

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**Estudo funcional das moléculas do módulo de reconhecimento celular
Irre durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de
*Drosophila melanogaster***

ANDRÉ CENDON SILVA

**Ribeirão Preto – SP
2017**

ANDRÉ CENDON SILVA

**Estudo funcional das moléculas do módulo de reconhecimento celular
Irre durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de
*Drosophila melanogaster***

**Functional study of Irre cell recognition module molecules in
developing embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*.**

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências –
Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular. Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Guelerrman Pinheiro Ramos

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, André Cendon

Estudo funcional das moléculas do módulo de reconhecimento celular Irre durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de *Drosophila melanogaster*. Ribeirão Preto, 2017.

56 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Ramos, Ricardo Guelherman Pinheiro.

1. *Drosophila melanogaster*. 2. Sistema Nervoso. 3. Linha Média.

Nome: SILVA, André Cendon

Título: Estudo funcional das moléculas do módulo de reconhecimento celular Irre durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos

Aprovado em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pelo apoio estrutural e oportunidade concedida;

À secretária Gabriela Bunhotto Zamoner, pela compreensão e ajuda em diversos momentos;

Ao Professor Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos, pela orientação, confiança, oportunidade e ensinamentos ao longo dos dois anos de execução desse projeto;

Aos integrantes e ex integrantes do laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento, Carlos, Tiago, Rafael, Felipe, Vítor e Maiaro (em memória) pela companhia e ajuda nos experimentos;

Á Mara e ao Valdir pelo acolhimento, amizade e todo suporte técnico para os experimentos;

Á Dra. Roberta Rossales pelo grande na delimitação dos experimentos, no auxílio na captura, no processamento de imagens e pela grande amizade.

À Professora Dra. Livia Moda pela auxílio na padronização dos ensaios de imunofluorescência

Aos amigos do departamento, Juliana, Gabriel e Cláudia pelos momentos compartilhados;

À minha família, mãe Edvane, minha Tia Dirce e minha avó por sempre me darem todo suporte e meus irmão Alexandre e Vítor

À minha prima Michela minha irmã Bárbara e meu amigo Ewister pela minha acolhida em Ribeirão e pelo companheirismo de sempre;

Aos meus amigos Juliana, Darlan, Bruna, Ticiane, Breno, Francisco e Roberta pelos grandes momentos juntos.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste projeto

Resumo

Silva, AC. Estudo funcional das moléculas do módulo de reconhecimento celular Irre durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de *Drosophila melanogaster*. 2017. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O Módulo de Reconhecimento de Celular de Irre (IRM) é uma pequena família de proteínas transmembranares envolvidas nos processos de adesão e reconhecimento celular. Para *Drosophila melanogaster* existem 4 proteínas bem caracterizadas desta família: Rough (Rst), Hibris (Hbs), Kin de Irre (Kirre) e Stick and Stones (Sns). Em estudos anteriores para elucidar o papel dessas moléculas no desenvolvimento embrionário de *Drosophila*, observou-se que a construção pCa18 3.1, que apenas codifica a porção extracelular de Roughest e está sob controle do promotor de choque térmico, quando superexpressa no início do desenvolvimento embrionário gera defeitos na formação do sistema nervoso (NS), que são observados apenas mais tarde. Observou-se, além disso, que, quando esta superexpressão é realizada em um background onde apenas 50% da proteína Hbs está presente, o fenótipo é reforçado, sugerindo um possível papel antagonista entre Rst e Hbs no desenvolvimento de SN. Com base nestes achados e na informação que Rst, Hbs e Kirre são encontrados no SN durante o desenvolvimento embrionário, este trabalho tem como objetivo continuar estudando o papel dos IRMs no desenvolvimento da SN. Para este propósito, além do já empregado promotor de choque térmico, usaremos o sistema de expressão binária Gal4 / UAS com drivers para SN e, assim, gerando, além de superexpressão, também o knockdown por RNAi de IRMs. As construções genéticas contendo Dicer, uma enzima envolvida no processamento de RNAi, serão empregadas para melhorar o knockdown. A quantificação das transcrições será realizada por PCR em tempo real. Para estudos de co-localização e análise de fenótipos, técnicas de citocinética e imunocitoquímica serão empregadas.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, sistema nervoso, linha média, IRM.

Abstract

Silva, AC. Functional study of Irre Cell Recognition Module molecules in developing embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*.. 2017. 56p. Dissertation – Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo.

The Irre Cell Recognition Module (IRM) complex is a small family of transmembrane proteins involved in cellular adhesion and recognition processes. For *Drosophila melanogaster* there are 4 well characterized proteins of this family: Roughest (Rst), Hibris (Hbs), Kin of Irre (Kirre) and Stick and Stones (Sns). In previous studies to elucidate the role of these molecules in *Drosophila* embryonic development, it was noted that the construction pCa18 3.1, which only encodes the extracellular portion of Roughest and is under control of the heat-shock promoter, when overexpressed in early development generate defects in the formation of the nervous system (NS), which are observed only later. It was observed, furthermore, that when this overexpression is carried out in a mutant with a deficiency, in which the coding sequence Hbs is not present, this phenotype is enhanced, suggesting a possible antagonist role between Rst and Hbs in the development of SN. Based on these findings and the information that Rst, Hbs and Kirre are found in the SN during embryonic development, this work aims to further study the role of IRMs in the development of SN. For this purpose, besides the already employed heat-shock promoter, we will use the binary expression system Gal4/UAS with drivers for SN and, thereby, generating, in addition to overexpression, also the knockdown by RNAi of IRMs. Genetic constructs containing Dicer, an enzyme involved in the processing of RNAi, will be employed to enhance the knockdown. The quantification of the transcripts will be carried out by Real Time PCR. For co-localization studies and analysis of phenotypes techniques of cytochemistry and immunocytochemistry will be employed.

Key words: *Drosophila melanogaster*, nervous system, midline, IRM.

Lista de tabelas

Tabela 1: Linhagens de <i>Drosophila melanoster</i> utilizadas	28
Tabela 2: Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência ...	30
Tabela3: Reagentes.....	33

Lista de figuras

Figura 1 – Eventos de neurogênese <i>Drosophila melanogaster</i>	16
Figura 2 – Padronização droso-ventral do embrião e formação da região neurogênica	19
Figura 3 –Estabelecimento dos grupos de competência no SNC e delaminação dos progenitores neurais	42
Figura 4 –Crescimento e direcionamento axonal dos neurônios da corda ventral de <i>Drosophila</i>	44

Sumário

1. Introdução	13
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	13
1.2 Desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.3 Módulo de Reconhecimento Celular Irre	20
2. Objetivo	27
3. Material e métodos	28
3.1 Linhagens utilizadas	28
3.2 Meio de cultura	28
3.3 Imunomarcção de embriões	31
4. Resultados	41
4.1 Padrão de expressão das IRM na linha média.....	41
4.2 Análise funcional de <i>rst</i> e <i>hbs</i> no desenvolvimento do SNC.....	42
4.3 Análise da expressão do produto proteico de <i>rst</i> na linha média.....	45
5. Discussão	49
6. Conclusão	50
7. Referências	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Drosophila melanogaster é um poderosíssimo modelo de estudo e o fato de 6 Nobeis de Medicina terem sido entregues a pesquisadores que desenvolveram seu trabalho utilizando a mosca da fruta é sem dúvida o melhor argumento para se corroborar isso. Um dos pioneiros e conhecido como “pai” da pesquisa em *Drosophila* é o norte-americano Thomas Hunt Morgan (BELLEN; YAMAMOTO, 2015). Morgan foi laureado com o Premio Nobel de 1933 pelos trabalhos a cerca do papel dos cromossomos na hereditariedade (“The Nobel Prize in Physics 1933”, [s.d.]). Mesmo tendo uma carreira curta (1901-1910) Morgan deixou uma prole de brilhantes pesquisadores que foram essenciais para as descobertas na área de genética de eucariotos nos anos que se seguiram. Um bom exemplo foi Hermann Joseph Muller pesquisador formado por Morgan, que com seu trabalho de geração de mutantes através de irradiação de raio x, recebeu o Prêmio Nobel de 1946 (“The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1946”, [s.d.]). Após esses grandes achados, e com a dissipação a respeito do poder da *Drosophila* como modelo, sua utilização se extrapolou para diversas áreas tais como neurociência, biologia celular e do desenvolvimento. Depois de quase 50 anos de jejum, em 1995 a pesquisa com *Drosophila* volta a receber o prêmio máximo da ciência, sendo os drosofilistas Christiane Nüsslein-Volhard, Edward B. Lewis e Eric F. Wieschaus laureados com o prêmio Nobel de Medicina desse ano por seus trabalhos a cerca dos mecanismos genéticos que controlam o desenvolvimento embrionário inicial (“The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1995”, [s.d.]). Em 2000, *Drosophila* ganha ainda mais destaque em estudos genômicos funcionais ao se tornar o segundo organismo modelo a ter seu genoma sequenciado (ADAMS et al., 2000).

Outra contribuição importante do modelo foi para desvendar a organização do sistema olfatório. As pesquisas foram desenvolvidas por Richard Axel e Linda Buck, que além de moscas, utilizaram camundongos e ratos em suas pesquisas e foram laureados com o Prêmio Nobel de 2004 (“The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2004”, [s.d.]). Em 2011, pelos grandes

avanços nas últimas décadas, a imunologia foi área escolhida para receber o prêmio Nobel e dentre os laureados estava o drosofilista francês Jules Hoffmann. Seu nome foi indicado pela descoberta, em 1996, de como o sistema imune inato é ativado em moscas (“The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011”, [s.d.]). Pouco mais de um mês, os ganhadores do Prêmio Nobel de 2017 foram revelados, com três drosofilistas recebendo o prêmio máximo da ciência, os norte-americanos: Michael Young, Jeffrey Hall e Michael Rosbash. A escolha foi pela descoberta do mecanismo molecular que controla os ritmos circadianos - oscilações internas que sincronizam o metabolismo celular e o comportamento do organismo perante o ciclo claro/escuro para gerar ritmos biológicos com periodicidade de 24 hs (“The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017”, [s.d.]).

Mas o que faz da *Drosophila* um organismo modelo tão poderoso? Com um ciclo de vida curto (1 dia-embrionese, 1 dia-primeiro instar, 1-dia segundo instar, 2 dias-terceiro instar e 4-dias pupa), onde em 10 dias temos um indivíduo adulto reprodutivamente ativo formado, a *Drosophila* é ainda um modelo barato, de baixo custo para manutenção e que necessita de pouco espaço para cultivo. As fêmeas vivem por volta de 20 dias e têm capacidade de botar por volta de 100 ovos por dia, o que torna fácil obter grande número de embriões ou moscas para um experimento quando necessário (STOCKER; GALLANT, 2008). Com um genoma compacto, totalmente sequenciado e com aproximadamente 14000 genes codificadores de proteínas, *Drosophila* apresenta ortólogos para 75% dos genes envolvidos em doenças humanas (ADAMS et al., 2000; REITER et al., 2001)

1.2 Desenvolvimento do Sistema Nervoso embrionário de *Drosophila melanogaster*

O Sistema Nervoso é composto por uma complexa coleção de células (neurônios e células da glia) que se organizam de forma a transmitir impulsos elétricos entre diferentes partes do corpo. Ao passo que os neurônios são responsáveis por conduzir os sinais elétricos, as células da glia dão suporte de

diferentes formas aos neurônios (nutricionalmente, estimulando crescimento, isolando os nervos, entre outros), para que esses impulsos elétricos sejam transmitidos de forma efetiva. Os neurônios de *Drosophila* podem ser subdivididos em três tipos principais: i) interneurônios, que apresentam seus dendritos e axônios restritos ao sistema nervoso central; ii) neurônios motores, os quais possuem projeções celulares que se dirigem para fora do sistema nervoso central e se conectam com a musculatura através de junções neuromusculares; e iii) células neurosecretoras, que são neurônios especializados em produzir hormônios (HARTENSTEIN, 2006; HECKSCHER et al., 2014; GOODMAN & DOE, 1993; (SCHMID; CHIBA; DOE, 1999). Já as células da glia podem ser subdivididas em: *cortex*, *neuropil*, superfície e periférica, as quais desempenham as mais variadas funções (GRANDERATH; KLÄMBT, 1999; HARTENSTEIN, 2011; HUMMEL; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999). Um fato interessante é que ao se comparar as diferentes classes de células da glia de *Drosophila* e de mamíferos é notável que suas características morfológicas e funcionais são equivalentes (para mais detalhes FREEMAN; DOHERTY, 2005).

O evento responsável pela geração de células neurais diferenciadas a partir de progenitores neurais recebe o nome de neurogênese. Durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* dois eventos de neurogênese são observados. O primeiro ocorre durante o estágio embrionário, sendo responsável pela formação do sistema nervoso larval. Durante o término do desenvolvimento embrionário os progenitores neurais sofrem apoptose sendo eliminados, no entanto um pequeno número desses neuroblastos (progenitores neurais) se tornam quiescentes e no final do primeiro instar larval ingressam novamente no ciclo celular e participam, assim, do segundo evento de neurogênese de *Drosophila*, que se estende até o estágio pupal, e é responsável por gerar 90% das células do sistema nervoso do indivíduo adulto (HOMEM, 2012). Como o embrião é o foco do nosso estudo serão discutidas a seguir apenas as etapas do desenvolvimento do sistema nervoso restritas a esse estágio .

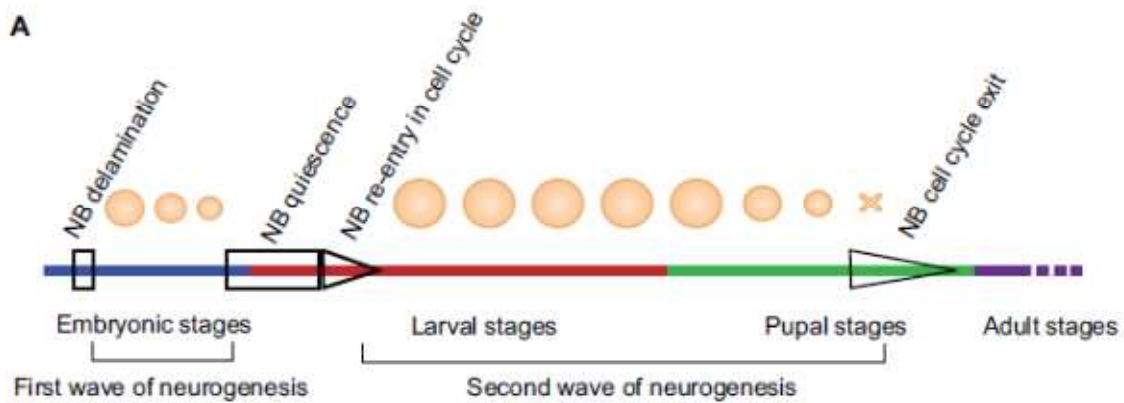


Figura 1: Eventos de neurogênese durante o desenvolvimento de *D. melanogaster*. A figura ilustra os dois períodos de neurogênese que ocorrem ao longo do desenvolvimento de *Drosophila*. Durante o estágio embrionário ocorre a delaminação dos progenitores neurais (neuroblastos) que irão se proliferar para formar o sistema nervoso da larva que irá emergir ao fim do desenvolvimento embrionário. No nos últimos estágios do desenvolvimento embrionário alguns neuroblastos se tornam quiescentes, e só voltarão a entrar no ciclo celular no fim do primeiro instar larval, onde participarão do segundo evento de neurogênese, que se estende até o estágio pupal. (modificado de HOMEM; KNOBLICH, 2012)

No reino animal tanto os bilatérios quanto os pré- bilatérios (Cnidários e Ctenóforos) possuem sistema nervoso. Em todos esses animais o sistema nervoso advém de uma camada epitelial, a ectoderme. A formação dos progenitores neurais ocorre a partir de ganho de competência neural por algumas células da ectoderme, esses progenitores então se separam, migram, proliferam e, por fim, diferenciam. (HARTENSTEIN; STOLLEWERK, 2015). A especificação da região neurogênica no embrião de *Drosophila* (Fig. X) tem início com a formação de um gradiente dorso-ventral formado pela translocação da proteína *Dorsal* para o núcleo celular. A região dorsal do embrião apresenta *Dorsal* localizado no citoplasma, ao passo que na região ventral, *Dorsal* é localizado predominantemente no núcleo das células (ROTH; STEIN; NÜSSLEIN-VOLHARD, 1989). *Dorsal* é um regulador da transcrição e, em níveis ideais, ativa a expressão dos fatores de transcrição *Snail* e *Twist* fazendo com que as células que os expressam tomem o destino mesodérmico.

Duas faixas de células adjacentes a mesoderme apresentam níveis intermediários de *Dorsal* nuclear, o que ativa o receptor *Heartless* e a expressão de *rhomboid*, que por sua vez inibem *twist* e *snail* conferindo a essas células o destino mesectodérmico, caracterizado pela expressão do regulador mestre *Single-minded* (*Sim*) (NAMBU; LEWIS; CREWS, 1993). Com a gastrulação, a mesoderme se invagina e as duas faixas de células que compõem a mesectoderme se tornam justapostas e surge no embrião um novo gradiente no eixo dorso-ventral formado por *Decapentaplegic* (*Dpp*) e *Short gastrulation* (*Sog*). Na região dorsal *Dpp* é altamente expresso ao passo que na região ventral *Sog* é predominantemente expresso. Esse gradiente entre *Dpp* e *Sog* divide a ectoderme em duas regiões, e faz com que a região ventral adquira capacidade neural, sendo agora chamada de neuroectoderme (BIEHS; FRANCOIS; BIER, 1996).

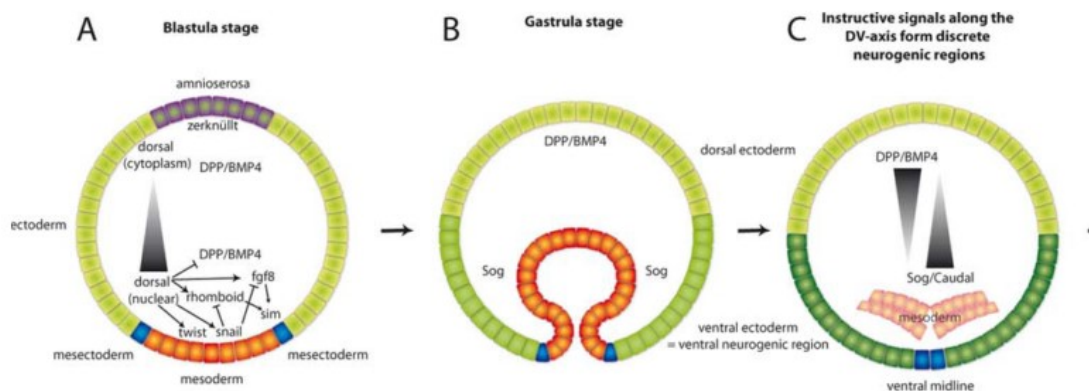


Figura 2.: Padronização dorso-ventral do embrião e formação da região neurogênica. (modificado de ALTENHEIN, 2015).

Dentro da neuroectoderme ocorre um novo tipo de padronização, a segmento/colunar, dividindo-a em diferentes domínios. A padronização segmento colunar faz com que a neuroectoderme fique dividida em segmentos transversais e em três faixas longitudinais, onde cada faixa expressa *vnd* ou *ind* ou *msh*. A expressão diferenciada desses genes, ditos em conjunto genes colunares, possibilita que progenitores neurais com características intrínsecas diversas sejam gerados (SKEATH; THOR, 2003). A formação dos progenitores neurais - que podem ser um neuroblasto, glioblasto ou neuroglioblasto de

acordo com os tipos celulares que darão origem (o termo neuroblasto aqui será utilizado de forma redundante) – tem início com a formação de grupos de competência dentro da neuroectoderme. As células que compõem os grupos de competência (por volta de 6-8 células) expressam genes proneurais (*achaete*, *scute* e *letal of scute*) e assim estão aptas a tomar o destino neural. No entanto, apenas uma única célula dentro do grupo de competência se tornará um progenitor neural e é o processo de inibição lateral mediado pelo receptor *Notch* (*N*) e, seu ligante, *Delta* responsável por isso. O nível de expressão dos genes proneurais dentro do grupo de competência, que por motivos possivelmente estocásticos, sofre flutuação de uma célula para outra. Os produtos proteicos do grupo proneural são responsáveis por ativar a transcrição de *delta*. Quando uma das células do grupo de competência atinge quantidades ideais de *Delta* em sua membrana o receptor *N* é ativado nas células adjacentes (para mais detalhes da sinalização mediada por *N* ver KOPAN; ILAGAN, 2009). *N* ativo sofre processamento proteolítico, liberando sua porção intracelular para o citoplasma. Em seguida, *N* intracelular é translocado para o núcleo, onde funciona como um aliviador da repressão de um grupo específico de genes, os genes neurogênicos (*Enhancer of split* e *Supressor of Hairless*). O grupo neurogênico é responsável por inibir o destino neural fazendo com que as células que o expressam permaneçam na neuroectoderme e tomem o destino epidermal. Assim, temos que apenas um neuroblasto é formado dentro do grupo de competência, o qual se delamina para região interior do embrião, onde proliferará e dará origem as células do sistema nervoso (CAMPOS-ORTEGA, 1998; HARTENSTEIN; WODARZ, 2013; SKEATH; THOR, 2003).

No interior do embrião os neuroblastos se proliferam por meio de divisões celulares assimétricas gerando novos neuroblastos e *ganglion mother cells* (*GMC*), um novo tipo de progenitor neural que consegue se dividir apenas mais uma vez. Na divisão assimétrica ocorre uma distribuição diferenciada, na região basal e apical da célula, de determinantes de diferenciação celular que durante a divisão celular segregam de forma diferente para as células filhas, gerando uma prole composta de tipos celulares distintos (HARTENSTEIN; WODARZ, 2013; JAN; JAN, 2001; SKEATH; THOR, 2003; YU; KUO; JAN,

2006). No neuroblasto em divisão o fator de transcrição *Prospero*, responsável por ativar genes de diferenciação e reprimir genes de proliferação celular, e o inibidor da via de Notch, *Numb*, se localizam na região basal da célula e segregam para a GMC ao fim da divisão celular. Essa polarização celular ocorre com o concurso do complexo heterotrimérico Bazooka/DmPar-6/DaPKC presente na região apical da célula e responsável por regular a segregação dos determinantes de destino celular. Durante a mitose, a quinase Aurora A fosforila Par6, que alivia a repressão da atividade quinase de aPKC. aPKC, então, fosforila Lgl com o seu desprendimento do complexo apical e sendo substituído por Baz. No complexo Baz-Par6-aPKC, Baz se liga a *Numb* permitindo sua fosforilação por aPKC. aPKC fosforila, ainda, *Miranda* que se liga diretamente a *Prospero* e indiretamente a *Numb*. *Miranda* fosforilado é excluído da região apical, segregando juntamente com *Numb* e *Prospero* para o polo basal da célula. Durante a divisão celular do neuroblasto o fuso mitótico se orienta de tal forma que durante ao fim da citocinese a célula seja dividida separando sua região apical da basal. Dessa forma, temos que a divisão celular do neuroblasto é assimétrica no que diz respeito ao tamanho das células geradas, assim como na composição molecular da progênie ((CHIA; SOMERS; WANG, 2008; YU; KUO; JAN, 2006).

Depois de gerada a GMC, essa célula progenitora se divide uma única vez dando origem a células precursoras que irão se diferenciar nos diferentes tipos de neurônios e células da glia. Essa diversidade de tipos celulares é governada por uma especificação espacial (já discutida, que diz respeito de qual região da neuroectoderme o neuroblasto se delamina) e uma especificação temporal que diz respeito do momento em que o neuroblasto se delamina da neuroectoderme. A especificação temporal é governada por uma cascata de fatores de transcrição que são expressos sequencialmente na seguinte ordem: *Hunchback (Hb)* → *Kruppel (Kr)* → *Castor (Cas)* → *Grainyhead (Gh)*. *Hb* é expresso nos neuroblastos assim que eles delaminam, se mantendo nos primeiros eventos de divisão celular. GMCs geradas a partir de neuroblastos expressando *Hb* também irão expressar esse fator de transcrição assim como os neurônios gerados a partir da GMC. Numa segunda janela temporal *Hb* é suprimido e a expressão de *Kr* é ativada, sendo a expressão de *Kr* herdada pela GMC gerada assim como o neurônio. O

neurônio expressando *Kr* terá um destino diferente do neurônio que expressa *Hb*. Já os fatores *Pdm*, *Cas* e *Grainyhead* geram neurônios de outros subtipos (KOHWI; DOE, 2013; YASUGI; NISHIMURA, 2016). Para além disso, os precursores neurais podem expressar o inibidor de destino neural *Glial cell missing* (*Gcm*) fazendo com que esses precursores se diferenciem em células da glia. *Gcm* além de autoativar-se, ativa a transcrição de outros fatores que contribuem para a diferenciação glial, como *reverse polarity*, *pointed* e *tramtrack* (ALTENHEIN, 2015).

Para além da neuroectoderme, outra região do embrião é responsável por originar células que compõem o sistema nervoso embrionário, a mesectoderme. Essa região que se encontra entre a mesoderme e a ectoderme neural dará origem a linha média do sistema nervoso central. A linha média desempenha diferentes funções entre as quais: influencia desenvolvimento da musculatura ventral do embrião (LEWIS; CREWS, 1994); assim como o desenvolvimento de epiderme ventral ((KIM; CREWS, 1993); e, apresenta papel pivotal, no direcionamento e arranjo axonal do sistema nervoso (ARAÚJO; TEAR, 2003; HUMMEL; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999; KEARNEY; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999; KIDD; BLAND; GOODMAN, 1999; NEUHAUS-FOLLINI; BASHAW, 2015; TEAR et al., 1996). Ao fim do desenvolvimento embrionário a linha média é composta por uma grande diversidade de células, cada um dos segmentos do embrião apresenta: 3 células da glia, 2 neurônios motores peptidérgicos (*MP1*), 1 interneurônio dopaminérgico (*H-cell*), 1 interneurônio glutamatérgico (*H-cell sib*), 3 neurônios motores modulatórios glutamatérgicos/octapaminérgicos (*mVUMs*), 3 interneurônios GABAérgicos (*iVUMs*), 1 neuroblasto mediano (*MNB*) e 8 interneurônios locais GABAérgicos (*mnbs*) (WHEELER; STAGG; CREWS, 2009).

O início do desenvolvimento da linha média é marcado pela expressão do regulador mestre *Sim* nas células da mesectoderme. As duas faixas de células que compõem a mesectoderme se tornam justapostas após a gastrulação e com a expansão da banda germinativa se inter cruzam formando uma linha contínua composta por 8 células por seguimento. Em seguida as 8 células progenitoras da linha média passam uma única divisão celular

sincronizada gerando 16 células por segmento, que se encontram organizadas em 8 pares (KLÄMBT; JACOBS; GOODMAN, 1991; NAMBU; LEWIS; CREWS, 1993). As 16 células da linha média agora são dispostas em 3 grupos de equivalência MP1, MP3 e MP4 (*Midline Precursor* 1, 3 e 4). Essas células, na etapa seguinte, tem a sinalização mediada por Notch ativada em diferentes níveis o que garantirá destinos específicos: células com altos níveis de sinalização por Notch tem o destino neural bloqueado e se tornaram células gliais precursoras ou uma célula tronco neural; a célula da linha média que apresenta níveis intermediários de sinalização por Notch dará origem ao MP6, com baixos níveis ao MP5 e as células que apresentam ausência de sinalização por Notch se tornarão MP1, MP3 e MP4 (WHEELER; STAGG; CREWS, 2008).

As células precursoras gliais por sua localização anteroposterior dentro da linha média expressam *runt* ou *engrailed* (WATSON et al., 2011). A células que expressam *engrailed* se diferenciarão em *PMG* (*Posterior Midline Glia*), já as células que expressam *runt* tomaram o destino *ensheating* se tornando *AMG* (*Anterior Midline Glia*). Os precursores neurais se dividirão apenas uma vez dando origem a 2 neurônios cada um. O MP1 sofre divisão assimétrica dando origem a 2 neurônios MP1 (interneurônios peptidérgicos). O MP3 possui seu destino especificado pela expressão de *gooseberry* e sofre uma divisão assimétrica dando origem a uma *H-cell* (neurônio dopaminérgico) e uma *H-cell sib* (neurônio glutamatérgico) (WATSON; CREWS, 2012). Os MP4, MP5 e MP6 sofrem divisões, também de forma assimétrica, dando cada um origem a um *Ventral Unpaired Median* neurônio motor e um *Ventral Unpaired Median* interneurônio. O neuroblasto mediano (MNB) se prolifera gerando 8 neurônios mnb (interneurônios GABAérgicos) se torna quiescente no final do desenvolvimento embrionário e participará do segundo evento de neurogênese. Todas as PMG e algumas AMG sofrem apoptose, sendo que ao final do desenvolvimento embrionário a linha média apresenta apenas 3 AMG que participam do *ensheathment* dos axônios comissurais. Os neurônios MP1 são mantidos apenas dos segmentos A5-A-8/9, sendo eliminados em todos os outros segmentos do embrião (WHEELER; STAGG; CREWS, 2009).

Durante sua diferenciação os neurônios projetam seus axônios e dendritos de forma a alcançarem seus alvos. Dentro da corda ventral do SNC 2 feixes de axônios por segmento atravessam a linha média, formando as comissuras anterior e posterior. Cada axônio cruza a linha média apenas uma vez, feito isso se projetam para região anterior do embrião, formando os conectivos (feixes de axônios paralelos à linha média) e permitindo que conexões entre a corda ventral e cérebro do embrião sejam formadas (ARAÚJO; TEAR, 2003; HUMMEL; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999; KEARNEY; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999). O que dita essa precisa organização das projeções neuronais é um complexo sistema compostos por sinais atrativos e repulsivos emanados da linha média e uma diversidade de receptores desses sinais que são orquestradamente expressos nos diferentes tipos de neurônios, os quais sinalizam para que alterações no citoesqueleto de actina dos cones de crescimento aconteçam.

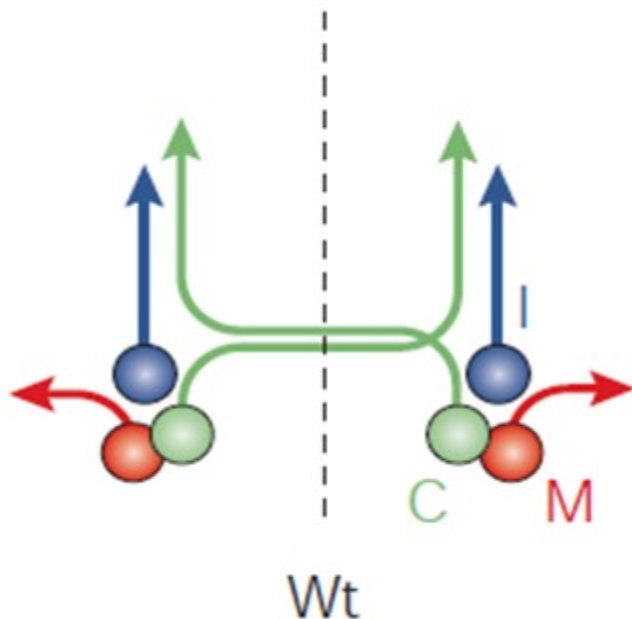


Figura X. Crescimento e direcionamento axonal dos neurônios da corda ventral de *Drosophila*. O esquema simplificado mostra as projeções axonais dos diferentes tipos de neurônios que compõem a corda ventral de *Drosophila*: os neurônios motores (M, vermelho) projetam seus axônios para fora do sistema nervoso central se conectando aos músculos através das junções neuro-musculares; os interneurônios ipsilaterais (I, azul) tem sua projeção axonal restrita a um lado da corda ventral; e os interneurônios comissurais (C, verde) projetam seus axônios contralateralmente, perpassando a linha média, formando assim as comissuras do SNC. (ARAÚJO; TEAR, 2003)

Para formação das comissuras dois sistemas que controlam o direcionamento axonal têm papéis pivotais e são bem estudados: *Netrin/Frazzled*, que desempenha um papel quimioatrativo e *Slit/Robo/Comm*, que desempenha um papel quimiorepressivo. Os axônios dos neurônios comissurais devem cruzar a linha média e isso tem início com a secreção de *Netrin A* e *B* pelas células da glia da linha média e pela expressão do receptor *Frazzled* que ocorre apenas nos neurônios comissurais. Embriões mutantes para os dois genes *netrin* apresentam comissuras mais finas, sugerindo um papel das *Netrins* na atração axonal, que no entanto esse papel depende ainda de outras proteínas (MITCHELL et al., 1996). Ao passo que os axônios

alcançam a linha média eles precisam deixá-la pelo lado oposto e não mais cruzá-la. Mutantes do gene *roundabout (robo)* possuem um fenótipo no qual axônios de neurônios ipsilaterais (não se projetam contralateralmente) se direcionam para a linha média e, ainda, os axônios que cruzavam a linha média apenas uma vez, agora o fazem várias vezes (KIDD; BLAND; GOODMAN, 1999).

Estudos sugerem que Robo é o receptor de sinais repulsivos de Slit, uma proteína secretada pelas células da glia da linha média. Nos neurônios comissurais *Robo* é excluído da membrana plasmática dos cones de crescimento pela ação de *Commissureless (Comm)*, um regulador pós traducional que quando expresso faz com que Robo seja endereçado para degradação (KELEMAN et al., 2002). Dessa forma neurônios que expressam *Comm* não recebem o sinal repulsivo de *Slit*. Ao atingirem a linha média os axônios comissurais tem a exclusão de *Robo* mediada por *Comm* aliviada, o que faz que *Robo* permaneça na membrana plasmática e o sinal repulsivo de *Slit* agora seja recebido pelos axônios comissurais. Fazendo com que os axônios deixem a linha média e não voltem mais a cruzá-la (KELEMAN et al., 2002; KIDD; BLAND; GOODMAN, 1999; RAJAGOPALAN; NICOLAS; DICKSON, 2000; TEAR et al., 1996). Para além dos sistemas expostos o direcionamento axonal dentro da corda ventral conta com sistemas que governam rostral-caudalmente os axônios, se eles irão cruzar a linha média através da comissura anterior ou posterior, entre outros (para mais detalhes (ARAÚJO; TEAR, 2003; NEUHAUS-FOLLINI; BASHAW, 2015; O'DONNELL; CHANCE; BASHAW, 2009; SCHNEIDER et al., 1995).

Para além das perturbações nos sistemas que governam o direcionamento axonal, defeitos no desenvolvimento das células da linha média podem gerar também má formação das comissuras do sistema nervoso. Um exemplo clássico são os mutantes do regulador mestre do desenvolvimento da linha média, *Sim*. Nos Mutantes *Sim* a linha média se degenera o que gera um colapso das projeções neuronais na corda ventral, com a fusão dos conetivos longitudinais (CREWS et al., 1992). Mutações que comprometem especificamente o desenvolvimento de neurônios ou células da glia da linha

média também acabam afetando o correto arranjo das projeções neuronais dentro da corda ventral. Hummel e colaboradores avaliaram os efeitos dos diferentes tipos celulares da linha média na formação das comissuras. A eliminação dos neurônios da linha média gera um afinamento das comissuras o que sugere que os neurônios sejam responsáveis por governar os sinais quimioatrativos. No caso das células da glia, a eliminação dessas células parece não gerar alteração nos sinais de atração da linha média, no entanto as células da glia parecem ter papel pivotal na liberação de sinais repulsivos. Durante o desenvolvimento as comissuras anterior e posterior são formadas unidas e só mais tarde no desenvolvimento as comissuras se separam. Esse separação ocorre pela migração da célula da glia da linha média, que se desloca entre as duas comissuras fazendo com que elas segreguem. Mutações em que o desenvolvimento ou até mesmo a migração das células da glia é comprometidos ocorrem fenótipo onde as comissuras anterior e posterior permanecem unidas.

1.3 Irre Cell Recognition Module (IRM)

2. OBJETIVO

Avaliar o(s) papel(is) das proteínas Roughest e Hibris da famílias das IRMs no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de *Drosophila melanogaster*..

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material 3.1.1 Material Biológico

Neste trabalho foram utilizados embriões e indivíduos adultos de *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) mantidos em cultura no Laboratório de Biologia Molecular do Desenvolvimento do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

3.1.2 Linhagens de *Drosophila melanogaster* utilizadas

3.1.3 Cruzamentos Todos os cruzamentos deste trabalho foram realizados a 24-25°C em

tubos de cultura individuais, sendo o número de machos duas vezes maior do que o número de fêmeas. Os parentais eram retirados do tubo 3 dias após o início dos cruzamentos.

3.2 Métodos

3.2.1 Pré-coleta e coleta de embriões Todos os experimentos realizados neste trabalho seguiram o mesmo

padrão de pré-coleta e coleta. Sempre a 25°C, eram feitas 4 pré-coletas com duração de 30 minutos em placas contendo meio de oviposição. Este procedimento foi realizado para garantir que a maior parte dos embriões estivesse sincronizada no mesmo estágio de desenvolvimento. Logo após a última pré-coleta, cerca de 50-200 embriões eram coletados por períodos que variaram de 30 a 90 minutos, dependendo do experimento, e deixados desenvolver na própria placa de oviposição até o estágio desejado..

3.2.2

4. RESULTADOS

4.1 Padrão de expressão espaço temporal de *roughest* e *hbs* na linha média

Os trabalhos de caracterização das IRMs apontam que três dos quatros membros da família são expressos no sistema nervoso embrionário (ARTERO; CASTANON; BAYLIES, 2001; BOUR et al., 2000; RUIZ-GOMEZ et al., 2000; STRÜNKELNBERG et al., 2001). *rst* e *hbs* são expressos na linha média (ARTERO; CASTANON; BAYLIES, 2001; STRÜNKELNBERG et al., 2001). *kirre* além de ser expresso nas células da linha média parece ser expresso em neurônios adicionais da corda ventral (RUIZ-GOMEZ et al., 2000). Já a expressão de *sns* no sistema nervoso embrionário não foi identificada, sendo expresso apenas nas células precursoras da musculatura do embrião (BOUR et al., 2000). Como nos trabalhos prévios em nosso laboratório sugerem uma interação entre *Rst* e *Hbs* para o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário daremos enfoque para essas duas proteínas da família das IRMs. Como *rst* e *hbs* são expressos na linha média buscamos no bando de dados MidExDB ((WHEELER; STAGG; CREWS, 2009) o padrão de expressão das IRMs (Fig X). Os dados de expressão sugerem 3 janelas temporais nas quais as IRMs são requeridas.

No início do desenvolvimento da linha média (células da mesectoderme) temos curiosamente a expressão de apenas uma das IRMs, *hbs*, Numa janela temporal intermediária no desenvolvimento da linha média (primórdio da linha média) a expressão de *hbs* é mantida e tem início a expressão de *rst*, sendo ambos os IRMs expressas em todas as células desse estágio. Por fim, nos estágio onde as células que compõem a linha média já estão diferenciadas em neurônios e células da glia, não se detecta a expressão de *rst* e o transcrito de *hbs* é restrito as células da glia da linha média. Mesmo informações a respeito da expressão de *kirre* não serem contempladas pelo MidExDB, o trabalho de caracterização desse gene mostra que sua expressão na linha média e na corda ventral ocorre em uma janela temporal na qual as células do sistemas nervoso central já se encontram diferenciadas, Dessa forma o requerimento das IRMs parece ser bastante complexo com uma expressão de *hbs* em todas as células da mesectoderme, expressão que é mantida e somada a expressão

de *rst* em todas as células que compõe a linha média primordia e por fim temos a expressão de *hbs* restrita as células da glia da linha média ao mesmo tempo que a ocorre a expressão de *kirre* na linha média (tipo células desconhecido) e em algumas células da corda ventral.

Figura. Padrão de expressão das IRM durante o desenvolvimeto da linha média. Três janelas temporais de requerimento das IRMs são observados: um requerimento de *hbs* em todas as células da mesectoderme é visualizado no inicio do desenvolvimento da linha média; no estágio de primórdio da linha média *rst* e *hbs* são expressos em todas as células; e no estagio de células diferenciadas temos a expressão de *hbs* restrita as células da glia da linha média em um mesmo período que transcritos de *kirre* são identificados tanto na linha média (tipo celular desconhecido) como em células da corda ventral (“MidExDB”, [s.d.]).

4.2 Análise funcional dos genes *rst* e *hbs* no desenvolvimento da corda ventral.

Com o intuito de avaliar o papel de *rst* e *hbs* para o desenvolvimento do sistema nervoso avaliamos os mutantes. Na análise do mutante *rst*^{CT}, que expressa um produto proteico sem a porção intracelular da proteína *rst*, vimos que ocorre uma formação perfeita das comissuras, no entanto, assim como na superexpressão de *Rst Ecd*, observa-se um afinamento dos conectivos. Sendo o mesmo fenótipo observado na deficiência *Df(1)w*^{67k30} que possui tanto *rst* como *kirre* eliminados do genoma. Ao analisarmos o efeito da ausência de *hbs* através da deficiência *Df(hbs)* observa um severo fenótipo com uma total perda do padrão das projeções axónais dentro da corda ventral, sendo observado ausencia total de comissuras em alguns segmentos, presença de apenas uma comissuras em outros, assim como segmentos que apresentam comissuras unidas.

Apartir desses resultados resolvemos realizar ensaios de perda de função utilizando RNAi para as IRMs. Utilizando o driver *sim-gal4* esperamos obter um silenciamento restrito espacialmente às células da linha média do embrião. Na figura X onde o driver foi cruzado com o estoque UAS-GFP podemos ver uma expressão de GFP restrita às células da linha média. Na análise dos cruzamentos nenhuma alteração foi observada utilizando o RNAi-*rst*. Para o RNAi-*hbs* foi observada uma perfeita formação das comissuras no entanto os conectivos dos embriões apresentam um consideravelmente espessamento comparado ao controle, fenótipo que também foi observado quando os embriões *sim-Gal4>>UAS-RNAi-hbs* foram analisados com a marcação de faloidina que marca citoesqueleto e também permite analisar o arranjo das projeções axonais dentro da linha média. Intrigantemente, quando cruzamos o driver *sim-Gal4* com o duplo RNAi para *rst* e *hbs* (*UAS-RNAi rst/UAS-RNAi hbs*) não é observada qualquer alteração tanto nos conectivos quanto nas comissuras da corda ventral.

4.3 Expressão do produto proteico de *rst* durante o desenvolvimento embrionário.

No passo seguinte buscamos avaliar a localização subcelular dos produtos protéicos dos genes da família IRM nas células da linha média. Mesmo em nosso laboratório a imunomarcação das IRMs para diferentes tecidos como retina, glândula salivar e ovário serem corriqueiramente utilizados tendo protocolos padronizados, as marcações para embriões ainda não possuíam um protocolo estabelecido. Mesmo após exaustivas tentativas, nos valendo dos mais diferentes protocolos não conseguimos estabelecer um protocolo para embrião. Como alternativa resolvemos avaliar a linhagem *Rst-GFP*, que apresenta o gene *rst* endógeno integrado a uma sequência codificadora da *tag* GFP. Obtivemos uma marcação GFP+ nas células da linha média em todas as células que compõem o primórdio da linha média, sendo uma forma marcação visualizada na superfície celular. Esses resultados vão de encontrados às informações prévias obtidas do banco de dados MidExDB e de trabalho prévios (APITZ et al., 2004; STRÜNKELNBERG et al., 2001) que apontam a presença de transcritos do gene *rst* durante esse estágio do desenvolvimento da linha média. Ao

analisarmos embriões em estágios mais avançados onde as células da linha média já estão diferenciadas em neurônios e células da glia, marcações GFP + ao longo dos axônios do CNS da corda ventral. Curiosamente, durante esse período mais avançado do desenvolvimento do sistema nervoso embrionário não existe expressão *rst* descrita na literatura (*rst* é tem seus níveis de expressão decrescendo ao longo do estágio 12, não sendo mais identificado no estágio 13 do desenvolvimento).

5. DISCUSSÃO

5.1 As IRMs são requeridas de maneira distinta em três janelas temporais durante o desenvolvimento da linha média.

Ao integrarmos as informações disponíveis no banco de dados MidExDB e nos trabalhos de caracterização molecular estabelecemos 3 janelas temporais distintas nas quais os genes da família IRM são expressos na linha média durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário. Intrigantemente, na mesectoderme temos que apenas *hbs* e nenhuma outra IRM é expressa. No requerimento canônico das IRMs em eventos celulares de adesão, reconhecimento e sinalização celular temos que o membro de uma subfamília que apresenta um maior domínio extracelular (*Rst* ou *Kirre*, para *Drosophila*) interage de modo heterofilico com membros da outra subfamília que apresentam uma região extracelular menor (no caso, *Hbs* e *SNS* para *Drosophila*). A expressão apenas de *hbs* nos faz levantar 3 hipóteses: 1) *hbs* agiria de forma hemofílica nas células da mesectoderme; ou 2) existiria um parceiro ainda não descrito; ou 3) um requerimento não canônico de híbris, que independe da presença de um parceiro, ocorrer nas células da mesectoderme. Sendo as duas primeiras hipóteses bem remotas, mas o que não faz com que elas sejam descartadas, a terceira hipóteses de um requerimento não canônico deve ser vista com bons olhos. Mutantes *hbs* apresentam alterações idênticas a fenótipos clássicos de Notch. O trabalho de Singh e colaboradores mostrou que células que apresentam altos níveis de sinalização mediada por Notch tem a clivagem do receptor estabilizada por *Hbs*, pelo fato de *Hbs* participar da

maturação de Presinilin, um dos membros do complexo de processamento transmembranar γ -secretase. (SINGH; MLODZIK, 2012).

A segunda janela de requerimento das IRMs ocorre no chamado primórdio da linha média, que é constituída por células precursoras que darão origem aos diferentes tipos celulares que compõem a linha média no final do desenvolvimento embrionário. Nesse estágio a expressão de hbs que é observada nas células da mesectoderme é mantida e tem início a expressão de *rst*, sendo ambas as IRMs expressas em todas as células desse estágio. Bao & Cagan mostraram que uma interação entre *Rst* e *Hbs* regula o desenvolvimento do olho composto de *Drosophila* (BAO et al., 2010). Na análise funcional de *rst* foi observado que tanto a superexpressão de *RstEcd*, como o mutante *rst*^{CT} e a deficiência *D(l)w*^{67k30} apresentaram defeitos de formação do sistema nervoso com uma diminuição na espessura dos conectivos e sendo observado, apenas na superexpressão de *RstEcd*, defeitos nas comissuras. O fato do artigo seminal de

Somado a isso, análises prévias realizadas em nosso laboratório mostraram que a superexpressão de *RstEcd* gera defeitos de formação do SNC, com redução na espessura dos conectivos e má formação de algumas comissuras da corda ventral. E que quando a superexpressão de *RstEcd* é realizada em um background com apenas com uma 50% da dose de *Hbris*, ocorre um aumento na severidade desses fenótipos (MODA; RAMOS, 2008). Quando analisamos estoques mutantes e deficientes para as IRMs vimos que o mutante *rst*^{CT}, que é funcionalmente inativo, apresenta um fenótipo de de redução da espessura dos conectivos de forma parecida ao observado na superexpressão de *RstEcd* comissuras (somado a análises prévias de nosso laboratório que mostraram que a superexpressão de *RstEcd*, que parece ser secretado, A expressão de ambas as IRMs nas células primordiais da linha média nos leva interação preferencial de *rst* e *hbris* ocorre também Em trabalho prévio em nosso laboratório foi mostrado que a superexpressão de *RstEcd* gera fenótipos severos de má formação do sistema nervoso

6. CONCLUSÃO

a) As IRMS Rst, Kirre e Hbs tem seus genes expressos na linha média do SNC, hbs é expresso ao longo de todo desenvolvimento da linha média, sendo a expressão de hbs restrita às células da glia na linha média madura, já rst apresenta expressão restrita as células da linha média primordial e kirre sendo expresso apenas na linha média madura (tipos celulares desconhecido);

b) A análise do mutante rst^{CT} mostrou fenótipo de afinamento dos conectivos, alteração que tbm foi observada na deficiência Df(l)w^{63k30}, assim como no estudo prévio da superexpressão de RstEcd, o que sugere um papel de rst perfeito desenvolvimento das células da linha média ou em sistemas de direcionamento axonal;

c) Os embriões deficientes para o gene hbs apresentaram um severo fenótipo de má formação dos arranjos axonais da corda ventral. Isso somado ao fenótipo de espessamento dos conetivos observados durante o *knockdown* de hbs na linha média e o aumento da severidade dos fenótipos de má formação do SNC observada durante a superexpressão de RstEcd fortalecem a hipótese de um requerimento de hbs para um perfeito desenvolvimento das células da linha média assim como nos sistemas de direcionamento axonal da linha média;

d) Da análise do produto proteico da do gene rst, foi observado que uma marcação GFP+ foi observada na linha média primordial indo de encontro as informações do banco de dados MidExDB que aponta a presença do seu transcrito nesse período. Por outro lado a presença de Rst- GFP nos axônios da corda ventral diverge de dados prévios de expressão do transcrito de rst, que não foram identificado em células diferenciadas do sistema nervoso, sugerindo que a proteína comporte de maneira bastante estável no final do desenvolvimento ou que o fato da acoplamento da *tag* GFP dificulte o transporte de RST-GFP para degradação.

e) O fato de hbs ter uma expressão restrita a células da glia da linha média madura sugerem a utilização de como um marcador de células da glia da linha média, que não podem ser identificadas pela expressão do marcador glial Rep, visto que seu gene não é expresso nas células da glia da linha média

. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5461, p. 2185–95, 24 mar. 2000.

ALTENHEIN, B. Glial cell progenitors in the *Drosophila* embryo. **Glia**, v. 63, n. 8, p. 1291–1302, 2015.

APITZ, H. et al. Identification of regulatory modules mediating specific expression of the *roughest* gene in *Drosophila melanogaster*. **Development Genes and Evolution**, v. 214, n. 9, p. 453–459, 2004.

ARAÚJO, S. J.; TEAR, G. Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 910–922, 2003.

ARTERO, R. D.; CASTANON, I.; BAYLIES, M. K. The immunoglobulin-like protein *Hibris* functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 21, p. 4251–4264, 2001.

BAO, S. et al. Preferential adhesion maintains separation of ommatidia in the *Drosophila* eye. **Developmental Biology**, v. 344, n. 2, p. 948–956, 2010.

BELLEN, H. J.; YAMAMOTO, S. Morgan's Legacy: Fruit Flies and the Functional Annotation of Conserved Genes. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 12–14, 24 set. 2015.

BIEHS, B.; FRANCOIS, V.; BIER, E. The *Drosophila* short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm. **Genes & Development**, v. 10, n. 22, p. 2922–2934, 15 nov. 1996.

BOUR, B. A. et al. *Drosophila* SNS , a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. p. 1498–1511, 2000.

CAMPOS-ORTEGA, J. A. The genetics of the *Drosophila* achaete-scute gene complex: A historical appraisal. **International Journal of Developmental Biology**, v. 42, n. 3, p. 291–297, 1998.

CHIA, W.; SOMERS, W. G.; WANG, H. *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. **The Journal of cell biology**, v. 180, n. 2, p. 267–72, 28 jan. 2008.

CREWS, S. et al. *Drosophila* single-minded gene and the molecular genetics of CNS midline development. **The Journal of experimental zoology**, v. 261, n. 3, p. 234–44, 1992.

FREEMAN, M. R.; DOHERTY, J. Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. **Trends in Neurosciences**, 2005.

GOODMAN, C.S., DOE, C.Q. Embryonic development of the *Drosophila* nervous system. In: Martinez-Arias A, Bate M, editors. The Development of *Drosophila melanogaster*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**,. p. 1091–1131,1993

GRANDERATH, S.; KLÄMBT, C. Glia development in the embryonic CNS of *Drosophila*. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, n. 5, p. 531–536, 1999.

HARTENSTEIN, V. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. 2006.

HARTENSTEIN, V. Morphological diversity and development of glia in *Drosophila*. **Glia**, v. 59, n. 9, p. 1237–1252, 2011.

HARTENSTEIN, V.; STOLLEWERK, A. The evolution of early neurogenesis. **Developmental Cell**, v. 32, n. 4, p. 390–407, 2015.

HARTENSTEIN, V.; WODARZ, A. Initial neurogenesis in *Drosophila*. **Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology**, v. 2, n. 5, p. 701–21, 2013.

HECKSCHER, E. S. et al. The eNeuro atlas : a modifiable , searchable 3D atlas that individually identifies the majority of interneurons in the *Drosophila* embryonic CNS and provides tools for functional access. 2014.

HOMEM, C. C. F.; KNOBLICH, J. A. *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. **Development**, v. 139, n. 23, p. 4297–4310, 2012.

HUMMEL, T.; SCHIMMELPFENG, K.; KLÄMBT, C. Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. **Development (Cambridge, England)**, v. 126, n. 4, p. 771–779, 1999.

JAN, Y.-N.; JAN, L. Y. Development: Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 11, p. 772–779, nov. 2001.

KEARNEY, J. B.; SCHIMMELPFENG, K.; KLÄMBT, C. Commissure Formation in the Embryonic CNS of *Drosophila* I . Identification of the Required Gene Functions. **Developmental Biology**, v. 398, p. 381–398, 1999.

KELEMAN, K. et al. Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 415–27, 23 ago. 2002.

KIDD, T.; BLAND, K. S.; GOODMAN, C. S. Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in *Drosophila*. **Cell**, v. 96, p. 785–794, 1999.

KIM, S. H.; CREWS, S. T. Influence of *Drosophila* ventral epidermal development by the CNS midline cells and spitz class genes. **Development (Cambridge, England)**, v. 118, n. 3, p. 893–901, jul. 1993.

KLÄMBT, C.; JACOBS, J. R.; GOODMAN, C. S. The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. **Cell**, v. 64, n. 4, p. 801–815, 1991.

KOHWI, M.; DOE, C. Q. Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 823–838, 2013.

KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. G. Review The Canonical Notch Signaling Pathway : Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, 2009.

LEWIS, J. O.; CREWS, S. T. Genetic analysis of the *Drosophila* single-minded gene reveals a central nervous system influence on muscle development. **Mechanisms of Development**, v. 48, n. 2, p. 81–91, 1 nov. 1994.

MidExDB. Disponível em: <http://midline.bio.unc.edu/MDB_home.aspx>. Acesso em: 19 out. 2017.

MITCHELL, K. J. et al. Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. **Neuron**, v. 17, n. 2, p. 203–215, 1996.

MODA, L.; RAMOS, R. Dissecção funcional in vivo da molécula de adesão celular Roughest durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster*. 2008.

NAMBU, J. R.; LEWIS, J. O.; CREWS, S. T. The development and function of the *Drosophila* CNS midline cells. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 104, n. 3, p. 399–409, 1993.

NEUHAUS-FOLLINI, A.; BASHAW, G. J. Crossing the embryonic midline: molecular mechanisms regulating axon responsiveness at an intermediate target. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 4, n. August, p. 377–389, 2015.

O'DONNELL, M.; CHANCE, R. K.; BASHAW, G. J. Axon Growth and Guidance: Receptor Regulation and Signal Transduction. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 32, p. 383–412, 2009.

RAJAGOPALAN, S.; NICOLAS, E.; DICKSON, B. J. Crossing the Midline: Roles and Regulation of Robo Receptors. **Neuron**, v. 28, p. 767–777, 2000.

REITER, L. T. et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome research**, v. 11, n. 6, p. 1114–25, 1 jun. 2001.

ROTH, S.; STEIN, D.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. **Cell**, v. 59, n. 6, p. 1189–202, 22 dez. 1989.

RUIZ-GOMEZ et al. Dumbfounded: A Myoblast Attractant Essential for Fusion. v. 102, p. 189–198, 2000.

SCHMID, A; CHIBA, A; DOE, C. Q. Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. **Development (Cambridge, England)**, v. 126, n. 21, p. 4653–4689, 1999.

SCHNEIDER, T. et al. Restricted Expression of the *irreC-rst* Protein Is Required for Normal Axonal Projections of Columnar Visual Neurons. v. 15, p. 259–271, 1995.

SINGH, J.; MLODZIK, M. *Hibris*, a *Drosophila* Nephrin Homolog, Is Required for Presenilin-Mediated Notch. **Developmental Cell**, v. 23, n. 1, p. 82–96, 2012.

SKEATH, J. B.; THOR, S. Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, n. 1, p. 8–15, 2003.

STOCKER, H.; GALLANT, P. Getting Started. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 420p. 27–44.

STRÜNKELNBERG, M. et al. *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 21, p. 4229–4239, 2001.

TEAR, G. et al. commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. **Neuron**, v. 16, n. 3, p. 501–514, 1996.

The Nobel Prize in Physics 1933. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1933/>. Acesso em: 14 out. 2017.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1946. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1946/>. Acesso em: 14 out. 2017.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1995. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1995/>. Acesso em: 14 out. 2017.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2004. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2004/>. Acesso em: 14 out. 2017.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2011/>. Acesso em: 14 out. 2017.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2017/>. Acesso em: 14 out. 2017.

WATSON, J. D. et al. *Drosophila* hedgehog signaling and engrailed-runt mutual repression direct midline glia to alternative ensheathing and non-ensheathing fates. **Development**, v. 1295, p. 1285–1295, 2011.

WATSON, J. D.; CREWS, S. T. Formation and specification of a *Drosophila* dopaminergic precursor cell. **Development**, v. 3325, p. 3316–3325, 2012.

WHEELER, S. R.; STAGG, S. B.; CREWS, S. T. Multiple Notch signaling events control *Drosophila* CNS midline neurogenesis , gliogenesis and neuronal identity. **Development**, v. 3079, p. 3071–3079, 2008.

WHEELER, S. R.; STAGG, S. B.; CREWS, S. T. MidExDB: A database of *Drosophila* CNS midline cell gene expression. v. 9, p. 1–9, 2009.

YASUGI, T.; NISHIMURA, T. Temporal regulation of the generation of neuronal diversity in *Drosophila*. **Development Growth and Differentiation**, v. 58, n. 1, p. 73–87, 2016.

YU, F.; KUO, C. T.; JAN, Y. N. *Drosophila* neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. **Neuron**, v. 51, n. 1, p. 13–20, 6 jul. 2006.