UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES PATOGÊNICOS

**Análise do padrão de expressão de BhC4-1-GFP em linhagens
transgênicas de *Drosophila melanogaster***

Vitor Trinca

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES PATOGÊNICOS

**Análise do padrão de expressão de BhC4-1-GFP em linhagens
transgênicas de *Drosophila melanogaster***

Dissertação submetida à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de *Mestre em Ciência*, área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Discente: Vitor Trinca
Orientadora: Profa. Dra. Nadia Monesi

Ribeirão Preto

2018

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.

Trinca, Vitor

Análise do padrão de expressão de BhC4-1-GFP em linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster*. Ribeirão Preto, 2018.

66 p.: il.; 30 cm

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vitor Trinca

Título: Análise do padrão de expressão de BhC4-1-GFP em linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster*

Dissertação submetida à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de *Mestre em Ciência*, área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Aprovado em: __/__/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a).

Instituição:

Avaliação: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).

Instituição:

Avaliação: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).

Instituição:

Avaliação: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

A professora Profa Dra Nadia, pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, pela paciência, ensinamentos, orientação e principalmente pelo crescimento profissional que me proporcionou;

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto por toda a infraestrutura oferecida;

A Srta. Gabriela, secretária do programa de pós-graduação em Biologia celular e molecular por todo suporte e ajuda com questões burocráticas;

As amigas e técnicas de laboratório, Maraísa, Marília e Vanessa, por toda ajuda e companheirismo;

Aos meus colegas de laboratório, Henrique, Jorge, João Vitor, Júlia, Luciana e Mariana pela assistência durante experimentos e pelas boas risadas;

Aos meus amigos pessoais que sempre me ajudam da melhor forma possível;

Em especial, à minha família, Pedro, Adriana e Júlia, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e foram minha base durante este período;

A CAPES pelo suporte financeiro e;

A FAPESP pelo auxílio regular ao laboratório.

RESUMO

TRINCA, V. **Análise do padrão de expressão de BhC4-1-GFP em linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster***. 2018. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Nosso laboratório investiga os mecanismos moleculares que promovem o estabelecimento de padrões de expressão gênica regulados no desenvolvimento em eucariotos superiores. Como modelo, utilizamos o gene de pufe de DNA *BhC4-1*, que é amplificado e expresso de modo regulado na glândula salivar e na glândula protorácica no final do quarto estadio larval de *B. hygida*. Estudos funcionais em *D. melanogaster* resultaram na identificação de módulos *cis*-reguladores (MCRs) na região promotora do gene *BhC4-1*. O MCR de glândula anelar de 67 bp (-253/-187), promove a expressão de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar a partir do final do desenvolvimento embrionário. O MCR de glândula salivar de 129 bp (-186/-58), dirige a expressão do transgene nas glândulas salivares de pré-pupas. A glândula anelar é o principal órgão endócrino larval e em *D. melanogaster* é o resultado da fusão das glândulas protorácicas (responsáveis pela síntese de hormônios esteroides), *corpus allatum* (síntese de hormônio juvenil) e *corpus cardiacum* (glândula neuroendócrina). Neste trabalho foram obtidas 12 linhagens independentes transformadas com uma construção que contém o fragmento (-253/+40) do promotor do gene de pufe de DNA *BhC4-1* clonado à montante do gene repórter GFP. O genótipo destas linhagens foi validado utilizando-se *Southern blots*. Inicialmente as 12 linhagens obtidas foram analisadas quanto ao padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estadio e em pré-pupas 2 horas. Em conjunto, esta análise revelou que o padrão de expressão de GFP é bastante variável nestas linhagens. A análise do padrão de expressão da proteína repórter foi estendida em duas linhagens representativas da série (-253/+40)/GFP. Nestas linhagens a expressão de GFP é inicialmente detectada na glândula salivar durante o estágio de pré-pupa e na glândula anelar a partir do terceiro estadio larval. Diferentemente do anteriormente observado em linhagens (-253/+40)/*lacZ*, nestas linhagens não detectamos a expressão de GFP em tempos do desenvolvimento anteriores ao terceiro estadio larval. Experimentos de interação gênica revelaram que na ausência do fator de transcrição *br*, a expressão de GFP é mantida na glândula anelar e abolida na glândula salivar de larvas de terceiro estadio. Os resultados dos experimentos de interação gênica corroboram dados anteriores que indicavam que o conjunto de fatores de transcrição que regulam a expressão de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar é distinto daquele que promove a expressão do gene na glândula salivar. As linhagens obtidas neste trabalho constituem uma ferramenta a ser utilizada na caracterização de fatores de transcrição tecido-específicos que

regulam o gene *BhC4-1* na glândula anelar e/ou na glândula salivar a partir do final do desenvolvimento larval.

Palavras-chave: glândulas protorácicas; glândula salivar; módulos *cis*-reguladores; sciarídeos, desenvolvimento.

ABSTRACT

TRINCA, V. **Analysis of the pattern of BhC4-1-GFP expression in *Drosophila melanogaster* transgenic lines.** 2018. Dissertação (mestrado). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo.

Our laboratory investigates the molecular mechanisms that promote the establishment of developmentally regulated gene expression patterns in metazoans. As a model, we employ the *BhC4-1* DNA puff gene, which is amplified and expressed in a regulated manner in the salivary gland and in the prothoracic gland at the end of the fourth larval instar in *B. hygida*. Functional studies in *D. melanogaster* resulted in the identification of *cis*-regulatory modules (CRMs) in the *BhC4-1* promoter region. The 67 bp (-253/-187) ring gland CRM drives *BhC4-1-lacZ* expression in the ring gland from late embryonic development. The 129 bp (-186/-58) CRM salivary gland drives transgene expression in the prepupal salivary glands. The ring gland is the major endocrine organ, and comprises the prothoracic glands (synthesis of ecdysteroid hormones), *corpus allatum* (synthesis of juvenile hormone) and *corpus cardiacum* (neuroendocrine gland). In this work, 12 independent lines transformed with a construct containing the *BhC4-1* promoter fragment (-253/+40) cloned upstream of the reporter gene GFP were obtained. The genotype of each line was validated using Southern blots. Initially, the 12 obtained lines were analyzed to investigate the pattern of GFP expression in the third instar larvae and in the 2 hours prepupae. This initial screening revealed that the pattern of GFP expression is highly variable in these lines. The developmental pattern of GFP expression was extended in two representative (-253/+40)/GFP lines. In these lines, GFP expression is initially detected in the larval and prepupal salivary glands and in ring gland third instar. Differently from previously observed in (-253/+40)/*lacZ* lines, in these lines we did not detect GFP expression at developmental times prior to the third larval instar. Gene interaction experiments revealed that in the absence of the *br* transcription factor, GFP expression is maintained in the ring gland and abolished in the salivary gland of third instar larvae. The results of gene interaction experiments corroborate previous data indicating the set of transcription factors that regulate *BhC4-1-lacZ* expression in the ring gland is distinct from that which promotes gene expression in salivary glands. The lines obtained in this work constitute a tool to characterize the tissue-specific transcription factors that regulate *BhC4-1* gene in the ring gland and/or in the salivary gland from the end of the larval development.

Keywords: prothoracic glands; salivary gland; *cis*-regulator modules; sciarids, development

Lista de figuras

Figura 1	Estrutura da glândula anelar de <i>D. melanogaster</i>	10
Figura 2	Esquema do transgene integrado no genoma de <i>D. melanogaster</i>	16
Figura 3	Esquema dos cruzamentos realizados para obtenção das linhagens da série (-253/+40)/GFP duplo homozigotas	23
Figura 4	Caracterização em <i>Southern Blot</i> das 12 linhagens transgênicas da série (-253/+40)/GFP	32
Figura 5	Caracterização em <i>Southern blot</i> das quatro linhagens da série (-253/+40)/GFP duplo homozigotas	33
Figura 6	Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas nas linhagens 2-1, 4-1, 17-1 e 56-3 da série (-253/+40)/GFP	35
Figura 7	Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas nas linhagens 66-1, 70-3, 73-1 e 74-1 da série (-253/+40)/GFP	36
Figura 8	Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas nas linhagens 79-1, 90-3, 102-1 e 113-3 da série (-253/+40)/GFP	37
Figura 9	Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas nas linhagens duplo homozigotas 66;56, 73;56, 66;90 e 73;90 da série (-253/+40)/GFP	38
Figura 10	Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP ao longo do desenvolvimento na linhagem 2-1 da série (-253/+40)/GFP	40
Figura 11	Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP nos sistemas reprodutores de machos e fêmeas adultos da linhagem 2-1 da série (-253/+40)/GFP	40
Figura 12	Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP em ao longo do desenvolvimento da linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP	41
Figura 13	Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP nos sistemas reprodutores de machos e fêmeas	41

adultos da linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP

Figura 14

Análise do padrão de expressão de GFP em machos $npr1^{3w};(-253/+40)/GFP$.

42

Lista de tabelas

Tabela 1

Número de embriões injetados, larvas e adultos obtidos a partir da injeção da construção (-253/+40)/GFP

29

Tabela 2

Linhagens estabelecidas, mapeamento do cromossomo no qual ocorreu a integração do transgene e o número de cópias do transgene no genoma, determinado por *Southern blot*.

29

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Regulação da expressão gênica em eucariotos superiores	1
Cromossomos politênicos e pufes de DNA.....	2
Biossíntese de hormônios esteroides em <i>Drosophila melanogaster</i>	4
Amplificação e expressão do gene <i>BhC4-1</i> do pufe de DNA C4 de <i>Bradysia hygida</i>	7
A glândula salivar de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
A glândula anelar de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Estudos funcionais e caracterização dos módulos <i>cis</i> -reguladores de <i>BhC4-1</i> das glândulas salivares e anelar	11
OBJETIVOS	15
MATERIAIS E MÉTODOS	16
Materiais Biológicos	16
Métodos	17
Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	17
Condicionamento de adultos e coleta de embriões	17
Preparação de DNA plasmidial	18
Eletroforese em gel de agarose	19
Preparo da solução de injeção	19
Obtenção de linhagens transgênicas de <i>D. melanogaster</i>	20
Obtenção dos duplos homozigotos.....	22
Ensaio de interação gênica.....	23
Aquisição e análise das imagens	24
Extração de DNA genômico de <i>D. melanogaster</i>	24
Digestão de DNAs.....	25
Purificação de DNA a partir de géis de agarose.....	25
Southern blot	25
Preparação da sonda de hibridação.....	26
Hibridação, geração do sinal e detecção	27
RESULTADOS.....	28
Estrutura do transgene (-253/+40)/GFP	28
Obtenção das linhagens da série (-253/+40)/GFP	28
Caracterização das linhagens transgênicas da série (-253/+40)/GFP por <i>Southern Blot</i>	30
Caracterização do padrão de expressão da proteína repórter GFP nos estágios L3 e pré-pupa 2 horas nas linhagens da série (-253/+40)/GFP	33
Caracterização do padrão de expressão da proteína repórter GFP nas linhagens 2-1 e 66-1 da série (-253/+40)/GFP durante o desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i>	39
Análise de interação gênica entre a linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP e a linhagem <i>npr1^{3w}</i>	39
DISCUSSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS	55

INTRODUÇÃO

Regulação da expressão gênica em eucariotos superiores

Os eucariotos empregam estratégias elaboradas na regulação da expressão gênica. A transcrição de um gene é um processo que depende de dois principais fatores que agem junto ao DNA, os elementos *cis*-reguladores e os fatores *trans*-ativadores que atuam na ativação ou na repressão da expressão de um dado gene (Gerstein et al., 2012; Zhang et al., 2012). As interações entre esses elementos regulam finamente os padrões de expressão gênica ao longo do desenvolvimento em tecidos específicos.

Os elementos *cis*-reguladores são sequências a montante, a jusante e/ou na região intrônica da sequência codificadora do gene. As regiões reguladoras, conhecidas como promotores, são mais comumente encontradas em metazoários. Os promotores são compostos pelo promotor basal, módulos de ativação, silenciadores e os insuladores (Ong e Corces, 2011) e podem apresentar de 5 a 20 módulos *cis*-reguladores (MCRs). Os MCRs são regiões reguladoras dos genes formadas por sequências de DNA, tipicamente não codificadoras, que apresentam sítios de ligação de fatores de transcrição e assim agem em conjunto para a regulação de um gene em determinado tempo do desenvolvimento (Davidson, 2006; Jeziorska et al., 2009; Ong e Corces, 2011).

O promotor basal é o MCR localizado mais próximo à região codificadora do gene e é onde a maquinaria basal de transcrição se liga. A maquinaria basal de transcrição é composta pelos fatores gerais de transcrição, pela RNA polímerase II e pela proteína de ligação da região consenso TATA *box*. A região consenso TATA *box* fica normalmente localizada antes do sítio de início da transcrição e é o elemento *cis*-regulador de início da transcrição mais importante na maioria dos eucariotos (Juven-Gershon et al., 2008; Spitz e Furlong, 2012).

Além do promotor basal, outros elementos *cis*-reguladores compõem o promotor. Os insuladores são regiões que regulam a atividade gênica em um *locus* e podem interagir com estruturas nucleares a fim de promover a

interação de MCRs que estão à longa distância (*loops* da cromatina) (revisado por Kyrchanova e Georgiev, 2014). Os silenciadores são repressores transcricionais que apresentam sítios de ligação de fatores repressores e interagem com a maquinaria basal de transcrição impedindo a expressão de um dado gene. Ao contrário dos silenciadores, os MCRs de ativação têm a função de atuar na ativação da transcrição, facilitando o recrutamento e montagem do complexo de iniciação de transcrição (Levine e Tjian, 2003; Ong e Corces, 2011; Spitz e Furlong, 2012).

Os fatores *trans*-ativadores ou fatores de transcrição são proteínas que apresentam domínios de ligação ao DNA e têm função de regular a expressão gênica, ativando ou inibindo a transcrição. Os fatores de transcrição podem ser encontrados na forma monomérica ou formando complexos que recrutam a maquinaria de transcrição para genes específicos. Os fatores de transcrição apresentam três motivos de ligação em sua estrutura: 1) os motivos de ligação ao DNA, que reconhecem sequências específicas de DNA, ou seja, os MCRs de ativação ou os silenciadores; 2) os motivos *trans*-ativadores, que reconhecem outros fatores de transcrição ou corretores, e; 3) os domínios de detecção de sinal, onde os fatores de transcrição detectam os sinais externos e, em resposta, transmitem esses sinais para o complexo de transcrição, resultado em um ajuste na expressão gênica (Latchman, 1997; Lee e Young, 2000; Levine e Tjian, 2003).

Em síntese, a ativação de um gene em determinado momento do desenvolvimento, em um tecido específico, é um processo complexo que depende de vários fatores. Entre eles, a RNA polimerase II, proteínas ligantes de DNA, corretores e os MCRs, devem agir em perfeita harmonia, para o correto funcionamento celular e o desenvolvimento do organismo.

Cromossomos politênicos e pufes de DNA

Cromossomos politênicos são cromossomos gigantes formados a partir do produto de múltiplos ciclos de replicação do DNA. Nestes cromossomos o DNA é replicado durante a interfase e não há separação das cromátides irmãs, nem a divisão celular (Zhimulev et al., 2004). Os cromossomos politênicos foram inicialmente descritos por (Balbiani), em 1881, nas células das glândulas

salivares de larvas da família Chironomidae (Stormo e Fox, 2017). Cromossomos politênicos são encontrados em um conjunto diverso de organismos, incluindo vertebrados [humanos, (Sarto, 1982); camundongos, (Hannibal et al., 2014)], plantas [Zea mays, (Nagl, 1981)] e insetos (Balbiani, 1881). (revisado por Stormo e Fox, 2017)

Nos cromossomos politênicos é possível a visualização de bandas escuras e claras, que correspondem a regiões mais e menos condensadas da cromatina, respectivamente. As bandas escuras estão em estado heterocromático, com menor acesso de proteínas ao DNA. Já as bandas claras estão em estado eucromático e em geral apresentam atividade transcricional (Zhimulev et al., 2004).

De maneira regulada no desenvolvimento, os pufes de DNA e de RNA surgem a partir da descompactação de algumas bandas claras dos cromossomos politênicos. Os pufes de RNA são de ocorrência geral nos Dípteros, e a sua formação está relacionada com o afrouxamento da cromatina e a transcrição desses *loci* (Ashburner et al., 1974; Thummel, 1996). Por outro lado, os pufes de DNA, característicos da família Sciaridae, são locais do genoma onde ocorrem, de maneira regulada no desenvolvimento, a amplificação e a abundante transcrição de genes amplificados (Lara et al., 1991; Stocker et al., 1996; Monesi et al., 2009; Simon et al., 2016). O hormônio esteroide ecdisona constitui o único fator identificado até o momento capaz de promover a formação dos pufes de DNA e a amplificação e expressão de genes de pufes de DNA (Monesi et al., 2009). A amplificação, associada a elevados níveis de transcrição desses *loci*, resulta na produção de grandes quantidades de proteínas de pufes de DNA em curtos períodos de tempo. Os produtos dos genes de pufes de DNA são encontrados nas glândulas salivares e em sua secreção. As funções desses produtos estariam relacionadas com a formação do casulo, pois a abertura dos pufes e a expressão de seus produtos são encontradas no final do desenvolvimento da fase larval. (Winter et al., 1977; Laicine et al., 1984; De-Almeida, 1997; Fontes et al., 1999; Monesi et al., 2004).

Biossíntese de hormônios esteroides em *Drosophila melanogaster*

Os hormônios esteroides são derivados de moléculas de colesterol e têm função indispensável para o desenvolvimento, tanto no reino animal como no vegetal. Em vertebrados, esses hormônios agem em inúmeros processos, incluindo reprodução, diferenciação celular, metabolismo, homeostase e o funcionamento do cérebro (Hosie et al., 2006; Huang et al., 2008).

Em insetos, os hormônios esteroides, ecdisona e a sua forma ativa 20-hidroxiecdisona (20E), atuam principalmente na muda durante o desenvolvimento, na oogênese e no funcionamento neural, em condições fisiológicas. Em plantas os hormônios esteroides são essenciais para os processos de desenvolvimento, incluindo diferenciação e proliferação celular (Riddiford et al., 2000; Asami et al., 2005).

Durante o desenvolvimento de *D. melanogaster*, pulsos alternados maiores e menores de ecdisona são liberados na hemolinfa em todos os estágios do desenvolvimento. Os pulsos maiores, com maiores títulos do hormônio, são responsáveis pelas mudanças durante o desenvolvimento e na diferenciação celular. Já os pulsos menores, influenciam mudanças na fisiologia do inseto, como o fim do comportamento alimentar o qual ocorre no final do terceiro estadio larval (Riddiford, 1993).

Durante o desenvolvimento larval de *D. melanogaster*, a biossíntese do hormônio esteroide ecdisona ocorre nas células das glândulas protorácicas, um dos componentes da glândula anelar. A glândula protorácica degenera durante a metamorfose (Dai e Gilbert, 1991) e, portanto, em adultos a biossíntese de ecdisona ocorre em outros tecidos. Em fêmeas adultas de *D. melanogaster* os genes *halloween*, responsáveis pela biossíntese de ecdisona na glândula protorácica larval, são expressos nos ovários, indicando que este pode ser o órgão responsável pela síntese de ecdisona nos adultos (Chávez et al., 2000; Warren et al., 2002; Petryk et al., 2003; Niwa et al., 2004; Warren et al., 2004). Já em machos adultos, a produção de ecdisona parece ocorrer também no sistema reprodutor. Nos mosquitos da espécie *Anopheles gambiae* e nos besouros *Tribolium castaneum*, a biossíntese de ecdisona ocorre nas glândulas acessórias do sistema reprodutor (Pondeville et al., 2008; Hentze et al., 2013). Em machos de *D. melanogaster* foi mostrado que as glândulas acessórias

produzem peptídeos e proteínas seminais que depois de transferidos às fêmeas pelo acasalamento induzem a ovulação, a ovoposição e ainda reduzem a receptividade sexual (Wolfner, 2002; Gillott, 2003).

Na maioria dos insetos, a esteroidogênese larval ocorre nas células das glândulas protorácicas (Wang et al., 2012) e resulta na conversão de colesterol em 20E, pelas enzimas da família *halloween* (*shadow*, *spook*, *phanton*, *disembodied* e *shade*) e também pela enzima *neverland* (Gilbert e Warren, 2005; Ono et al., 2006; Yoshiyama et al., 2006). Os genes da família *halloween* e o gene *neverland* foram inicialmente caracterizados em embriões de *D. melanogaster* através de estudos de mutantes. As mutações nos genes da família *halloween* implicam um fenótipo que impede a formação da cutícula das larvas de primeiro estadiu levando à morte do embrião. Esse fenótipo indicou a participação dessas enzimas na muda e no desenvolvimento larval (revisado por Huang et al., 2008). Nos embriões de *D. melanogaster*, as enzimas *halloween* são expressas na epiderme da região do protórax do embrião, anteriormente à formação da glândula anelar. No final do desenvolvimento embrionário e após a formação da glândula anelar, os genes *halloween: phanton*, *disembodied* e *shadow*, são expressos nas glândulas protorácicas (Niwa et al., 2004).

Ashburner e colegas propuseram um modelo, que mais tarde foi intitulado de Modelo de Ashburner, acerca da formação de pufes e do papel do hormônio ecdisona na glândula salivar durante a metamorfose. Foi observado que a formação dos pufes de RNA nas glândulas salivares de *D. melanogaster* ocorre em resposta ao aumento nos títulos dos hormônios esteroides. A exposição das glândulas salivares à 20E rapidamente induz a formação dos denominados pufes de RNA iniciais de *D. melanogaster*. Horas mais tarde, após exposição das glândulas à 20E, mais de cem pufes denominados tardios são formados (Ashburner et al., 1974). A formação dos pufes iniciais e tardios mostra a complexidade da regulação gênica e o envolvimento de poucos fatores de transcrição, os quais são produtos dos pufes iniciais, e estão envolvidos na regulação da expressão de outros genes, presentes nos pufes tardios, durante o desenvolvimento do inseto (Hill et al., 2013).

Para que a 20E seja reconhecida pela célula e inicie a cascata de ativação gênica, o hormônio precisa se ligar ao receptor (Ashburner et al., 1974). O receptor de ecdisona é um heterodímero nuclear formado por duas proteínas ligadas não covalentemente: a proteína *Ecdysone Receptor* (EcR) e Ultraespiraculo (USP) (EcR/USP). Quando ligados, atuam como fator de transcrição que regula a expressão dos genes iniciais em resposta aos aumentos dos títulos de ecdisona. O receptor se liga a sequências de DNA específicas que apresentam domínios de ligação chamados de elementos de resposta à ecdisona (EcREs) (Oro et al., 1990; Koelle et al., 1991; Yamanaka et al., 2013). Alguns genes de resposta primária foram extensamente estudados, e incluem os fatores de transcrição *Broad-complex* (*br*), E74 e E75, expressos, dentre outros tecidos, na glândula salivar de *D. melanogaster*. Os produtos destes genes regulam a expressão de genes tardios (Ashburner et al., 1974; Thummel, 1996; Basso et al., 2006; Xiang et al., 2010; Frank et al., 2017). Mais recentemente esses genes primários também foram identificados como expressos nas glândulas protorácicas, componente da glândula anelar de *D. melanogaster* (Ou et al., 2016).

A via de transdução regulada pelo hormônio ecdisona está presente em, virtualmente, todos os tecidos dos adultos de *D. melanogaster* (Schwedes et al., 2011), indicando que o dímero receptor EcR/USP é importante na regulação gênica de adultos (Schwedes e Carney, 2012). Embora os níveis de ecdisona na hemolinfa sejam mais baixos quando comparados aos níveis do hormônio presente nos tecidos larvais, o hormônio está presente nos três segmentos do adulto: cabeça, tórax e abdômen e ainda em tecidos específicos, como intestino, testículos, túbulos de Malpighi e ovários (Handler, 1982; Bownes et al., 1984; Schwartz et al., 1985). Nos adultos, os títulos de ecdisona são influenciados pelo ambiente e apresentam-se elevados em situações como jejum (Terashima e Bownes, 2005), privação de sono (Ishimoto e Kitamoto, 2010), fêmeas já fertilizadas (Harshman et al., 1999) e em machos que tiveram sua tentativa de cópula recusada por fêmeas anteriormente fertilizadas (Ishimoto et al., 2009). (revisado por Schwedes e Carney, 2012).

Deste modo, o hormônio ecdisona é um fator que desencadeia mudanças que ocorrem no organismo dos insetos durante todas as fases do

desenvolvimento, mesmo que o local de biossíntese desse hormônio se altere entre larvas e adultos. Através da ativação da transcrição de genes de pufes de RNA iniciais, a qual é mediada pelo aumento dos títulos do hormônio ecdisona, é possível a produção das proteínas necessárias para as mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento.

Amplificação e expressão do gene *BhC4-1* do pufe de DNA C4 de *Bradysia hygida*

Nosso laboratório utiliza o gene *BhC4-1* do pufe de DNA C4 de *Bradysia hygida* como um modelo para a investigação de mecanismos reguladores da expressão gênica em metazoários. Em *B. hygida*, o gene *BhC4-1* é amplificado cerca de 21x na glândula salivar e é abundantemente expresso na glândula salivar na idade em que o pufe de DNA C4 é formado nos cromossomos politênicos (Paçó-Larson et al., 1992; Monesi et al., 1995). Tanto a amplificação, como a expressão de *BhC4-1* e a formação do pufe de DNA C4 são induzidas como uma resposta tardia aos aumentos dos títulos de ecdisona (Basso et al., 2002). O produto do gene *BhC4-1* constitui um polipeptídeo de 43 kDa secretado pela glândula salivar e é encontrado em estruturas fibrosas presentes na saliva da larva (Monesi et al., 2004).

Mais recentemente foi demonstrado que em *B. hygida*, o gene *BhC4-1* é amplificado e expresso de modo regulado no desenvolvimento em um segundo tecido larval, a glândula protorácica, o principal órgão endócrino larval (Candido-Silva et al., 2015). O RNAm de outro gene de pufe de DNA, o gene *BhB10-1* de *B. hygida* foi encontrado em outros tecidos além da glândula salivar de *B. hygida*, incluindo os túbulos de Malpighi, cérebro e tecido gorduroso do sciarideo (Monesi et al., 2001). Em conjunto, estes dados sugerem que a ocorrência de amplificação gênica regulada no desenvolvimento em sciarídeos pode ser mais frequente do que o anteriormente pensado, e que a expressão de genes de pufes de DNA não é restrita às glândulas salivares, tecido onde os pufes de DNA são formados (Monesi et al., 2001; Candido-Silva et al., 2015).

A glândula salivar de *Drosophila melanogaster*

As glândulas salivares de *D. melanogaster* são compostas por dois tipos celulares, as células secretoras e as células dos ductos. As células secretoras são células polarizadas de epitélio colunar. Já os ductos são formados por células cuboidais de epitélio simples e levam o produto das células secretoras até a boca da larva. As células secretoras se desenvolvem a partir de um par de placodes de aproximadamente 100 células, na região posterior do embrião (Campos-Ortega e Hartenstein, 1985). A diferenciação entre estes dois tipos celulares ocorre durante o desenvolvimento embrionário. Posteriormente a isso, elas aumentam de volume e não se dividem mais (Andrew et al., 2000).

A formação das glândulas salivares e a origem de suas células foram amplamente estudadas. As células das glândulas salivares são provenientes de placodes localizados na região da ectoderme ventral do embrião. Myat and Adrew (2000), postularam quatro estágios da invaginação da glândula salivar. No estágio I, há a formação dos placodes celulares, que darão origem às glândulas salivares. No estágio II, há o início da invaginação celular, que ocorre nas células na região posterior do placode, localizadas no ventre do embrião. Por sua vez, no estágio III, com o início da invaginação e o encontro das células provenientes das regiões dorso-medial e dorso-anterior do placode, há a formação de uma região bulbosa na porção distal do placode com seções tubulares de uma única camada celular em torno de lúmen central. Finalmente, no estágio IV, há a invaginação completa do placode quando o último anel de células sofre invaginação. Assim, um órgão tubular alongado bem definido que se estende até o terceiro segmento do embrião é formado. Este órgão alongado encontra-se localizado na porção dorso-lateral ao cordão nervoso ventral. Em síntese, o desenvolvimento embrionário das glândulas salivares de *D. melanogaster* ocorre através de uma onda de alterações morfológicas das células do placode e invaginações que são iniciadas pelas células dorso-medial e terminam com a invaginação das células dorso-posterior do placode. (Andrew et al., 2000; Myat e Andrew, 2000).

Ao mesmo tempo em que as células que dão origem às glândulas salivares migram, elas também passam por mudanças fisiológicas, para que as futuras células das glândulas salivares atendam aos altos níveis de secreção

ao final da fase larval. Uma dessas mudanças fisiológicas é a endorreduplicação a qual se inicia na fase embrionária. A endorreduplicação ocorre para a formação dos cromossomos politênicos, onde o DNA das células das glândulas salivares duplica, sem que haja a separação das cromátides irmãs e a divisão celular. Esses cromossomos serão necessários para que a célula possa atender a demanda metabólica ao final do desenvolvimento larval (Smith e Orr-Weaver, 1991; Andrew et al., 2000). Além disso, outra mudança fisiológica é a transcrição de maiores níveis dos genes que fazem parte da maquinaria de secreção pelas glândulas salivares, comparado a outros tecidos embrionários. Tais genes são os fatores de transcrição, proteínas específicas do retículo endoplasmático rugoso (RER) e proteínas que medeiam o transporte de vesículas do RER até o complexo de Golgi (Abrams e Andrew, 2005).

Nos insetos, os pulsos do hormônio ecdisona são responsáveis por mudanças fisiológicas e de comportamento. Um pulso de ecdisona ao final do desenvolvimento larval de *D. melanogaster* induz a formação do pupário e um segundo pulso leva à metamorfose (Riddiford, 1993). A partir do segundo pulso de ecdisona, cerca de 10 horas após a formação do pupário, a morte celular programada das células que compõem as glândulas salivares se inicia. Neste processo, inicialmente, essas células se separam da membrana basal que envolve o órgão. Após 14,5 horas da formação do pupário, todas as células já sofreram apoptose, com fragmentação do DNA. Rapidamente, 15 horas após a formação do pupário, não é mais possível detectar as glândulas salivares (Jiang et al., 1997; Yin et al., 2007).

A glândula anelar de *Drosophila melanogaster*

A glândula anelar de *Drosophila melanogaster* é o principal órgão endócrino larval e é o resultado da fusão das glândulas protorácicas, que são responsáveis pela síntese de hormônios ecdisteróides, pelo *corpus allatum*, responsável pela produção do hormônio juvenil (Wang et al., 2012), e *corpus cardiacum*, uma glândula neuroendócrina, responsável pela produção do homônimo adipocinético, que armazena energia para voo e rastejamento (Kim e Rulifson, 2004). A glândula anelar localiza-se dorsalmente entre os dois

hemisférios cerebrais. O *corpus allatum* localiza-se dorsalmente e o *corpus cardiacum* ventralmente à aorta, formando um anel ao redor da aorta, característica morfológica que dá nome à estrutura. As porções anterior e lateral da glândula anelar constituem as glândulas protorácicas. O *corpus cardiacum* ocupa as extremidades posteriores da glândula anelar, enquanto o *corpus allatum* está localizado na região medial anterior e suas células são circundadas pelas células das glândulas protorácicas (De Velasco et al., 2004) (figura 1).

Figura 1 – Estrutura da glândula anelar de *D. melanogaster*. (A) reconstrução 3D mostrando as posições das três glândulas que formam a glândula anelar e (B) diagrama esquemático da glândula anelar larval em vista lateral. Abreviações: ao- aorta, br- cérebro, ca- *corpus allatum*, cc- *corpus cardiacum*, es- esôfago, ptg- glândulas protorácicas, vc- nervos da corda ventral. (A) retirado de Sánchez-Higueras et al., 2014 e (B) retirado de De Velasco et al., 2004

A origem das células das glândulas *corpus allatum* e protorácicas foi recentemente definida. As células destinadas ao *corpus allatum* são células de origem ectodérmica derivadas do segmento mandibular enquanto as células que dão origem à glândula protorácica também são de origem ectodérmica, porém provêm do segmento labial. Após a invaginação desses dois conjuntos de células, que ocorre no estágio embrionário 11, estes passam por uma transição epitélio-mesênquima e coalescem, formando um grupo celular que migra dorsalmente através da aorta anterior e se junta ao *corpus cardiacum* para formar a glândula anelar (Sánchez-Higueras et al., 2014; Sanchez-Higueras e Hombria, 2016).

O desenvolvimento embrionário do *corpus cardiacum* começa durante a gastrulação. As células destinadas ao *corpus cardiacum* são originadas a partir do blastoderme do embrião, como parte do segmento labial da invaginação do sulco ventral anterior. As células progenitoras do *corpus cardiacum* formam um agrupamento intercalado entre as células destinadas ao cérebro e as células do intestino anterior. A migração das células destinadas a essa glândula se inicia no estágio embrionário 11 e continua até o estágio 15, com o aumento do número de células de 3-4 para 6-8, respectivamente. A invaginação das células do *corpus cardiacum* ocorre paralelamente à invaginação e alongação do esôfago. No estágio embrionário 15, as células do *corpus cardiacum* passam na região ventral da comissura cerebral e se juntam ao *corpus allatum* para formar a glândula anelar (De Velasco et al., 2004).

O desenvolvimento da glândula anelar de *D. melanogaster* foi intensamente estudado durante a metamorfose. Após a formação do pupário, as glândulas protorácicas degeneram gradualmente, o que culmina na morte celular das células das glândulas protorácicas cerca de 30 a 40 horas após a formação do pupário (Dai e Gilbert, 1991). Durante esse processo, o *corpus cardiacum* separa-se da glândula anelar e uma lâmina basal é secretada para revestir o *corpus allatum*. No adulto, o *corpus allatum* migra até ficar ancorado no esôfago à frente do pró-ventrículo, na região anterior do tórax do adulto (Dai e Gilbert, 1991; Demerec, 1994).

Estudos funcionais e caracterização dos módulos *cis*-reguladores de *BhC4-1* das glândulas salivares e anelar

Avanços no entendimento dos mecanismos reguladores da amplificação e expressão de genes de pufes de DNA foram obtidos a partir de estudos funcionais realizados no organismo modelo *D. melanogaster* (Bienz-Tadmor et al., 1991; Monesi et al., 1998; Monesi et al., 2001; Soares et al., 2003). Especificamente no caso do gene *BhC4-1*, estudos iniciais em transgênese revelaram que o mesmo é expresso de modo regulado durante o desenvolvimento nas glândulas salivares de pré-pupas transgênicas e que a expressão do mesmo não é acompanhada nem da amplificação do gene, nem da formação de pufes nos locais de inserção do transgene (Monesi et al., 1998). Experimentos *in vitro* de incubação de glândulas salivares na presença

de ecdisona, mostraram que assim como em *B. hygida*, em *D. melanogaster* transgênicas o gene *BhC4-1* é induzido nas glândulas salivares com uma resposta tardia ao hormônio (Basso et al., 2002). Em síntese, estes estudos iniciais revelaram que grande parte dos mecanismos que regulam a expressão deste gene na glândula salivar encontra-se conservada em *D. melanogaster* (Monesi et al., 1998; Basso et al., 2002; Basso et al., 2006; Frank et al., 2017).

Estudos funcionais levaram à identificação de um conjunto de módulos que regulam a expressão de *BhC4-1-lacZ* em *cis* (Monesi et al., 2003; Lecci et al., 2008). Um destes módulos constitui o promotor basal de *BhC4-1*, contido no fragmento de 97 pb (-57/+40) (Garcia et al., 2011). Outras duas regiões identificadas no promotor de *BhC4-1* constituem o MCR de 129 pb (-186/-58), o qual promove a expressão do gene na glândula salivar de pré-pupas, e o MCR de 67 pb (-253/-187) o qual promove a expressão de *BhC4-1* na glândula anelar desde o final da embriogenese até o término do estágio de pré-pupa (Monesi et al., 2003; Lecci et al., 2008). As regiões (-3314/-1294) e (-1293/-254) foram identificadas como repressoras da expressão de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar em períodos anteriores a pré-pupas 0 hora e L2, respectivamente (Monesi et al., 2003). A caracterização da região repressora proximal foi ampliada pela análise de linhagens transformadas com as construções (-488/-187) e (-824/-187) que contêm o ativador da glândula anelar (-253/-187) clonado à jusante de dois diferentes fragmentos da região repressora proximal (-488/-254) e (-824/-254). Os resultados obtidos revelaram que o fragmento (-488/-254) reprime a expressão de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar em tempos anteriores ao segundo estadio larval, e que a presença destes dois MCR (repressor + ativador) é suficiente para promover a expressão do gene na glândula anelar a partir o segundo estadio larval (Neves, 2009).

Estudos posteriores foram responsáveis pela caracterização dos fatores *trans*-ativadores que participava da ativação do MCR de glândula salivar (-186/-58). Segundo a hierarquia da expressão gênica regulada por ecdisona, os genes *E74*, *E75* e *br*, diretamente induzidos por esse hormônio, regulam a expressão de genes de pufes de RNA tardios (Karim et al., 1993; Fletcher e Thummel, 1995; Bialecki et al., 2002). Foi mostrado que para a ativação do MCR de glândula salivar (-186/-58) nem todas as isoformas desses fatores de

transcrição são essenciais. Para a expressão de *BhC4-1-lacZ* nas glândulas salivares de pré-pupas é fundamental que a isoforma Z3 do fator de transcrição *br* esteja presente, enquanto que na ausência das isoformas Z1, Z2 e Z4 mutantes, os níveis de expressão de *BhC4-1-lacZ* não são alterados significativamente. Os níveis de expressão de *BhC4-1* parecem menores nas glândulas salivares de pré-pupas nos mutantes das isoformas *E74A* e *E75A*, enquanto que não são alterados em pré-pupas de mutantes de *E74B*, *E75B* e *E75C* (Basso et al., 2006). Mais recentemente, foi demonstrado que a superexpressão de *E74A* induz diretamente o MCR de glândula salivar de *BhC4-1-lacZ* nas glândulas salivares em tempos anteriores a pré-pupas e experimentos no sistema monoíbrido de levedura revelaram que este fator de transcrição se liga diretamente ao MCR de glândula salivar (-186/-58) (Frank et al., 2017).

A topografia das glândulas protorácicas, *corpus allatum* e *corpus cardiacum* variam entre os Diptera (Pathak e Ghosh, 1991). Diferentemente do verificado em drosofilídeos, que apresentam uma glândula anelar como resultado da fusão destes três órgãos, em *B. hygida* o sistema neuroendócrino é composto de um par de glândulas protorácicas, que ficam justapostas às glândulas salivares, e um *corpus allatum* ligado a um *corpus cardiacum* que ficam localizados abaixo da aorta retrocerebral (Candido-Silva et al., 2015). A demonstração de que o gene *BhC4-1* é também expresso de modo regulado nas glândulas protorácicas de *B. hygida* indica que a conservação dos mecanismos reguladores da expressão de *BhC4-1* é mais ampla do que anteriormente pensado e que elementos *cis*-reguladores contidos no MCR (-253/-187) de *BhC4-1* são reconhecidos por fatores de transcrição presentes na glândula anelar de *D. melanogaster*.

A caracterização molecular do MCR de glândula anelar (-253/-187) foi estendida pela análise de um conjunto de cinco construções (MUT1-MUT5) que constituem versões mutadas do MCR de glândula anelar. Em cada uma das construções foram inseridas mutações transversas em blocos de 10 nucleotídeos, o que permitiu avaliar o efeito destas ao longo de toda extensão do MCR. Os dados obtidos revelaram que as sequências mutadas nas construções MUT4 (-210/-201) e MUT5 (-198/-189) são essenciais para a

expressão de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar, enquanto que as regiões mutadas nas construções MUT1 (-246/-237) e MUT2 (-234/-225) parecem estar envolvidas na modulação dos níveis de expressão do gene neste tecido em tempos posteriores do desenvolvimento. Finalmente, a região mutada na construção MUT3 (-222/-213) é essencial para expressão do gene na glândula anelar em tempos posteriores ao segundo estadio larval (Malta et al., 2006; Furtado, 2013). Esses dados corroboram os dados obtidos por Lecci e colaboradores (Lecci et al., 2008) que identificaram 67 sequências únicas no genoma de *D. melanogaster* que são semelhantes à sequências contidas no MCR de glândula anelar, as quais variam entre 15 a 24 nucleotídeos. Das sequências identificadas no genoma de *D. melanogaster*, 96% estão ancoradas no fragmento de 45 pb localizadas no fragmento (-231/-187), o qual abrange as regiões mutadas nas construções MUT4 e MUT5, (-210/-201) e (-198/-189), respectivamente, sendo que essas regiões são fundamentais para a expressão do gene na glândula anelar. Em síntese, uma vez que as diferentes mutações resultaram em diferentes alterações no padrão de expressão de *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar, a análise conjunta destes mutantes indica a existência de sítios de ligação de fatores de transcrição ao longo de toda extensão do módulo *cis*-regulador de glândula anelar.

As linhagens das séries MUT1, MUT2, MUT4 e MUT5 ainda apresentaram um segundo padrão de expressão de *BhC4-1-lacZ*. Este segundo padrão de expressão foi consistentemente observado no lobo maxilar de embriões tardios (estágio 16-17) e em larvas de primeiro estadio. Em conjunto, a análise destes mutantes sugere que os elementos que promovem a expressão de *BhC4-1-lacZ* no lobo maxilar encontram-se na região mutada na construção MUT3 (-222/-213). Quando à análise deste conjunto de mutantes, foi sugerido que as células da glândula anelar e do lobo maxilar poderiam ter uma origem embrionária comum e que a ativação do transgene aconteceria antes da separação das respectivas células precursoras (Furtado, 2013). Interessantemente, as células destinadas às glândulas protorácicas e *corpus allatum* são originadas a partir dos segmentos do labium e do lobo maxilar, respectivamente (Sánchez-Higueras et al., 2014).

OBJETIVOS

Obter linhagens de *D. melanogaster* transgênicas transformadas com a construção $(-253/+40)/GFP$.

Analisar o padrão de expressão da proteína repórter GFP ao longo do desenvolvimento nas linhagens da série $(-253/40)/GFP$.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais Biológicos

Foram utilizadas 16 diferentes linhagens da série $(-253/+40)/GFP$, sendo sete balanceadas no cromossomo III, quatro no cromossomo II e uma no qual a transformação ocorreu no cromossomo X. Quatro das linhagens obtidas são viáveis em homozigose e essas foram utilizadas para a geração de quatro linhagens duplo homozigotas, que apresentam inserções nos cromossomos II e III. O transposon integrado no genoma de *D. melanogaster* apresenta a seguinte estrutura: elemento *P* / módulo *cis*-regulador (MCR) de glândula anelar $(-253/-187)$ / MCR de glândula salivar $(-186/-58)$ / promotor basal do gene *BhC4-1* $(-57/+40)$ / gene repórter GFP^{S65T} / sequência de polidenilação do vírus SV40 / gene de seleção *white* / elemento *P* (Figura 2).

A linhagem mutante para o fator de transcrição *broad-complex*, $npr1^{3w}$, (*br*), apresenta uma deficiência no cromossomo X e é mantida balanceada sobre o cromossomo balanceador *Binsn*. Na linhagem $npr1^{3w}$ nenhuma das isoformas de *br* é expressa (Dibello et al., 1991).

Figure 2 – Esquema do transgene integrado no genoma de *D. melanogaster*. As barras coloridas correspondem aos módulos e genes presentes no plasmídeo *pUAST* e a barra abaixo dos módulos *cis*-reguladores e do gene repórter *GFP* indica a região de aproximadamente 900 bp, utilizada como sonda nos experimentos de *Southern blot*.

Métodos

Cultivo de *Drosophila melanogaster*

As linhagens de *D. melanogaster* eram mantidas a 25 °C em tubos de vidro de 40 mL, contendo 5 mL de meio de milho padrão [(fubá 10,5%; levedura de cerveja 1,84%; ágar 1,16%; sacarose 3,03%; dextrose 5,15%; ácido propiônico 0,24%, ácido fosfórico 0,02% e solução de nipagin (concentração final nipagin 0,06% e ácido fosfórico 0,006%)] e eram trocadas a cada 15 dias. Alternativamente, e quando necessário, as linhagens eram mantidas em garrafas de 500 mL, contendo aproximadamente 75 mL do meio supracitado, e cultivadas a 25 °C. Nesta temperatura, o ciclo de vida dura cerca de 15 dias.

O ciclo de vida de *D. melanogaster* compreende os estágios embrionário, larval, pré-pupal, pupal e adulto. A 25°C o desenvolvimento embrionário dura cerca de 24 horas. Posteriormente a larva de primeiro estadio (L1) se alimenta em cima do meio por 24 horas até a primeira muda. As larvas de segundo estadio (L2) migram para o interior do meio para se alimentar, onde ocorre a segunda muda em 24 horas. As larvas de terceiro estadio (L3) se alimentam no interior do meio por 36 horas e então saem deste e apresentam um comportamento errante na parede do tubo de cultivo por 12 horas. Ao final do estágio larval dá-se a formação do pupário, que é caracterizado pela eversão dos espiráculos anteriores, pela imobilidade do animal e ausência da coloração da cutícula (pré-pupa 0 hora). A ausência de coloração da cutícula dura cerca de 30 minutos, a 25°C, e é utilizada como ponto de partida para o estagiamento de pré-pupas e pupas. O estágio de pré-pupa dura em torno de 12 horas. Após esse período inicia-se o estágio de pupa. É durante esse estágio que ocorre a metamorfose do animal, onde os tecidos larvais são histolisados e as estruturas do adulto são formadas a partir dos discos imaginais. O estágio de pupa dura em torno de 4,5 a 5 dias e termina com o surgimento do imago (Ashburner, 1989).

Condicionamento de adultos e coleta de embriões

Para a coleta de grandes quantidades de embriões de *D. melanogaster*, linhagem y,w, os adultos (machos e fêmeas), provenientes de várias garrafas, eram transferidos para uma única garrafa com uma grande quantidade de

levedura, para que o desenvolvimento dos ovários das fêmeas fosse completo. Esses animais ficavam durante 24 horas em cada garrafa e eram transferidos para garrafas novas com levedura fresca três vezes.

Após os três dias de condicionamento, os adultos eram transferidos para um béquer de 100 mL de plástico com pequenos furos. O béquer era tampado com uma placa de petri de plástico contendo meio de ovoposição (suco de uva 45,5%; açúcar cristal 8,7%; ágar 2,2%; NaOH 0,0125 N; ácido propiônico 0,46% e ácido fosfórico 0,045%), sobre o qual colocava-se uma pequena quantidade de pasta de levedura. Os adultos ficavam em adaptação no béquer de plástico por, pelo menos, 24 horas.

Após as 24 horas iniciais, a placa com meio de ovoposição e o béquer de plástico eram trocados e substituídos por uma nova placa com uma pequena quantidade de pasta de levedura. De rotina, eram realizadas duas pré-coletas de 1 hora cada, a 25 °C, com placas frescas, para permitir a postura de ovos retidos nos ovidutos. Para obtenção de embriões destinados à injeção, as coleções de adultos eram mantidas a 18 °C durante 30 minutos e então as placas eram substituídas e os ovos recém ovipositados eram utilizados para as injeções.

Preparação de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial em pequena escala, era realizada uma mini preparação, onde uma colônia de bactéria recombinante era coletada a partir de placa de meio LB sólido (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; ágar 5%) contendo ampicilina (concentração final 100 µg/mL), com o auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada e transferida para o interior de um tubo de cultivo contendo 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (concentração final 100 µg/ml) para seleção. O meio líquido assim que inoculado era incubado por 16 horas, a 37 °C, a 180 rpm.

Após o cultivo, a cultura era centrifugada a 15000 g durante um minuto, o sobrenadante era descartado e o precipitado era ressuspenso com 300 µL de tampão STET (8% sacarose; EDTA 50 mM pH 8.0; 0.1% Triton™ X-100; Tris 50 mM pH 8.0) aos quais era adicionado lisozima (concentração final 1 µg/mL), seguido de incubação durante cinco minutos à temperatura ambiente. O lisado

bacteriano era fervido durante 1,5 minutos, seguido de centrifugação a 15000 g, por 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado era removido e adicionavam-se 12 μ L de CTAB 5% ao sobrenadante, seguido de centrifugação a 15000 g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspensionado em 300 μ L de NaCl 1,2 M. O DNA plasmídico era precipitado com 750 μ L de etanol absoluto, seguido de centrifugação a 15000 g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o precipitado era ressuspensionado em 300 μ L de etanol 70%, seguido de centrifugação a 15000 g por 10 minutos, temperatura ambiente. O sobrenadante era removido, o DNA era seco ao ar à temperatura ambiente e ressuspensionado em 25 μ L de TE.

Alternativamente, quando era necessária a obtenção de uma maior quantidade de DNA plasmídico, utilizávamos o kit *QIAfilter, Plasmid Midi Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Eletroforese em gel de agarose

De rotina, as amostras eram analisadas em géis de agarose de diferentes concentrações. A eletroforese era realizada em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8.0; EDTA 1 mM) utilizando o sistema de eletroforese *Fisher FBSB-710*, 7 cm x 10 cm, para géis analíticos e o sistema *Fisher FBSB-2025*, 20 cm x 25 cm para géis destinados a *Southern blots*. A amostra a ser analisada continha tampão de amostra 1x (concentração final de glicerol 5%; azul de bromofenol 0,04%), o DNA a ser analisado e TE para volume final de 10 μ L. A corrida era realizada à voltagem constante de 90V durante 60-80 minutos. Para géis destinados a *Southern blots*, a corrida era realizada a 35 V durante aproximadamente 16 horas. Após a eletroforese, os géis eram corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL). A visualização do DNA era feita em transluminador de luz ultravioleta, a imagem do gel era capturada com o auxílio de fotodocumentador (*BIO RAD* modelo universal rood-II) e as imagens eram processadas pelo software *Quantity one* (versão 4.6.8).

Preparo da solução de injeção

A mistura de injeção era realizada em volume final de 50 μ L. A mistura preparada continha o DNA a ser transformado, neste caso a construção (-

293/+40)/GFP (concentração final 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a construção $\text{phs}\pi$, fonte de transposase, (concentração final 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), tampão de injeção 1x (tampão fosfato pH 6.8 0,1 mM; KCl 5 mM) e corante alimentar verde a 10%. A mistura era centrifugada durante 30 minutos, a 15000 g, a 4 °C. O sobrenadante era transferido para um tubo de 1,5 mL limpo, novamente centrifugado durante 30 minutos, a 15000 g, a 4 °C, aliquoteado e mantido a -20 °C até o uso.

Obtenção de linhagens transgênicas de *D. melanogaster*

Os embriões que estavam na placa de ovoposição eram coletados com auxílio de uma agulha de costura e transferidos para uma fita dupla-face (Scotch) aderida a uma lâmina histológica, durante cinco minutos ou até que uma quantidade suficiente de embriões fosse coletada, sob estereomicroscópio Leica MZ6. Para a remoção do córion, os embriões eram rolados em cima da fita dupla-face, um a um, com auxílio da agulha e alinhados na lateral da lâmina sobre a fita dupla face. A seguir, os embriões eram desidratados ao ar por 5 minutos e cobertos com óleo halocarbono.

Para a injeção era utilizando o microscópio Leica invertido DMIL e a injeção era realizada com as microagulhas *Eppendorf Fentotips* acopladas ao microinjetor *Eppendorf FemtoJet*. Os embriões injetados eram contados e incubados em câmara úmida a 18 °C, por 24 horas, e a seguir a 25 °C por mais 24 horas.

A enzima transposase, codificada pelo plasmídeo $\text{phs}\pi$ medeia a integração do transgene através dos elementos *P*, presentes no plasmídeo *pUAST*, que flanqueiam o transgene. A sequência que codifica para a enzima transposase não é integrada no genoma, pois é flanqueado por elementos *P* mutados.

Os adultos provenientes dos embriões injetados eram então coletados, identificados e cruzados individualmente (cruzamento G0), com adultos da linhagem parental *y,w*, que apresenta olhos da cor branca. Os animais transformados (animais G1) eram identificados pela cor dos olhos, pois o transgene contém o gene de seleção *white* (*w+*), que confere cor alaranjada aos olhos dos animais transformados. Os transformantes obtidos foram utilizados para o estabelecimento de linhagens homozigotas e/ou balanceadas.

Inicialmente, para o estabelecimento das linhagens da série (-253/+40)/GFP os animais w^+ , de olhos alaranjados, eram cruzados (cruzamento G1) com a linhagem parental y,w para o aumento do número de indivíduos transgênicos. Os machos e fêmeas G2 (w^+/w^-) selecionados eram cruzados entre si para a obtenção de animais homozigotos (w^+/w^+). Como o gene de seleção que confere cor aos olhos tem efeito aditivo, os animais G3 que apresentavam cor dos olhos alaranjados escuros ou ainda vermelhos constituíam os homozigotos. Posteriormente, os animais G3 homozigotos eram cruzados entre si para estabelecimento das linhagens homozigotas.

Nem todos os animais transformados eram viáveis em homozigose. Portanto, em paralelo, eram realizados cruzamentos para balanceamento dos cromossomos e a manutenção do transgene no genoma. Os cromossomos balanceados têm inversões gênicas geradas por radiação que impedem a ocorrência de recombinação durante a meiose, são letais em homozigose e apresentam pelo menos um gene marcador dominante, cujo fenótipo é de fácil identificação.

Para o balanceamento das linhagens, os adultos G2 (w^+/w^-) eram cruzados em paralelo com machos ou fêmeas balanceadas para os cromossomos II ou III (cruzamento G3). Os animais que apresentam o cromossomo II balanceado apresentam o fenótipo de asas curvadas (Cy), enquanto que linhagens balanceadas no cromossomo III apresentam cerdas torácicas mais curtas (Sb). Os adultos provenientes dos dois cruzamentos G3 (balanceados em II ou III) apresentavam uma mistura de fenótipos, sendo possível encontrar animais transgênicos ou não transgênicos associados ou não à marca do cromossomo balanceador. A partir desta progênie, eram selecionados fêmeas e machos transgênicos (w^+) balanceados nos cromossomos II ou III. Em paralelo eram montados cruzamentos entre os animais que apresentavam o cromossomo II ou III balanceado (G4). Quando a integração do transgene ocorria, por exemplo, no cromossomo II eram encontrados na progênie do cruzamento G4, apenas animais transgênicos (w^+) e balanceados e também animais homozigotos (w^{++}), no caso de inserções não letais.

Obtenção dos duplos homozigotos

Na tentativa de obtermos maiores níveis de expressão da proteína repórter GFP, foram construídas linhagens que apresentavam quatro cópias do transposon integradas no genoma, sendo duas no cromossomo II e duas no III. Essas linhagens eram obtidas a partir do cruzamento de linhagens homozigotas independentes, nas quais a inserção do transgene havia sido mapeada no cromossomo II ou III.

Inicialmente, cada uma das linhagens homozigotas escolhida era cruzada em paralelo com uma linhagem que apresentava dois cromossomos balanceadores (cromossomos II e III). No primeiro cruzamento (F1) ambos os cromossomos eram balanceados, e os animais selecionados apresentavam olhos alaranjados e os balanceadores dos cromossomos II e III. Em seguida (F2), em paralelo, esses animais eram cruzados entre si, para obtenção de homozigotos que apresentavam um cromossomo balanceado, no cromossomo oposto àquele no qual ocorreu a inserção do transposon (animais F3). O cruzamento F3 era realizado entre os animais, obtidos na progênie dos cruzamentos F2, realizados em paralelo, que apresentavam o transgene em homozigose no cromossomo II ou III e balanceados no cromossomo oposto. A progênie do cruzamento F3 era selecionada pela presença dos balanceadores nos cromossomos II e III e pelo fenótipo de olhos alaranjados (animais F4). Esses animais eram cruzados entre si e os animais duplo homozigotos eram selecionados pela ausência de fenótipos balanceadores. (Figura 3)

Figure 3 - Esquema dos cruzamentos realizados para obtenção das linhagens da série (-253/+40)/GFP duplo homozigotas.

Ensaio de interação gênica

O fator de transcrição *br*, é um gene de resposta primária ao hormônio ecdisona, que apresenta domínios de ligação proteína-proteína e proteína-DNA. O *br* ativa diretamente genes de resposta tardia através da interação com elementos *cis*-reguladores presentes nas regiões promotoras dos genes tardios (Karim e Thummel, 1992; Crossgrove et al., 1996).

Para verificar o efeito da ausência de *br* no padrão de expressão de GFP em linhagem da série (-253/+40)/GFP, eram realizados cruzamentos entre a linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP e a linhagem *npr1*^{3w}, que constitui uma deficiência de *br* (Dibello et al., 1991). Esses cruzamentos eram realizados em

frascos de cultura com meio, contendo 0,5% de azul de bromofenol, o que possibilitava o estagiamento larval e não alterava o desenvolvimento do inseto (Maroni e Stamey, 1983).

Para o cruzamento, eram utilizadas fêmeas com deficiência *npr1*^{3w} balanceadas sobre o cromossomo balanceador *Binsn*, e machos da linhagem 66 (*w++*) para o cruzamento. Larvas de 140 horas contadas a partir da eclosão, que apresentavam intestino vazio, foram inicialmente selecionadas. A seguir, os machos foram identificados pela presença de testículos, que são visíveis por transparência. Machos de genótipo *br* deficiente eram diferidos dos balanceados *Binsn* pela cor dos ganchos da boca, que são pretos para os balanceados e marrom claro para os mutantes.

Aquisição e análise das imagens

As imagens eram analisadas em estereomicroscópio Leica MZ16F, acoplado a uma câmera Leica DFC7000T, seguido de aquisição e análise das imagens pelo software *Leica Application Suite* versão 4.8.0.

Extração de DNA genômico de *D. melanogaster*

O DNA genômico de *D. melanogaster* era extraído de adultos. Aproximadamente 150 animais eram utilizados como ponto de partida em cada extração. Primeiramente os animais eram colocados em *eppendorfs* de 1,5 mL, congelados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 500 µL de tampão de homogeneização (NaCl 0,06 M; EDTA 0,01M pH 8,0; sacarose 5%; spermina 0,15 mM; spermidina 0,15 mM; Tris 0,01 M pH 7,5), seguido de adição de 500 µL de tampão TE (Tris 0,2 M pH 9,0; EDTA 0,03 M pH 8,0; 2% SDS; 5% sacarose) e proteinase K (concentração final 0,2 µg/ml). O homogeneizado era incubado a 37 °C, por 1,5 horas, sob leve agitação e em seguida era adicionada mais proteinase K (para concentração final 0,4 µg/mL), seguido de nova incubação por 1,5 horas, a 37 °C, sob leve agitação.

O lisado era extraído duas vezes com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Cada extração era realizada durante 15 minutos, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Em seguida, a amostra era centrifugada durante 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo

tubo de 2 mL. Para a precipitação do DNA adicionava-se 1/10 do volume total de acetato de sódio (NaCOOH^+ 3 M pH 5,2) e dois volumes de etanol absoluto à fase aquosa obtida a partir da última extração. A fibra de DNA formada era coletada e lavada com etanol 70% duas vezes. Finalmente a fibra era seca ao ar, à temperatura ambiente, durante 20 minutos e ressuspensa em 30 μL de TE (Tris 100 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0).

A quantificação do DNA genômico era realizada por fluorimetria (Picofluor - Turner BioSystems), com *HOESCHT 33258*. O aparelho era calibrado e era realizada uma curva padrão utilizando DNA de esperma de salmão, nas concentrações finais 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em solução TNE 1x (Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0; NaCl 1M), .

Digestão de DNAs

Tanto o DNA plasmidial como o DNA genômico eram submetidos à digestão com enzimas de restrição de escolha, de acordo com as especificações do fabricante. As digestões eram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

Purificação de DNA a partir de géis de agarose

Os fragmentos de interesse eram recortados do gel com auxílio de uma lâmina de barbear (Laser Super) e o DNA era purificado utilizando-se o *QIAEX II gel extration kit* (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. Quando era necessário que a concentração final da amostra fosse maior era utilizado o kit *MinElute gel extration kit* (Qiagen), segundo recomendações do fabricante.

Southern blot

Após a eletroforese, o DNA era corado com brometo de etídeo e o gel era documentado. A seguir, a região de interesse do gel era recortada e o gel era incubado em um banho de HCl 0,125 N, durante 10 minutos, sob leve agitação. A seguir, o gel era imerso em solução desnaturante (NaOH 0,4 N; NaCl 0,6 N), durante 30 minutos, sob leve agitação. Após a desnaturação era realizada a neutralização, onde o gel era incubado em solução de neutralização (NaCl 1,5 N; Tris 0,5 N pH 7,5) durante 30 minutos sob agitação leve. Entre essas incubações o gel era lavado em água deionizada para remoção dos resíduos

das soluções anteriores. Em paralelo, preparava-se a membrana de nylon (*Hybond-N⁺*, *GE healthcare*), que era cortada na medida do gel, e dos papéis cromatográficos (3MM), sendo três tiras na medida do gel mais um centímetro em cada dimensão, duas na mesma medida do gel e uma faixa de comprimento variado e largura na dimensão do gel, que era utilizada para ponte salina. Uma tira de papel cromatográfico previamente embebido em SSC 10x (NaCl 0,5 N; Citrato de Sódio 0,15 N, pH 7,0 - 8,0) era colocada em cima de uma placa de vidro, seguida da faixa para a ponte salina, mais as duas tiras maiores que o gel. O gel de agarose era colocado sobre o último papel cromatográfico com a parte de baixo voltada para cima para maior contato do DNA com a membrana. A membrana, de tamanho exato ao gel, era colocada diretamente em contato com este. Filme plástico era colocado ao redor do gel para que a solução salina passasse somente através do gel. Em cima da membrana eram colocadas duas tiras de papel cromatográfico, de mesmo tamanho do gel, e uma pilha de papel toalha, para absorver a solução salina, seguida de uma placa de vidro. Finalmente um peso era colocado sobre o vidro. A transferência do DNA do gel de agarose para a membrana era realizada por capilaridade, em solução SSC 10X, durante aproximadamente 18 horas. Ao término da transferência, o *blot* era desmontado, a membrana era orientada e a seguir incubada em estufa à 80 °C por duas horas, para fixação do DNA.

Preparação da sonda de hibridação

Cerca de 100 ng do fragmento de interesse eram utilizados para marcação com o sistema de marcação e detecção *Amersham Gene Images AlkPhos*, seguindo as orientações do fabricante. Nesse sistema o DNA de interesse (sonda) é inicialmente desnaturado por fervura e ligado covalentemente à fosfatase alcalina por um *cross-linker* fornecido pelo fabricante. Após a hibridação da sonda com o DNA genômico imobilizado na membrana, os híbridos são detectados com o reagente de detecção *CDP-StarTM*. Esse reagente contém o substrato dioxetano quimioluminescente estabilizado que é degradado pela fosfatase alcalina ligada ao DNA marcado. A

luz emitida nessa reação é detectada pela exposição da membrana a um filme de detecção para quimioluminescência.

Hibridação, geração do sinal e detecção

O *Southern blot* era colocado em uma garrafa de hibridação contendo volume adequado de tampão de hibridação (0,25 mL/cm² de membrana) *AlkaPhos Direct hybridization buffer* (GE Healthcare), contendo 0,5 N de NaCl e reagente de bloqueio (concentração final 4%, GE Healthcare). A membrana era pré-hibridada. Era adicionada a sonda marcada (concentração final 10 ng/mL) na garrafa, onde era realizada a pré-hibridação, e a hibridação era realizada durante aproximadamente 16 horas, a 55 °C, no forno de hibridação (*Hybridiser HB-1D*, TECHNE).

Após a hibridação o tampão de hibridação era removido e a membrana era lavada em volume adequado (5 mL/cm² de membrana) de tampão de lavagem primário (2 M Ureia; 0,1% SDS; 50 mM NaH₂PO₄.H₂O, pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,2% reagente de bloqueio), durante duas vezes, por 10 minutos, à 55°C, sob agitação, no forno de hibridação. Em seguida, a membrana era transferida para um recipiente limpo contendo volume abundante de tampão secundário de lavagem (0.05 N Tris; 0,1 N NaCl; 2 mM MgCl₂) e lavada sob leve agitação durante 30 minutos, à temperatura ambiente, por duas vezes. Após a última lavagem a membrana era colocada sobre um saco plástico e era aplicado reagente de revelação *CDP-Star* (40 µL/cm² de membrana) sobre a membrana, seguido de incubação por 5 minutos. Após a incubação o excesso de reagente de revelação era removido e a membrana era envolta em filme PVC, transferida para o cassete e exposta ao filme (*HyperfilmTM ECL*, GE Healthcare).

RESULTADOS

Estrutura do transgene (-253/+40)/GFP

A construção (-254/+40)/GFP já encontrava-se disponível em nosso laboratório (Moretto, JAS e Monesi, N dados não publicados) e é derivada da construção UAS-97 bp (Garcia et al., 2011). Esta construção, por sua vez, é derivada do vetor *pUAST* (Brand e Perrimon, 1993) e apresenta cinco cópias do elemento UAS à montante do promotor basal do gene *BhC4-1*(-57/+40) clonadas à montante da sequência codificadora de GFP (Garcia et al., 2011). Em ambas as construções a sequência de GFP utilizada constitui a GFP^{S65T}, uma variante de GFP mais sensível que a GFP selvagem, que apresenta maturação mais rápida do cromóforo (Sullivan et al., 2000) e que já foi utilizada com sucesso em nosso laboratório (Garcia et al., 2011).

A obtenção da construção (-253/+40)/GFP envolveu a substituição do cassete 5XUAS/*BhC4-1*(-57/+40) pelo cassete *BhC4-1*(-253/+40) na construção UAS-97 bp (Moretto, JAS e Monesi, N dados não publicados). O cassete *BhC4-1* (-253/+40) contém o módulo *cis*-regulador de glândula anelar (-253/-187), o módulo *cis*-regulador de glândula salivar (-186/-58) e o promotor basal de *BhC4-1* (-57/+40). No genoma, o transposon integrado apresenta a seguinte estrutura: elemento *P* / módulo *cis*-regulador de glândula anelar (-253/-187) / módulo *cis*-regulador de glândula salivar (-186/-58) / promotor basal de *BhC4-1*(-57/+40) / GFP^{S65T} / sequência de término de transcrição do vírus SV40 / gene de seleção *white* / elemento *P* (figura 2).

Obtenção das linhagens da série (-253/+40)/GFP

As linhagens da série (-253/+40)/GFP foram obtidas a partir da injeção da construção (-253/+40)/GFP em embriões da linhagem *y.w* de *D. melanogaster*. Em conjunto, foram realizados três ciclos independentes de injeções (tabela 1). No total, 13,7% dos embriões injetados sobreviveram à injeção e atingiram o primeiro estágio larval, dessas larvas, 35% chegaram ao estágio adulto e cerca de 55% dos adultos eram férteis. A análise da progênie F1 desses adultos resultou em 12 linhagens independentes transformadas com a construção (-253/40)/GFP.

Ciclos	Embriões injetados	Larvas de 1º estadio	Adultos	Adultos transgênicos
1	1151	63 (5,5%)	14 (22,2%)	1 (7%)
2	701	53 (7,6%)	9 (17%)	0
3	1241	300 (24,1%)	122 (41%)	11 (9%)
TOTAL	3093	416 (13,7%)	145 (35%)	12 (8,5%)

Tabela 1 – Número de embriões injetados, larvas e adultos obtidos a partir da injeção da construção (-253/+40)/GFP. A primeira coluna mostra o número os ciclos de injeções realizadas em embriões de *D. melanogaster* com a construção (-253/+40)/GFP. A segunda coluna mostra o número de embriões injetados em cada ciclo, na terceira é mostrado o número de larvas de primeiro estadio obtidas e a porcentagem de eclosão calculada em relação aos embriões injetados. A coluna 'adultos' retrata o número total de adultos obtidos e a porcentagem de adultos que emergiram, calculada em relação ao número de larvas obtidas. A última coluna retrata o número de adultos transgênicos emergidos e a porcentagem de adultos transgênicos obtidos em relação ao número de adultos totais.

Linhagem	Cromossomo de inserção	Número de inserções do transgene
2-1	III	1
4-1	III	1
17-1	III	4
56-3	III	1
66-1	II	2
70-3	III	1
73-1	II	1
74-1	III	1
79-1	II	1
90-3	III	1
102-1	II	1
113-3	X	1

Tabela 2 – Linhagens estabelecidas, mapeamento do cromossomo no qual ocorreu a integração do transgene e o numero de cópias do transgene no genoma, determinado por *Southern blot*.

Os adultos transformados foram utilizados como ponto de partida para o estabelecimento das linhagens transgênicas. A tabela 2 lista as linhagens

transgênicas da série *(-253/+40)/GFP* e o cromossomo no qual ocorreu a inserção do transgene. A linhagem 113 não foi balanceada, pois a integração ocorreu no cromossomo X e não resultou em letalidade.

Caracterização das linhagens transgênicas da série *(-253/+40)/GFP* por *Southern Blot*

Para confirmar se as 12 diferentes linhagens eram resultado de eventos de integração independentes, *Southern blots* contendo DNA genômico das linhagens da série *(-253/+40)/GFP*, digerido com *Eco* RI, foram hibridados com o fragmento *(-253/+40)/GFP* (figura 2). O transgene *(-253/+40)/GFP* não apresenta sítios de restrição para a enzima *Eco* RI em sua sequência e portanto os fragmentos esperados eram sempre maiores que 7 Kb.

Como mostrado na figura 4, nas linhagens 2-1, 4-1, 17-1, 56-3, 66-1, 74-1, 79-1, 90-3, 102-1 e 113-3 foram detectados fragmentos com pesos moleculares distintos, sempre maiores que 7 Kb, indicando que estas linhagens são resultado de eventos de integração independentes do transgene e que nas mesmas o transgene está completo. No caso das linhagens 70-3 e 73-1, foram detectados fragmentos de tamanhos semelhantes. Entretanto neste caso os adultos precursores dessas linhagens eram ambos machos, o que nos permitiu excluir a possibilidade de que essas duas linhagens tivessem sido obtidas a partir de um mesmo evento de transformação, ou que os adultos G0 tivessem cruzado entre si. Assim, é possível afirmar que as inserções nas linhagens 70-3 e 73-1 apesar de aparentemente apresentarem o mesmo peso molecular, são provenientes de eventos de transformação independentes.

No caso das linhagens 17-1 e 56-3 o resultado obtido gerou dúvidas, pois os DNAs genômicos apresentavam-se parcialmente digeridos e na hibridação foram detectados rastros. Após uma nova extração do DNA genômico dessas linhagens e nova digestão da amostra, repetimos o *Southern blot* e a hibridação conforme descrito anteriormente. No segundo *blot* das linhagens 17-1 e 56-3 foram detectados fragmentos de tamanhos definidos. Neste segundo *Southern blot* a digestão do DNA genômico das linhagens 17-1 e 56-3 foi completa e foi possível concluir que nas linhagens 17-1 e 56-3 ocorreram quatro e um eventos de integração do transgene, respectivamente.

Em síntese, a análise deste conjunto de *Southern blots* revelou que nas linhagens 2-1, 4-1, 56-3, 70-3, 73-1, 74-1, 79-1, 90-3, 102-1 e 113-3 ocorreu um único evento de integração do transgene no genoma, enquanto nas linhagens 66-1 e 17-1 ocorreram dois e quatro eventos de transformação, respectivamente (tabela 2).

Na tentativa de obter linhagens que apresentassem maiores níveis de expressão do transgene realizamos uma série de cruzamentos entre as linhagens homozigotas, para a obtenção de animais que apresentassem quatro inserções do transgene no genoma, duas no cromossomo II e duas no cromossomo III. Essas linhagens foram obtidas e os respectivos genótipos também foram validados em *Southern blots* contendo DNA genômico extraído das linhagens parentais e das linhagens duplo homozigotas digeridos com *Eco* RI (figura 5).

O *Southern blot* das linhagens duplo homozigotas foi hibridado com a sonda (-253/+40)/GFP e sua análise revelou que as linhagens duplo homozigotas apresentam os mesmos fragmentos anteriormente detectados nas respectivas linhagens parentais (figura 5). Deste modo, podemos concluir que as linhagens duplo homozigotas apresentam as mesmas inserções presentes nas linhagens parentais.

Figura 4 – Caracterização em *Southern Blot* das 12 linhagens transgênicas da série (-253/+40)/GFP. A) À esquerda, fotografia do gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, contendo DNA genômico das linhagens da série (-253/+40)/GFP, digerido com a enzima de restrição *Eco* RI que foi utilizado para confecção do *Southern blot*. À direita é mostrado o resultado obtido após a hibridação do *Southern blot* com a sonda (-253/+40)/GFP. B) À esquerda, fotografia do gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, contendo DNA genômico das linhagens 17-1 e 56-3, digerido com *Eco* RI que foi utilizado para a confecção do *Southern blot*. À direita é apresentado o resultado obtido após a hibridação do *Southern blot* com a sonda (-253/+40)/GFP. Os números à esquerda indicam o tamanho (em pb) dos fragmentos do marcador de peso molecular λ /Hind III. As diferentes linhagens analisadas são mostradas no topo de cada figura.

Figura 5 – Caracterização em *Southern blot* das quatro linhagens da série (-253/+40)/GFP duplo homozigotas. À esquerda, fotografia do gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, contendo DNA genômico das linhagens da série (-253/+40)/GFP, digerido com a enzima de restrição *Eco* RI, que foi utilizado para confecção do *Southern blot*. À direita é mostrado o resultado obtido após hibridação do *blot* com a sonda (-253/+40)/GFP. O DNA genômico utilizado na análise da linhagem 56-3 é proveniente da mesma extração utilizada no *Southern blot* da figura X que também apresentou digestão parcial. As setas indicam o fragmento detectado quando a digestão do DNA é completa. Os números à esquerda indicam o tamanho (em pb) dos fragmentos do marcador de peso molecular *λHind III*. As diferentes linhagens são mostradas no topo das figuras.

Caracterização do padrão de expressão da proteína repórter GFP nos estágios L3 e pré-pupa 2 horas nas linhagens da série (-253/+40)/GFP

Estudos anteriores mostraram que o fragmento (-253/+40)/GFP de *BhC4-1* promove a expressão do transgene nas glândulas salivares de *D. melanogaster* na entrada da metamorfose e na glândula anelar partir do final do desenvolvimento embrionário (Monesi et al., 2003; Lecci et al., 2008).

Inicialmente investigamos as larvas de terceiro estadió e pré-pupas 2 horas das 12 linhagens da série (-253/+40)/GFP quanto à expressão do gene repórter *GFP*, para obtermos um panorama do padrão de expressão de *GFP* nas linhagens obtidas. Em larvas de terceiro estadió, foi possível detectar a

expressão da proteína repórter GFP na glândula anelar das *linhagens* 2-1, 17-1, 66-1, 74-1 e 79-1. (figuras 6, 7 e 8). Nessas mesmas linhagens 2-1, 17-1, 66-1, 74-1 e 79-1, também detectamos expressão de GFP nas glândulas salivares de pré-pupas. Essa dado está de acordo com o padrão previamente descrito de expressão do gene *BhC4-1*. Por outro lado, no estágio de pré-pupas 2 horas das linhagens 4-1, 56-3, 70-3, 73-1, 102-1 e 113-3 não foi possível observar a expressão de GFP em nenhuma das glândulas, nem na glândula anelar nem na glândula salivar (figuras 6, 7 e 8). Surpreendentemente, a linhagem 90-3 apresenta um padrão distinto, onde é possível detectar a expressão da proteína repórter GFP apenas nas glândulas salivares no estágio pré-pupa 2 horas, enquanto que na glândula anelar essa expressão é ausente em ambos os estágios analisados, terceiro estadio larval e pré-pupa 2 horas (figuras 6, 7 e 8).

Em todas as linhagens duplo homozigotas, 66;56, 73;56, 66;90 e 73;90, é possível observar expressão da proteína repórter GFP na glândula anelar e na glândula salivar apenas em pré-pupas 2 horas (figura 9). Assim, apesar de conterem quatro cópias do transgene, as linhagens duplo homozigotas não apresentaram níveis de expressão mais robustos do que as linhagens que apresentam apenas duas cópias do transgene.

Assim, uma vez que nas linhagens 2-1 e 66-1 da série (-253/+40)/GFP os níveis de expressão da proteína repórter GFP em L3 e pré-pupa 2 horas são aparentemente maiores quando comparados às demais linhagens, escolhemos estas linhagens para refinar a caracterização do padrão de expressão da proteína repórter GFP durante o desenvolvimento.

Figura 6 – Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estadio e pré-pupas 2 horas nas linhagens 2-1, 4-1, 17-1 e 56-3 da série (-253/+40)/GFP. Larvas de terceiro estadio e pré-pupas 2 horas foram dissecadas e observadas em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. O número à esquerda das figuras indica as linhagens e no topo da figura é apresentado o estágio analisado. A linhagem homozigota está identificada por um asterisco. A glândula anelar é indicada por uma seta (→) e as glândulas salivares por asteriscos (*). A barra corresponde a 0,2 mm.

Figura 7 – Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estadio e pré-pupas 2 horas nas linhagens 66-1, 70-3, 73-1 e 74-1 da série (-253/+40)/GFP. Larvas de terceiro estadio e pré-pupas 2 horas foram dissecadas e observadas em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. O número à esquerda das figuras indica as linhagens e no topo da figura é apresentado o estágio analisado. As linhagens homozigotas estão identificadas por um asterisco. A glândula anelar é indicada por uma seta (→) e as glândulas salivares por asteriscos (*). A barra corresponde a 0,2 mm.

Figura 8 – Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas nas linhagens 79-1, 90-3, 102-1 e 113-3 da série (-253/+40)/GFP. Larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas foram dissecadas e observadas em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. O número à esquerda das figuras indica as linhagens e no topo da figura é apresentado o estágio analisado. A linhagem homozigota está identificada por um asterisco. A glândula anelar é indicada por uma seta (→) e as glândulas salivares por asteriscos (*). A barra corresponde a 0,2 mm.

Figura 9 – Análise do padrão de expressão de GFP em larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas nas linhagens duplo homozigotas 66;56, 73;56, 66;90 e 73;90 da série (-253/+40)/GFP. Larvas de terceiro estágio e pré-pupas 2 horas foram dissecadas e observadas em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. O número à esquerda das figuras indica as linhagens e no topo da figura é apresentado o estágio analisado. A glândula anelar é indicada por uma seta (→) e as glândulas salivares por asteriscos (*). A barra corresponde a 0,2 mm.

Caracterização do padrão de expressão da proteína repórter GFP nas linhagens 2-1 e 66-1 da série (-253/+40)/GFP durante o desenvolvimento de *D. melanogaster*

O rastreamento inicial das 16 diferentes linhagens da série (-253/+40)/GFP foi determinante para a escolha das linhagens que aparentemente apresentavam níveis mais altos de expressão da proteína repórter GFP. Nas linhagens 2-1 e 66-1 da série (-253/+40)/GFP, a expressão de GFP é inicialmente detectada na glândula anelar de L3. Níveis aparentemente semelhantes de GFP são também observados na glândula anelar de pp 0h, pp 1h e pp 2h. Em ambas as linhagens analisadas, a expressão de GFP é detectada nas glândulas salivares de pp 2h, entretanto, somente na linhagem 66-1 observa-se expressão de GFP nas glândulas salivares em pp 1h. Em pupas 24 horas não foi encontrada a expressão da proteína repórter GFP, nem nas glândulas salivares, nem na glândula anelar (figuras 10 e 12).

Durante o desenvolvimento embrionário das linhagens 2-1 e 66-1 da série (-253/+40)/GFP não foi possível detectar a expressão de GFP nem em microscopia de fluorescência nem utilizando-se microscopia confocal. Adicionalmente, investigamos os sistemas reprodutores de machos e fêmeas, nos quais ocorre a síntese de ecdisona nos adultos de *D. melanogaster* (Chávez et al., 2000; Warren et al., 2002; Petryk et al., 2003; Niwa et al., 2004; Warren et al., 2004; Hentze et al., 2013). Os resultados obtidos revelam ausência de expressão de GFP nos órgãos anexos que fazem parte do sistema reprodutor de machos e fêmeas das linhagens 2-1 e 66-1 da série (-253/+40)/GFP. (figuras 11 e 13).

Análise de interação gênica entre a linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP e a linhagem *npr1*^{3w}

O gene *Broad-complex* (CG11491) tem localização citogenética no cromossomo X na região 2B5 (Belyaeva et al., 1980). O locus *broad* é traduzido em isoformas do fator de transcrição *broad* (*br*), que contém domínios de interação proteína-proteína e proteína-DNA. Os produtos de *br* ativam diretamente diferentes genes de expressão tardia pela interação com a região reguladora dos mesmos (Crossgrove et al., 1996). O mutante *npr1*^{3w} constitui

uma deleção desse *locus*, o que impede a transcrição deste fator de transcrição e, por consequência, os genes de pufes tardios regulados por este fator de transcrição não são ativados.

Figura 10 – Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP em larvas e pré-pupas da linhagem 2-1 da série (-253/+40)/GFP. Larva L1 observada por transparência em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. Larvas L2, L3 e pré-pupas foram dissecadas e observadas em estereomicroscópio, dotado de filtro para detecção de GFP. No topo de cada figura é indicado o estágio do desenvolvimento observado. A glândula anelar é indicada por uma seta (→) e a glândula salivar por um asterisco (*). A barra corresponde a 0,2 mm.

Figura 11 – Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP nos sistemas reprodutivos de machos e fêmeas adultos da linhagem 2-1 da série (-253/+40)/GFP. Adultos machos e fêmeas foram dissecados e observados em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. Apesar de algumas das estruturas apresentarem autofluorescência, não foi observada expressão de GFP no

sistema reprodutor dos adultos. Legenda: (ts'') testículo direito; (ts') testículo esquerdo; (dts'') ducto testicular direito; (dts') ducto testicular esquerdo; (ag) glândula acessória; (dea) ducto ejacutório anterior; (fb) folículo basal; (ov) ovário; (gro) germário. A barra corresponde a 0,2 mm.

Figura 12 – Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP em larvas e pré-pupas da linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP. Larva L1 observada por transparência em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. Larvas L2, L3 e pré-pupas foram dissecadas e observadas em estereomicroscópio, dotado de filtro para detecção de GFP. No topo de cada figura é indicado o estágio do desenvolvimento observado. A glândula anelar é indicada por uma seta (→). A barra corresponde a 0,2 mm.

Figura 13 – Análise do padrão de expressão da proteína repórter GFP nos sistemas reprodutores de machos e fêmeas adultos da linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP. Adultos machos e fêmeas foram dissecados e observados em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. Apesar de algumas das estruturas apresentarem autofluorescência, não foi observada expressão de GFP no sistema reprodutor dos adultos. Legenda: (ts'') testículo direito; (ts') testículo esquerdo;

(dts'') ducto testicular direito; (dts') ducto testicular esquerdo; (ag) glândula acessória; (fb) folículo basal; (ov) ovário; (gro) germário; (fol) folículo. A barra corresponde a 0,2 mm.

A linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP foi escolhida para o ensaio de interação gênica, pois aparentemente apresenta maiores níveis de expressão da proteína repórter GFP. Para analisarmos o efeito da ausência de *br* na expressão de GFP nesta linhagem, realizamos cruzamentos entre as linhagem 66-1 e a deficiência *npr1^{3w}*, os quais resultaram em machos *npr1^{3w};66-1* ou *Binsn;66-1* e fêmeas *+/Binsn;66-1* ou *+/npr1^{3w};66-1*. Uma vez que o locus *br* é localizado no cromossomo X analisamos somente larvas do sexo masculino hemizigotos. O mutante *npr1^{3w}* não entra em metamorfose, portanto analisamos a expressão de GFP em larvas de terceiro estadio e que apresentavam intestino vazio, segundo método de Maroni e Stamey (1983).

Aparentemente, não houve alterações na expressão de GFP na glândula anelar das larvas machos de terceiro estadio *npr1^{3w};66-1*, comparada à expressão do repórter nas glândulas anelares de larvas de terceiro estadio de machos *Binsn;66-1*. Esses dados confirmam que a ausência de *br* não resulta em alterações no padrão de expressão de *BhC4-1* na glândula anelar.

Figura 14 – Análise do padrão de expressão de GFP em machos *npr1^{3w};66-1* e machos *Binsn;66-1*. Larvas de intestino vazio foram dissecadas e observadas em estereomicroscópio dotado de filtro para detecção de GFP. A glândula anelar é indicada por uma seta (→) e a glândula salivar é indicada por um asterisco (*). A barra corresponde a 0,2 mm.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, obtivemos 12 linhagens de *D. melanogaster* transformadas com a construção $(-253/+40)/GFP$. Essa construção apresenta o MCR de glândula anelar $(-253/-187)$, o MCR de glândula salivar $(-186/-58)$ e o promotor basal do gene de *B. hygida BhC4-1* clonados a montante da sequência codificadora do gene repórter *GFP*. A partir de um rastreamento inicial, selecionamos duas linhagens, 2-1 e 66-1, para caracterizar o padrão de expressão da proteína repórter GFP ao longo do desenvolvimento. Nestas duas linhagens o padrão de expressão de GFP é bastante similar. A expressão de GFP é inicialmente detectada na glândula anelar de larvas de terceiro estádio e continua a ser detectada neste órgão até o estágio de pré-pupa. Além disso, também verificamos expressão de GFP em um segundo órgão larval, a glândula salivar, a partir do estágio de pré-pupas.

Os dados obtidos neste trabalho concordam parcialmente com resultados anteriores do nosso grupo. Em linhagens transformadas com o MCR de glândula salivar $(-186/-58)$, tanto na orientação nativa como na orientação invertida, a expressão de *BhC4-1-lacZ* é consistentemente detectada na glândula salivar a partir do estágio de pré-pupa 0 hora (Lecci 2008). Nas linhagens da série $(-253/+40)/GFP$ a expressão do repórter é detectada somente a partir de pré-pupas 1 hora no caso da linhagem 66-1 e a partir de pré-pupas 2 horas, no caso da linhagem 2-1. Estes dados podem estar sugerindo que os níveis de expressão da proteína repórter GFP são menores, quando comparados aos níveis de expressão de *BhC4-1-lacZ* nas linhagens $(-186/-58)$ ou alternativamente, que a proteína GFP é menos estável que a proteína repórter β -galactosidase, o que em ambos os casos dificultaria a detecção de GFP em pré-pupas 0h.

Resultados anteriores, derivados de experimentos de interação gênica, revelaram que os produtos de genes diretamente induzidos pelo hormônio ecdisona regulam a expressão de *BhC4-1-lacZ* na glândula salivar (Basso et al., 2006; Frank e al., 2017). Nestes estudos foram utilizadas linhagens *BhC4-1-lacZ* e as alterações nos padrões de expressão do transgene foram detectadas principalmente utilizando-se ensaios histoquímicos de atividade da

proteína repórter (Basso et al., 2006; Frank e al., 2017). Neste contexto, tendo em vista que a análise do padrão de expressão de GFP é relativamente simples, poderíamos utilizar as linhagens da série *(-253/+40)/GFP* para identificação de outros fatores de transcrição que atuam como reguladores da expressão de *BhC4-1* na glândula salivar de pré-pupas.

Uma situação distinta refere-se ao padrão de GFP na glândula anelar. O MCR de glândula anelar *(-253/-187)* foi extensamente caracterizado como um elemento que promove a expressão de construções *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar desde o final do desenvolvimento embrionário até o estágio de pré-pupa. Resultados anteriores do nosso laboratório revelaram que em linhagens *(-253/-187)* e linhagens *(-253/+40)* a expressão do RNAm *lacZ* na glândula anelar é detectada a partir do estágio 13 do desenvolvimento embrionário, enquanto que a proteína repórter é detectada neste órgão a partir do estágio 15-16 do desenvolvimento embrionário (Monesi et al., 2003; Lecci et al., 2008; Furtado, 2013). Neste sentido, a ausência de expressão de GFP em embriões e em larvas de primeiro e segundo estágio constitui um resultado inesperado.

Por outro lado, a expressão de GFP na glândula anelar das linhagens da série *(-253/+40)/GFP* a partir do terceiro estágio larval e durante o estágio de pré-pupas é similar ao anteriormente observado em linhagens das séries *(-253/-187)* e *(-253/+40)* (Monesi et al., 2003; Lecci et al., 2008; Furtado, 2013). Em conjunto, os dados acerca do padrão de expressão de GFP na glândula anelar reforçam a sugestão de que nas linhagens obtidas os níveis de expressão de GFP são menores, quando comparados aos níveis de expressão de β -galactosidase anteriormente detectados em linhagens *BhC4-1-lacZ*.

Além de observarmos níveis aparentemente menores de expressão de GFP tanto na glândula salivar, como na glândula anelar nas linhagens da série *(-253/+40)/GFP*, o padrão de expressão de GFP nas 12 linhagens obtidas mostrou-se bastante variável quando as linhagens foram comparadas umas com as outras. Embora tenhamos observado variações quanto ao padrão de expressão de β -galactosidase em linhagens transformadas com construções *BhC4-1-lacZ* (Lecci et al., 2008), via de regra a análise de 3 ou 4 linhagens independentes era suficiente para determinarmos o padrão de expressão do repórter promovido por uma dada construção. As construções *BhC4-1-lacZ* são

em sua maioria derivadas do vetor pCaSpeR-AUG- β Gal e nas mesmas os fragmentos de promotor testados encontravam-se flanqueados à montante pelo gene marcador *white* e à jusante pelo gene repórter *lacZ*, o que pode ter protegido os fragmentos de promotor testados de efeitos de posição da cromatina circundante. Por outro lado, a construção *(-253/+40)/GFP* é derivada do plasmídeo *pUAST*. Nesta construção, o gene *white* encontra-se posicionado à jusante do gene repórter *GFP* e a sequência de promotor testada encontra-se flanqueada à montante apenas pela sequência do elemento *P*, o que pode ter deixado o fragmento *(-253/+40)* mais suscetível a efeitos de posição e resultaria nas diferenças observadas nos padrões de GFP no conjunto de linhagens obtidas.

A ocorrência de expressão de GFP em tempos anteriores a L3 nas linhagens obtidas não pode ser descartada. É possível que os níveis de expressão de GFP na glândula anelar de embriões e larvas jovens não sejam suficientes para serem detectados por microscopia de fluorescência. Uma alternativa seria a realização de experimentos de hibridação *in situ* ou RT-qPCR com vistas a detectar o RNAm *GFP*, ou ainda experimentos de imunolocalização visando a detecção da proteína GFP nestes estágios do desenvolvimento. Durante o desenvolvimento deste projeto optamos por não realizar estes experimentos, pois o principal objetivo do projeto era a obtenção de linhagens que apresentassem níveis elevados de expressão de GFP na glândula anelar de embriões. Estas linhagens seriam então cruzadas com linhagens que apresentassem mutações em genes anteriormente caracterizados no laboratório e constituem candidatos a regular o gene *BhC4-1* na glândula anelar (Candido-Silva e Monesi, dados não publicados).

Numa tentativa de obtermos linhagens que apresentassem maiores níveis de expressão de GFP realizamos cruzamentos a partir das quatro linhagens homozigotas da série *(-253/+40)/GFP* e obtivemos quatro linhagens duplo homozigotas. Surpreendentemente, os níveis de expressão de GFP observados nas linhagens duplo homozigotas são bastante similares aos observados nas linhagens homozigotas parentais e nas mesmas também não foi possível detectar a expressão de GFP durante o desenvolvimento embrionário.

Em conjunto, nossos experimentos indicam que a obtenção de linhagens transformadas com o MCR de glândula anelar (-253/-187) que apresentem níveis altos de expressão de GFP na glândula anelar ao longo de desenvolvimento depende da utilização de novas construções. Neste sentido, uma alternativa seria a construção de um novo transgene contendo várias cópias em tandem do MCR de glândula anelar de 67 pb (-253/-187) clonadas à montante do gene repórter *GFP*. Alternativamente, poderíamos construir um transgene com uma estrutura semelhante aos transgenes derivados do vetor pCaSpeR no qual o MCR de glândula anelar de 67 pb (-253/-187) ficasse menos sujeito a efeitos de posição uma vez integrado no genoma.

Conforme anteriormente explicado, dados mais recentes do nosso laboratório revelaram que o gene *BhC4-1* é também expresso e amplificado de maneira regulada nas glândulas protorácicas na época em que o pufe de DNA C4 é formado nas glândulas salivares de *B. hygida* (Candido-Silva et al., 2015). Interessantemente, durante as análises das linhagens da série (-253/+40)/*GFP*, observamos que a expressão de GFP parece não ocorrer na glândula anelar como um todo, como anteriormente descrito quando da análise de linhagens *BhC4-1-lacZ* (Lecci et al., 2008), mas parece estar restrita às células das glândulas protorácicas, um dos componentes da glândula anelar. Um dos problemas da utilização da proteína β -galactosidase como repórter está relacionado ao fato que o produto do ensaio histoquímico difunde-se pelas células vizinhas. Neste contexto, a utilização de GFP como gene repórter mostrou-se mais vantajosa, pois a expressão de GFP ficou restrita aos tecidos nos quais a mesma é expressa e revelou que a expressão de (-253/+40)/*GFP* ocorre somente em um dos componentes da glândula anelar, as glândulas protorácicas.

Ensaio de interação gênica entre uma das linhagens da série (-253/+40)/*GFP* e a linhagem deficiente para o fator de transcrição *br*, *npr1*^{3w}, mostraram que na ausência de *br* a expressão da proteína repórter GFP não é alterada na glândula anelar em larvas de terceiro estadiu. Estes dados concordam com dados anteriores que mostraram que na ausência de *br* a expressão de (-1293/+40) *BhC4-1-lacZ* na glândula anelar não é alterada,

enquanto que a expressão do transgene na glândula salivar é praticamente abolida (Basso et al., 2006).

O gene *npc1* de *D. melanogaster* é um gene que atua na via de biossíntese de ecdisona e mutantes *npc1* são deficientes em ecdisona (Huang et al., 2008). A região promotora de *npc1* contém um MCR que regula a expressão deste gene na glândula anelar. Estudos de interação gênica revelaram que na ausência de *br* os níveis de expressão de *npc1* são bastante reduzidos na glândula anelar, sugerindo que *br* faz parte do complexo de fatores de transcrição que liga-se ao promotor de *npc1* (Xiang et al., 2010). A ausência de *br* também leva à diminuição dos níveis de expressão de um conjunto adicional de 8 genes (*ecd*, *mld*, *start1*, *dib*, *shadow*, *shade*, *phantom* e *dare*) cuja expressão na glândula anelar de *D. melanogaster* foi demonstrada (Xiang et al., 2010). Neste sentido, a observação de que a ausência de *br* não resulta em alterações aparentes nos níveis de expressão de transgenes que contêm o MCR de glândula anelar (-253/-187) (Basso et al., 2006, esta dissertação) sugere fortemente que os fatores de transcrição que regulam a expressão de *BhC4-1* na glândula anelar são distintos daqueles que regulam um conjunto de genes que direta ou indiretamente participam da via de biossíntese de ecdisona na glândula anelar de *D. melanogaster*.

Experimentos em andamento em nosso laboratório resultaram na identificação de um conjunto de fatores de transcrição que são capazes de se ligar ao MCR de glândula anelar (-253/-187). Adicionalmente, trabalhos recentes derivados de abordagens em larga escala identificaram conjuntos adicionais de fatores de transcrição que são expressos na glândula anelar de *D. melanogaster* (Ou et al., 2016; Danielsen et al., 2016). Este conjunto de fatores de transcrição compreende potenciais reguladores de *BhC4-1* na glândula anelar e a investigação acerca da interação dos mesmos com o MCR de glândula anelar poderá resultar na caracterização de redes reguladoras de expressão gênica que atuam na glândula anelar distintas daquelas identificadas até o momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. Molecular characterization of an 18 kb segment of DNA puff C4 of *Bradysia hygida* (Diptera, sciaridae). **Chromosoma**, v. 103, n. 10, p. 715-24, Jul 1995.

_____. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 9, p. 991-1010, Sep 2004.

_____. The induction of DNA puff *BhC4-1* gene is a late response to the increase in 20-hydroxyecdysone titers in last instar dipteran larvae. **Mech Dev**, v. 110, n. 1-2, p. 15-26, Jan 2002.

ABRAMS, E. W.; ANDREW, D. J. CrebA regulates secretory activity in the *Drosophila* salivary gland and epidermis. **Development**, v. 132, n. 12, p. 2743-58, Jun 2005.

ANDREW, D. J.; HENDERSON, K. D.; SESHIAH, P. Salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. **Mech Dev**, v. 92, n. 1, p. 5-17, Mar 2000.

ASAMI, T.; NAKANO, T.; FUJIOKA, S. Plant brassinosteroid hormones. **Vitam Horm**, v. 72, p. 479-504, 2005. ISSN 0083-6729.

ASHBURNER, M. et al. **Temporal Control of Puffing Activity in Polytene Chromosomes. 1974**

ASHBURNER, M. **Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual**. Cold Spring Harbor Press, 1989.

BALBIANI, E. Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*.: **Zool Anz**. 4: 662-667 p. 1881.

BASSO, L. R. et al. Broad-Complex, E74, and E75 early genes control DNA puff *BhC4-1* expression in prepupal salivary glands. **Genesis**, v. 44, n. 11, p. 505-14, Nov 2006.

BELYAEVA, E. S. et al. Cytogenetic analysis of the 2B3-4--2B11 region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Cytology of the region and mutant complementation groups. **Chromosoma**, v. 81, n. 2, p. 281-306, 1980.

BIALECKI, M. et al. Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. **Dev Cell**, v. 3, n. 2, p. 209-20, Aug 2002.

BIENZ-TADMOR, B.; SMITH, H. S.; GERBI, S. A. The promoter of DNA puff gene II/9-1 of *Sciara coprophila* is inducible by ecdysone in late prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Cell Regulation**, v. 2, n. 11, p. 875-88, Nov 1991

BOWNES, M.; DÜBENDORFER, A.; SMITH, T. Ecdysteroids in adult males and females of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 30, n. 10, p. 823-30, 1984.

BRAND, A. H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. **Development**, v. 118, n. 2, p. 401-15, Jun 1993.

CAMPOS-ORTEGA, J. A.; HARTENSTEIN, V. **The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster***. Berlin, Germany: Springer, 1985. 277.

CANDIDO-SILVA, J. A. et al. Amplification and expression of a salivary gland DNA puff gene in the prothoracic gland of *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae). **J Insect Physiol**, v. 74C, p. 30-37, Feb 2015.

CHÁVEZ, V. M. et al. The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. **Development**, v. 127, n. 19, p. 4115-26, Oct 2000

CROSSGROVE, K. et al. The *Drosophila* Broad-Complex early gene directly regulates late gene transcription during the ecdysone-induced puffing cascade. **Dev Biol**, v. 180, n. 2, p. 745-58, Dec 1996.

DAI, J. D.; GILBERT, L. I. Metamorphosis of the *corpus allatum* and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland. **Dev Biol**, v. 144, n. 2, p. 309-26, Apr 1991.

DANIELSEN, E. T. et al. A *Drosophila* Genome-Wide Screen Identifies Regulators of Steroid Hormone Production and Developmental Timing. **Dev Cell**, v. 37, n. 6, p. 558-70, Jun 2016.

DAVIDSON, E. H. **The regulatory genome: gene regulatory networks in development and evolution**. 2006.

DE VELASCO, B. et al. Embryonic development of the *Drosophila corpus cardiacum*, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass. **Dev Biol**, v. 274, n. 2, p. 280-94, Oct 2004.

DE-ALMEIDA, J. C. A 28-fold increase in secretory protein synthesis is associated with DNA puff activity in the salivary gland of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 5, p. 605-14, May 1997

DEMEREK, M. **Biology of *Drosophila***. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 632.

DIBELLO, P. R. et al. The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. **Genetics**, v. 129, n. 2, p. 385-97, Oct 1991.

FLETCHER, J. C.; THUMMEL, C. S. The ecdysone-inducible Broad-complex and E74 early genes interact to regulate target gene transcription and *Drosophila* metamorphosis. **Genetics**, v. 141, n. 3, p. 1025-35, Nov 1995.

FONTES, A. M. et al. The DNA puff BhB10-1 gene encodes a glycine-rich protein secreted by the late stage larval salivary glands of *Bradysia hygida*. **Gene**, v. 231, n. 1-2, p. 67-75, Apr 1999.

FRANK, H. O. et al. The *Drosophila melanogaster* Eip74EF-PA transcription factor directly binds the sciarid BhC4-1 promoter. **Genesis**, v. 55, n. 11, Nov 2017

FURTADO, I. M. D. A. **Caracterização do padrão de expressão BhC4-1-lacZ em linhagens de *Drosophila melanogaster* transformadas com diferentes versões do ativados de glândula anelar do gene BhC4-1.** 2013. 80f (Dissertação (Mestrado)). Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, FMRP-USP, Ribeirão Preto.

GARCIA, A. C. et al. Functional characterization of the sciarid BhC4-1 core promoter in transgenic *Drosophila*. **BMC Mol Biol**, v. 12, p. 32, 2011.

GERSTEIN, M. B. et al. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 91-100, Sep 2012

GILBERT, L. I.; WARREN, J. T. A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone. **Vitam Horm**, v. 73, p. 31-57, 2005

GILLOTT, C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annu Rev Entomol**, v. 48, p. 163-84, 2003.

HANDLER, A. M. Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. **Developmental Biology**, v. 93, n. 1, p. 73-82, 1982.

HANNIBAL, R. L. et al. Copy Number Variation Is a Fundamental Aspect of the Placental Genome. **PLOS genetics**, 2014

HARSHMAN, L. G.; LOEB, A. M.; JOHNSON, B. A. Ecdysteroid titers in mated and unmated *Drosophila melanogaster* females. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, n. 6, p. 571-577, 1999.

HENTZE, J. L. et al. Accessory gland as a site for prothoracicotropic hormone controlled ecdysone synthesis in adult male insects. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55131, 2013.

HILL, R. J. et al. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. **Annu Rev Entomol**, v. 58, p. 251-71, 2013.

HOSIE, A. M. et al. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. **Nature**, v. 444, n. 7118, p. 486-9, Nov 2006

HUANG, X.; WARREN, J. T.; GILBERT, L. I. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. **J Genet Genomics**, v. 35, n. 1, p. 1-10, Jan 2008

ISHIMOTO, H.; KITAMOTO, T. The steroid molting hormone Ecdysone regulates sleep in adult *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 185, n. 1, p. 269-81, May 2010]

ISHIMOTO, H.; SAKAI, T.; KITAMOTO, T. Ecdysone signaling regulates the formation of long-term courtship memory in adult *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 15, p. 6381-6, Apr 2009.

JEZIORSKA, D. M.; JORDAN, K. W.; VANCE, K. W. A systems biology approach to understanding cis-regulatory module function. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 7, p. 856-62, Sep 2009.

JIANG, C.; BAEHRECKE, E. H.; THUMMEL, C. S. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. **Development**, v. 124, n. 22, p. 4673-83, Nov 1997.

JUVEN-GERSHON, T. et al. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. **Curr Opin Cell Biol**, v. 20, n. 3, p. 253-9, Jun 2008.

KARIM, F. D.; GUILD, G. M.; THUMMEL, C. S. The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. **Development**, v. 118, n. 3, p. 977-88, Jul 1993.

KARIM, F. D.; THUMMEL, C. S. Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. **EMBO J**, v. 11, n. 11, p. 4083-93, Nov 1992.

KIM, S. K.; RULIFSON, E. J. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 316-20, Sep 16 2004.

KOELLE, M. R. et al. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 59-77, Oct 1991.

KYRCHANOVA, O.; GEORGIEV, P. Chromatin insulators and long-distance interactions in *Drosophila*. **FEBS Lett**, v. 588, n. 1, p. 8-14, Jan 2014.

LAICINE, E. M. et al. Development of DNA puffs and patterns of polypeptide synthesis in the salivary glands of *Bradysia hygida*. **Chromossoma**, v. 84, n. 4, p. 280-284, 1984.

LARA, F. J.; STOCKER, A. J.; AMABIS, J. M. DNA sequence amplification in sciarid flies: results and perspectives. **Braz J Med Biol Res**, v. 24, n. 3, p. 233-48, 1991.

LATCHMAN, D. S. Transcription factors: an overview. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 12, p. 1305-12, Dec 1997.

LECCI, M. S. et al. Functional and bioinformatics analyses reveal conservation of cis-regulatory elements between sciaridae and drosophilidae. **Genesis**, v. 46, n. 1, p. 43-51, Jan 2008.

LEE, T. I.; YOUNG, R. A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. **Annu Rev Genet**, v. 34, p. 77-137, 2000.

LEVINE, M.; TJIAN, R. Transcription regulation and animal diversity. **Nature**, v. 424, n. 6945, p. 147-51, Jul 2003.

MALTA, T. M.; RUIZ, J. C.; MONESI, N. Functional characterization and bioinformatics analysis of the *BhC4-1* ring gland enhancer in transgenic *Drosophila*. Belgium.: **In 16th International Ecdysone Workshop**. 2006.

MARONI, G.; STAMEY, S. C. Developmental profile and tissue distribution of alcohol hydrogenase. **Drosophila Information Service**, v. 59, p. 77-79, 1983.

MONESI, N. et al. Immunocharacterization of the DNA puff BhC4-1 protein of *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 6, p. 531-42, Jun 2004.

MONESI, N. et al. Regulation of Sciarid DNA Puffs by Ecdysone: Mechanisms and Perspectives. In: SMAGGHE, G. (Ed.). Ecdysone: Structures and Functions: **Springer Netherlands**, 2009. cap. II, p.165-183.

MONESI, N.; BASSO, L. R.; PAÇÓ-LARSON, M. L. Identification of regulatory regions in the DNA puff BhC4-1 promoter. **Insect Mol Biol**, v. 12, n. 3, p. 247-54, Jun 2003.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M.; PAÇÓ-LARSON, M. L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, v. 107, n. 8, p. 559-69, Dec 1998.

MONESI, N.; SOUSA, J. F.; PAÇÓ-LARSON, M. L. The DNA puff BhB10-1 gene is differentially expressed in various tissues of *Bradysia hygida* late larvae and constitutively transcribed in transgenic *Drosophila*. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 7, p. 851-9, Jul 2001.

MYAT, M. M.; ANDREW, D. J. Organ shape in the *Drosophila* salivary gland is controlled by regulated, sequential internalization of the primordia. **Development**, v. 127, n. 4, p. 679-91, Feb 2000.

NAGL, W. Polytene Chromosomes of Plants. **ScienceDirect**, v. 73, p. 21-53, 1981.

NEVES, M. D. C. **Caracterização funcional da região repressora proximal do promotor do gene de pufe de DNA BhC4-1**. 2009. 69f (Dissertação (Mestrado)). Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, FMRP-USP, Ribeirão Preto.

NIWA, R. et al. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 34, p. 35942-9, Aug 2004.

ONG, C. T.; CORCES, V. G. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 4, p. 283-93, Apr 2011.

ONO, H. et al. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. **Dev Biol**, v. 298, n. 2, p. 555-70, Oct 2006.

ORO, A. E.; MCKEOWN, M.; EVANS, R. M. Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. **Nature**, v. 347, n. 6290, p. 298-301, Sep 1990.

OU, Q. et al. The Insect Prothoracic Gland as a Model for Steroid Hormone Biosynthesis and Regulation. **Cell Rep**, v. 16, n. 1, p. 247-62, Jun 28 2016.

PAÇÓ-LARSON, M. L. et al. Cloning of a developmentally amplified gene sequence in the DNA puff C4 of *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae) salivary glands. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 6, p. 439-446, 1992.

PATHAK, S. C.; GHOSH, S. The retrocerebral endocrine complex in Diptera. **Funct Dev Morphol**, v. 1, n. 2, p. 19-26, 1991.

PETRYK, A. et al. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 24, p. 13773-8, Nov 2003.

PONDEVILLE, E. et al. *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 50, p. 19631-6, Dec 2008.

RIDDIFORD, L. M. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor*, v. 3, n. 3, p. 203-9, 1993.

RIDDIFORD, L. M.; CHERBAS, P.; TRUMAN, J. W. Ecdysone receptors and their biological actions. **Vitam Horm**, v. 60, p. 1-73, 2000.

SANCHEZ-HIGUERAS, C.; HOMBRIA, J. C. Precise long-range migration results from short-range stepwise migration during ring gland organogenesis. **Dev Biol**, v. 414, n. 1, p. 45-57, Jun 01 2016.

SANCHEZ-HIGUERAS, C.; SOTILLOS, S.; CASTELLI-GAIR HOMBRIA, J. Common origin of insect trachea and endocrine organs from a segmentally repeated precursor. **Curr Biol**, v. 24, n. 1, p. 76-81, Jan 2014.

SARTO, G. E. E. A. Endomitosis in human trophoblast. **Hum Genet**, v. 62, n. 3, p. 228-32, 1982.

SCHWARTZ, M. B. et al. The effects of nutrition and methoprene treatment on ovarian ecdysteroid synthesis in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 31, n. 12, p. 955-957, 1985.

SCHWEDES, C. C.; CARNEY, G. E. Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*. **J Insect Physiol**, v. 58, n. 3, p. 293-302, Mar 2012.

SCHWEDES, C.; TULSIANI, S.; CARNEY, G. E. Ecdysone receptor expression and activity in adult *Drosophila melanogaster*. **J Insect Physiol**, v. 57, n. 7, p. 899-907, Jul 2011.

SIMON, C. R.; SIVIERO, F.; MONESI, N. Beyond DNA puffs: What can we learn from studying sciarids? **genesis**, v. 54, n. 7, p. 17, June 1, 2016 2016.

SMITH, A. V.; ORR-WEAVER, T. L. The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny. **Development**, v. 112, n. 4, p. 997-1008, Aug 1991.

SOARES, M. A. et al. Analysis of the amplification and transcription of the C3-22 gene of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) in transgenic lines of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, v. 112, n. 3, p. 144-51, Oct 2003.

SPITZ, F.; FURLONG, E. E. M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, 2012-08-07 2012.

STOCKER, A. J. et al. DNA replication and amplification during the final cycle of polytene in sciarid salivary gland chromosomes and their control by ecdysone: **Ciência e Cultura**. 48: 306-312 p. 1996.

STORMO, B. M.; FOX, D. T. Polyteny: still a giant player in chromosome research. **Chromosome Research**, p. 14, 2017.

SULLIVAN, W.; ASHBURNER, M.; HAWLEY, R. S. **Drosophila Protocols**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

TERASHIMA, J.; BOWNES, M. A microarray analysis of genes involved in relating egg production to nutritional intake in *Drosophila melanogaster*. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 5, p. 429-40, May 2005.

THUMMEL, C. S. Flies on steroids--*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. **Trends Genet**, v. 12, n. 8, p. 306-10, Aug 1996.

WANG, C. et al. Defining the contribution of select neuropeptides and their receptors in regulating sesquiterpenoid biosynthesis by *Drosophila melanogaster* ring gland/corpus allatum through RNAi analysis. **Gen Comp Endocrinol**, v. 176, n. 3, p. 347-53, May 2012.

WARREN, J. T. et al. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 17, p. 11043-8, Aug 2002.

WINTER, C. E. et al. The giant DNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary gland secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 23, n. 11-12, p. 1455-1459, 1977.

WOLFNER, M. F. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. **Heredity (Edinb)**, v. 88, n. 2, p. 85-93, Feb 2002.

XIANG, Y.; LIU, Z.; HUANG, X. br regulates the expression of the ecdysone biosynthesis gene *npc1*. **Dev Biol**, v. 344, n. 2, p. 800-8, Aug 2010.

YAMANAKA, N.; REWITZ, K. F.; O'CONNOR, M. B. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. **Annu Rev Entomol**, v. 58, p. 497-516, 2013.

YIN, V. P.; THUMMEL, C. S.; BASHIRULLAH, A. Down-regulation of inhibitor of apoptosis levels provides competence for steroid-triggered cell death. **J Cell Biol**, v. 178, n. 1, p. 85-92, Jul 2007.

YOSHIYAMA, T. et al. Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. **Development**, v. 133, n. 13, p. 2565-2574, 2006.

ZHANG, H. M. et al. AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D144-9, Jan 2012.

ZHIMULEV, I. F. et al. Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. **Int Rev Cytol**, v. 241, p. 203-75, 2004.

ANEXOS

Anexo 1- Recorte da glândula anelar de larva de terceiro estadio da série (-253/+40)/GFP. (A) reconstrução 3D mostrando as posições das três glândulas que formam a glândula anelar. (B) larva de terceiro estadio da linhagem 66-1 da série (-253/+40)/GFP com marcação nas glândulas protorácicas por uma linha pontilhada vermelha. É possível determinar que a expressão da proteína repórter GFP seja exclusiva das glândulas protorácicas. Abreviações: ca- *corpus allatum*, cc- *corpus cardiacum*, ptg- glândulas protorácicas, (A) retirado de Sánchez-Higuera et al., 2014