pelo domínio FH2 associa-se ao filamento de actina, esta ligação posiciona estrategicamente a proteína formina e impede a ligação das proteínas de capeamento. Após a interação do domínio FH2 e o filamento de actina, o domínio FH1 recruta a profilina. A profilina, por afinidade liga-se a monômeros de actina, formando o complexo profilina-actina. O domínio FH1, por este mecanismo, aumenta a disponibilidade de actina próximo ao domínio funcional FH2. A ligação, adicionando a actina globular (G-actina) ao filamento de actina (F-actina), ocasiona no alongamento do mesmo (Figura modificada de Campellone e Welch, 2010).

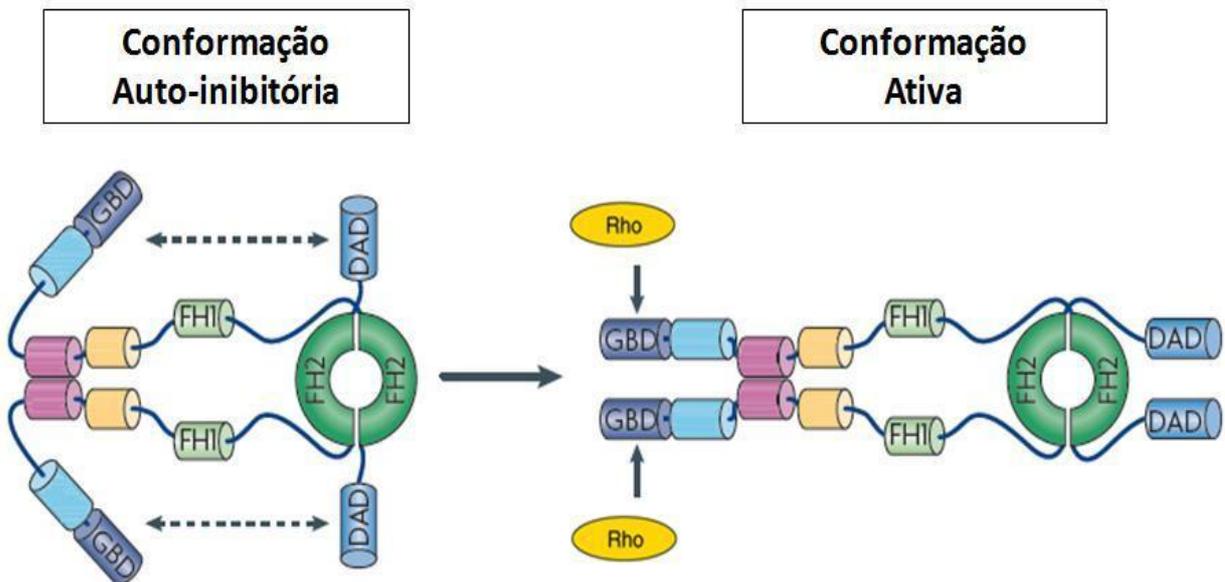


FIGURA 12 - Representação de uma formina convencional na conformação auto-inibitória e ativa. A conformação inativa é resultante da atração molecular entre os domínios GBD-DAD, neste formato o domínio dimérico FH2 está temporariamente inacessível à G-actina. A ligação de proteínas da família Rho GTPase muda a conformação molecular, passando a proteína para a forma ativa e expondo o domínio funcional FH2 (Campellone e Welch, 2010).

Nos metazoários, as proteínas forminas podem ser divididas em 7 subclasses distintas: FHOD (formin-homology domain proteins), Dia (Diaphanous), FRL (formin-related proteins in leukocytes), DAAM (Dishevelled-associated activators of morphogenesis), FMN

(Formin), Delphilin e INF (inverted-formin); esta divisão foi organizada baseando-se na divergência da sequência apresentada pelo domínio FH2 (Liu *et al.*, 2010; Higgs e Peterson, 2005; Campellone e Welch, 2010). Forminas de organismos não metazoários formam um grupo separado. Dentro dos metazoários, a classificação pode ainda ser realizada de maneira diferente, levando em consideração as regiões de similaridade fora do domínio FH2, a divisão em questão é feita em apenas 3 grupos: DRFs (“diaphanous-related formins” ou forminas diaphanous-relacionadas), DAAM e FRL (Liu *et al.*, 2010).

Nas forminas pertencentes às DRFs observa-se a presença de um domínio N-terminal de ligação a Rho ou “Rho-binding domain” (RBD), e na porção C-terminal encontra-se o domínio de autorregulação diaphanous ou auto-inibitória. Estes domínios exercem entre si uma auto-inibição que impede a acessibilidade dos domínios de FH1 e FH2, inibindo por consequência a atividade dos mesmos. Esta interação DAD-RBD é interrompida pela ligação de Rho (FIGURA 12). O domínio FH3 parece exercer função importante na sublocalização celular (Etienne-Manneville e Hall, 2002; Copeland *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A MCP é um processo fundamental para a homeostase dos organismos multicelulares tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta. Desordens na regulação ou execução da morte celular estão relacionadas a doenças importantes. A descoberta e o entendimento das funções de novos genes envolvidos nos processos de morte celular são de grande importância para o avanço no entendimento dessas doenças e ampliam a possibilidade de novas terapêuticas.

A *Drosophila melanogaster* é um modelo muito vantajoso para este fim, pois apresenta uma extensa conservação evolutiva dos processos celulares fundamentais, a possibilidade de experimentação *in vivo* e a grande disponibilidade de dados genômicos e proteômicos. A identificação do papel do locus *Fhos* é um exemplo disso. Sua função é essencial ao desenvolvimento, e para a morte celular autofágica das glândulas salivares larvais. O locus *Fhos* é regulado por ecdisona e dependente da expressão da proteína E93 para a sua indução. A homologia de seus produtos com a família das forminas, as quais participam do remodelamento dinâmico do citoesqueleto tornam este locus de muita importância para o desenvolvimento do inseto.

Os aspectos acima comentados, aliados à importância biológica das forminas, nos levaram a analisar o locus *Fhos*, principalmente no que tange às isoformas anotadas mais recentemente, especialmente a maior delas, a isoforma *Fhos-C*, bem como avançar na caracterização da isoforma *Fhos-B*, expressa no intestino médio larval o qual também é destinado à MCP em resposta à presença de ecdisona.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*.

Construção de vetores de transformação para expressão ectópica da isoforma *Fhos-B*.

Caracterização do perfil de expressão de *Fhos* durante a morte celular do intestino médio larval de *Drosophila melanogaster* e expressão ectópica de *Fhos-B* durante a morte celular do intestino médio larval de *Drosophila melanogaster*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise *in silico* da sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da isoforma *Fhos-C*.
- Análise do perfil de transcrição da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento.
- Construção do vetor *pFhosB (LD24110)*.
- Construção do vetor *pFhosB-myc-tag*.
- Análise da transcrição de *Fhos* na morte celular do intestino-médio larval de *Drosophila melanogaster*.
- Superexpressão ectópica da isoforma *B* de *Fhos* nas primeiras horas da morte celular do intestino-médio larval de *Drosophila melanogaster*.
- Expressão ectópica de interferência das isoformas *Fhos* nas primeiras horas da morte celular do intestino-médio larval de *Drosophila melanogaster*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para realização deste trabalho, foram utilizados embriões, larvas, pré-pupas, pupas e adultos de *Drosophila melanogaster*. Todos os organismos utilizados neste trabalho foram mantidos em estufas à 25°C em sala específica para cultura de *Drosophila*. Esta sala pertence ao Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento coordenado pelo Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

4.1.1 Linhagens de *Drosophila* utilizadas

Canton Special (CS): linhagem amplamente utilizada como controle experimental e considerada selvagem. Obtido do laboratório do Dr. Spyros Artavanis-Tsakonas, Yale University (E.U.A).

Yellow White¹¹¹⁸ (yw): linhagem utilizada como controle experimental, comparável a animais selvagem, porém com “background” genético contendo características corporais diferenciadas que auxiliam na seleção genética, tais como: cutícula corporal amarelada (“yellow”) e olhos brancos (“white”) no adulto.

UAS-GFP (W*; P{UAS-gapGFP}AC1): esta linhagem possui uma construção genética contendo a sequência da proteína fluorescente verde ou “green fluorescent protein” (GFP) sob o controle de um promotor UAS (“Upstream Activating Sequence”), obtida do “Bloomington *Drosophila* Stock Center”.

Linhagem transgênica para o knockdown de Fhos por interferência de RNA in vivo (linhagem 19-11c): Esta linhagem possui um transgene contendo sequências repetidas e invertidas do exon 10 do gene *Fhos* sob o controle de promotor de condicionamento UAS. Esta linhagem foi produzida e gentilmente cedida pelo Dr. Lucas Anhenzini (Anhenzini, 2011).

Linhagem transgênica para a expressão ectópica Fhos (linhagem FL-FhosB): Esta linhagem possui uma construção transgênica de expressão ectópica para *Fhos*. Nesta construção também foi utilizado o condicionamento da expressão a um promotor UAS.

Linhagem foi produzida e gentilmente cedida pelo Dr. Lucas Anhezini (Anhezini, 2011).

Linhagens de expressão de GAL4: Essas linhagens encontram-se disponíveis em nosso laboratório e expressam o fator de transcrição de leveduras *GAL4* sob o controle de diferentes promotores estágio ou tecido específicos ou por choque térmico. O fator de transcrição *GAL4* se liga às sequências UAS, ativando a transcrição do transgene de maneira condicional ao promotor *GAL4* utilizado.

- **HS-GAL4** (y^{1118} , w^* , P{hsp70-GAL4}): esta linhagem possui o promotor “Hsp70- heat shock protein 70” que ativa a expressão de GAL4 por choque de temperatura.

- **driver intestino:** w^{1118} ; P{drm-GAL4.7.1}1.1/TM3, Sb¹ esta linhagem possui o promotor do genes drumstick (drm) que ativa a expressão de GAL4 em fases do desenvolvimento do intestino no embrião e no intestino larval. Obtida do “Bloomington Drosophila Stock Center”.

4.2 MEIOS DE CULTURA DE *Drosophila melanogaster*

Meio padrão

Fubá de milho (181,8g), Dextrose(105g), Sacarose (52,4g), Levedura (31,8g), Agar (20g), Nipagim[®] 10% em etanol 95% (11,5ml) Mistura de ácidos (propiónico 41,8% e fosfórico 3,53% - 20,2ml) e Água destilada (2000ml).

Meio de Ovoposição

Suco de uva (45%), Açúcar (8,7%), Agar (2,2%), NaOH (hidróxido de sódio - 50mM), Mistura de ácidos (propiónico 41,8% e fosfórico 3,53%) e Água destilada (qsp 540ml).

4.3 MEIOS DE CULTURA DE BACTÉRIAS *E. coli*

Meio LB

Extrato de levedura (5g), Cloreto de sódio (NaCl - 10g), Triptona (10g), Agar (15g) e Água destilada (qsp 1000ml).

Os componentes foram dissolvidos em um volume menor de água destilada, o pH foi ajustado em 7,0 e o volume completo para 1 litro. Em seguida o meio foi autoclavado por

20 minutos. O meio LB pode ser utilizado em placas de Petri para culturas sólidas e líquidas, adicionando-se Agar alternativamente na medida indicada.

Meio SOB

Triptona (2g), Extrato de Levedura (0,5g), Cloreto de sódio (NaCl - 0,05g) e Água destilada (qsp 100ml).

Para este meio, adicionava-se volume menor de água, e adicionavam-se os componentes sob agitação constante. Após a dissolução, adiciona-se 1ml de KCl a 250mM e ajustava-se o pH para 7,0 com auxílio de solução de NaOH a 5N. Adicionava-se água destilada suficiente para 100ml. O meio era então autoclavado, resfriado e a ele adicionava-se 1ml de MgCl₂ 1M.

Meio SOC

Para este meio procedia-se da mesma maneira que o meio SOB, adicionando-se apenas glicose. Para cada 10ml de SOB adicionavam-se 180ul de glicose estéril a 20% (preparada por filtração) ou 2ml de glicose 1M.

4.4 VETORES

pFhos – consiste do vetor pOT contendo o cDNA inteiro da isoforma B de *Fhos* (clone LD24110) obtido a partir do estoque de *Drosophila em Bloomington EUA*, disponível sob a identidade *BL11540*.

pUAST – obtido a partir de estoque disponível no Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP).

pUASTmyc-tag – gentilmente cedido pelo Professor Cheng-yu Lee (University of Michigan).

4.5 CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*.

O ciclo de vida completo de *Drosophila melanogaster* tem comumente a duração de 11 a 12 dias a 25° C (FIGURA 13); este intervalo compreende o momento da ovoposição até o surgimento da mosca adulta (Watson *et al.*, 2006).

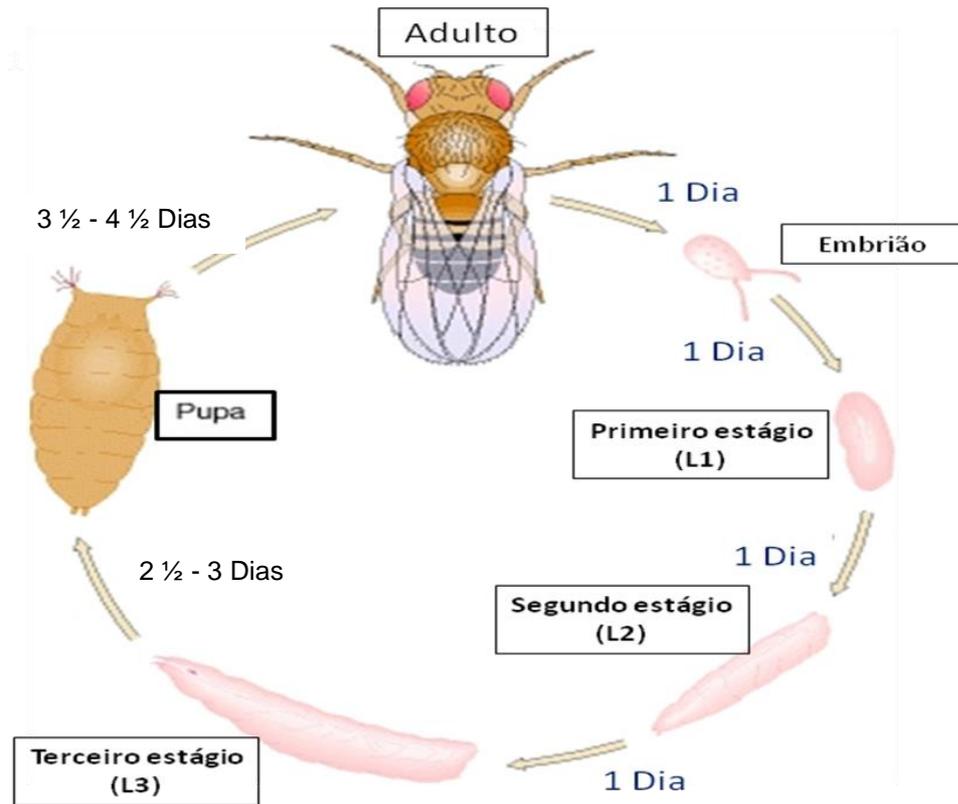


FIGURA 13 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Esquema dos estágios do desenvolvimento deste organismo e a duração de cada um desses estágios. O ciclo de vida demonstrado é o observado à temperatura de 25°C. A duração temporal das fases e ciclo pode demonstrar consideráveis variações, principalmente influenciadas pela variação de temperatura (figura modificada de Watson *et al.*, 2006).

O ciclo de vida da *Drosophila* possui um curto período de embriogênese e um estágio larval que divide-se em três fases. O ciclo inicia-se após o embrião ser fecundado e depositado pela fêmea adulta na comida. Após 24 horas ocorre a eclosão e surge o primeiro estágio larval. O primeiro estágio larval é denominado L1 e tem seu intervalo de duração nas primeiras 24 horas, trata-se de uma minúscula larva, inicialmente do mesmo tamanho do embrião. Seguida as primeiras 24 horas que compreendem o estágio L1, as larvas evoluem para o segundo estágio larval, denominado L2. Nesse estágio as larvas começam a apresentar um tamanho intermediário em relação aos outros estágios larvais, também tem duração de 24 horas. Completando o desenvolvimento larval estão as larvas no terceiro estágio (L3). Neste estágio as larvas possuem um tamanho consideravelmente maior que nos outros estágios larvais descritos. O estágio L3 dura aproximadamente 72 horas (3 dias), tendo seu término quando a larva inicia a fase de pré-pupa (Watson *et al.*, 2006). A fase pré-pupal e pupal são fases estáticas, onde o organismo sofre metamorfose. Este evento nos fornece uma grande oportunidade de investigação, pois nele ocorre uma série de modificações importantes, como por exemplo: intensa proliferação, diferenciação e morte celular programada. Esta fase tem seu término no momento em que ocorre a emergência da mosca adulta (Shingleton, 2010).

4.6 ESTAGIAMENTO DOS ANIMAIS

Nos experimentos executados, todos os procedimentos de coleta e estagiamento foram executados a 25°C (exceto experimentos de choque térmico). Os embriões foram estagiados com contagem inicial de horas logo após a ovoposição. Nas larvas em estágio L1 e L2, procedemos a contagem de horas após a eclosão da larva. As larvas em estágio L3 foram estagiadas conforme a coloração intestinal, após a alimentação com meio padrão corado com azul de bromophenol (descrito detalhadamente a seguir). O estagiamento de pupas e pré-pupas foi baseado na contagem de horas após a formação do pupário (horas AFP). A formação do pupário é caracterizada pelo surgimento de uma pré-pupa branca e imóvel. Este estágio dura aproximadamente 30 minutos e é considerado o estágio 0h AFP.

4.7 EXPLANTE DE TECIDOS DE *Drosophila melanogaster*

A dissecação e o explante dos tecidos foram feitos sob estereomicroscópio *Zeiss* em lâminas de microscopia escavadas contendo solução de PBS 1X (“phosphate buffered saline”) concentrado ou PBS 1X-DEPC. A adição de DEPC (diethylpyrocarbonate) foi utilizada somente para as extrações de RNA. Os procedimentos de dissecação e o explante foram realizados com o auxílio de pinças de ponta fina (Dumont, biologie n°5).

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE *Drosophila melanogaster*

O procedimento de extração de RNA total foi realizado em variadas fases do desenvolvimento, os estágios e quantidade de animais utilizados estão descritos a seguir. Para as extrações de RNA total, animais da linhagem selvagem (*Yellow White*¹¹¹⁸) foram coletados após o estagiamento a 25°C. Após este procedimento os indivíduos foram imediatamente homogeneizados em 500µl de *Trizol*® (*Invitrogen*) previamente aliquotado em tubos *ependorf* de 1,5mL livres de RNase. Depois de homogeneizadas as alíquotas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente foram adicionados 100µl de clorofórmio a cada amostra (correspondente a 1/5 do volume inicial de *Trizol*®), as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 20 minutos à temperatura de 4°C. A fase aquosa sobrenadante foi coletada e transferida para novo tubo *ependorf* de 1,5mL livre de RNase. Nova incubação

por 2 minutos à temperatura ambiente foi feita e a alíquota, foi adicionado isopropanol em volume igual ao coletado. Esta mistura foi homogenizada por múltipla inversão e incubada à -20°C por aproximadamente 16 horas (“overnight”). Após a precipitação as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 40 minutos à temperatura de 4°C. Os concentrados (ou “pellets”) de RNA total precipitados foram lavados 2 vezes com 500µl de etanol 70%, seguido de 5 minutos de centrifugação a 12.000g. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o concentrado foi seco à temperatura ambiente. O RNA total foi dissolvido em água deionizada tratada com dietilpirocarbonato a 0,1% (DEPC 0,1%). As amostras foram tratadas com DNase (*RQI Rnase-free Dnase, Promega*) por 1 hora a 37°C e armazenadas à -80°C até o uso. Para a inativação da enzima DNase as amostras foram mantidas a 65°C por 15 minutos.

4.9 DOSAGEM DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

As dosagens de DNA ou RNA foram feitas em aparelho espectrofotômetro de microvolumes *NanoDrop*[®] (*Thermo Scientific*). Para as quantificações, foi utilizado 1µl de cada amostra de DNA ou RNA. O aparelho expressa os resultados em razão de micrograma por microlitro (µg/µl).

4. 10 SÍNTESE DE cDNA

Para as reações de transcrição reversa e síntese da primeira fita de cDNA, foram utilizadas alternativamente: alíquotas de 2.5µg de RNA total para amostras de RNA isoladas a partir de animais inteiros e 1µg de RNA total isolado do intestino médio larval. Para a síntese do cDNA foram seguidas as instruções do protocolo do fabricante do “kit” *High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. As amostras foram incubadas em diferentes temperaturas como descrito na TABELA 1.

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Temperatura °C	25	37	85	4
Tempo	10 min	120 min	5 min	∞

TABELA 1 – Condições tempo/temperatura utilizadas na reação de transcrição reversa. Programação utilizada no termociclador. O experimento foi conduzido conforme indicado no protocolo do kit (*High Capacity Reverse Transcription*).

4.11 ESTAGIAMENTO E EXTRAÇÃO

4.11.1 Estagiamento e extração de RNA de embriões.

Para a extração de RNA total de embriões, foram coletados machos e fêmeas jovens (até 2 dias de vida) que foram colocados em frasco de cultura novo e sem meio de cultura. Nestes frascos foram utilizadas como tampas placas contendo meio de ovoposição novo (descrito anteriormente), contendo uma pasta de levedo de pão e água destilada. Esta pasta atrai as fêmeas fecundadas para a ovoposição. Em um intervalo de dois dias foram feitas múltiplas trocas dessas placas de ovoposição com o intuito de condicionar as fêmeas a realizarem uma ovoposição mais rápida e homogênea, obtendo-se embriões com postura quase simultânea. Após o condicionamento, foram feitas as coletas experimentais nos estágios indicados na TABELA 2.

Embrião	Intervalo	Duração
Estágio 2	De 00h25 min e 01h05 min, após momento da ovoposição.	40 minutos.
Estágio 5	De 02h10 min e 02h50 min, após momento da ovoposição.	40 minutos.
Estágio 8	De 03h10 min e 03h40 min, após momento da ovoposição.	30 minutos.
Estágio 10	De 04h20 min e 05h20 min, após momento da ovoposição.	60 minutos.
Estágio 14	De 10h20 min e 11h20 min, após momento da ovoposição.	60 minutos.
Estágio 16	De 13 horas e 16 horas, após momento da ovoposição.	180 minutos.

TABELA 2 - Intervalos utilizados nas coletas dos embriões e fase de duração de cada estágio abordado na análise dos níveis de expressão. As moscas foram condicionadas/sincronizadas e posteriormente acomodadas em uma placa de ovoposição recém-preparada, pelo preciso intervalo referido na tabela como “duração”. Após as coletas, as placas de ovoposição foram retiradas e estagiadas conforme demonstrado “intervalo”. Em cada um dos estágios foram coletados para extração de RNA total aproximadamente 60 embriões. Tabela organizada conforme classificação descrita por Bownes (1975).

4.11.2 Estagiamento e extração de RNA total de larvas L1.

Para a coleta de larvas em primeiro estágio larval (L1), inicialmente procedemos como para a de embriões. As placas de ovoposição contendo os ovos foram mantidas a 25° C por 24 horas. Após esse período as larvas eclodidas estão seguramente no estágio L1. Essas larvas recém eclodidas foram transferidas para uma nova placa de ovoposição. Como o estágio de L1 dura cerca de 24 horas após a eclosão, decidimos por subdividir as 24 horas que correspondem o estágio L1 em 4 etapas. Foram retiradas para extração imediata de RNA, 20 larvas L1 recém eclodidas e as demais foram estagiadas por 6, 12 e 18 horas após o momento da eclosão. As larvas coletadas (20 larvas em cada um dos intervalos) foram submetidas à extração de RNA total como descrito anteriormente.

4.11.3 Estagiamento e extração de RNA total de larvas L2.

Para a coleta de larvas em segundo estágio larval (L2), utilizamos procedimento similar ao descrito para L1 e após esse período foram feitas coletas nas seguintes idades: 24, 30, 38 e 42 horas após a eclosão da larva. Também foram utilizadas para a extração de RNA total 20 larvas em cada um dos pontos de coleta.

4.11.4 Estagiamento e extração de RNA total de larvas L3.

Para a coleta e estagiamento de larvas de terceiro estágio (L3) utilizamos abordagem diferenciada, para evitar assincronias que poderiam interferir nas análises de expressão neste estágio como descrito por Andres e Thummel (1994).

O meio para cultivo de *Drosophila* foi preparado conforme descrito em material e métodos, e depois de pronto, no momento do resfriamento do meio, foi adicionado o corante na proporção de 0,05g para cada 100ml (Maroni e Staney, 1983). As larvas foram coletadas ainda no estágio L2 e transferidas para um novo frasco de cultura contendo o meio de cultura padrão corado em azul. O corante é inócuo ao animal e ao desenvolvimento (Andres e Thummel, 1994). Esta coloração auxilia a observação do intestino larval, que apresenta a seguinte peculiaridade, a quantidade de coloração intestinal pode ser utilizada como controle de estagiamento de larvas em L3 (FIGURA 14) em três diferentes fases de larvas L3: Larvas L3 azul intenso (aproximadamente 12-24 horas antes da formação do pupário), larvas L3 azul claro (aproximadamente 5-12 horas antes da formação do pupário) e larvas L3 intestino sem marcação (aproximadamente 1-6 horas antes da formação do pupário). Um total de 20 larvas foram submetidas à extração de RNA total como descrito anteriormente.

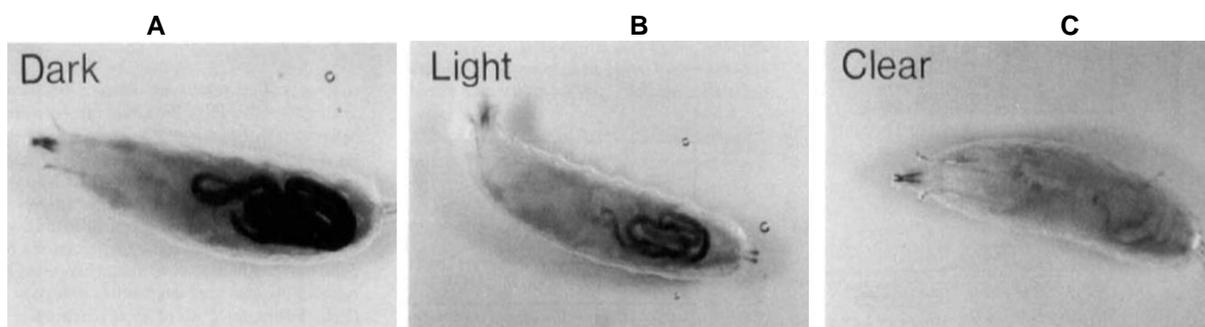


FIGURA 14 - Estagiamento de larvas L3 utilizando padrão de tonalidade do corante azul de bromophenol presente no intestino. As larvas são coletadas ainda na fase de L2 e transferidas para um frasco de cultura; este contendo meio de cultura padrão para cultivo de *Drosophila*, acrescido com 0,05% do corante azul de bromophenol. Representado na figura por: A – Intestino azul escuro, B – intestino azul claro e C – Intestino limpo de azul (ilustração modificada de Andres e Thummel, 1994).

4.11.5 Estagiamento e extração de RNA total de adultos.

No próprio frasco de cultivo, inicialmente foram retirados os adultos mais velhos, cuidando para que restassem apenas pupas e larvas no frasco. A partir deste controle, em intervalos fixos, os frascos foram investigados para a presença de adultos recém nascidos, os quais eram anestesiados em CO₂, separados por sexo e submetidos a extração de RNA (como descrito anteriormente). Para os ensaios utilizando adultos com um dia de vida, os adultos recém nascidos foram retirados, transferidos para novo frasco e estagiados por 24 horas a 25°C. Após este estagiamento os adultos (1 dia) foram processados para extração de RNA total como descrito anteriormente. Foram utilizados 20 adultos para cada período abordado.

4.12 RT-PCR SEMIQUANTITATIVO DO TRANSCRITO *Fhos-C*.

As amostras de RNA utilizadas em reações de RT-PCR semiquantitativo foram obtidas como descrito anteriormente, quantificadas e utilizadas para a síntese de cDNAs também como descrito.

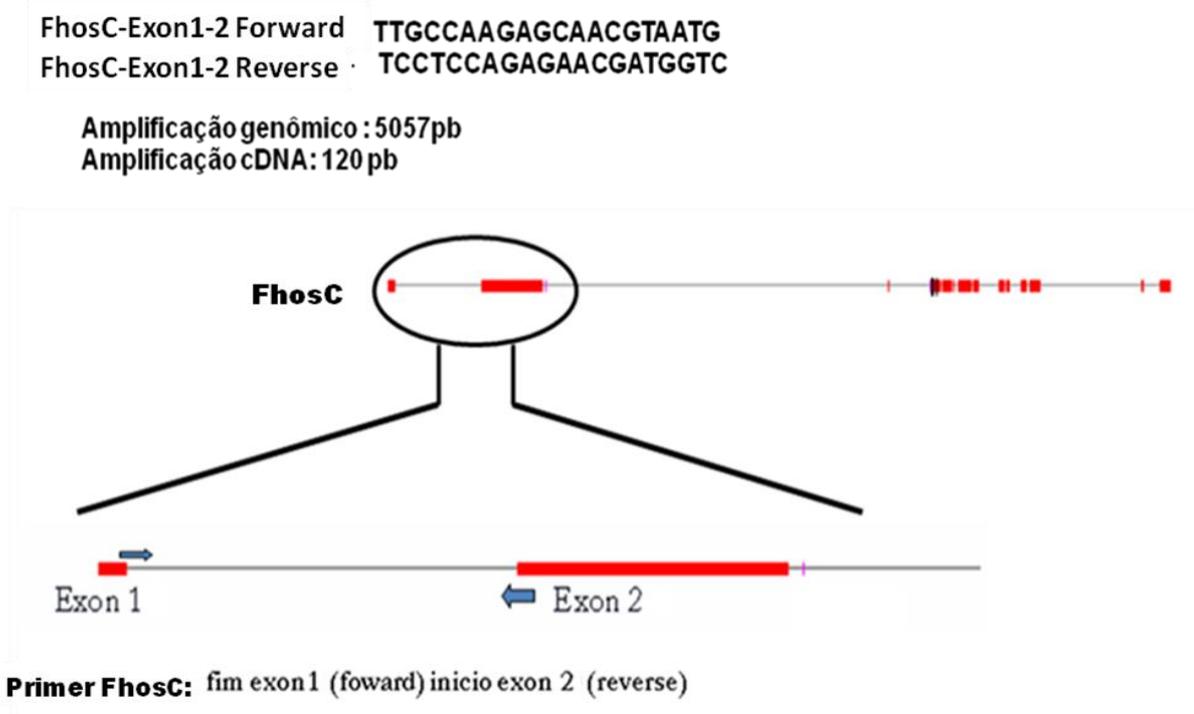


FIGURA 15 - Representação dos “primers” *Fhos-C*. Localizado superior, está a sequência de nucleotídeos dos “primers forward” e “reverse”. Está ilustrado também a quantidade de pares de base da amplificação, diferenciando a extensão da amplificação conforme a região utilizada como molde. Abaixo, destaca-se esquema mostrando parte da distribuição exônica da isoforma *Fhos-C*, e em detalhe a localização e direção dos “primers”.

Reação de PCR		
dNTP 10 mM		2uL
Primers forward (10pM)		2uL
Primers reverse (10pM)		2uL
cDNA		1uL
Tampão para polimerase		5uL
Polimerase		1uL
Água livre de Nuclease		q.s.p 50uL
Condições da reação		
Passo	Temperatura utilizada	Duração
Desnaturação inicial	95°C	5 min.
Número de ciclos		28 para rp49 e 32 para Fhos-C
Desnaturação	95°C	30seg
Anelamento dos primers	60°C	45seg
Extensão (amplificação)	72°C	30seg
Extensão final	72°C	1 min.

TABELA 3 - Quantidade de reagentes e condições utilizadas nas reações de PCR. Quantidade de reagentes utilizados em cada reação, conforme orientado pelo fabricante. E a descrição das condições utilizadas nas reações realizadas. Foi utilizado para proporcionar a variação tempo e temperatura descritas o termociclador *PTC 200 Peltier Thermal Cycler – MJ Research*.

A TABELA 3 mostra os reagentes e condições de reação destes experimento. Os “primers” utilizados neste experimento e os amplicons estão indicados na FIGURA 15. A temperatura ideal de anelamento dos “primers” específicos para a isoforma *Fhos-C*, foi estabelecida através de um gradiente de temperatura, com intervalo de 55°C a 65°C. A quantidade ideal de ciclos foi estabelecida através de experimento prévio utilizando intervalos de 26 a 40 ciclos. Como controle interno destes experimentos foi utilizado a expressão de *rp49*.

4.13 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

4.13.1 Análise de sequência de nucleotídeos

Para as análises de sequência de nucleotídeos, utilizamos o programa de alinhamento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool[®]), que encontra-se disponível gratuitamente no sítio: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

A ferramenta BLAST procura analogia comparando sequências biológicas primárias (nucleotídeos ou aminoácidos) fornecidas, denominadas “query”, entre si ou contra

sequências depositadas em bancos de dados. Os resultados são expressos em alinhamentos de “escore” mais alto. Estes alinhamentos são ferramentas essenciais na análise da qualidade de sequências obtidas experimentalmente. Além disso, nos permite discutir ou propor relações funcionais, evolutivas e identificar membros da família de genes (Altschul *et al.*, 1990, 1997; Barrett *et al.*, 2012).

4.13.2 Análise de sequência de aminoácidos

Para análise da sequência predita de aminoácidos, utilizamos a ferramenta de bioinformática *Interproscan* (*InterProScan Sequence Search*[®]), disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>. Esta ferramenta localiza sequências presentes em domínios, sítios, sinais de localização, possíveis famílias, assinaturas proteicas, entre outras sequências já caracterizadas.

4.13.3 Análise do perfil de hidropaticidade de *Fhos*

Para análise do perfil hidropático de *Fhos*, foi utilizado o algoritmo Kite-Doolittle (<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>) que analisa a sequência de aminoácidos de interesse com relação à hidrofília e hidrofobia dos resíduos presentes nas cadeias laterais de cada um dos aminoácidos da sequência (Kyte e Doolittle, 1982).

4.14 CONSTRUÇÃO DO VETOR PARA SUPER-EXPRESSAR O TRANSCRITO

Fhos-B.

Para a construção do vetor de expressão ectópica de isoforma *Fhos-B*, por nós denominado *pFhos-B*, utilizamos duas metodologias distintas.

Na primeira abordagem, efetuamos a excisão por endonucleases do cDNA LD24110, clonado originalmente no vetor *pOT2*, denominado inicialmente *pJaz*; este representa o cDNA completo da isoforma *Fhos-B*. Após a excisão, tentamos a ligação direcionada ao vetor pUAS_t. Chamaremos este vetor a ser construído de *pFhos-B*.

Na segunda abordagem, produzimos a isoforma *Fhos-B* por reação de PCR e posteriormente sua clonagem ao vetor pUAS_tmyc-tag. A este vetor demos o nome de *pFhosB-myc-tag*. Metodologia esquematizadas na FIGURA 16.

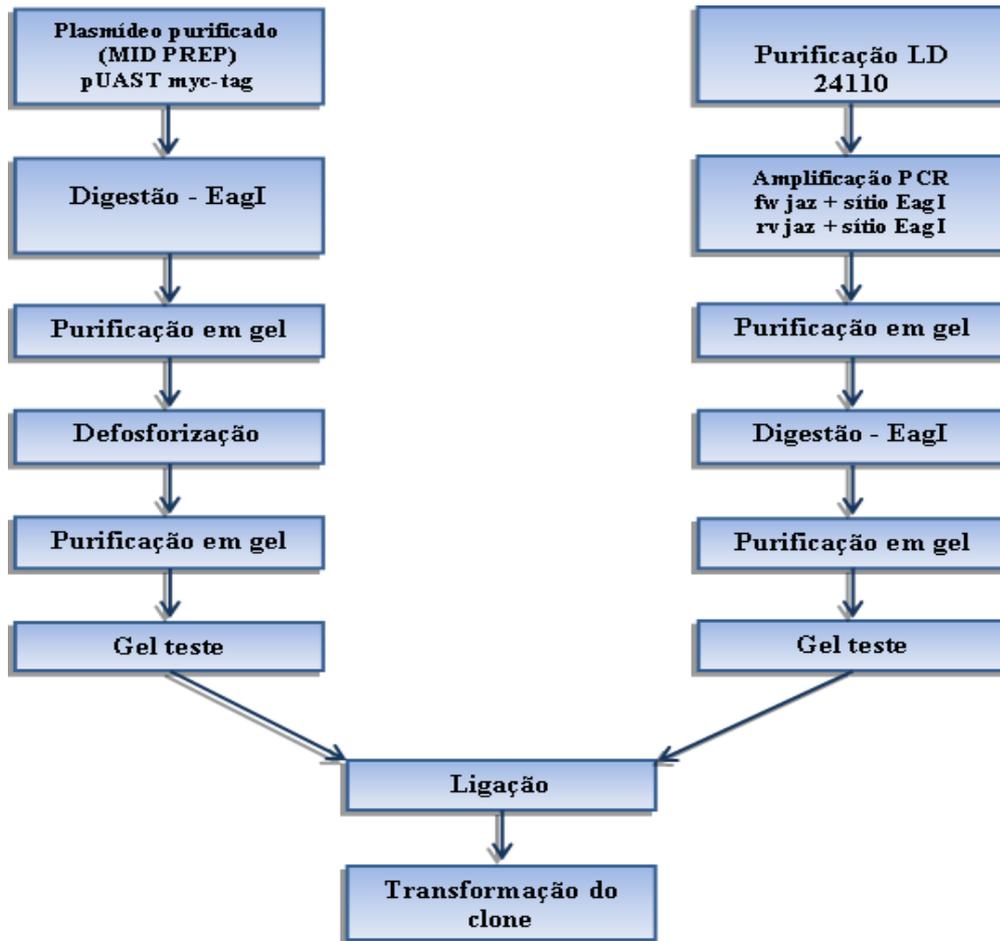


FIGURA 16 - Fluxograma resumindo todo processo de construção do vetor de superexpressão utilizando amplificação do fragmento por PCR. Este fluxograma resume, da purificação à ligação, todo o procedimento necessário para se produzir o vetor de expressão ectópica fusionado com myc-tag. No canto esquerdo, descreve-se os passos utilizando pUASTmyc-tag. Na lateral direita, os passos necessários para preparar os fragmentos. Todo processo é descrito detalhadamente no texto.

4.14.1 Construção do vetor *pFhosB*.

Dispúnhamos em nosso laboratório de clone contendo o cDNA LD24110, trazido pelo Dr. Cláudio Simon durante seu pós-doutoramento na Universidade de Maryland (EUA) e inicialmente denominado *pJaz*. O clone de cDNA identificado como LD24110 corresponde ao cDNA inteiro da isoforma B de *Fhos* (FIGURA 17). Este cDNA, está disponível no *Drosophila Genome Resources Center* (DGRC) clonado no plasmídeo *pOT2* entre os sítios de restrição de *XhoI* e *EcoRI* do “poly-linker” (FIGURA 17). Os plasmídeo *pOT2* possuem resistência ao antibiótico cloranfenicol. A estratégia utilizada foi a excisão do cDNA inteiro da isoforma B e clonagem deste inserto em vetor do pUAS para posterior transformação de *Drosophilas*.

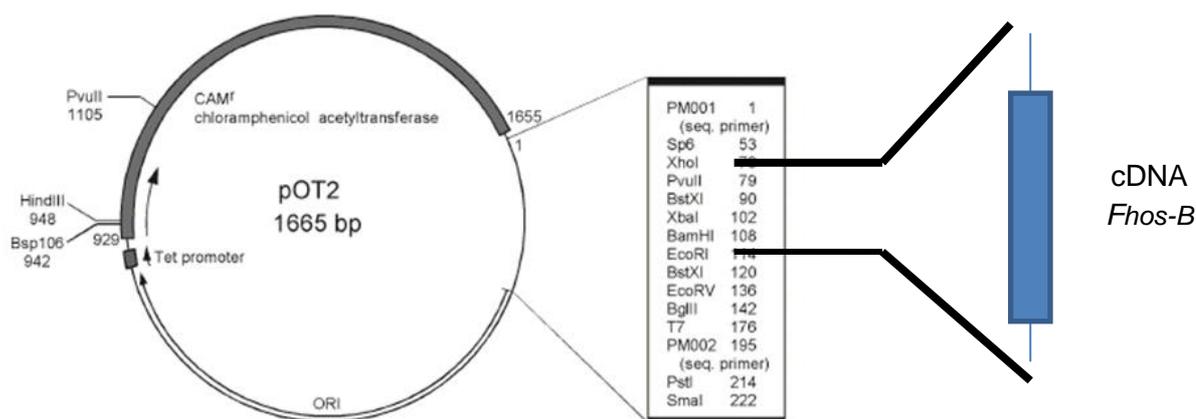


FIGURA 17 - Esquema demonstrativo da construção do plasmídeo *pFhos* (LD24110). Ilustra o plano representativo da construção do plasmídeo contendo a sequência da isoforma *Fhos-B*. Como mostrado, o plasmídeo pOT2 funcionou como base para a construção. O pOT2 é um plasmídeo relativamente pouco extenso (1665pb), destaca-se a presença do sítio seletivo de resistência ao antibiótico cloranfenicol. Pode-se observar na lista de sítios de restrição, presentes no seu poly-linker, que o fragmento clonado contendo a sequência com informação molecular de *Fhos-B* foi inserido entre os sítios das endonucleases XhoI e EcoRI.

4.14.1.1 Amplificação e purificação do plasmídeo LD24110.

Inicialmente o vetor *pJaz* disponível foi amplificado através de re-transformação em bactérias competentes DH5 α como descrito a seguir.

Alíquotas de 100 μ l de DH5 α competentes (pré-armazenadas a -80°C), foram descongeladas lentamente em gelo. Após o descongelamento foi adicionado 1 μ l do plasmídeo *pJaz* contendo o cDNA LD24110 e a amostra foi mantida em gelo por 30 minutos. Após essa primeira incubação, procedemos ao choque térmico, incubando a amostra a 42°C por 45 segundos em bloco de aquecimento (*Boekel Scientific, tropicooler modelo 260014*). Ao final deste período a amostra foi transferida novamente para gelo e incubada por 2 minutos. Adicionamos 500 μ l de meio SOC, e as amostras foram incubadas a 37°C por uma hora em agitador orbital com 160 rotações por minuto. Após este período, 300 μ l do meio contendo as bactérias transformadas foi plaqueado em placas contendo meio LB sólido acrescido do antibiótico cloranfenicol na concentração de 1 μ g/ml. As placas foram mantidas em posição invertida, em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas. As colônias presentes na placa foram então inoculadas em 3ml de meio LB líquido contendo cloranfenicol (1 μ g/ml) e incubadas “overnight” a 37°C em estufa do tipo *Shaker* (*New Brunswick Scientific, modelo C2*) com agitação a 180 rotações por minuto. Amostras de meio, referentes a cada colônia, foram alíquotadas em microtubos do tipo Eppendorf de 2 ml e centrifugadas a 12.000g, por 40 segundos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os “pellets” de bactéria

foram submetidos à preparações plasmidiais seguindo o protocolo do fabricante do o kit de *QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit*.

4.14.1.2 Amplificação e purificação do pUAS_t

O plasmídeo pUAS_t utilizado, também disponível em nosso laboratório e armazenado em temperatura de -80°C, passou por amplificação e purificação como descrito para o vetor *pJaz*. Apenas o antibiótico utilizado foi a ampicilina na concentração de 1 µg/ml.

4.14.1.3 Reações de restrição e preenchimento do cDNA LD24110

Para a excisão do cDNA LD24110 correspondente à isoforma *Fhos-B*, utilizamos o programa NEBcutter (disponível em: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Este programa indica os sítios e as enzimas de restrição mais adequadas para as reações de digestão. Foram selecionadas as enzimas: NruI, PstI, SalI e NarI (Invitrogen[®]). Para a digestão com as enzimas combinadas NruI e PstI foi utilizado o tampão REact[®]6, para a digestão com NarI e PstI, utilizamos o tampão REact[®]1 e na combinação das endonucleases SalI e PstI, utilizamos o tampão REact[®]6. As reações foram todas feitas à temperatura de 37°C “overnight” em bloco de aquecimento (*Boekel Scientific, tropicooler modelo 260014*).

Após a digestão, todo o volume de reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7% e iniciou-se a purificação dos fragmentos digeridos. A banda correspondente ao fragmento digerido foi purificada utilizando o kit de purificação de DNA em gel de agarose ou “kit QIAquick Gel Extraction kit” (QIAGEN[®]).

Todas as enzimas utilizadas deixam extremidades coesivas no fragmento digerido e requerem seu preenchimento para a produção de extremidades “cegas” (“blunt”) necessárias à sua posterior subclonagem no vetor pUAS_t. Para as reações de preenchimento, utilizamos a enzima DNA polimerase Klenow da empresa Promega[®], em tampão próprio seguindo as condições de reação indicadas pelo fabricante. Os períodos de incubação foram: 15 minutos a temperatura ambiente com posterior inativação da enzima a 75°C por 10 minutos.

Após o preenchimento das extremidades dos fragmentos, o volume total da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7% e as bandas correspondentes aos fragmentos foram novamente purificadas utilizando o kit QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN[®]).

4.14.1.4 Linearização do pUAST e defosforilação do pUAST

Para a linearização do vetor *pUAST*, selecionamos a enzima EcoRI (Invitrogen®) presente no “polylinker” deste vetor. A digestão foi feita a 37°C em banho seco “overnight” em tampão apropriado REact®3.

Após a digestão, procedemos a eletroforese em gel de agarose à 0,7% e como descrito anteriormente, os fragmentos isolados do gel foram purificados pelo kit QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN®). Posteriormente, os fragmentos referentes ao plasmídeo linearizado foram preenchidos com auxílio da DNA polimerase Klenow como descrito anteriormente e novamente purificados. Para evitar a religação espontânea das extremidades, o plasmídeo já linearizado e preenchido, foi defosforilado. Para a defosforilação, utilizamos a enzima CIP (Calf Intestinal Phosphatase, da New England Biolabs). Foram somados a esta enzima, o plasmídeo a ser defosforilado pUAST e o tampão fornecido pelo próprio fabricante. Como indicado, o vetor foi defosforilado por 1 hora à temperatura de 37°C em banho seco. Imediatamente após o procedimento de defosforilação, realizou-se uma nova eletroforese em gel de agarose à 0,7% e o vetor novamente foi purificado em gel utilizando o kit purificação de DNA em gel de agarose (QIAGEN®). Com tal procedimento, o vetor está pronto para ser utilizado em reações de ligação.

4.14.1.5 Ligação e plaqueamento para clonagem *pFhosB*

Para as reações de ligação utilizamos a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®) em tampão próprio (Buffer T4 DNA Reaction Ligase) seguindo as orientações do fabricante. Nas reações foram utilizadas proporções distintas entre vetor e inserto (1:1; 1:3; 1:6; 1:9; 1:12 e 1:15). Para as reações de ligação entre extremidades “cegas” ou “blunt”, a temperatura utilizada foi de 14°C “overnight”. Alternativamente foram feitas reações de ligação por períodos de uma a duas horas a 25°C.

Após as reações de ligação, 20µl desta foram submetidas à transformação bacteriana em bactéria DH5α. O antibiótico utilizado foi a ampicilina. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas e incubadas em estufa à 37° C.

Os controles de ligação e transformação utilizados foram: bactérias transformadas com o vetor pUAST “vazio”; bactérias transformadas com o pUAST linearizado submetidos ou não à religação com T4 ligase. Bactérias competentes não transformadas. As colônias formadas foram inoculadas em meio de cultura, e os plasmídeos purificados como descrito.

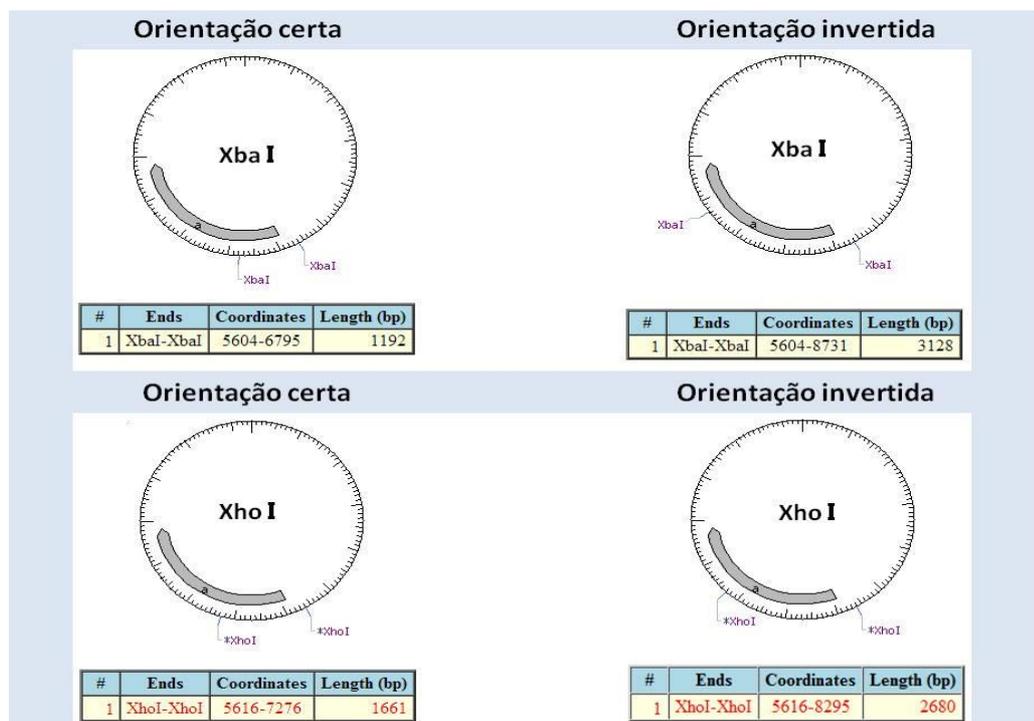


FIGURA 18 - Digestão diferencial para verificar a orientação de inserção de *Fhos*. Para verificar a presença da sequência e sua orientação, verificamos a possibilidade de utilização de várias enzimas. Após uma longa observação selecionamos as duas opções esquematizadas. Na parte superior, a enzima de utilização preferencial, XbaI, foi a que melhor atendeu os critérios, libertando porções ou “bandas” de tamanho bastante diferenciado. Como mostrado, se a orientação do inserto foi a correta, uma sequência de 1192pb será liberada; caso o inserto seja invertidamente inserido, o fragmento liberado será de 3128pb. Uma segunda opção calculada foi a enzima XhoI, com 1661pb se certo e 2680 quando a inserção é ocorrida de forma errada.

Primers utilizados		
<i>FhosA-E</i> forward	5' - CAAGCTCGAACCCCTAACCAG – 3'	
<i>FhosA-E</i> reverse	5' - GACTCATTGGCAGGTTGCTC – 3'	
Reação de PCR		
dNTP 10 mM	2µL	
Primers forward (10pM)	2µL	
Primers reverse (10pM)	2µL	
DNA plasmídeo purificado	1µL	
Tampão para polimerase	5µL	
Polimerase	1µL	
Água livre de Nuclease	q.s.p 50µL	
Condições da reação		
Passo	Temperatura utilizada	Duração
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos
Número de ciclos		33 ciclos
Desnaturação	95°C	30 segundos
Anelamento dos primers	60°C	45 segundos
Extensão (amplificação)	72°C	1 minuto
Extensão final	72°C	10 minutos

TABELA 4 - Quantidade de reagentes e condições utilizadas nas reações de PCR *FhosA-E*. Quantidade de reagentes utilizados em cada reação conforme orientado pelo fabricante. Descrito também as condições utilizadas nas reações realizadas. Foi utilizado para proporcionar a variação tempo e temperatura descritas o termociclador *PTC 200 Peltier Thermal Cycler – MJ Research*.

Para a verificação da subclonagem do fragmento referente à isoforma *Fhos-B*, foram feitas reações de PCR, nas condições descritas na TABELA 4 ou alternativamente por digestão utilizando enzimas que permitem definir se houve clonagem e em qual orientação ocorreu a inserção do inserto (FIGURA 18).

4.14.2 Construção do vetor *pFhosB-myc-tag*

Como método alternativo para a construção de vetor de expressão ectópica da isoforma ativa *Fhos-B*, utilizamos o vetor pUAS_t modificado pela presença de uma cauda (“tag”) do protooncogene c-myc, denominado pUAS_t-myc-tag que foi gentilmente cedido pelo Dr. Cheng-Yu Lee (Universidade de Michigan).

4.14.2.1 Amplificação e purificação do *pUAS_t-myc-tag*

O protocolo utilizado nos procedimentos de transformação, amplificação do plasmídeo em bactéria e purificação, foram idênticos aos utilizados para a construção do vetor *pFhos-B*.

4.14.2.2 Linearização do vetor *pUAS_t-myc-tag* e defosforilação

Para a linearização do vetor *pUAS_t-myc-tag*, foi utilizada a endonuclease EagI (New England Biolabs), em tampão fornecido pelo fabricante (NEBuffer3), em reação “overnight” à 37°C em banho seco. Após a digestão a reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose à 0,7% a “banda” correspondente ao plasmídeo linearizado foi excisada e purificada como descrito anteriormente.

O plasmídeo linearizado foi defosforilado como descrito anteriormente à 37°C em banho seco por 1 hora.

4.14.2.3 Amplificação do fragmento da isoforma B de *Fhos* utilizando PCR

Nesta segunda abordagem, o cDNA a ser clonado foi amplificado por reação de PCR de alta fidelidade, utilizando como molde o vetor *pJaz* contendo o cDNA LD24110. Na reação de PCR, utilizamos a DNA polimerase Pac5000 e as condições de reação e sequências de “primers” foram descritos na TABELA 5.

Os “primers” utilizados contém em suas extremidades a sequência do sítio de restrição da endonuclease EagI. Esta inserção facilita a posterior clonagem do produto de PCR ao vetor *pUAS_t-myc-tag*.

Primers utilizados		
(Sequência 5'- 3')		
<i>FhosEAG1 Forward</i>	5' – GACCATCGTTCTCTGGAGGA – 3''	
<i>FhosEAG1 Reverse</i>	5' – ATGACGAGTTGAAGCGCCGATGC – 3''	
Reação de PCR		
dNTP 10 mM	2µL	
Primers forward (10pM)	2µL	
Primers reverse (10pM)	2µL	
cDNA	1µL	
Tampão para polimerase	5µL	
Polimerase	1µL	
Água livre de Nuclease	q.s.p 50µL	
Condições da reação		
Passo	Temperatura utilizada	Duração
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos
Número de ciclos		32 ciclos
Desnaturação	95°C	15 segundos
Anelamento dos “primers”	60°C	30 segundos
Extensão (amplificação)	72°C	4 minutos
Extensão final	72°C	5 minutos

TABELA 5 - Quantidade de reagentes e condições utilizadas nas reações de PCR *Fhos-EagI*. Quantidade de reagentes utilizados em cada reação, conforme orientado pelo fabricante. Descrito também as condições utilizadas nas reações realizadas. Foi utilizado para proporcionar a variação tempo e temperatura descritas o termociclador *PTC 200 Peltier Thermal Cycler – MJ Research*.

Após a reação de PCR, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% e a banda correspondente ao produto de PCR (3905pb) foi purificada. O fragmento purificado foi digerido com a enzima EagI (New England Biolabs) “overnight” à 37°C em banho seco. Após a digestão o DNA foi novamente purificado.

4.14.2.4 Ligação e plaqueamento para clonagem *pFhosB-myc-tag*

As reações de ligação foram feitas como descrito nos procedimentos anteriores. Neste caso, como as extremidades do fragmento geradas pela digestão com a enzima EagI são

coesivas, a temperatura utilizada na reação de ligação foi de 25°C por uma hora. Alternativamente as mesmas temperaturas testadas anteriormente foram realizadas nestes experimentos. As bactérias DH5 α foram utilizadas para a transformação. Ampicilina foi o antibiótico usado para a seleção clonal, na concentração de 1 μ g/ml. O plaqueamento e a purificação do DNA plasmidial seguiram os protocolos anteriormente escritos para a produção de *pFhos-B*.

Utilizamos as mesmas técnicas de detecção do sucesso da clonagem. A reação de PCR e a digestão diferencial, ambas procedidas rigorosamente como descrito na verificação de clonagem de *pFhos-B*.

4.15 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE *Fhos* NA MCP DO INTESTINO-MÉDIO LARVAL DE *Drosophila melanogaster*

4.15.1 Extração de RNA total de intestino de *Drosophila melanogaster*

Para as extrações de RNA total de intestinos larvais, os animais das linhagens selvagens *Canton S* e *yellow white*¹¹¹⁸ foram coletados como pré-pupas brancas (0h AFP) e estagiados até as idades desejadas (0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h AFP). Após o estagiamento os animais foram dissecados em PBS 1X em água previamente tratada com DEPC (Diethyl Piro-Carbonato) e imediatamente homogeneizados em 200 μ l de Trizol[®]. Para cada intervalo analisado, foram explantados 8 intestinos. Os passos de extração de RNA total efetuados após a homogeneização foram os mesmos descritos para animais inteiros, no entanto, em proporções menores. Para a síntese de cDNA, nas reações de transcrição reversa, o procedimento foi idêntico ao descrito anteriormente utilizando 1 μ g de RNA total de intestinos larvais.

4.15.2 RT-PCR semiquantitativo

Para essas análises foram utilizados os “primers”, reagentes e procedimentos descritos na TABELA 6. Os “primers” *FhosA-E* amplificam uma região de 120 pares de base referente aos transcritos A-E. Entretanto é importante lembrar que foi detectado em *northern blot*, apenas o transcrito *Fhos-B* de 4,3 kb enquanto os outros transcritos teriam em torno de

5kb. O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total extraído de intestinos dissecados. Para os transcritos *Fhos*, o ponto de saturação da quantidade de DNA amplificado, ou seja, aquele em que uma banda nítida é vista após eletroforese em gel de agarose, foi de 33 ciclos, enquanto para o transcrito controle *rp49* foi de 28 ciclos.

4.15.3 PCR em tempo real

Para as análises de PCR em tempo real qRT-PCR, utilizamos o método de *Sybr Green* (Applied Biosystems®), um reagente que se intercala a cadeia DNA, emitindo uma fluorescência em comprimento de onda diferente do observado quando ele está em solução. A fluorescência detectada pelo aparelho de qPCR (7000 system SDS software Applied Biosystems), reflete o conteúdo de DNA a cada ciclo, sendo que a quantificação do sinal origina o “*Threshold Cycle*” (CT). O CT é o ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção. Quando as curvas de amplificação se posicionam abaixo desse ciclo, a fluorescência é considerada somente um ruído. Quanto menor o CT, maior é a quantidade do transcrito.

Para a validação dos “primers”, foi utilizada uma mistura dos cDNAs de animais *Canton S* e *yellow white*¹¹¹⁸. Essa validação é necessária para verificar se utilizando esses “primers” a eficiência de amplificação dos transcritos em análise (*FhosA-E*) e do transcrito expresso constitutivamente (*rp49*) é próxima a 100%. Os “primers” *Fhos* e de *rp49* foram usados em qPCRs com o mix de cDNAs em 4 diferentes concentrações (1:5, 1:50, 1:500 e 1:5000). A análise de amplificação do transcrito de interesse mostrou que o “primer” específico para *Fhos* apresentou uma alta eficiência de amplificação, assim como o “primer” que detecta o gene de expressão constitutiva *rp49*. Além disso, a especificidade do sinal foi confirmada pela análise de dissociação.

Com base nos CTs obtidos com cada diluição do cDNA, determinou-se que a diluição mais adequada, onde cada curva de amplificação estivesse na taxa de 25 a 30 ciclos, foi a diluição de 1:5. A quantificação dos mRNAs foi feita utilizando-se o método do CT comparativo disponível no *User Bulletin #2 Applied Biosystems*®. Os CTs de *rp49* foram subtraídos dos valores obtidos para o transcrito avaliado, obtendo-se o Δ CT, que corresponde aos valores normalizados.

Como calibrador para a análise do padrão de expressão de *Fhos*, foi utilizado o cDNA proveniente do RNA de animais selvagens, ou da idade de 0h de cada linhagem

analisada. O ΔCT do calibrador foi subtraído dos ΔCT s de cada linhagem, obtendo-se o $\Delta\Delta CT$. Calculou-se a média dos $\Delta\Delta CT$ e o erro padrão de 3 quantificações.

Primers utilizados		
Primer	Sequência de 5' – 3'	
<i>FhosA – E Fw</i>	5' – CAA GCT CGA ACC CTA ACC AG -3'	
<i>FhosA – E Rv</i>	5' – GAC TCA TTG GCA GGT TGC TC -3'	
<i>rp49 Fw</i>	5' – TCG ACA ACA GAG TGC GTC GC -3'	
<i>rp49 Rv</i>	5' – TCG AAC GTC CGG -3'	
Reação de PCR		
<i>Primer forward (10μM)</i>	1 μ L	
<i>Primer reverse (10μM)</i>	1 μ L	
<i>cDNA molde</i>	1 μ L	
<i>PCR Master Mix (Applied Biosystems)</i>	7,5 μ L	
<i>Água livre de Nuclease</i>	q.s.p 15 μ L	
Condições da reação		
Passo	Temperatura	Tempo
Incubação inicial	50°C	2 minutos
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos
Ciclos de Amplificação (40 ciclos)		
Desnaturação	95°C	15 segundos
Anelamento dos primers e extensão	60°C	1 minuto
Extensão final	60°C	20 segundos
Desnaturação final	95°C	15 segundos

TABELA 6 - Primers e condições utilizadas nas reações de PCR em tempo real. Nessa tabela são mostradas a sequência dos “primers”, as quantidades de reagentes utilizadas em cada reação e as condições do programa utilizado no termociclador (*700 system SDS Software Applied Biosystems*). No primeiro estágio dessa reação de PCR é realizada uma incubação inicial à 50°C por 2 minutos, o qual é adicionado ao programa antes da ativação da *DNA polimerase*. Durante este estágio, a enzima *Uracil N-glicosilase (UNG)* remove uracilas de dUMP incorporados em qualquer molécula contaminante, deixando sítios apirimídicos. Durante o próximo passo de ativação da *DNA polimerase* (10 minutos à 95°C) a enzima UNG é inativada e moléculas contaminantes são destruídas. Nos passos subsequentes (40 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos / anelamento dos “primers” e extensão à 60°C por 1 minuto), apenas ácidos nucleicos específicos serão amplificados.

4.16 EXPRESSÃO ECTÓPICA E SISTEMA UAS-GAL4 EM *Drosophila*

O sistema de expressão “bipartido” UAS-GAL4, é uma ferramenta muito valiosa disponível na *Drosophila*, sendo amplamente utilizada. GAL4 é um potenciador utilizado em muitos organismos transgênicos (White-Cooper, 2012). O gene GAL4 codifica uma proteína de 881 aminoácidos e foi identificada como um fator de transcrição induzido pela presença de galactose em *Saccharomyces cerevisiae* (Laughon e Gesteland, 1984).

Nesse sistema bipartido a expressão de um gene de interesse é controlada pela presença de um elemento “Upstream Activating Sequence “ (UAS), formado por 5 sequências

repetitivas. O gene de interesse é clonado a jusante (ou a 3') dos locais de ligação do fator de transcrição exógeno. No caso do sistema UAS-GAL4, a proteína GAL4 é o fator de transcrição exógeno, FIGURA 19. Isto nos proporciona vantagens significativas, possibilitando um relativo controle espacial e temporal para o sistema de expressão ectópica (White-Cooper, 2012).

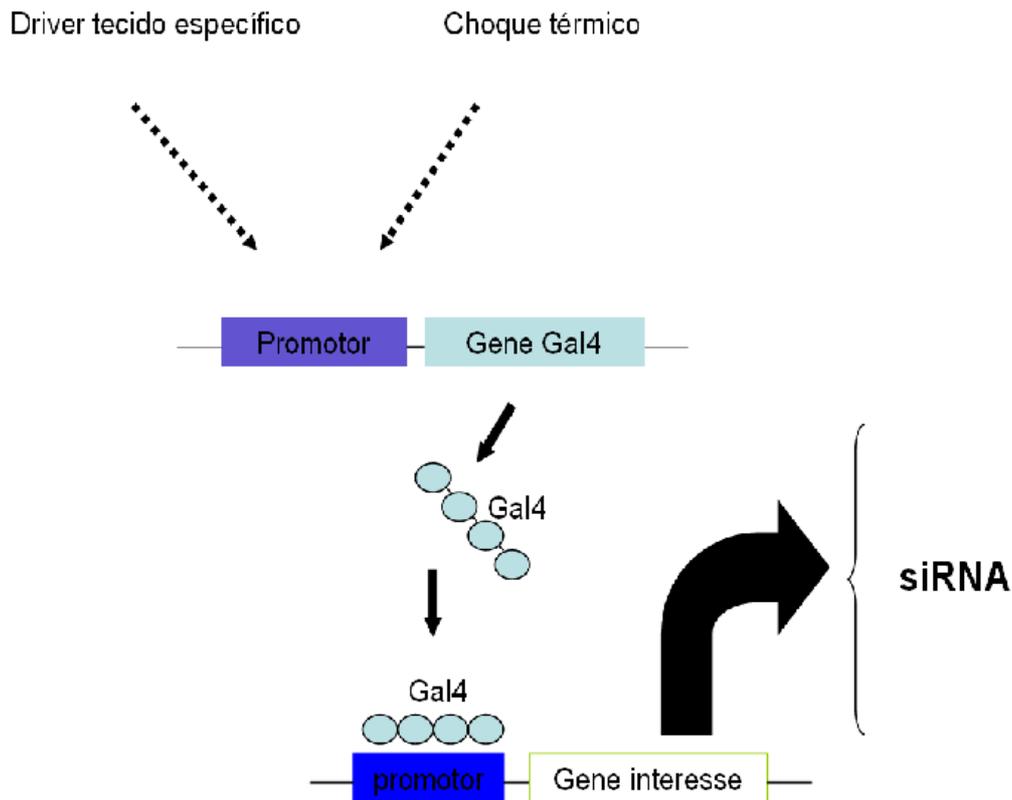


FIGURA 19 - Esquema demonstrando de forma simplificada o sistema bipartido UAS-GAL4. A produção da proteína GAL4 é desencadeada utilizando a regulação de um determinado promotor, por exemplo: um gene expresso dirigido especificamente em um determinado tecido ou com expressão relacionada ao choque térmico. Por tratar-se de uma construção transgênica, este promotor não transcreve o produto do seu gene e sim o fator de transcrição GAL4 de levedura. Em outra região gênica, presente em outra construção, está a região UAS que é regulada pela ligação de GAL4. Quando a proteína GAL4 torna-se disponível no núcleo celular, ela promove a produção do gene de interesse que foi clonado a jusante desta região reguladora.

4.17 CRUZAMENTOS PARA A INDUÇÃO DE GFP E TRANSGENES

Para a padronização dos ensaios funcionais utilizando linhagens transgênicas, baseadas no sistema UAS-GAL-4, inicialmente analisamos a expressão da proteína reporter “green fluorescent protein” (GFP) induzida por choque térmico (*Hs-GAL4*) e por “driver” específico para intestinos embrionários e larvais *drm-GAL4*.

4.17.1 Cruzamentos teste para a indução de GFP com o “driver” de intestino *drm-GAL4*

Este “driver” foi utilizado por expressar a proteína GAL4, de forma específica no intestino. O cruzamento de padronização foi feito utilizando: fêmeas virgens com construção UAS-GFP e machos com a construção *drm-GAL4* expressando no intestino larval. Para os cruzamentos controle, utilizamos fêmeas virgens da linhagem UAS-GFP cruzada com macho da linhagem *Yellow White*, que corresponde ao “background” genético no qual essas linhagens foram construídas.

A progênie era estagiada até o período de pupa branca (0h AFP), e uma hora após eram coletadas e dissecadas. Os intestinos explantados foram analisados sob estereomicroscópio (Leica), acoplado a luz ultravioleta e câmara de aquisição de imagens para induzir a fluorescência e analisar a expressão de GFP.

4.17.2 Cruzamentos teste para a indução de GFP por choque térmico (*Hs-GAL4*)

Para a ativação de GFP por choque térmico, foram realizados cruzamentos entre fêmeas *UAS-GFP* virgens e machos contendo a construção *Hs-GAL4*. Esta linhagem utiliza de um promotor de *Hsp70* para a indução de GAL4 por elevação da temperatura corporal. Como cruzamento controle, utilizamos fêmeas da linhagem UAS-GFP cruzadas com machos da linhagem *Yellow White* (“background” genético da construção).

Para a padronização da melhor temperatura e duração dos choques térmicos, foram feitos vários experimentos utilizando as temperaturas: à 25°C, com 28°C por 2h e 6h, também com 30°C por 2h e 6h, à 33°C por 2h, também à 35°C por 2h e 6h; e por fim, observamos por 37°C também por 2h e 6 horas.

Após os cruzamentos, a progênie contendo as construções foram colocadas em frascos contendo a comida corada com azul de bromophenol (como descrito anteriormente) para a distinção de três etapas do desenvolvimento de larvas de terceiro estágio (L3): -18h, -8h e -2 horas antes da formação do pupário. As larvas com aproximadamente -2h e -8h foram separadas e submetidas aos choques térmicos e períodos descritos acima.

Após o choque, as larvas foram observadas em estereomicroscópio (Leica) acoplado a luz ultravioleta e câmara de aquisição de imagens para induzir a fluorescência e analisar a expressão de GFP.

4.17.3 Cruzamentos para análise funcional de *Fhos* durante a MCP do intestino médio larval

Como primeira análise funcional de *Fhos* na MCP dos intestinos larvais, inicialmente induzimos o transgene contendo uma construção de RNAi da linhagem 19-11C produzida em nosso laboratório e capaz de diminuir a transcrição de *Fhos* em 85%, como demonstrado por Anhezini, 2011. As induções foram feitas como descrito anteriormente para GFP, por choque de temperatura e por “driver” de intestino. Como controles do cruzamento, foram utilizados animais contendo apenas o transgene.

Após os choques de temperatura ou indução por *drm-GAL4*, os animais foram estagiados por 12 horas AFP e processados para a produção de secções histológicas em parafina e coloração com HE (hematoxilina e Eosina). As pupas foram estagiadas, coletadas e removidas do envoltório pupal (“pupal case” ou cutículas). Posteriormente, foram fixadas em FAAG (EtOH a 80%, formaldeído a 4%, ácido acético glacial a 5% e glutaraldeído a 1%) e então processadas histologicamente seguindo o protocolo padrão para inclusão em parafina. Após este processamento, foram feitas secções longitudinais de 7,5 µm de espessura, que posteriormente foram coradas por hematoxilina e Eosina e analisadas.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE *IN SILICO* DA LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO EXÔNICA DO TRANSCRITO *Fhos-C*.

No início do presente trabalho, os produtos descritos para o gene *Fhos* eram apenas os transcritos *Fhos-A*, *Fhos-B* e *Fhos-C*. Dentre as três, *Fhos-C* foi a última a ser anotada. A isoforma *Fhos-B* foi considerada como a fisiologicamente ativa, sendo expressa em diferentes tecidos e em distintos processos: tecidos em MCP e tecidos em diferenciação. *Fhos-A* mostrou-se expressa apenas em adultos. (Anhezini *et al.*, 2012; Saita, 2008; Anhezini, 2011). A isoforma *Fhos-C*, não foi detectada em *northern blots* (Anhezini *et al.*, 2012). Porém, a anotação desta isoforma nos chamou a atenção, principalmente por apresentar uma maior extensão (aproximadamente 8,3 kb, enquanto as isoformas A e B possuem 5kb e 4,6kb respectivamente) e codificar um potencial polipeptídeo de 2511 aminoácidos.

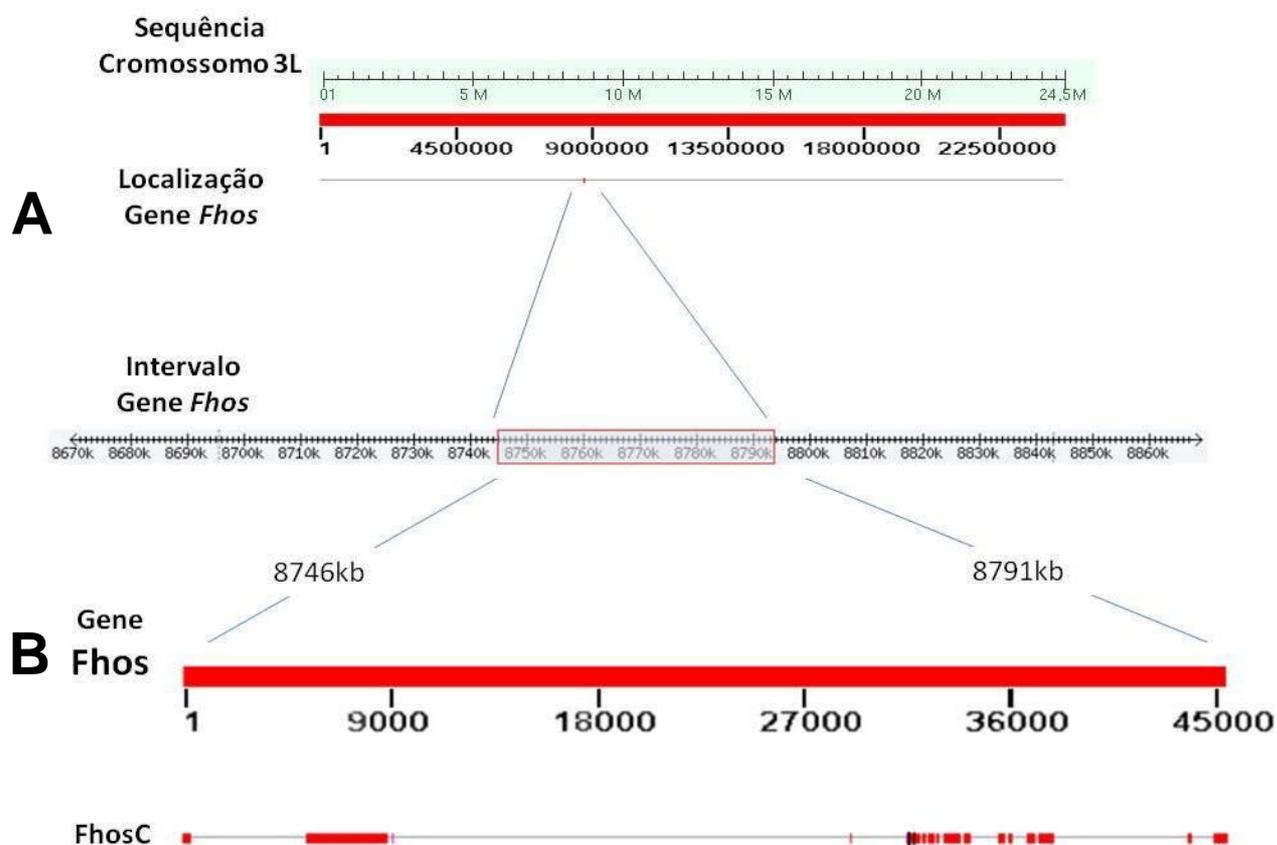


FIGURA 20 – Localização e distribuição dos exons do transcrito *Fhos-C*. A - Localização do locus *Fhos* na sequência do cromossomo 3L de *Drosophila melanogaster*. B - Esquema representando a sequência do gene *Fhos* e a sequência de um de seus transcritos, *Fhos-C*. Ambas as sequências utilizadas nesta abordagem foram obtidas através do banco de dados *Flybase*. Os presentes “Outputs” foram obtidos através da utilização do programa BLAST.

Iniciamos nossa caracterização *in silico*, utilizando a ferramenta BLASTn, com o intuito de alinhar o *locus Fhos* (anotado pelo Flybase), com o “braço” esquerdo do cromossomo três de *Drosophila melanogaster* (3L). Como esperado, houve alinhamento perfeito do *locus* num intervalo de aproximadamente 45,1kb como mostrado na FIGURA 20.

Em seguida, alinhamos a sequência de 8,3kb anotada pelo Flybase e referente à isoforma *Fhos-C*. Este alinhamento revelou a presença de 18 exons. Os três primeiros exons representam a região menos conservada entre *Fhos-C* e as outras isoformas descritas anteriormente. O primeiro exon possui um total de 325pb e está posicionado a uma distância de 525 pares de bases do início do *locus Fhos*. O segundo exon possui 3446 pb sendo o maior exon identificado na sequência. O terceiro exon é relativamente curto, possuindo 77 pares de base (FIGURA 20-B). Os demais exons pertencentes ao transcrito, localizam-se na região mais terminal da sequência do gene *Fhos*. Essa região apresenta maior similaridade com outras isoformas, como descrito a seguir (FIGURAS 20 e 21; TABELA 7).

Exons	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nucleotídeos	325	3446	75	109	58	184	223	221	259

Exons	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Nucleotídeos	137	722	201	366	146	338	715	226	598

TABELA 7 – Composição da quantidade de nucleotídeos dos exons *Fhos-C*. Tabela contendo a relação dos 18 exons do transcrito *Fhos-C* e sua respectiva quantidade de nucleotídeos formadores do exon.

5.2 ANÁLISE *IN SILICO* DA SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA DOS TRANSCRITOS *Fhos* E *Fhos-C*

Novamente utilizando a ferramenta BLASTn, alinhamos a isoforma *Fhos-C* com as outras isoformas descritas e depositadas no Flybase. Lembrando que durante o curso deste trabalho houve adição e eliminação de isoformas anteriormente depositadas no banco de dados. Como mostrado na FIGURA 21, podemos notar que a região de maior identidade entre as isoformas ocorre na metade à 3` dos transcritos (região correspondente a porção C-terminal após tradução). Outro ponto importante a ser observado é a ausência de “gaps” entre essas três isoformas.

Quando comparamos a isoforma *Fhos-C* com os transcritos *Fhos-D*, *Fhos-E* e *Fhos-F*, observamos um alinhamento significativo na região 3' de *Fhos-C*. Porém, existe a presença de um “gap” ocupando posições muito próximas nessas isoformas, sendo variáveis em tamanho, respectivamente 614pb, 151pb e 132pb. Já a isoforma *Fhos-G*, possui um “gap” em local distinto das outras isoformas de 2597pb de extensão.

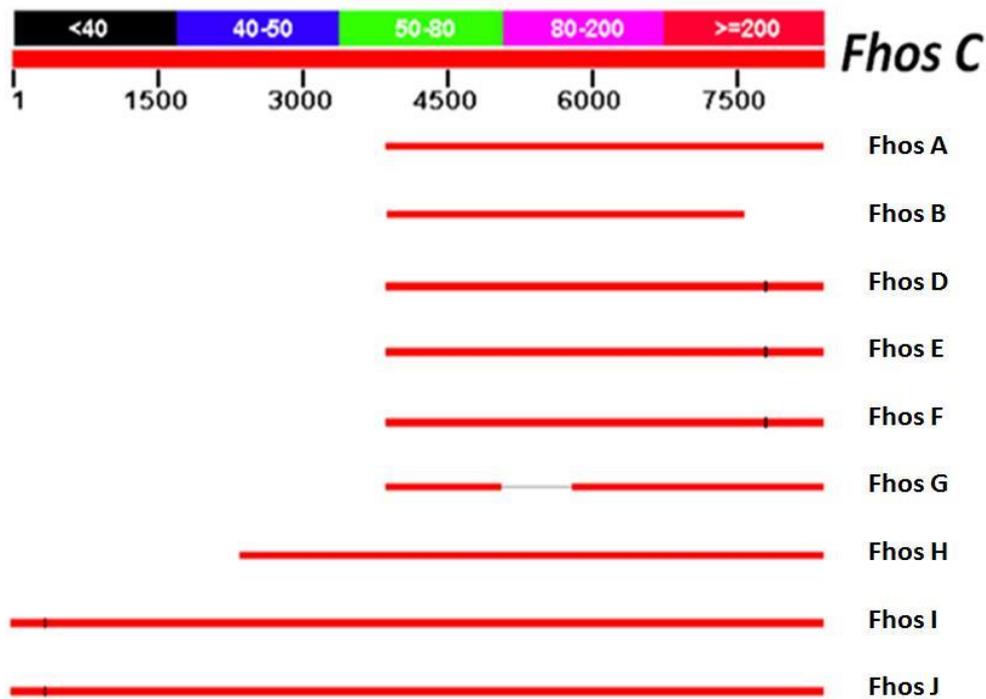


FIGURA 21 - Alinhamento entre as sequências dos transcritos do gene *Fhos* e o transcrito *Fhos-C*. O presente “output” foi gerado pelo programa de bioinformática BLAST, após alinhamento das sequências dos transcritos de *Fhos* disponíveis no banco de dados Flybase. O alinhamento mostrou grande identidade entre os transcritos comparados. A barra indicada para *Fhos-C* possui a representação gradual em pares de base e a barra superior colorida apresenta legenda em cores para o “score” de identidade.

Interessantemente, as últimas três isoformas anotadas para o locus: *Fhos-H*, *Fhos-I* e *Fhos-J*; são maiores que as anteriormente descritas. As diferenças identificadas estão localizadas nas regiões 5' dos transcritos. Dentre essas isoformas, *Fhos-I* e *Fhos-J* apresentam maior similaridade de sequência com *Fhos-C*, como descrito a seguir.

5.3 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS ANOTADAS PARA OS TRANSCRITOS *Fhos-I*, *Fhos-J* E *Fhos-C*

Neste alinhamento utilizamos as ferramentas BLASTn e ClustalW para o alinhamento dos transcritos *Fhos-C*(8393pb), *Fhos-I* (8968pb) e *Fhos-J* (8444pb). Como

banco de dados do NCBI. Normalmente essas buscas apresentam uma quantidade muito grande de seqüências de similaridade. Como esperado, a maioria dos “alinhados” trata-se de alinhamentos com seqüências cromossômicas de *Drosophila*, entre as isoformas de *Fhos* e outras forminas de *Drosophila*. Porém, de forma interessante, também nos mostrou uma grande identidade com a seqüência genômica do gene *desert* predito em *Drosophila melanogaster*.

Esta grande seqüência de identidade foi confirmada através de um novo alinhamento utilizando BLASTn na qual utilizamos a seqüência genômica do gene *desert* (11,8kb) e a mesma região descrita acima, região de 3,5kb de *Fhos-C* (FIGURA 23–A). O gene *desert* está anotado no banco de dados do NCBI e também está localizado no cromossomo 3L. Coincidentemente, *desert* ocupa uma posição adjacente ao gene *Fhos* (FIGURA 23-B).

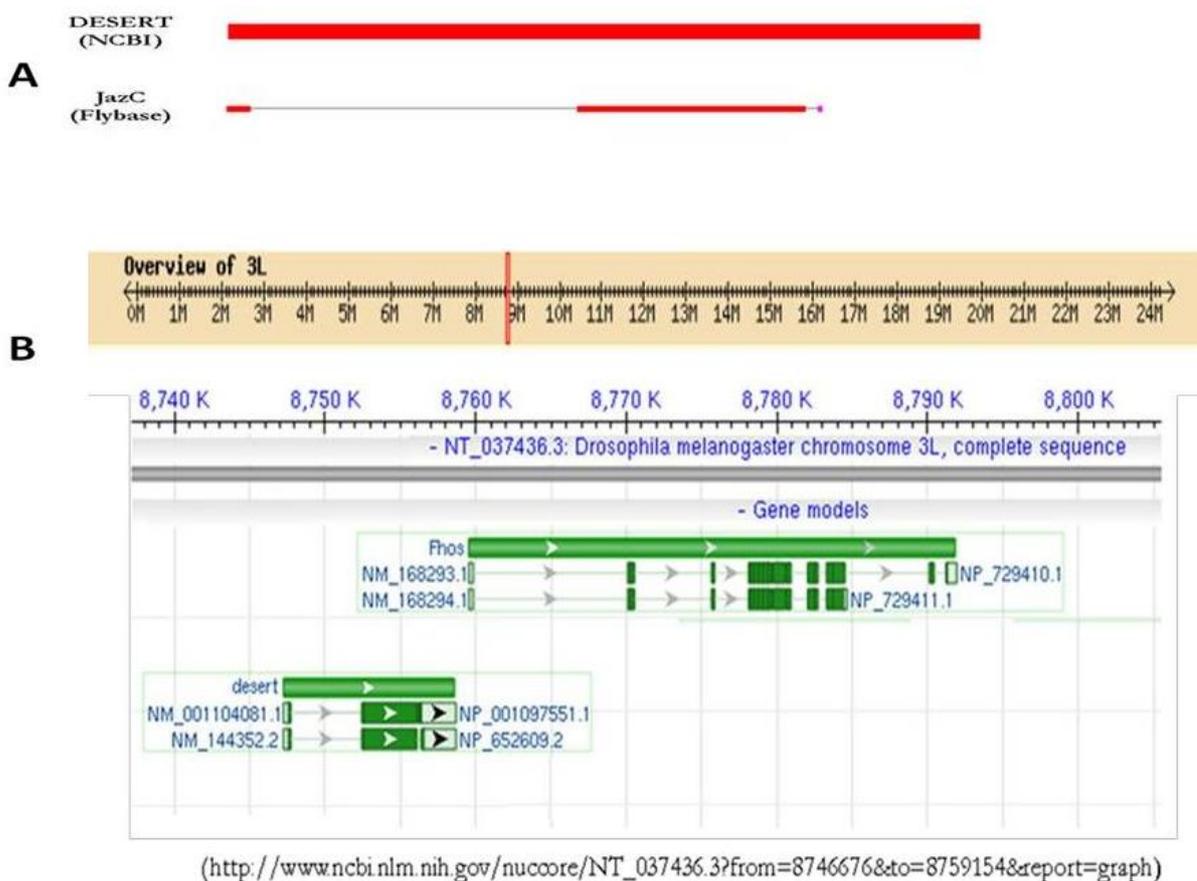


FIGURA 23 - Localização dos genes *Fhos* e *desert*. A – Representação gerada a partir do resultado de alinhamento utilizando o programa BLAST, demonstra o alto grau de similaridade obtido a partir da comparação entre as seqüências dos genes *desert* (seqüência disponível no banco de dados do NCBI) e os exons iniciais do transcrito *Fhos-C* (disponível no banco de dados Flybase). B – Figura representando a posição dos genes *Fhos* e *desert*, no cromossomo 3L de *Drosophila melanogaster*.

Durante a análise, identificamos uma divergência das anotações desta região entre os bancos de dados NCBI e Flybase. Com base nesta observação realizamos um novo alinhamento entre as seguintes sequências de nucleotídeos: *locus Fhos* anotado no banco Flybase (45,1kb), a sequência *Fhos* do banco de dados NCBI (*Fhos* NCBI 33,5kb) e o gene *desert* disponível no NCBI (11,8kb). O resultado mostrou uma aparente fusão entre os genes *desert* e *Fhos* por parte do banco de dados do *Flybase* (FIGURA 24).

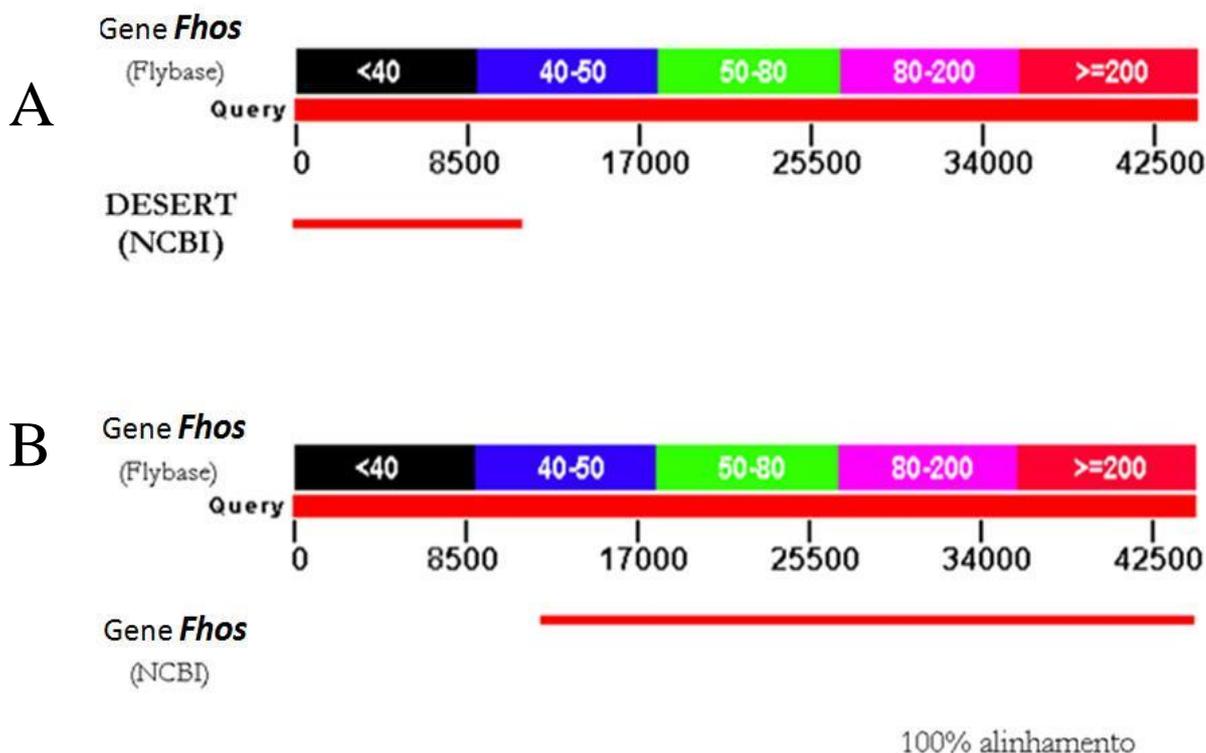


FIGURA 24 - Divergência entre anotações do gene *Fhos*. Alinhamento utilizando a sequência gênica do gene *Fhos* em dois bancos de dados distintos. A sequência superior em ambos os alinhamentos (representada como faixa mais espessa e contendo graduação), trata-se da sequência de *Fhos* obtida através do banco de dados Flybase. (A) nesse alinhamento a faixa inferior representa a sequência do gene *desert* pelo banco de dados do NCBI. (B) nesse a faixa inferior representa a sequência do gene *Fhos*, também disponibilizada do NCBI. Repetiu-se a faixa mais espessa justamente para tornar claro o agregamento presente na sequência disponibilizada pelo *Flybase*. Utilizou-se nesta abordagem o programa BLAST.

5.5 ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA PREDITA DA ISOFORMA *Fhos-C*

Utilizamos nesta série de experimentos a anotação da sequência de aminoácidos predita para o transcrito *Fhos-C*. Esta sequência foi disponibilizada pelo banco de dados Flybase.

5.5.1 Análise *in silico* da composição de aminoácidos, peso molecular e perfil hidropático de *Fhos-C*

Utilizamos as ferramentas disponíveis no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) para determinar o percentual dos aminoácidos que compõem a proteína e calcular o peso molecular estimado. Como demonstrado na ilustração, *Fhos-C* possui um peso molecular de 277.427,53 (FIGURA 25).

Esta análise nos mostrou que a sequência *Fhos-C* é composta por uma diversidade nos aminoácidos. Dos 10 aminoácidos mais frequentes na sequência, sete deles apresentam características polares, são eles: serina, treonina, asparagina, glutamato, lisina, arginina, aspartato. Os outros três: leucina, prolina e alanina; possuem um perfil apolar.

COMPOSITION:

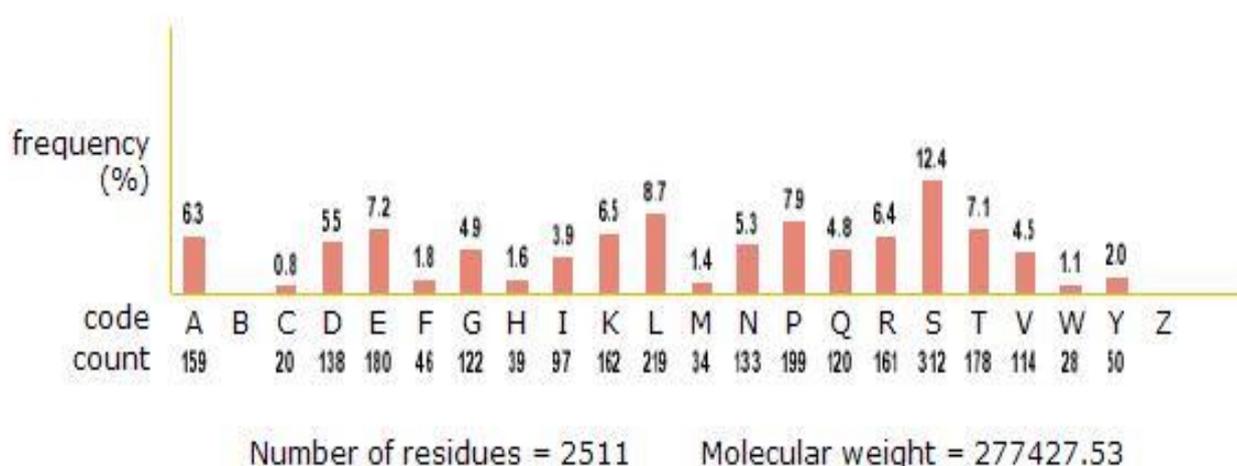


FIGURA 25 - Peso molecular predito e gráfico de composição de aminoácidos. Resultado obtido a partir de programa que calcula o peso molecular e gera gráfico mostrando a composição de aminoácidos. No eixo X, estão representados 22 aminoácidos, utilizando a indentificação de abreviação por letra. Abaixo está a quantidade do respectivo aminoácido na sequência examinada. O eixo Y nos oferece uma referência da porcentagem da frequência de cada aminoácido (disponível: http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/comp_mw.shtml).

A análise seguinte foi do perfil hidropático da sequência de aminoácidos de *Fhos-C*, utilizando o programa Kite-Doolittle (<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>). A FIGURA 26 mostra que a sequência é composta em sua grande parte por resíduos hidrofílicos. Esta característica hidrofílica é naturalmente observada em proteínas citoplasmáticas. Este resultado confere com os já observados para produtos do *locus Fhos*, e é esperado para proteínas que participam da dinâmica do citoesqueleto.

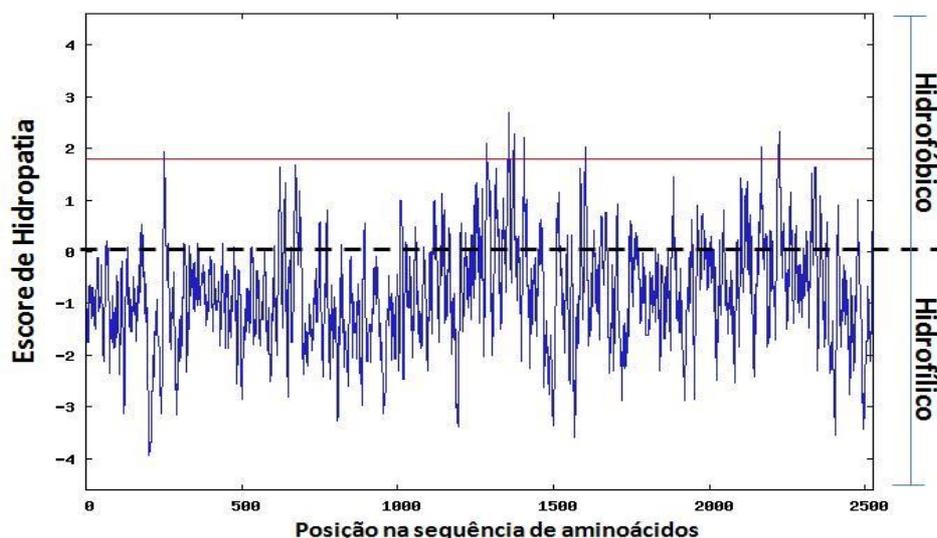


FIGURA 26 – Análise do perfil hidropático de *Fhos-C*. Resultado gerado pelo algoritmo Kite-Doolittle. O programa atribui uma pontuação de “hidrofobicidade” entre - 4,6 e 4,6. Quanto mais próximo à pontuação de 4,6 mais hidrofóbico é o composto. A linha pontilhada limita o ponto neutro de hidropatia. A linha vermelha é utilizada para estabelecer parametros para identificação de possíveis regiões transmembrana, o que não mostrou ser o caso desta sequência. Foi utilizada a sequência de aminoácidos de *Fhos-C* anotada no banco de dados Flybase.

5.5.2 Análise dos domínios preditos para sequência de aminoácidos do transcrito *Fhos-C*

Utilizamos a ferramenta de bioinformática *Interproscan* (*InterProScan Sequence Search*[®] - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). A sequência primária da proteína *Fhos-C* foi obtida mediante consulta ao banco de dados do *Flybase*.

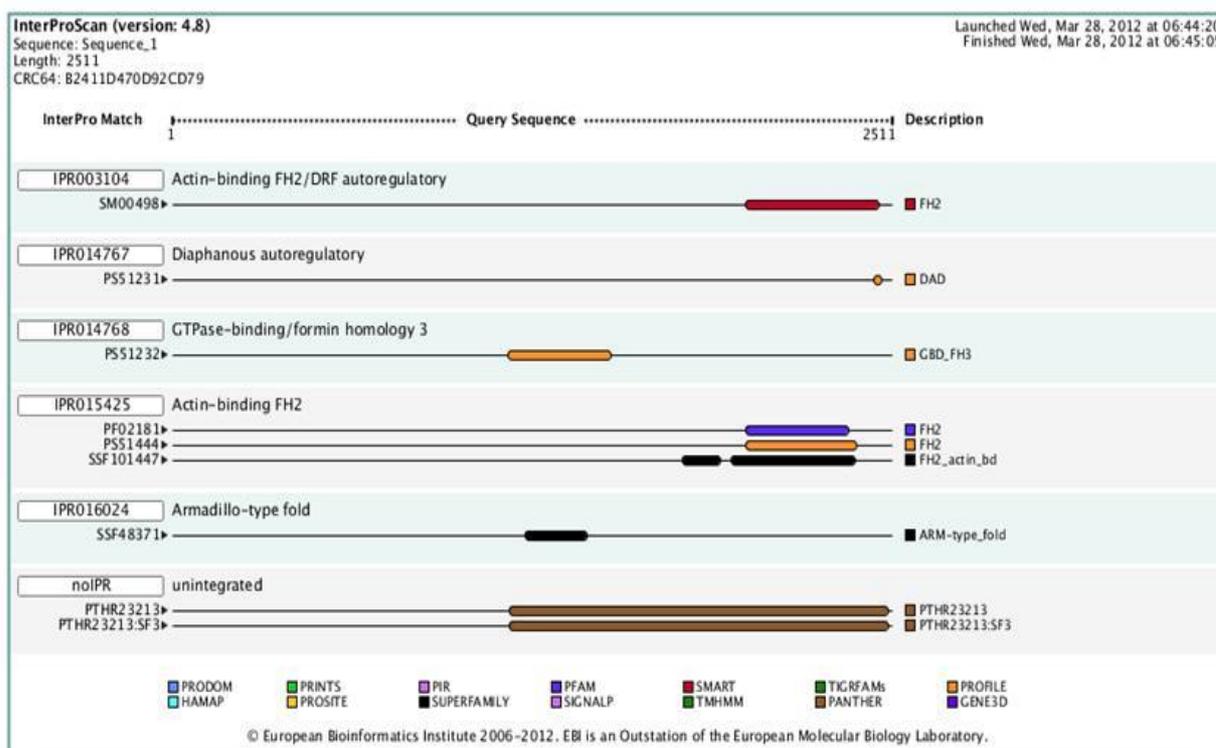


FIGURA 27 - Domínios preditos em sequência de aminoácidos de *Fhos-C*. “Output” obtido através da aplicação do programa *Interproscan*. Em destaque, a presença de domínios identificados pelo programa e sua localização na sequência da cadeia de aminoácidos submetida. Foi utilizado como base para este experimento *in silico* a sequência de aminoácidos da *Fhos-C* disponível o banco de dados Flybase.

Foi possível identificar na sequência de aminoácidos a presença de domínios característicos da família das proteínas forminas (FIGURA 27). Todos os domínios identificados e descritos a seguir estão localizados mais próximo da porção C-terminal da sequência. Como mostrado na figura, ocorreu à identificação do domínio FH2, que é característico da família das proteínas forminas. Também foram identificados: os domínios autoregulatórios de Diaphanous ou “diaphanous autoregulatory domain” (DAD), o domínio ligante de GTPase ou “GTPase binding domain” (GBD). Consta também no “output” o domínio “armadillo”. Este domínio é composto por uma estrutura super-helicoidal e tem como característica a capacidade de interagir com múltiplos parceiros proteicos (Figueroa *et al.*, 2009).

Com o objetivo de refinar este estudo, ainda utilizando o *Interproscan*, realizamos a mesma abordagem utilizando agora somente os primeiros 1250 aminoácidos (ou N-terminais) dos 2511 da anotação de *Fhos-C* (FIGURA 28). Esta sequência dos 1250 aminoácidos iniciais é exclusiva das isoformas maiores (*Fhos-C*, *Fhos-I* e *Fhos-J*). O resultado obtido foi o mesmo, nenhuma similaridade de acordo com os parâmetros utilizados pelo programa.

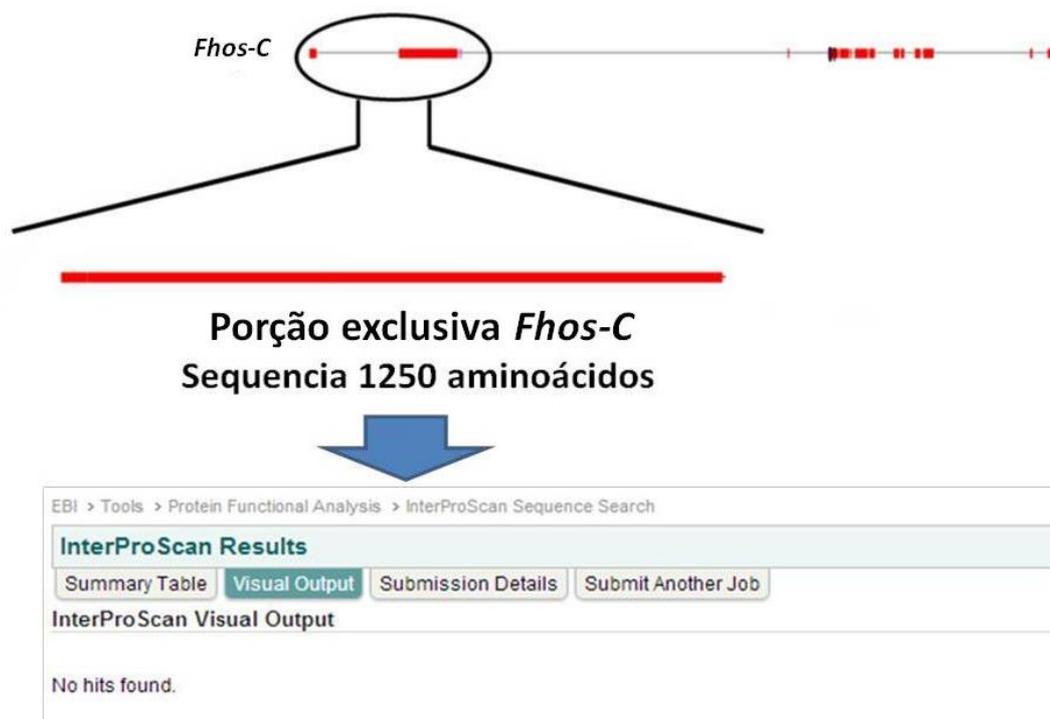


FIGURA 28 - Investigação da presença de domínios em porção N-terminal de *Fhos-C*. O círculo presente na figura indica a porção exclusiva de *Fhos-C* (codifica os 1250 primeiros aminoácidos N-terminais). Logo abaixo, apresenta-se uma barra de cor vermelha, ilustrando a sequência de aminoácidos codificada pela região destacada. Na parte inferior da figura, o resultado gerado pelo programa *Interproscan*, mostrando o não reconhecimento de domínios específicos na porção examinada. A sequência utilizada foi retirada do banco de dados *Flybase*.

5.5.3 Análise *in silico* da homologia da sequência de aminoácidos codificada pelo transcrito *Fhos-C*

Através do programa BLASTp, promovemos uma análise da homologia *Fhos-C* e sequências anotadas no citado banco de dados. Como resultado deste alinhamento, o programa nos forneceu 172 “alinhamentos” e gerou representativamente em seu resultado um esquema das 100 sequências de maior pontuação (FIGURA 29).

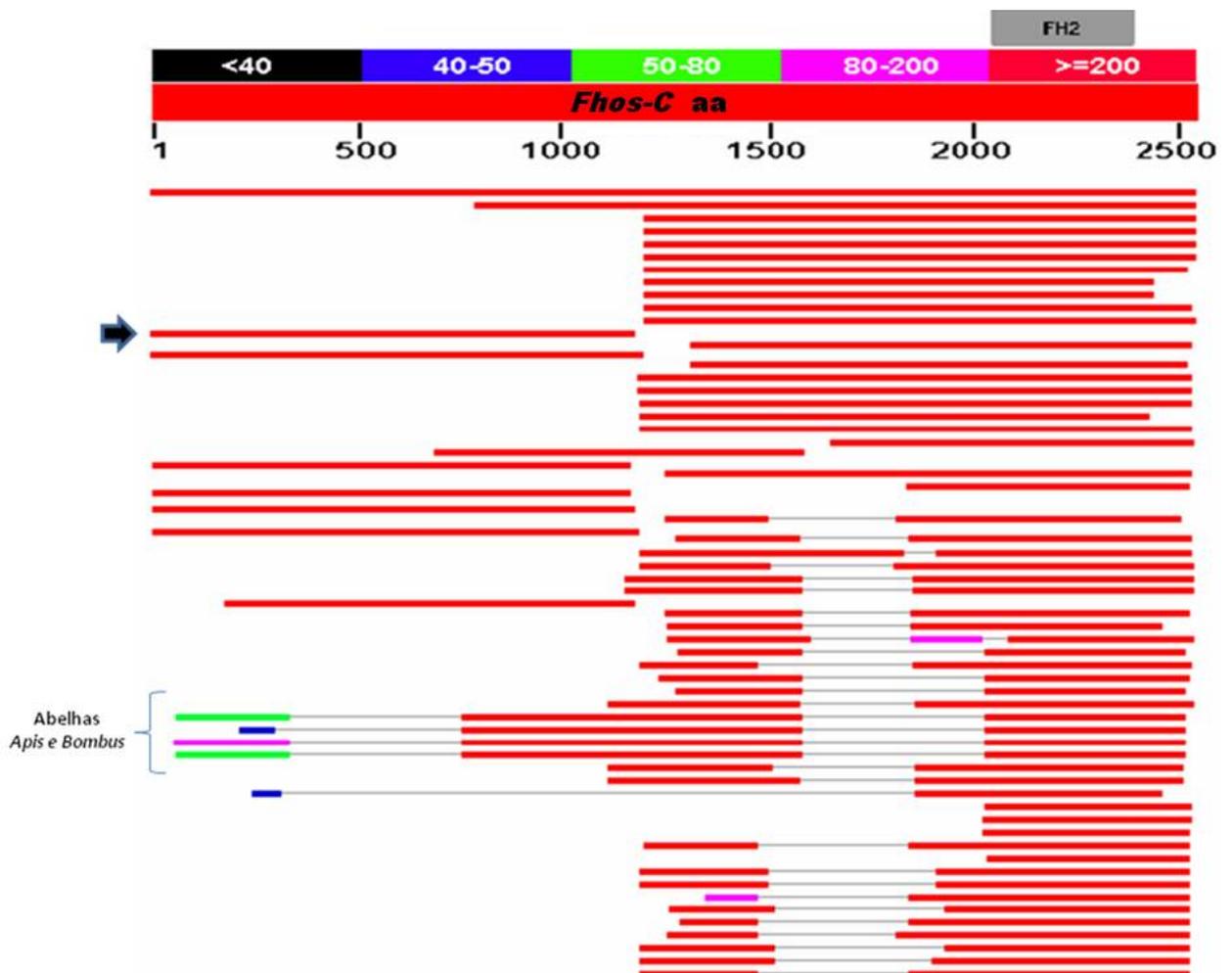


FIGURA 29 – Homologia da sequência de aminoácidos de *Fhos-C*. Alinhamento gerado pelo programa BLASTp utilizando a sequência de *Fhos-C* anotada no Flybase e sequências presentes no banco de dados NCBI. A localização do domínio FH2 está representada em cinza na parte superior da ilustração, junto à representação da sequência de aminoácidos *Fhos-C*. A seta à esquerda da ilustração aponta a localização da representação da sequência do produto *desert*. Em destaque, encontra-se indicação dos transcritos preditos para abelhas.

Conforme demonstrado nos resultados anteriores, as maiores semelhanças encontram-se nas porções próximas à extremidade carboxi-terminal. Justamente na região onde encontram-se os domínios característicos das forminas, dentre eles o domínio FH2 (FIGURA 29).

Como esperado, além das forminas pertencentes a *Fhos*, foram identificadas pelo programa uma grande quantidade de sequências de outras forminas. Dentre estas forminas, destacaram-se por apresentar uma grande representatividade de homologia de sequência a sub-família *FHOD* (formin homology 2 domain containing), mais precisamente as *FHOD 3*.

O resultado mostra que estas, possuem homologia em diversos organismos, como por exemplo: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Orcinus orca*, *Felis catus*, *Papio anubis*, *Ovis aries* e outros organismos (dados não mostrados).

Ainda na porção C-terminal (FIGURA 29), foi constatado um frequente alinhamento com outras espécies de *Drosophila*, como por exemplo: *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila simulans*, *Drosophila virilis*, *Drosophila erecta*, *Drosophila majovensis*, *Drosophila ananassae* e *Drosophila grimshawi*. Para esta mesma região, foi mostrado também o alinhamento com outros insetos, com por exemplo: *Aedes aegypti*, *Anopheles darling* (mosquito prego), *Tribolium castaneum* (Besouro marrom), *Acromyrmex echinator* (formiga carregadeira), *Megachile rotundata* (abelha europeia), *Solenopsis invicta* (formiga de fogo), *Culex quinquefasciatus* (mosquito hematófago), *Harpegnathos saltator* (formiga saltadora) e *Daphnia pulex* (pulga de água).

Dentre as sequências que apresentaram homologia na região específica *Fhos-C* (N-terminal), foram listadas principalmente espécies de *Drosophila*: *Drosophila erecta*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila yakuba*, *Drosophila simulans*, *Drosophila ananassae* e *Drosophila persimilis*. Entre as sequências alinhadas com a região N-terminal, destaca-se a sequência de aminoácidos anotada como produto de *desert* de *Drosophila melanogaster*. Esta é composta por uma sequência de 1178 aminoácidos (anotação no GenBank: AAF34753.1) e tem seu alinhamento exclusivamente com a região menos conservada de *Fhos-C*. Nenhuma função foi atribuída a esse gene predito.

Algumas sequências com menor “pontuação” e alinhamento em ambas as extremidades (N- e C-terminal) podem ser observadas, dentre elas destacam-se as proteínas preditas de: *Bombus impatiens* (uma abelha encontrada no leste e sudeste Americano), *Apis mellifera*, *Apis florea* (abelha de pequeno porte do sudeste Asiático), *Bombus terrestris* (Abelha europeia); todas destacadas nesta ordem na FIGURA 29. Também com características semelhantes, está a sequência predita de *Pediculus humanus* (uma espécie de piolho que infesta o corpo humano), sequências essas que devem representar forminas uma vez que possuem o domínio marcador de forminas o FH2 (FIGURA 29).

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DA ISOFORMA *Fhos-C* DURANTE O DESENVOLVIMENTO

5.6.1 Transcrição da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento embrionário e larval inicial

As amostras de RNAs totais de embriões foram utilizadas em reações de RT-PCR semiquantitativo, com o objetivo de determinar a presença do transcrito em diferentes estágios do desenvolvimento como descrito em material e métodos.

Durante a embriogênese, conforme podemos observar na FIGURA 30, foi detectada a transcrição de *Fhos-C* apenas nos estágio E16. Com relação à transcrição na fase larval, foi possível detectar a expressão de *Fhos-C* apenas em amostras de larvas de primeiro estágio larval (L1). Em L2, como na maioria dos estágios embrionários, não observou-se uma amplificação significativa. Como controle do RT-PCR foi utilizada a amplificação do gene constitutivo da proteína ribossomal *rp49*.

5.6.2 Transcrição da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento de larvas no terceiro estágio e indivíduos adultos

Em seguida, analisamos o perfil de transcrição de *Fhos-C* durante o terceiro estágio larval L3. Por ser mais longo, o estágio L3 foi analisado em três momentos distintos, cujo estagiamento é feito utilizando como recurso a quantidade de alimento corado em azul presente no intestino larval, são elas: BL (“blue gut”), HBL (“half blue gut”) e CG (“clear gut”).

Como mostrado na FIGURA 31, as três primeiras amostras derivadas do RNA total de larvas no terceiro estágio, não apresentaram amplificação. Pode-se observar a amplificação do gene de referência *rp49* indicando o funcionamento da reação.

Neste experimento, analisamos conjuntamente a transcrição de *Fhos-C* em adultos divididos em: machos e fêmeas virgens ou com um dia de vida adulta, cuja virgindade não foi garantida. Observamos a transcrição em todas as amostras de adultos analisadas. Aparentemente não foi identificada uma diferença de expressão relacionada ao sexo ou de uma variação de tempo maior de vida, no caso um dia (FIGURA 31).

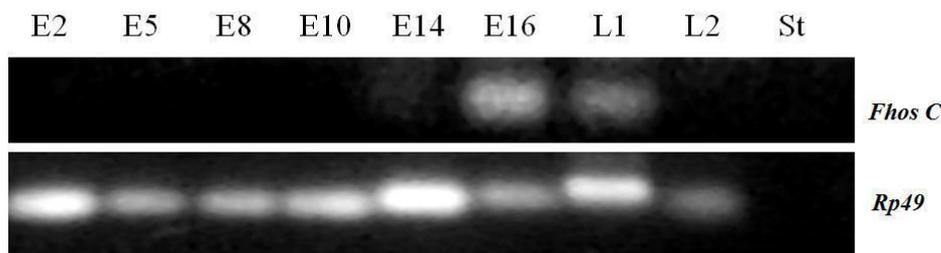


FIGURA 30 - Análise semiquantitativa do perfil transcricional da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento embrionário e larval. Foram utilizados nesta abordagem embriões e larvas (L1 e L2) da linhagem selvagem Y_w^{1118} . Estes foram estagiados, macerados e o RNA total extraído pelo método Trizol®. Síntese de cDNA feita a partir de 1µg de RNA total. O cDNA foi submetido a experimentos de RT-PCR utilizando “primers” que detectam a isoforma *Fhos-C*. Como gene de referência nos experimentos, foram utilizados “primers” específicos para o transcrito da proteína ribossomal *rp49*. Como representado na figura: E2 = Embrião em estágio 2, E5 = Embrião em estágio 5, E8 = Embrião em estágio 8, E10 = Embrião em estágio 10, E14 = Embrião em estágio 14, E16 = Embrião em estágio 16, L1 = Larva no primeiro estágio, L2 = Larva no segundo estágio e St = Reação sem “template” ou reação de controle.

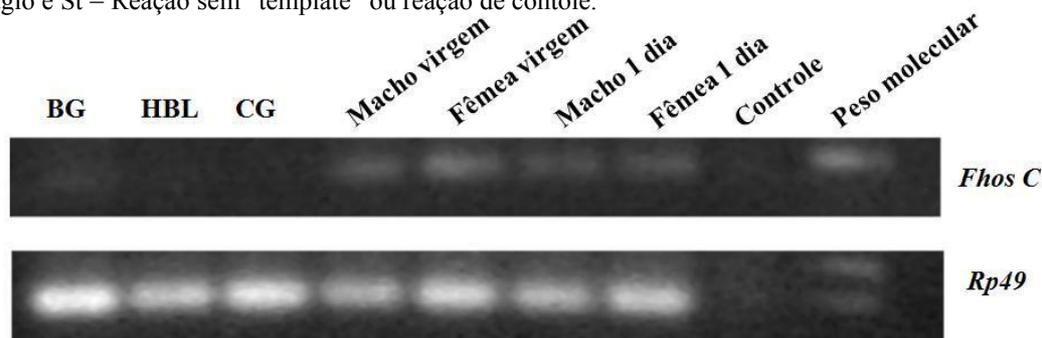


FIGURA 31 - Análise semiquantitativa do perfil transcricional da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento de larvas no terceiro estágio e indivíduos adultos. Foram utilizadas neste experimento larvas no estágio L3 e indivíduos adultos da linhagem selvagem Y_w^{1118} . Estes foram estagiados, macerados e o RNA total extraído pelo método Trizol®. Síntese de cDNA a partir de 1µg de RNA total. O cDNA foi submetido à experimentos de RT-PCR utilizando “primers” que detectam a isoforma *Fhos-C*. Como gene de referência nos experimentos, foram utilizados “primers” específicos para o transcrito da proteína ribossomal *rp49*. Conforme abreviado na figura BG = “blue gut” ou “dark blue gut”, HBL “half blue gut” e CG “clear gut”.

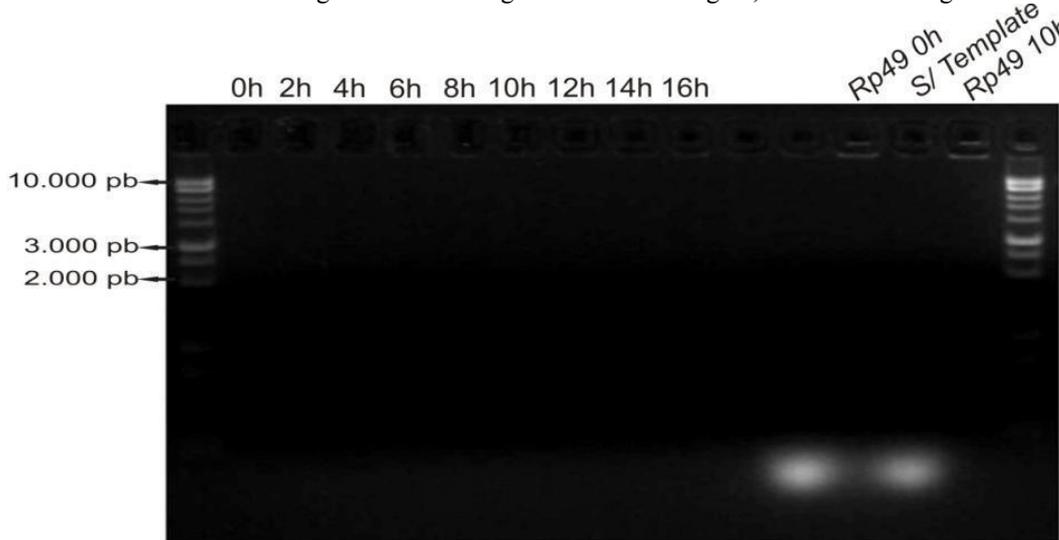


FIGURA 32 - Análise qualitativa do perfil transcricional da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento de pré-pupas e pupas. Foram utilizadas pré-pupas, da linhagem selvagem Y_w^{1118} . Estas foram estagiadas, maceradas e o RNA total extraído pelo método Trizol®. Síntese de cDNA a partir de 2,5µg de RNA total. O cDNA foi utilizado para experimentos de PCR qualitativo convencional, utilizando “primers” que detectam a isoforma *Fhos-C*. As amostras foram estagiadas de acordo com horas após a formação do pupário. Foi utilizado como controle positivo desta reação, amostras dos “templates” no período de 0 hora e 10 horas, foram utilizados “primers” de iniciação para o gene expresso de forma constitutiva *rp49*.

5.6.3 Detecção da transcrição da isoforma *Fhos-C* durante o desenvolvimento de pré-pupas e pupas

Analisamos também a presença do transcrito *Fhos-C* durante o período pupal. Conforme ilustrado na FIGURA 32, nenhuma das amostras apresentou amplificação considerável. Foram utilizadas como controle apenas duas amostras amplificadas com os iniciadores (“primers”) para amplificação de *Rp-49*. Os controles foram escolhidos dentre os seis estágios analisados para expressão de *Fhos-C* (0 hora e 10 horas). Neste mesmo período do desenvolvimento a isoforma *Fhos-B* foi identificada como ativa e participante dos processos de MCP durante a metamorfose.

5.7 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA SUPER EXPRESSÃO *Fhos-B* DURANTE A MCP DO INTESTINO MÉDIO LARVAL.

5.7.1 Construção do vetor *pFhosB*

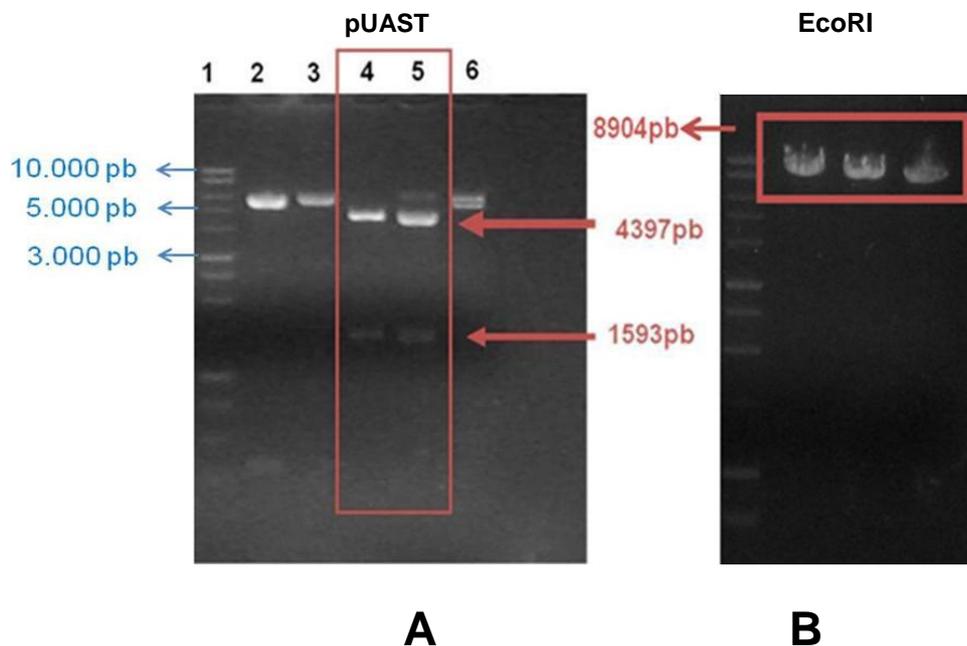


FIGURA 33 - Gel teste para excisão do fragmento completo de *Fhos-B* e linearização em gel do pUAST.
 Gel A: Testando as digestões propostas pelo programa NEBcutter, para excisar o fragmento completo de *Fhos-B* clonado no plasmídeo LD24110. Os teste número 2, utiliza a combinação *NruI* e *PstI*. O número 3, indica a digestão usando somente a enzima *SalI*. Os testados 4 e 5, utilizaram *SalI* e *PstI*, sendo a numerada 5 com a utilização do dobro de enzima (2 μ l). O último teste foi procedido com *NarI* e *PstI*. Como padrão, indicado como , marcador de peso molecular de 1kb, produzido pela *Promega*[®]. Gel B: Digestão do plasmídeo pUAST para posterior clonagem do fragmento *Fhos-B*. Reação de digestão procedida com a enzima de restrição *EcoRI*, também, marcador de peso molecular de 1kb, *Promega*[®]. Em destaque em ambas as figuras, o fragmento escolhido para a clonagem seus respectivos pesos moleculares.

Para a excisão do cDNA do transcrito *Fhos-B*, foi utilizada a combinação entre as enzimas de restrição Sall e PstI (ambas da empresa *Invitrogen*[®]). Esta combinação digere o plasmídeo LD24110 liberando o fragmento de interesse, este com o tamanho esperado de 4,4kb (FIGURA 33-A).

Para a linearização do vetor pUAST foi utilizada a enzima EcoRI, cujo sítio único está presente no “polilinker”, mostrou-se bastante eficiente nesta função (FIGURA 33-B). Após obtidos os fragmentos de interesse, foram purificados do gel, defosforilado e processados para as tentativas de clonagem como descrito em Material e Métodos .

5.7.2 Efetividade da ligação e verificação da Clonagem *pFhosB*

Os dados referentes a cada uma das tentativas realizadas estão demonstrados na TABELA 8. Não obtivemos nenhuma construção positiva para a clonagem de *pFhosB* .

Tentativas	Reação de ligação	Seleção por antibiótico		Verificação de Clonagem positiva	
	relação vetor/inserto	Número de colônias coletadas	Número de colônias que cresceram em meio líquido	PCR	Digestão diferencial
1 ^a	1:3	24	20	0	0
2 ^a	1:3	24	16	0	0
3 ^a	1:3	12	8	0	0
4 ^a	1:3	12	5	0	0
5 ^a	1:1	3	0	0	0
6 ^a	1:2	0	0	0	0
7 ^a	1:6	15	8	0	0
8 ^a	1:9	7	3	0	0

TABELA 8 – Resultados das tentativas de clonagem do fragmento *Fhos-B*.

5.8 CONSTRUÇÃO DO VETOR *pFhosB-myc-tag*

5.8.1 Amplificação por PCR do inserto *Fhos-B* e linearização do pUASTmyc-tag

Após várias tentativas, não houve clonagem do fragmento *Fhos-B* no vetor pUAST. No curso dessas tentativas, obtivemos a doação por parte do Dr. Cheng-Yu Lee

(Universidade de Michigan) de um vetor pUAST modificado, contendo a cauda “myc-tag” que permite sua diferenciação da proteína endógena e detecção bioquímica. Neste sentido, optamos por outra estratégia de clonagem para este novo vetor. Além disso, produzimos o fragmento referente ao cDNA por PCR de alta fidelidade a partir do plasmídeo LD24110. Com o intuito de facilitar a futura clonagem do fragmento amplificado, foi adicionado às extremidades dos “primers”, sítios da enzima *EagI* a qual está presente no vetor que seria também em paralelo digerido com a mesma enzima.

Como mostrado na FIGURA 34, a amplificação por PCR apresentou um fragmento do tamanho esperado de aproximados 3,9kb. Da mesma forma, o plasmídeo pUAST-myc foi linearizado com a enzima *EagI*, produzindo um fragmento de aproximadamente 9 kb após a eletroforese em gel de agarose.

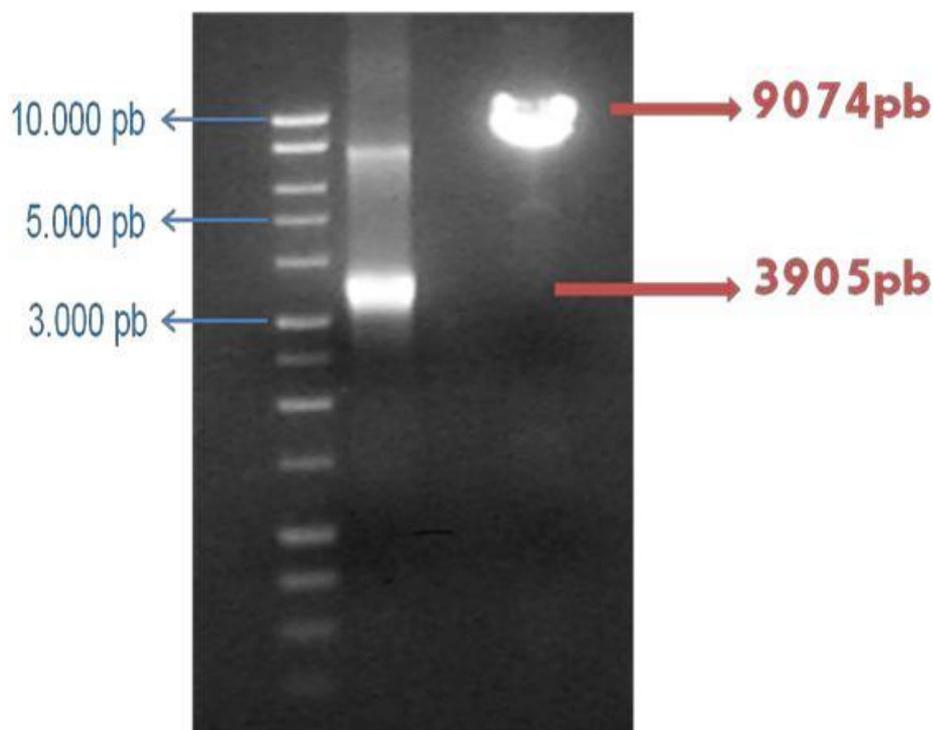


FIGURA 34 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o fragmento *FhosB* produzido pelo PCR e a linearização do vetor para clonagem *pUAST-myc-tag*. Indicado na figura com 3905pb, fragmento *Fhos-B* amplificado por reação de PCR. Também indicado, plasmídeo linearizado *pUASTmyc-tag*, linearizado com a endonuclease *EagI*. Gel de agarose a 0,7%. Marcador de peso molecular de 1kb, produzido pela *Promega*[®].

5.8.2 Efetividade da ligação e verificação da Clonagem *pFhosB-myc-tag*

Os dados referentes a cada tentativa realizada utilizando esta abordagem, foram demonstrados na TABELA 9. Nenhuma clonagem positiva foi obtida.

Tentativa	Reação de ligação		Seleção por antibiótico		Verificação de clonagem positiva	
	Relação vetor/inserto	Colônias coletadas Placa	Colônias crescimento meio líquido	PCR	Digestão diferencial	
1 ^a	1:1	0	0	0	0	
2 ^a	1:3	2	1	0	0	
3 ^a	1:9	12	7	0	0	
4 ^a	1:12	6	1	0	0	
5 ^a	1:5	7	2	0	0	
6 ^a	1:7	9	6	0	0	

TABELA 9 – Resultados das tentativas de clonagem do fragmento *pFhos-B-myc-tag*.

5.9 ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE *Fhos* DURANTE A MCP DO INTESTINO MÉDIO LARVAL

5.9.1 Análise transcricional de *Fhos* no intestino médio larval ao final do terceiro estágio larval (L3)

Analisamos através de RT-PCR semiquantitativo, a transcrição de *Fhos* em intestinos isolados em três momentos marcantes de L3. Utilizando como recurso novamente a quantidade de alimento corado presente no intestino larval, são elas BL (blue gut); HBL (half blue gut), e CG (clear gut, ver material e métodos).

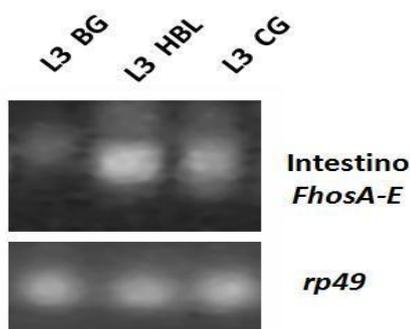


FIGURA 35 - Análise semiquantitativa do perfil transcricional de *Fhos* no intestino médio larval durante o desenvolvimento de larvas no terceiro estágio. Larvas no estágio L3 foram estagiadas, tiveram seus intestinos dissecados e o RNA total extraído pelo método Trizol®. Síntese de cDNA a partir de 1µg de RNA total. Os primers utilizados não discriminam as isoformas *FhosA-E*. Como controle e referência nos experimentos, foram utilizados “primers” específicos para o transcrito da proteína ribossomal *rp49*. Conforme abreviado na figura BG = “blue gut” ou “dark blue gut”, HBL = “half blue gut” e CG = “Clear gut”. Quantidade de reagentes e condições utilizadas nas reações de PCR *FhosA-E*, estão descritos na TABELA 4.

Como podemos observar na FIGURA 35, existe baixa transcrição de *Fhos* em intestinos larvais isolados no estágio BL (“blue gut”), este representa cerca de 18 horas antes da formação do pupário. Porém, nos outros dois estágios analisados, HBL (“half blue gut”) e

CG (“clear gut”), respectivamente 10 e 2 horas antes da formação do pupário, observamos um aumento da transcrição de *Fhos* no intestino.

5.10 ANÁLISE QUANTITATIVA DA TRANSCRIÇÃO DE *Fhos* DURANTE A MCP DO INTESTINO LARVAL

Como as análises anteriores revelaram um aumento da transcrição de *Fhos* em períodos que antecedem a MCP do intestino larval, realizamos a análise quantitativa da transcrição de *Fhos* no intestino larval por qRT-PCR (PCR em tempo real). As amostras de RNA total foram isoladas de intestinos larvais de animais selvagens das linhagens *Canton S* e *yellow white* (“background” genético das linhagens de RNAi e superexpressão) nas cinco primeiras horas da metamorfose (0-5h AFP), período esse em que efetivamente ocorre a destruição maciça do intestino médio larval.

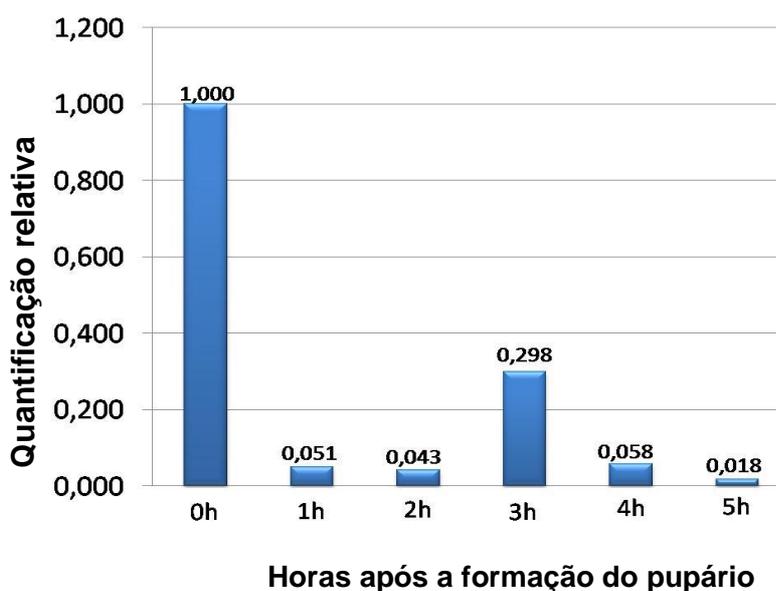


FIGURA 36 – Análise do perfil transcricional de *Fhos* durante as primeiras horas da morte celular programada do intestino médio larval. Pré-pupas de animais selvagens *Canton S* foram estagiadas, seus intestinos larvais dissecados e o RNA total coletado pelo método do Trizol[®]. Por tratar-se de extrações de RNA em menor escala procedemos a síntese de cDNA a partir de 1µg de RNA total. O cDNA foi submetido a experimentos de PCR em tempo real utilizando “primers” que detectam as cinco isoformas de *Fhos*. Como gene de referência nos experimentos de tempo real, utilizamos “primers” específicos para o transcrito da proteína ribossomal *rp49*.

Como mostrado na FIGURA 36, a expressão de *Fhos* no intestino médio larval de *Canton S* é elevada na idade de 0h AFP. No seguinte ponto observado (1h e 2h AFP), ocorreu uma considerável queda (cerca de 20 vezes em relação a 0h). Os níveis deste transcrito apresentaram um novo aumento na idade de 3h AFP. Este aumento foi seguido novamente

por uma queda significativa (cerca de 6 vezes menor) nos níveis de transcrição.

Em animais “*yellow White*” (“background” genético das linhagens de RNAi e superexpressão), a expressão de *Fhos* é bastante aumentada em +2, +3 e +4 horas AFP (Figura 37). Este período em que *Fhos* apresenta uma expressão elevada coincide com a ocorrência da morte celular programada do intestino (Jiang *et al.*, 1997). Processo MCP do intestino está ilustrado na introdução (FIGURA 7).

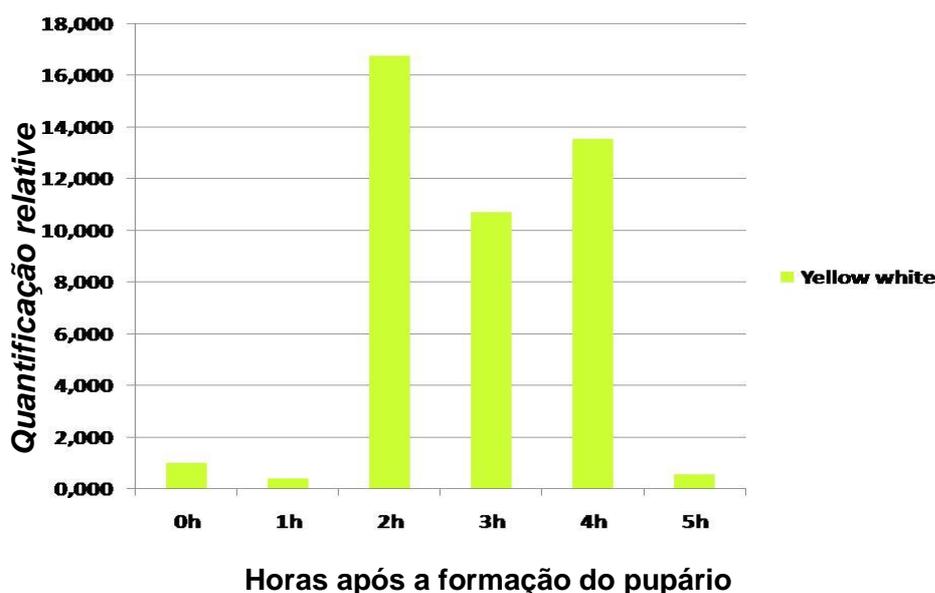


FIGURA 37 – Análise do perfil transcricional de *Fhos* durante as primeiras horas da morte celular programada do intestino médio larval. Pré-pupas selvagens *yellow white* foram estagiadas, seus intestinos larvais dissecados e o RNA total coletado pelo método do Trizol[®]. Por tratar-se de extrações de RNA em menor escala procedemos a síntese de cDNA a partir de 1µg de RNA total. O cDNA foi submetido a experimentos de PCR em tempo real utilizando “primers” que detectam as cinco isoformas de *Fhos*. Como gene de referência nos experimentos de tempo real utilizamos primers específicos para o transcrito da proteína ribossomal *rp49*.

5.11 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS FUNCIONAIS UTILIZANDO LINHAGENS TRANSGÊNICAS

Para a utilização das linhagens transgênicas (linhagens *UAS-GAL4*) em ensaios funcionais, é necessário padronizar as condições experimentais para a ativação do transgene. Em nosso laboratório, dispomos de linhagens sensíveis ao choque de temperatura (*HS-GAL4*) ou com promotores estágio e tecido-específicos (“drivers”). Estas linhagens produzem GAL4 de forma condicionada. Utilizamos para a padronização destas a ativação do transgene *UAS-GFP*. Este transgene possui como repórter para presença de GAL4, a produção da proteína fluorescente verde (GFP); ver material e métodos.

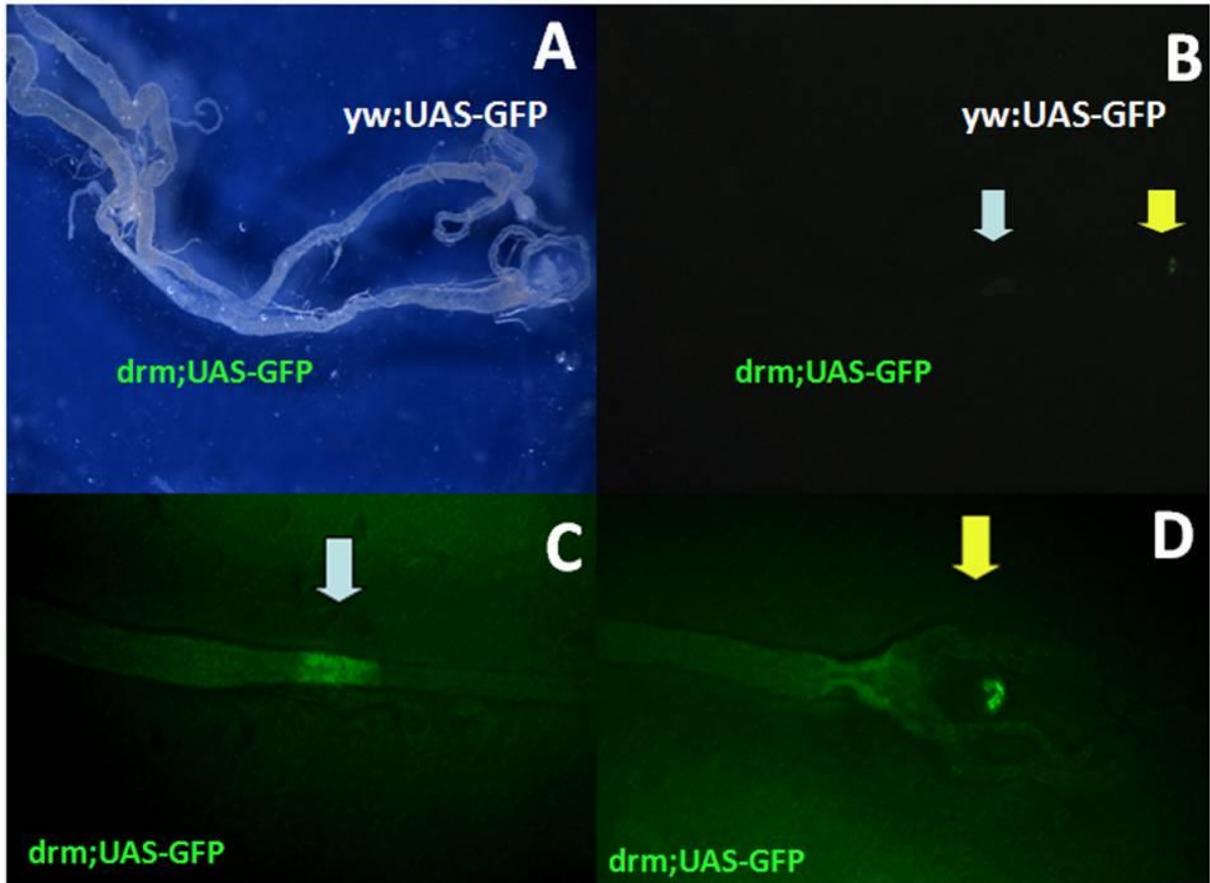


FIGURA 38 - Padrão de expressão de GAL4 produzida pelo “driver” de intestino *drm-GAL4* revelado pela expressão de GFP. Utilizamos um estereomicroscópio (Leica) acoplado a luz ultravioleta e câmara de aquisição de imagens para confirmar o padrão de expressão de GAL4 no presente “driver”. No painel A: observação em luz convencional, intestinos dissecados do cruzamento teste (*drm;UAS-GFP*) e controle de autofluorescência (*yw;UAS-GFP*). No painel B: observação dos mesmos intestinos com iluminação ultravioleta, as setas indicam os pontos observados em detalhe nos próximos painéis. No painel C: intestino do cruzamento *drm;UAS-GFP* observação em aumento da região indicada por seta branca no painel B. No painel D: observação em detalhe da região indiada por seta amarela no painel B, intestino *drm;UAS-GFP*. O cruzamento controle não apresentou fluorescência.

A FIGURA 38 mostra o padrão de expressão de GFP após sua indução com o “driver” *drm-GAL4* em intestinos explantados 1 h AFP. O citado “driver” *drm-GAL4* tem sua expressão (proteína GAL4) dirigida no intestino em diversos estágios, incluindo o estágio que compreende o processo de MCP do intestino. O painel A mostra dois intestinos em visão panorâmica, sendo um deles o controle de autofluorescência (*yw;UAS-GFP*) e o outro o experimental (*drm;UAS-GFP*). Embora sua intensidade seja baixa, foi possível identificar a indução de GFP em duas regiões específicas (painel B). O painel C demonstra a fluorescência numa região mais proximal do intestino médio, enquanto o painel D revela a expressão de GFP no proventrículo do intestino larval anterior (FIGURA 38). O intestino controle (*yw;UAS-GFP*) não apresentou fluorescência. Com base nesses resultados, consideramos que os níveis de expressão do repórter são muito baixos para que essa abordagem possa ser utilizada em ensaios funcionais com os transgenes *Fhos*.

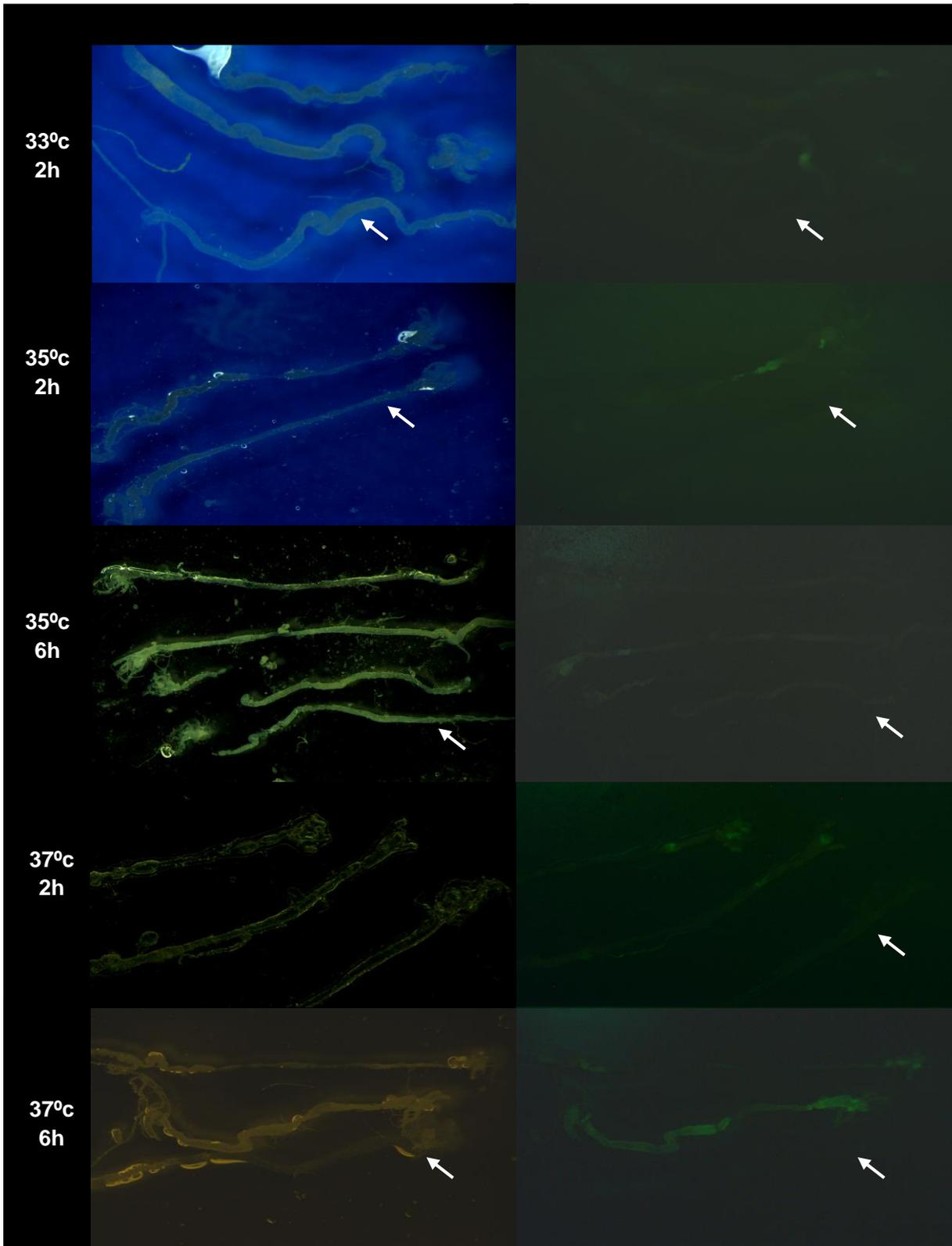


FIGURA 39 - Padrão de expressão de GFP induzida por choque de temperatura. Conforme indicado, realizamos um gradiente testando diversas combinações de tempo e temperatura. Os painéis alinhados a esquerda possuem imagem adquiridas dos intestinos dissecados utilizando luz convencional. Nos painéis alinhados a direita é mostrada a detecção da proteína GFP. Utilizamos para esta detecção um estereomicroscópio (Leica) acoplado a luz ultravioleta e câmara de aquisição de imagens. O maior nível de expressão foi obtido no choque térmico à 37°C por 6 horas. Conforme indicado por seta todos os testes possuem um intestino do cruzamento controle.

Alternativamente, utilizamos o choque térmico como indução do transgene contendo GFP (*UAS-GFP*). Para padronizar as condições mais adequadas com relação à temperatura e tempo do choque térmico e estabelecer um parâmetro de expressão na fase abordada do intestino, foram realizados vários testes. Utilizamos variações de temperatura entre 25°C e 37°C e intervalos de choque de temperatura de 2h e 6h.

Os animais progênie do cruzamento *Hs-GAL4* e *UAS-GFP*, foram estagiados, submetidos ao tratamento de choques térmico e dissecados. Os intestinos explantados foram analisados sob estereomicroscópio (Leica[®]) acoplado a luz ultravioleta e câmara de aquisição de imagens (FIGURA 39).

Como mostrado na FIGURA 39 a maior indução de expressão do repórter ocorreu nos tratamentos de 6h horas à 35°C e 37°C. Estas temperaturas foram selecionadas para os experimentos funcionais de interferência e superexpressão de *Fhos*. Nas temperaturas mais baixas também era possível observar a indução, porém em níveis mais baixos.

5. 12 ANÁLISE FENOTÍPICA DO IMPACTO DA EXPRESSÃO ECTÓPICA *FHOS* NO INTESTINO MÉDIO LARVAL

Para iniciarmos a análise fenotípica utilizamos as linhagens de superexpressão (*UAS-FL2*) e a linhagem de interferência (*UAS-RNAi*). Estas duas linhagens quando cruzadas com as linhagens produtoras de GAL4 (no caso *drm-GAL4* e *hs-GAL4*) podem auxiliar no melhor entendimento da função de *Fhos*.

No cruzamento utilizando a linhagem *drm-GAL4/RNAi* adotamos uma ativação induzida diretamente no intestino. Este cruzamento foi realizado objetivando a interferência tecido-específica de *Fhos* no intestino durante a MCP deste tecido. Porém, na análise de cortes histológicos não foi observado a presença de nenhum impacto aparente (FIGURA 40 – A). Da mesma forma, o cruzamento promovendo a interferência pontual por choque térmico (*hs-GAL4/RNAi*) nos mostrou um resultado parecido (FIGURA 40-B). A interferência de *Fhos* por choque de temperatura foi ativada justamente durante a MCP do intestino. Por ultimo, também tratando com choque de temperatura, utilizamos a linhagem que expressa *Fhos-B* ectópica (*hs-GAL4/FL2*). Também não foi identificada nenhuma alteração relacionada a ativação do transgene (FIGURA 40 – C).

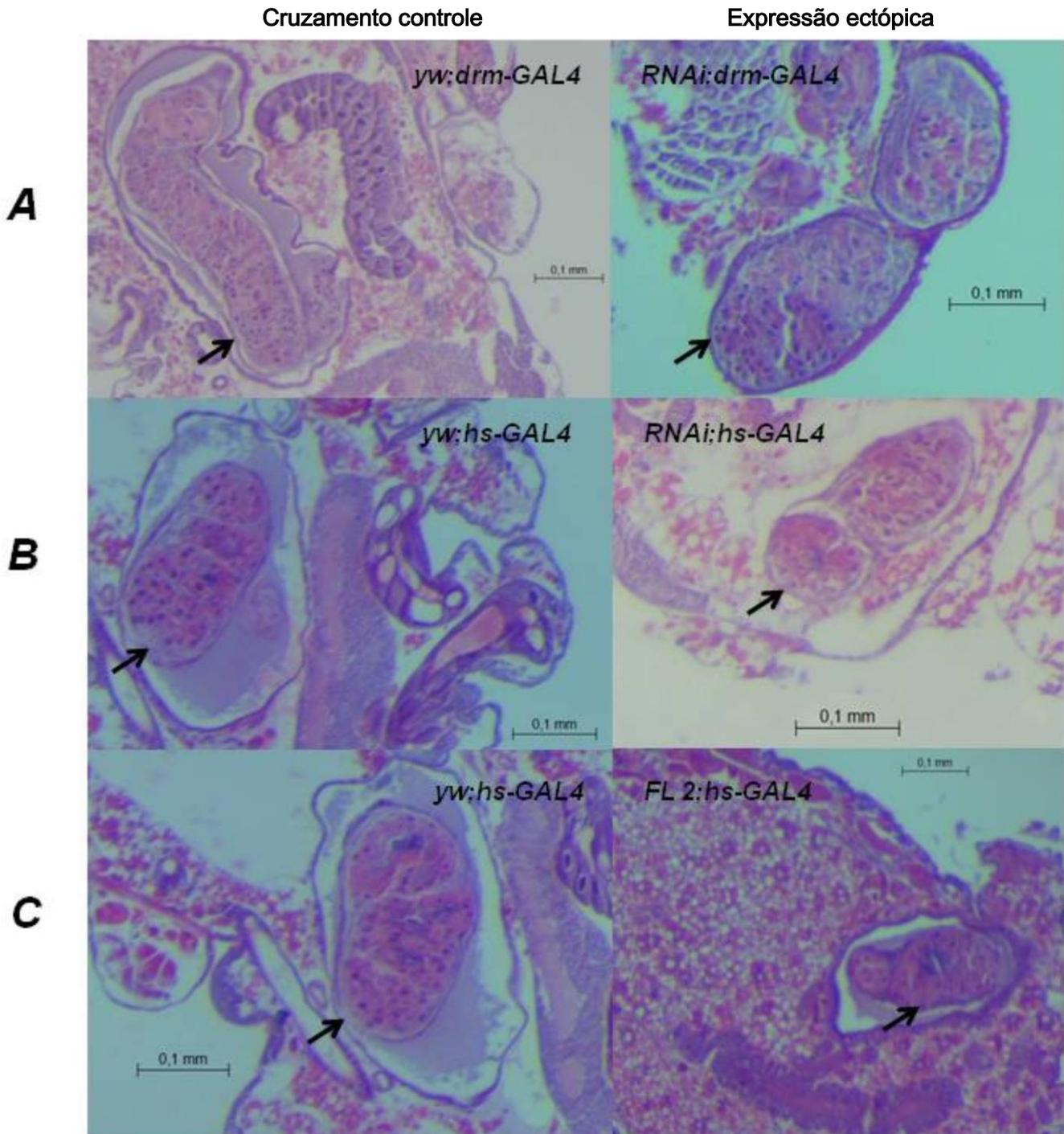


FIGURA40 – Análise fenotípica do impacto da expressão ectópica *Fhos* no intestino médio larval. Análise por meio de cortes histológicos em parafina corados com HE. Todos os cortes apresentados foram observados no estágio de 12 AFP. As setas indicam a localização do intestino. Painei **A**: Animais teste de genótipo linhagem *RNAi/drm-GAL4* e animais controle *yw/drm-GAL4*. Foram estagiados por 12 horas AFP a 25°C. Painei **B**: Linhagem *RNAi/hs-GAL4* e controle *yw/hs-GAL4*, tratamento de choque térmico de 37°C por 6 horas. Painei **C**: Teste linhagem de superexpressão *FL2-GAL4* e controle *yw/hs-GAL4* tratamento térmico de 37°C por 6 horas.

Como mostrado indiretamente através do reporter GFP (resultado do experimento de padronização) a proteína GAL4 parece estar disponível para ativar o sistema bipartido de expressão ectópica. Porém, é necessário quantificar a superexpressão ou silenciamento provocada pela ativação do transgene.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, desempenhamos a análise de um transcrito específico codificado pelo *locus Fhos*, o transcrito *Fhos-C*. No banco de dados *Flybase*, no início da elaboração deste trabalho, existiam apenas três isoformas anotadas para o *locus Fhos*: *Fhos-A* (5 kb), *Fhos-B* (4.3kb) e *Fhos-C* (8.3kb). Os dados anteriores mostraram que em “*northern blots*”, apenas foram detectados os transcritos *Fhos-A* e *Fhos-B* (Anhezini *et al.*, 2012). Desta maneira, *Fhos-C* destacou-se por ser um transcrito ainda não observado e possuir uma sequência maior que a apresentada pelos outros transcritos. Esses fatores chamaram a atenção para a necessidade de sua caracterização.

Com base nesta diferença de tamanho, realizamos uma primeira análise sobre forminas em geral e *Fhos-C*. Utilizamos como palavras-chave em busca realizada no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI): “formin family” (374 proteínas como resultado) ou FH2 (4039 resultados); pudemos observar que as proteínas da família das forminas possuem em média 800 a 1400 aminoácidos em suas sequências primárias. *Fhos-C* possui uma sequência anotada de 2511 aminoácidos, emergindo entre os resultados observados na busca como a maior sequência dentre as forminas examinadas naquele momento. A existência de várias isoformas dentro de um *locus* causa interesse, pois suscita a possibilidade de expressão e função diferencial entre as mesmas, tornando o *locus* potencialmente ativo em diferentes processos biológicos (Watson *et al.*, 2006). Nossos dados anteriores mostraram um papel central da isoforma *Fhos-B* na MCP (Anhezini *et al.*, 2012), levantando portanto a hipótese, se *Fhos-C* poderia possuir padrão de transcrição diferencial durante o desenvolvimento e participar também da MCP ou de outros processos do desenvolvimento.

As nossas análises *in silico* revelaram que o transcrito *Fhos-C* diferencia-se das outras isoformas, essencialmente nas regiões mais a 5` do transcrito (N-terminal após tradução proteica). Nesta região não estão localizados os domínios assinatura de forminas como o FH1, FH2 e GBD (ver introdução). Encontramos através de alinhamento desta região (exclusiva de *Fhos-C*), também utilizando BLAST contra o banco de dados do NCBI, um alinhamento perfeito com o gene conhecido como *desert*. A sequência deste produto do *desert*, foi anotada no “International Nucleotide Sequence Database Collaboration”(INSDC) em 1999, no cromossomo 3, tendo relatada inicialmente uma sequência de mRNA de 6066 pares de bases (atualmente 3537pb) e sua proteína possui 1.178 aminoácidos (ID proteica

AAF34753.1). Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho mostrando dados funcionais para *desert*. Curiosamente, este gene sempre foi um ponto de interesse no estudo do gene *Fhos*. Este interesse justifica-se pela proximidade entre os genes *Fhos* e *desert*, como pode ser observado na FIGURA 23-B. Esta proximidade dos genes é um aspecto importante, pois a mutação original gerada pela inserção do Elemento-P poderia de alguma forma afetar ou comprometer eventos relacionados ao *desert*. Em experimentos de “*northern blots*” realizados pelo Dr. Claudio Simon, em diversas tentativas, a transcrição de *desert* nunca foi detectada. Esses dados podem sugerir que este gene não seja funcional, pelo menos nos contextos e tecidos analisados.

Ao investigarmos melhor a relação entre o gene *desert* e a região inicial do transcrito *Fhos-C*, acabamos por encontrar divergências de anotações. Já nas primeiras abordagens experimentais *in silico*, achamos curioso o fato de um produto do gene *Fhos* mostrar alinhamento coincidentemente com o produto do gene *desert*. Quando realizamos então o alinhamento da FIGURA 24, entre a sequência completa do gene *Fhos* (45,1kb) que estava disponível no banco de dados Flybase e a sequência do gene *desert* (11,8kb) identificada no banco de dados NCBI, percebemos também um alinhamento perfeito das sequências. Para confirmar nossa suspeita, procuramos a anotação do gene *Fhos* no banco de dados NCBI, e encontramos uma sequência de 33,5kb. Como mostrado na FIGURA 24, a junção desses alinhamentos descritos acima, indica uma fusão dos genes *desert* e *Fhos* por parte do Flybase. Interessantemente, esta fusão parece ter ocorrido justamente no mesmo período em que surgiu a anotação do transcrito *Fhos-C*. Provavelmente, devido ao tamanho do *locus*, as anotações iniciais tenham tratado os exons iniciais da isoforma *Fhos-C* como o gene *desert*. Outro aspecto interessante é que o produto codificado por *desert* foi anotado como uma potencial proteína nuclear (Erkner *et al.*, 1999; Serralbo e Kerridge, 2000), entretanto, nossas análises buscando por domínios funcionais nessa região de *Fhos-C* não revelaram a presença de nenhum domínio ou elemento consenso por exemplo, para localização nuclear.

Curiosamente, a fusão de genes é entendida como um dos mecanismos pelo qual as proteínas poderiam adquirir novos domínios, este processo de aquisição inclui: a citada fusão gênica, extensão de exons, recombinação de exons, recombinação de íntrons e retrotransposição (Marsh e Teichmann, 2011; Toll-Riera e Alba, 2013). Porém, a fusão gênica tem sido proposta como o mais importante desses mecanismos (Buljan, Frankish e Bateman, 2010).

Nas anotações seguintes do *locus* realizadas pelo Flybase, notamos que novos

transcritos foram adicionados. Em consulta recente, os seguintes transcritos haviam sido anotados no *locus*: *Fhos-A*, *Fhos-B*, *Fhos-C*, *Fhos-D* (5,6kb), *Fhos-E*(5,1kb), *Fhos-F* (4,8kb), *Fhos-G* (4,3kb), *Fhos-H* (6,0kb), *Fhos-I* (8,9kb) e *Fhos-J* (8,4kb). Dentre as isoformas citadas, nos chamou a atenção as isoformas *Fhos-I* e *Fhos-J* que emergiram na última anotação. Além de anotadas recentemente, elas possuem uma longa região de alinhamento na porção 5' do transcrito *Fhos-C*. Como mostrado na FIGURA 22, as isoformas *Fhos-I* e *Fhos-J* apresentam uma grande semelhança de sequência se comparada a *Fhos-C*. A isoforma *Fhos-J* mostrou-se a mais parecida, possuindo como diferença apenas um “gap” de 51pb. A isoforma *Fhos-I* apresenta uma sequência ligeiramente maior, um total de 525 pares de bases na sua porção 5'. Como mostrado em experimento realizado, utilizando o programa *Interproscan* (FIGURA 27), nem o “gap” que possui 51pb, nem a diferença dos iniciais 525 pb, apresentam a localização coincidente com domínios proteicos preditos. Um ponto interessante que reforça esta observação é que na anotação disponibilizada pelo Flybase, tanto a isoforma *Fhos-I* como a *Fhos-J* apresentam uma sequência de 2528 aminoácidos e essas são idênticas do primeiro ao último aminoácido. *Fhos-C* possui 2511 aminoácidos e essa diferença de 17 aminoácidos é localizada justamente no “gap” de 51pb.

Um dado relevante é que em uma última anotação, a isoforma *Fhos-C* foi excluída dos produtos anotados para o *locus Fhos*. Esta exclusão parece mostrar que os produtos originados principalmente nesta região 5' do *locus* necessitam de uma maior atenção, por se tratar de uma região extensa e bastante divergente. Se *Fhos-C* foi realmente descartada, os dados de transcrição de nossas análises devem se referir às isoformas *Fhos-I* e *Fhos-J* combinadas, uma vez que os primers utilizados não discriminariam *Fhos-C* dessas outras recentemente anotadas.

Devido à variação de anotações e a constante adição de novos produtos para este *locus*, realizamos o alinhamento de todos os transcritos anotados para *Fhos* e o transcrito utilizado neste estudo; *Fhos-C* (FIGURA 21). Como esperado, foi observada uma grande conservação da região C-terminal de todos os transcritos, esta região é justamente a que possui a sequência da informação molecular dos domínios característicos das forminas, em especial o domínio FH2. Este domínio é a assinatura da família das forminas, sendo suficiente e necessário para o evento de polimerização da actina (Kovar *et al.*, 2003; Goode e Eck, 2007).

Durante o curso de nosso trabalho, antes da exclusão da anotação de *Fhos-C*, voltamos nossas atenções à sequência de aminoácidos e as análises do perfil hidropático de *Fhos-C*, utilizando o programa Kite-Doolittle. Este programa nos proporciona uma análise da

estrutura primária de proteínas (Kyte e Doolittle, 1982). Conforme mostrado na FIGURA 26, podemos observar que *Fhos-C* é composto basicamente por resíduos hidrofílicos, incluindo a região exclusiva e a que compõem os domínios característicos FH1 e FH2. Forminas são proteínas caracteristicamente citoplasmáticas, tendo sua participação bem estabelecida na dinâmica do citoesqueleto (Goode e Eck, 2007; Campellone e Welch, 2010). As duas isoformas primeiramente identificadas (*Fhos-A* e *Fhos-B*), já haviam sido analisadas com este mesmo programa e produziram resultados similares (Saita 2008). Este resultado nos aponta que a região adicional que compõem *Fhos-C*, parece não mudar as características hidrofílicas desta proteína. O programa indicou que *Fhos-C* parece ser uma proteína citoplasmática.

O próximo passo utilizando como base sequência de aminoácidos codificadas pelo transcrito *Fhos-C*, foi a busca por domínios utilizando a ferramenta de bioinformática *Interproscan*. Esta reconhece em uma determinada sequência de aminoácidos as diferentes assinaturas proteicas já descritas para outras proteínas (Quevillon *et al.*, 2005).

O programa identificou como esperado a assinatura proteica do domínio FH2. A presença deste domínio é necessária para a montagem da actina celular (Paul e Pollard, 2009; Higgs e Peterson, 2005). Outro domínio identificado foi o domínio autoregulatório de *diaphanous* ou “*diaphanous autoregulatory domain*” (DAD). A terceira assinatura proteica indentificada foi domínio FH3/domínio, ligado por GTPase ou “FH3/GTPase binding domain” (GBD). O conjunto destes três domínios é característico das forminas pertencente a subfamília diáfanos (Seth, Otomo e Rosen, 2006). *Fhos-C* possui os domínios necessários para organizar a regulação pós-tradução, utilizando o mecanismo de ligação intramolecular DAD-GBD. Lembrando que estes dois domínios possuem uma atração molecular, proporcionando a possibilidade de ativação e inativação. Esta autoinibição é “aliviada” pela ligação proteína GTPase-Rho no domínio GBD. Esta ligação desloca a interação com domínio DAD (Watanabe *et al.*, 1999; OTomo *et al.*, 2010). Os nucleadores de actina devem ser bem regulados para garantir a homeostase celular, controlar onde e quando serão criados novos filamentos é excencial, esta descrita regulação pós-tradução da proteína colabora bastante nesta regulação (Bor *et al.*, 2012).

Utilizando ainda o programa *Interproscan*, agora abordando apenas a região exclusiva de *FHOS-C* (1250 aminoácidos N-terminais), novamente nenhum domínio foi detectado (FIGURA 28). O fato da não identificação de domínios preditos, não necessariamente descarta uma possível relevância deste produto, uma vez que ele conserva plenamente o domínios da família das forminas (FIGURA 27). Ainda, esta porção adicional pode ser útil, por exemplo, por conferir uma característica estrutural distinta. Além disso, a

dificuldade em prever a função de uma proteína utilizando como base sua sequência primária é bastante estabelecida (Louie, Higdon e Kolker, 2009). Devemos também lembrar que foram observadas incongruências de dados funcionais, existentes em bancos de dados de proteínas (Schnoes *et al.*, 2009). Por fim, ainda existem muitas proteínas com funções desconhecidas e muitos domínios ainda não descritos (Louie, Higdon e Kolker, 2009).

As análises de homologia utilizando o programa BLAST, identificaram na sequência *Fhos-C* múltiplos alinhamentos. Foram identificadas pelo programa aproximadamente 170 sequências, em sua grande maioria, sequências relativas à forminas. Estas como esperado apresentavam alinhamento especificamente com a região C-terminal, com os outros transcritos *Fhos* e com sequências cromossomais de outras espécies de *Drosophila*, ou com outros insetos como *Anopheles darlingi*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera* entre outros. Em vertebrados, as maiores pontuações são observadas nos alinhamentos com as forminas *Fhod3* de mamíferos (*Homo sapiens* e *Mus musculus*). Como já observado anteriormente, existe uma grande similaridade de sequência entre os produtos proteicos *FhosA-B* e as forminas-*FHOD* (Saita, 2008). Esta homologia de sequência conforme mostrado, localiza-se exclusivamente na região C-terminal.

A presente região de homologia com o gene *desert* (antes de sua fusão com *Fhos*), mostra características relacionadas aos genes órfãos. Estes codificam proteínas que não possuem homólogos em espécies evolutivamente distantes, não demonstrando sinais de ascendência comum (Domazet-Loso e Tautz, 2003; Wissler *et al.*, 2013). Como pode ser observado na FIGURA 29, o antigo *desert*, possui similaridade com outras espécies de *Drosophila*, entre elas: *Drosophila erecta*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila yakuba*, *Drosophila simulans*, *Drosophila ananassae* e *Drosophila persimilis* *Bombus impatiens*, *Apis mellifera*, *Apis florea*, *Bombus terrestris* e *Pediculus humanus*; todos pertencentes a classe *insecta*. O gene *desert* por observação realizada baseando-se neste resultado, parece encaixar-se no grupo das sequências do proteoma de *Drosophila Melanogaster* que não apresentam correspondentes significativos com sequências de não-insetos (Domazet-Loso e Tautz, 2003).

Uma porção considerável das regiões codificantes de todos os genomas sequenciados, consistem de genes órfãos. Porém, apesar da abundância, o significado funcional e evolutivo destes genes não é ainda bem compreendido (Domazet-Loso e Tautz, 2003). Estudos recentes demonstraram que os genes órfãos podem contribuir para a adaptação específica das linhagem (Wissler *et al.*, 2013).

Com relação aos resultados acerca da transcrição da isoforma *Fhos-C*, obtivemos dados que demonstram uma baixa taxa de transcrição. Como dito anteriormente, o transcrito

Fhos-C foi excluído da última anotação do Flybase. Nossos dados de transcrição devem, portanto, ter identificado a transcrição correspondente à *Fhos-I* e *Fhos-J*.

Durante a embriogênese, foi detectada a uma baixa transcrição de *Fhos-C* no estágio E14. Esta parece aumentar no estágio E16, manter-se um pouco mais elevada até a larva precoce L1 e desaparecer na larva mais avançada L2. Se compararmos este resultado, com os dados semiquantitativos da expressão de *Fhos*, podemos notar um aumento na transcrição de *Fhos* nos estágios E14 e E16 (período final da fase embrionária). *Fhos* parece ter uma expressão moderada no início da embriogênese (estágios E3 e E5), uma expressão um pouco mais baixa no período intermediário (estágios E8 e E10) e uma expressão mais elevada no fim da embriogênese (estágios E14 e E16). Estes dados semiquantitativos são reforçados por resultados obtidos em análise dos estágios embrionários por “microarrays” (Graveley *et al.*, 2011). Mesmo em baixos níveis, a expressão detectada de *Fhos-C* parece coincidir com este aumento da transcrição de *Fhos* no final da fase embrionária. Nestes estágios (entre 14 e 16) acontecem vários eventos importantes para o término da transição embrião-larva, neste período ocorrem, por exemplo, as seguintes formações e mudanças: o começo e término da involução da cabeça, formação do intestino larval anterior e posterior, do aparelho bucal, túbulos de malpighi, placa anal, glândulas salivares (Campos-Ortega e Hartenstein, 1985).

Não foi identificada nenhuma transcrição de *Fhos-C* no final do período larval (estágio L2 e L3) e nas fases de pré-pupa e pupa. A transcrição de *Fhos* detectada em animal inteiro para este período (fases de pré-pupa e pupa) é observada em todos os pontos examinados (0h a 16 horas AFP), possuindo um aumento considerável na expressão de *Fhos* nos períodos de: 0h, 6h e 9 horas após a fase de formação do pupário. Estes aumentos nos níveis relacionam-se com os picos do hormônio ecdisona (Anhezini, 2011). Este fato pode nos indicar que *Fhos-C* parece não responder a elevação dos níveis do hormônio ecdisona, diferente do observado para *Fhos-B* que apresenta este perfil (Anhezini *et al.*, 2012).

Em adultos, recém eclodidos e com um dia de vida, observamos uma baixa transcrição de *Fhos-C*. Esta parece ser similar nas quatro etapas adultas abordadas, não estando relacionada com o sexo do organismo ou mesmo com a pequena diferença de um dia de vida. Como mostrado nessa abordagem semiquantitativa, o transcrito *Fhos-C* parece não ser transcrito em altos níveis, porém, temos que levar em consideração alguns outros aspectos, como por exemplo, a abordagem experimental utilizada. Por tratar-se de uma abordagem inicial e bastante abrangente, optamos por utilizar sempre amostras de RNA extraídas de organismo inteiro, o que talvez não nos permitisse observar uma transcrição tecido específica considerável. Uma alternativa para contornar esta dificuldade seria a utilização de uma análise

detalhada tecido-específica em variadas fases do desenvolvimento.

Existe também a possibilidade da baixa observação de *Fhos-C* ser relacionada a uma possível regulação pós-transcricional. Na observação de dados de expressão gênica, existe uma dificuldade em distinguir se a variação apresentada é referente à variação da transcrição ou da taxa de decaimento (Pai *et al.*, 2012). Existem indicativos de que em alguns tipos de resposta, até metade das alterações apresentadas na quantidade de mRNA podem atribuir-se à alteração da taxa de decaimento (Garneau, Wilusz e Wilusz, 2007). Por exemplo, um transcrito pode ser expresso e sofrer um processo rápido de decaimento ou degradação, o que dificultaria a sua detecção. A isoforma *Fhos-C* pode possuir uma meia-vida curta. No entanto, quando examinamos a sequência de nucleotídeos do transcrito, não foram observadas sequências características dos RNAs denominados: elemento rico em AU ou “AU-rich elements” (ARE). A presença destas sequências reguladoras denominadas ARE, causaria a rápida degradação do RNA, o que acaba suprimindo a expressão gênica em um nível pós-transcricional (Spasic *et al.*, 2012; Khalid e Khabar, 2010). A detecção de AREs em uma sequência é um excelente indicador de mRNA de vida-curta (Spasic *et al.*, 2012).

Por outro lado, utilizando a mesma ferramenta para a detecção de AREs, o programa de bioinformática RegRNA (<http://regna2.mbc.nctu.edu.tw/detection.html>), encontrou na sequência *Fhos-C*, um sítio de reconhecimento para um miRNA chamado *dm-mir-318* (Aravin *et al.*, 2003; Ruby *et al.*, 2007). Os miRNAs, tem como origem genes que codificam produtos curtos (20-30pb) e estes adquirem a conformação molecular “hairpin”. Este grupo vem sendo extensamente caracterizado e representam uma classe crescente de RNAs não codificadores. Como já bem estabelecido, miRNAs são conhecidos por direcionar o silenciamento transcricional de um determinado gene de maneira pós-transcricional, utilizando-se o processamento da ribonuclease tipo III; enzima Dicer (Aravin *et al.*, 2003).

O transcrito *Fhos-C* possui este sítio de reconhecimento para *dm-mir 318*, localizado no início de sua sequência (região 5’), região onde figurava o antigo *locus desert*. Segundo relatado no banco Flybase, a função molecular de *dm-mir 318* ainda não é conhecida, assim como seu envolvimento em processos biológicos. Foi observado na literatura, que o citado miRNA parece ser expresso só no corpo adulto; tanto em macho quanto fêmea (Aravin *et al.*, 2003; Ruby *et al.*, 2007). Um importante fato a ser observado, é que geralmente os mRNA com rápida taxa de decaimento, possuem locais em sua sequência de ligação para miRNA e ou proteínas (Pai *et al.*, 2012).

Em experimento semiquantitativo (FIGURA 31), também observamos uma transcrição de *Fhos-C* em adultos, no entanto, essa expressão foi considerada baixa. Isto

indica uma possível expressão concomitante de *Fhos-C* e *dm-mir318*. Este fato pode nos levar a considerar uma possível interferência regulada pela expressão *dm-mir318*, no transcrito *Fhos-C*, onde o miRNA provavelmente diminuiria a quantidade do transcrito pela ação de ribonucleases. Porém, para concluirmos tal afirmativa seriam necessários experimentos para validar a hipótese.

Outro ponto que poderia dificultar a de detecção de *Fhos-C* seria que este, poderia possuir uma regulação transcricional diferente dos outros transcritos *Fhos-A* e *Fhos-B*. Estes mostraram regulação por ecdisona durante a metamorfose, “downstream” aos genes *E93* e *BR-C* de resposta primária ao hormônio. Uma vez que mutações nesses genes alteram a expressão de *Fhos-B* (AnhezinI *et al.*, 2012). Sua fusão com o gene *desert* pode explicar que os elementos regulatórios mobilizados nesta isoforma são distintos.

O estudo e caracterização das novas isoformas do *locus Fhos* apresenta grandes desafios, primeiramente pela necessidade de determinar finalmente quais seriam as isoformas biologicamente ativas. E a partir destes dados determinar se existe expressão diferencial das mesmas ao longo do desenvolvimento. No caso da isoforma *Fhos-C*, que nesse momento pode ser expandida como *Fhos-I e J*, o dado mais concreto é que mesmo em baixos níveis, essas proteínas podem ter função em estágio adulto ou durante a embriogênese tardia. Porém, para avançar nesta questão seria preciso “dissecar” tecidualmente seus perfis de transcrição e produzir anticorpos específicos. Outra conclusão importante é que estas isoformas não participam dos eventos de MCP desempenhados pela isoforma *Fhos-B* (Anhezini *et al.*, 2012) o que torna a hipótese de que as forminas que são clivadas e translocadas para o núcleo tenham função relacionada à esses processos.

Por este conjunto de motivos resolvemos investir no transcrito funcionalmente *Fhos-B*, especificamente explorar sua participação na MCP do intestino médio larval.

A MCP do intestino larval, embora seja induzida por ecdisona e possua características autofágicas (Jiang *et al.*, 1997; Baehrecke, 2000), tal qual glândulas salivares larvais, ainda é um processo pouco estudado. Suas características gerais foram descritas por Lee *et al.*, 2002 (ver introdução). Como detalhado anteriormente neste trabalho, o primeiro pico de ecdisona desencadeia a formação do pupário (Riddiford, 1993) e a morte do intestino médio.

Visto a participação central de *Fhos* na MCP de glândulas salivares e tendo sido observada sua transcrição durante o período de MCP do intestino, nosso grupo iniciou a caracterização de suas funções nesse tecido. Estudos preliminares realizados por Saita (2013), revelaram que *Fhos* é expresso no intestino médio larval e que sua distribuição subcelular é

similar às aquelas observadas nas glândulas salivares, ou seja, inicialmente citoplasmática, posteriormente em redor do núcleo, e mais tardiamente no interior do núcleo (Saita, 2013; Anhezini *et al.*, 2012).

Baseados nesses resultados, resolvemos construir um vetor para expressão ectópica de *Fhos-B*, para futuramente utilizá-lo em estudos funcionais da MCP do intestino.

No início deste trabalho, já dispúnhamos de linhagens de interferência para *Fhos*, porém, ainda não possuíamos linhagens transgênicas superexpressando *Fhos-B*. As linhagens de interferência *Fhos*, quando ativada apresenta alta taxa de letalidade embrionária. Esse “knockdown” é da ordem de 85% como descrito por Anhezini, 2011, e produzem o fenótipo de persistência da glândula salivar, mostrando que essa linhagem é efetiva na diminuição da transcrição de *Fhos-B*.

Além das linhagens de RNAi destinadas ao “knockdown” necessitamos de linhagens transgênicas contendo o cDNA inteiro referente à esta isoforma. Estas linhagens são de grande valia em experimentos de expressão ectópica de *Fhos-B*, bem como em ensaios de resgate do fenótipo mutante. Estas linhagens são normalmente utilizadas na caracterização funcional de um gene em diferentes “backgrounds” genéticos (Yamamoto, 2010; Bellen, *et al.* 2011).

Neste trabalho tentamos construir vetores de transformação de *Drosophila* contendo o cDNA inteiro referente à isoforma *Fhos-B*. Duas estratégias foram utilizadas, a primeira, para a produção do vetor denominado *pFhosB*, foi baseada na excisão do cDNA da isoforma *Fhos-B*, presente no plasmídeo *pOT2* (que contém os cDNAs do projeto genoma de *Drosophila*), seguido de sua subclonagem ao vetor *pUAST*, utilizado no sistema de indução GAL4-UAS.

Apesar de todos os passos serem cuidadosamente observados e controlados, não foi observada nenhuma colônia indicando a clonagem positiva de *pFhosB*. Vários experimentos foram feitos utilizando variações experimentais como: enzimas diferentes, vetores oriundos de preparações distintas, diferentes taxas inserto/vetor e diferentes temperaturas e períodos nas reações de ligação. Com base nestes dados, é difícil justificar o insucesso desta primeira tentativa. Decidimos então mudar a abordagem visando à obtenção de outra construção (*pFhos-B-myc-tag*). Nesta segunda tentativa trocamos a excisão por endonucleases do fragmento, por uma amplificação do fragmento *Fhos-B* inteiro utilizando PCR. O fragmento seria então clonado em fase com um vetor *pUAST* contendo um “tag” do gene *myc* que produziria uma proteína recombinante que poderia ser facilmente reconhecida com anticorpos específicos para o “tag”, permitindo assim sua diferenciação das proteínas

endógenas. Além disso, nesta segunda abordagem, ao colocarmos nos “primers” sequências de enzimas de restrição eliminaríamos a necessidade de reações de preenchimento e fosforilação. Mesmo com essas variações, também não obtivemos êxito na clonagem desta segunda construção (*pFhosB-myc-tag*). Todas as tentativas realizadas tiveram seus passos cuidadosamente observados e foram realizados vários controles para detectar possíveis falhas de procedimento. Foram realizados os seguintes testes: a transformação utilizando apenas o *pUASt* linearizado sem a presença da T4 ligase, a transformação do *pUASt* linearizado com enzima de ligação T4 ligase para demonstrar a efetividade da enzima, a observação do crescimento de bactéria portadora do plasmídeo *pUASt* não digerido, entre outras abordagens para afastar a possibilidade de contaminação.

Com base nestes resultados negativos, aproveitamos o ensejo que o Dr. Lucas Anhezini, que me co-orienta neste projeto, durante seu estágio no laboratório do Dr. Cheng-Yu Lee na Universidade de Michigan (EUA), construiu dentre outras linhagens, uma com construção para expressão ectópica *Fhos-B*. Esta foi gentilmente cedida para os experimentos funcionais realizados no intestino larval. Esta linhagem não possui o myc-tag.

Para entender melhor a participação de *Fhos* na MCP do intestino médio larval, iniciamos a caracterização do perfil transcricional de *Fhos* pouco antes e durante a MCP (-18h, -8h, -2h, 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5 horas AFP). Por RT-PCR semiquantitativo (FIGURA 37), observamos um aumento progressivo da transcrição de *Fhos* em períodos mais tardios do estágio larval (L3 com -18h, -8h e -2horas AFP). Porém neste momento, é impossível estabelecer qualquer relação entre a sua expressão e algum processo biológico. Esse período é anterior à MCP e caracterizado pela paralisação da alimentação pelas larvas, o que suscitaria uma menor atividade das células intestinais que poderia preceder a MCP mais tardia do intestino larval (Berreur *et al.*, 1979; Shingleton, 2010).

Quando analisamos *Fhos* por qRT-PCR no período de MCP do intestino larval (durante as primeiras 5 horas), confirmamos que a indução de *Fhos* em animais selvagens da linhagem *Canton S* ocorre em resposta ao pulso de ecdisona (FIGURA 36). Este resultado suporta os dados observados em “northern blots” (Anhezini, 2011). Entretanto, quando foram analisados intestinos da linhagem *yw*¹¹¹⁸, notamos que *Fhos* é expresso em maiores níveis no período de 2 a 4 horas AFP, decaindo bastante no estágio de 5h AFP (FIGURA 37). Essas diferenças são atribuídas ao “background” genético *yw*. Esta linhagem é normalmente utilizada como controle de cruzamentos, principalmente para a produção de linhagens transgênicas. Porém, nossos dados indicam que quando este “background” *yw* for utilizado

para a análise de *Fhos*, existem diferenças que devem ser levadas em consideração. Mostra-se então imprescindível a utilização de dados de expressão característicos dessa linhagem.

Como dispomos de linhagens transgênicas que permitem a análise funcional de *Fhos* nesses tecidos, neste trabalho iniciamos a padronização da melhor abordagem para a ativação dos transgenes. Foi utilizado como proteína repórter a GFP que foi alternativamente expressa por “driver” específico para o intestino e alternativamente o choque térmico. Com relação ao *drm-GALA*, é sabido que os maiores níveis de ativação apresentam-se durante a embriogênese, porém existe sua expressão durante o período larval (Graveley *et al.*,2011). Mas nossos resultados mostraram uma indução relativamente pequena de GFP além de estar localizado em algumas regiões específicas o que limitaria muito sua utilização em ensaios funcionais. Já com a utilização de choque de temperatura, foi possível observar que tratamentos de 37° C por 6 horas promoveram a indução de GFP em níveis consideráveis (FIGURA 39). E estas condições foram utilizadas inicialmente em ensaios funcionais buscando a presença de fenótipos marcantes seja pela indução ectópica da isoforma *Fhos-B* inteira, seja pelo “knockdown” promovido pelo RNA de interferência. A análise preliminar de secções histológicas de animais provenientes desses tratamentos não demonstrou nenhum fenótipo evidente (FIGURA 40). Porém é importante ressaltar a necessidade de análises ultraestruturais futuras com o intuito de detectar alterações subcelulares não necessariamente observáveis no tecido inteiro. Os resultados aqui apresentados confirmam a indução de *Fhos* após o pico de ecdisona, porém existem diferenças entre *yw* e *Canton S* que devem ser levadas em consideração durante experimentos funcionais futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor L.G., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J.M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L.B., Davies P., Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A.D., Dew I., Dietz S.M., Dodson K., Doup L.E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B.C., Dunn P., Durbin K.J., Evangelista C.C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A.E., Garg N.S., Gelbart W.M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J.H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N.L., Harvey D., Heiman T.J., Hernandez J.R., Houck J., Hostin D., Houston K. A., Howland T.J., Wei M., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G.H., Ke Z., Kennison J.A., Ketchum K.A., Kimmel B.E., Kodira C.D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A.A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T.C., McLeod M.P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N.V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S.M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D.M., Nelson D.L., Nelson D.R., Nelson K.A., Nixon K., Nusskern D.R., Pacleb J.M., Palazzolo M., Pittman G.S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M.G., Reinert K., Remington K., Saunders R.D., Scheeler F., Shen H., Shue B.C., Sidén-Kiamos I., Simpson M., Skupski M.P., Smith T., Spier E. , Spradling A.C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A.H., Wang X., Wang Z.Y., Wassarman D. A., Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., Woodage T., Worley K.C., Wu D., Yang S., Yao Q. A., Ye J., Yeh R. F., Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X. H., Zhong F. N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H.O., Gibbs R.A., Myers E. W., Rubin G.M., Venter J.C. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000; 287(5461): 2185-2195.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts.K. & Walter. P. *Molecular Biology of the cell*. 4.ed. Garland Science, 2002.

Altieri D.C. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*. 2010; 430(2): 199–205.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 403–410.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 3389–3402.

Andres A.J., Thummel, C.S., Methods for quantitative analysis of transcription in larvae and prepupae. *Methods Cell Biol.* 1994; 44: 565–573.

Anhezini L. A. Produção e caracterização de linhagens transgênicas para o estudo funcional de jazigo durante o desenvolvimento de *Drosophila*. Ribeirão Preto – SP. Tese de

Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP. 2011; 190p.

Anhezini L., Saita A. P., Costa M. S., Ramos R. G., Simon C. R.. Fhos encodes a *Drosophila* Formin-like protein participating in autophagic programmed cell death. *Genesis*. 2012; 50(9): 672-84.

Aravin A.A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., Zavolan M., Marks D. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*. 2003; 5: 337–350.

Baehrecke E.H. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(10): 779-787.

Baehrecke E.H. Steroid regulation of programmed cell death during *Drosophila* development. *Cell Death and Differentiation*. 2000; 7(11) 1057-1062.

Barrett T., Clark K., Gevorgyan R., Gorelenkov V., Gribov E., Karsch-Mizrachi I., Kimelman M., Pruitt K.D., Resenchuk S., Tatusova T. BioProject and BioSample databases at NCBI: facilitating capture and organization of metadata. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40:D57– D63.

Bellen H. J., Levis R. W., He Y., Metaxakis A., Savakis C., Schulze K. L., gene disruption project: Progress using Genetics. 2011; 188(3): 731–743.

Berreuer P., Porchero P., Berreuer Bonnefant I., Simpson P. Ecdysteroid levels and pupariation in *Drosophila melanogaster*. *Exp.Zool*. 1979; 210, 347-352.

Berry D.L., Baehrecke E.H. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*. 2007; 131(6): 1137–1148.

Bor B., Vizcarra C. L., Phillips M. L., Quinlan M. E. Autoinhibition of the formin Cappuccino in the absence of canonical autoinhibitory domains. *Mol Biol Cell*. 2012; 23(19): 3801–3813.

Buljan M., Frankish A., Bateman A. Quantifying the mechanisms of domain gain in animal proteins. *Genome Biol*. 2010; 11(7): 74.

Campellone K.G., Welch M.D. A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(4): 237–251.

Campos-Ortega J.A., V. Hartenstein. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, 1985. Berlin.

Castrillon D.H., Wasserman S.A. Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development*. 1994; 120(12): 3367-3377.

Chan F.K. Fueling the flames: Mammalian programmed necrosis in inflammatory diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4: a008805. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536335/>)

Chittaranjan S., McConechy M., Hou Y.C., Freeman J.D., DeVorkin L., Gorski S.M. Steroid Hormone Control of Cell Death and Cell Survival: Molecular Insights Using RNAi. *PLoS Genet.* 2009; 5(2): e1000379.

Cho Y.S., Challa S., Moquin D., Genga R., Ray T.D., Guildford M., Chan F.K. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 2009; 137(6): 1112-1123.

Copeland J.W., Copeland S.J., Treisman R. Homo-oligomerization is essential for F-actin assembly by the formin family FH2 domain. *J Biol Chem.* 2004; 279(48): 50250–50256.

Denton D., Nicolson S., Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* 2012; 19(1): 87–95.

Denton D., Shrivage B., Simin R., Mills K., Berry D. L., Baehrecke E. H., S. Kumar. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol.* 2009; 19(20): 1741–1746.

Denton D., Shrivage B., Simin R., Baehrecke E.H., Kumar S. Larval midgut destruction in *Drosophila*: Not dependent on caspases but suppressed by the loss of autophagy. *Autophagy.* 2010; 6(1): 163.

Domazet-Loso T., Tautz D. An Evolutionary Analysis of Orphan Genes in *Drosophila*. *Genome Res.* 2003; 13(10): 2213–2219.

Edinger A.L., Thompson C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16(6): 663-669.

Erkner A., Roure A., Core N., Angelats C., Vola C., Fasano L., Kerridge S. Submetido para o banco de dados INSDC- EMBL/GenBank/DDBJ. 1999.

Etienne-Manneville, Hall S. Rho GTPase in cell biology. *Nature.* 2002; 420:629 – 653.

Figueroa M, Hinrichs M.V., Bunster M., Babbitt P., Martinez-Oyanedel J., Olate J. Biophysical studies support a predicted superhelical structure with Armadillo repeats for Ric-8. *Protein Sci.* 2009; 18:1139–1145.

Fink S. L., Cookson B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005; 73: 1907–1916.

Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differ.* 2007; 14(7): 1237–1243.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S. A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein

D.C., Shi Y., Simon H.U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012; 19(1): 107–120.

Garneau N. L., Wilusz J., Wilusz C. J. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(2): 113-26.

Goode B. L., Eck M. J. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Rev. Biochem.* 2007; 76: 593–627.

Graveley B. R., Brooks A. N., Carlson J. W., Duff M. O., Landolin J. M., Yang L., Artieri C. G., van Baren M. J., Boley N., Booth B. W., Brown J. B., Cherbas L., Davis C. A., Dobin A., Li R., Lin W., Malone J. H., Mattiuzzo N. R., Miller D., Sturgill D., Tuch B. B., Zaleski C., Zhang D., Blanchette M., Dudoit S., Eads B., Green R. E., Hammonds A., Jiang L., Kapranov P., Langton L., Perrimon N., Sandler J. E., Wan K. H., Willingham A., Zhang Y., Zou Y., Andrews J., Bickel P.J., Brenner S.E., Brent M.R., Cherbas P., Gingeras T. R., Hoskins R.A., Kaufman T. C., Oliver B., Celniker S. E. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 2011; 471 (7339): 473-9.

HeeKim C., Jeon H. M., Yeon Lee S., Kyung Ju M., J. Y. Moon, H. G. Park, M. Yoo, B. T. Choi, J. I. Yook, S. Lim, S. Han, H. S. Kang. Implication of Snail in Metabolic Stress-Induced Necrosis. *PLoS One.* 2011; 6(3): e18000.

Higgs H. N., Peterson K.J. Phylogenetic Analysis of the Formin Homology 2 Domain. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(1): 1–13.

Higgs H.N. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.* 2005; 30(6): 342-353.

Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *Cell Death.* 2009; *N Engl J Med* 361: 1570-1583. [10.1056/NEJMra0901217 PubMed: 19828534.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19828534/)

Ihry R.J., Sapiro A.L., Bashirullah A. Translational Control by the DEAD Box RNA Helicase Belle Regulates Ecdysone-Triggered Transcriptional Cascades. *PLoS Genet.* 2012; 8(11): e1003085.

Jiang C., Baehrecke E. H., Thummel C. S. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development.* 1997; 124: 4673-4683.

Khalid S., Khabar A.. Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67(17): 2937–2955

Kiess W., Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur. J. Endocrinol.* 1998; 138: 482-491.

Klionsky D.J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci.* 2005; 118(1): 7–18.

Kovar D. R., Kuhn J. R., Tichy A. L., Pollard T. D. The fission yeast cytokinesis

formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol.* 2003; 161:875–887.

Kroemer G., Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(12): 1004–1010.

Kuchárová-Mahmood S., Raska I., Mechler B.M., Farkas R. Temporal regulation of *Drosophila* salivary gland degeneration by the Broad-Complex transcription factors. *Journal of Structural Biology.* 2002; 140(1-3): 67–78.

Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Mol Biol.* 1982; 157: 105–132.

Laughon A., Gesteland R. F. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol.* 1984; 4(2): 260–267.

Lee C.Y., Baehrecke E. H.. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development.* 2001; 128(8): 1443-1455.

Lee C.Y., Cooksey B.A., Baehrecke E.H. Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Dev Biol.* 2002; 250(1):101-11.

Liu R., Linardopoulou E.V., Osborn G.E., Parkhurst S.M. Formins in Development: Orchestrating Body Plan Origami. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(2): 207–225.

Louie B., Higdon R., Kolker E. A statistical model of protein sequence similarity and function similarity reveals overly-specific function predictions. *PLoS One.* 2009; 4(10): e7546.

Macias M.J., Wiesner S., Sudol M. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.* 2002; 513(1): 30–37.

Maroni, G., Stamey S. C. Use of blue food to select synchronous, late third instar larvae. *Dros. Inf. Serv.* 1983; 59: 142-143.

Marsh J. A., Teichmann S. A. How do proteins gain new domains? *Genome Biol.* 2010; 11(7): 126.

McPhee C.K., Baehrecke E.H. Autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793(9): 1452–1460.

Meier P., Finch A., Evan G. Apoptosis in development. *Nature.* 2000; 407(6805): 796-801.

Meléndez A., Neufeld T. P. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development.* 2008; 135(14): 2347–2360.

Ménard I., Gervais F.G., Nicholson D.W., Roy S. Caspase-3 cleaves the formin-homology-domain-containing protein FHOD1 during apoptosis to generate a C-terminal

fragment that is targeted to the nucleolus. *Apoptosis*, 2006; 11(11): 1863-1876.

Otomo T., Tomchick D.R., Otomo C., Machius M. Rosen M.K. Crystal structure of the formin mDial in auto in habited conformation. *PLOS ONE*. 2010; 12896 doi:10.1038/35087035.

Pai A. A., Cain C. E., Mizrahi-Man O., De Leon S., Lewellen N., Veyrieras J., Degner J. F., Gaffney D. J., Pickrell J. K., Stephens M., Pritchard J. K., Gilad Y. The Contribution of RNA Decay Quantitative Trait Loci to Inter-Individual Variation in Steady-State Gene Expression Levels. *PLoS Genet*. 2012; 8(10): e100300.

Paul A. S., Pollard T.D. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009; 66(8): 606–617.

Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R., Lopez R. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33: 116–120.

Rewitz K.F., Yamanaka N., O'Connor M.B. Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2010; 19(6): 895–902.

Riddiford L.M. Hormones and *Drosophila* development. *Cold Spring Harbor*. 1993; 2: 899–939.

Rodriguez-Rocha H., Garcia-Garcia A., Panayiotidis M. I., Franco R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res*. 2011; 711: 158–166.

Ruby J.G., Stark A., Johnston W.K., Kellis M., Bartel D.P. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res* 2007;17: 1850–1864.

Ryoo H.D., Baehrecke E.H. Distinct death mechanisms in *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22:889–895.

Saita A. P. Caracterização da Expressão Tecidual de FHOS durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*. Ribeirão Preto – SP. Dissertação de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP. 2013.101 p.

Saita. A. P. Produção de anticorpos policlonais e determinação do padrão subcelular de distribuição de JAZIGO durante a morte celular programada em glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*. Ribeirão Preto – SP. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP. 2008; 103 p.

Schnoes A.M, Brown S.D., Dodevski L., Babbín. Annotation error in public database: mis annotation of molecular function in enzyme super families. *PLOS Comput Biol*. 2009; 5(12) e 1000605.

Schweichel J.V. and Merker H.J. The morphology of various types of all death in prenatal tissues. *Teratology* 7. 1973; 253-266.

Serralbo O., Kerridge S. Desert: a new *Drosophila* segment polarity gene.

Submetido para o banco de dados EMBL/GenBank/DDBJ. 2000.

Seth A., Otomo C., Rosen M. K. Autoinhibition regulates cellular localization and actin assembly activity of the diaphanous-related formins FRLalpha and mDia1. *J Cell Biol.* 2006; 174: 701–713.

Shen H.M, Codomo P. Autophagic cell death: lach ness monster or endangered spicies? *Autophegy.* 2011; 7(5):457-65.

Shingleton A.W. The regulation of organ size in *Drosophila*: Physiology, plasticity, patterning and physical force. *Organogenesis.* 2010; 6: 76.

Simon C. R., Ameida J.C. Programmed cell death in *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae) salivary glands presents apoptotic features. *Genesis.* 2004; 40(1): 22-31.

Simon, C. R.; Rizvi, N.; Baehrecke, E.H . Caracterização genética e molecular de jazigo, um novo gene que participa da morte celular programada em *Drosophila melanogaster*. In: Emílio A. Jeckel-Neto; Moisés E. Bauer. (Org.). *Avanços em Biologia Celular.* Porto Alegre, 2002, p. 85-88.

Smith B.A., Smith B.D. Biomarkers and molecular probes for cell death imaging and targeted therapeutics. *Bioconjug Chem.* 2012; 23:1989-2006

Spasic M., Friedel C. C., Schott J., Kreth J., Leppek K., Hofmann S., Ozgur S., Stoecklin G.. Genome-Wide Assessment of AU-Rich Elements by the AREScore Algorithm. *PLoS Genet.* 2012; 8(1): e1002433.

Takashima S., Younossi-Hartenstein A., Ortiz P. A., Hartenstein V.. A novel tissue in an established model system: the *Drosophila* pupal midgut. *Dev Genes Evol.* 2011; 221:69– 81.

Talbot W.S., Swyryd E.A., Hogness D.S. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell.* 1993; 73(7): 1323-1337.

Thummel C.S. Steroid-triggered death by autophagy. *BioEssays.* 2001(8); 23: 677-682.

Toll-Riera M., Albà M. M.. Emergence of novel domains in proteins. *BMC Evol Biol.* 2013; 13: 47.

Vandenabeele P., Galluzzi L., Berghe T.V., Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2010; 11: 700–714.

Vanlangenakker N., Berghe V. T., Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 75-86.

Venter J.C., Adams M.D., Sutton G.G., Kerlavage A.R., Smith H.O., Hunkapiller

M. Shotgun sequencing of the human genome. *Science*. 1998; 280: 1540-1542.

Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka A., Saito Y., Nakao K., Jockusch B., Narumiya S. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*. Jun 2, 1997; 16(11): 3044–3056.

Watanabe N., Kato T., Fujita A., Ishizaki T., Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*. 1999; 1(3): 136-43.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Grann A., Levine M. Losick R., Cshlp I. *Molecular Biology of the Gene*. Artmed. 2006; 5: 760.

Westendorf J., Mernaugh R., Hibert S. Identification and characterization of a protein containing formin homology (FH1/FH2) domains. *Gene*. 1999; 232:173-182.

White E. Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis. *Autophagy*. 2008; 4(4): 399–401

White-Cooper H. Tissue, cell type and stage-specific ectopic gene expression and RNAi induction in the *Drosophila* testis. *Spermatogenesis*. 2012 January 1; 2(1): 11–22.

Wissler L., Gadau J., Simola D. F., Helmkamp M., Bornberg-Bauer E. Mechanisms and Dynamics of Orphan Gene Emergence in Insect Genomes. *Genome Biol Evol*. 2013; 5(2): 439–455.

Xu Y., Moseley J. B., Sagot I., Poy F., Pellman D., Goode B. L., Eck M. J. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*. 2004; 116(5): 711-723.

Yamamoto M.T. *Drosophila* Genetic Resource and Stock Center. *Exp Anim*. 2010; 59(2): 125-38.

Yao T.P., Segraves W.A., Oro A.E., McKeown M., Evans R.M. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*. 1992; 71(1): 63-72.

Yin V.P., Thummel C.S. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2005; 16: 237–243.