

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

ANDRÉ CENDON SILVA

Analise do papel das proteínas IRM (Irre Cell Recognition Module) no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário e comportamento de *Drosophila*

Ribeirão Preto – SP

2022

ANDRÉ CENDON SILVA

Análise do papel das proteínas IRM (Irre Cell Recognition Module) no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário e comportamento de *Drosophila*

Analysis of the role of IRM (Irre Cell Recognition Module) in embryonic nervous system development and behavior of *Drosophila*

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título e Doutorado em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Enilza Maria Espreafico

Ribeirão Preto – SP

2022

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.

Cendon-Silva, André

Análise do papel das proteínas IRM (Irre Cell Recognition Module) no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário e comportamento de *Drosophila*. Ribeirão Preto, 2022. p.:79 il.: color; 30cm

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

Orientadora: Espreafico, Enilza Maria.

1. *Drosophila melanogaster*. 2.Sistema Nervoso. 3. Neurodesenvolvimento. 4.IRMs. 5. Comportamento.

Nome: CENDON-SILVA, André

Título: Análise do papel das proteínas IRM (Irre Cell Recognition Module) no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário e comportamento de *Drosophila*

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

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof^a. Dr^a. Enilza Maria Espreafico.

Avaliado em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

In memoriam ao meu irmão Alexandre Cendon e aos demais 700 mil brasileiros vítimas da covid-19 no Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico pela confiança e incentivo ao longo do Doutorado.

Ao Prof. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos pelos ensinamentos e generosidade ao longo de todos esses anos trabalhando juntos. Além de ser uma referência científica, Ricardo tem minha admiração por ser um exemplo de liderança, sempre promovendo um ambiente harmonioso para o trabalho científico.

Aos amigos do laboratório Tiago, Vanessa, Carlos, Felipe, Rafael e Maiaro pelo companheirismo ao longo desses anos.

Ao Valdir Mazzucato pelo suporte técnico e cuidado com nossa pesquisa.

À Roberta Rosales e Elisabete Milani pela amizade e suporte técnico nas incontáveis horas de microscopia ao longo de todos esses anos.

A todos os técnicos da FMRP, principalmente aos técnicos do Depto de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pelo comprometimento com os serviços prestados.

A todos os docentes do Programa de Biologia Celular e Molecular pelo aprendizado em todas as disciplinas ao longo desses anos.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Biologia Celular e Molecular pelo ambiente acadêmico exemplar.

Aos meus amigos Juliana e Julia pela longa amizade e suporte emocional e científico.

A minha mãe Edvane, minha avó Terezinha, minha tia Dirce, meus irmãos Alexandre, Vitor e Barbara, minha prima Michella e toda minha família por todo incentivo, cuidado e amor.

À Universidade de São Paulo pela formação de excelência. Feliz em acompanhar ao longo desses anos que a USP vem se tornando um espaço cada vez melhor e mais inclusivo.

AGRADECIMENTO PELO APOIO FINANCEIRO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de doutorado, além do apoio institucional ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro com os projetos regulares que possibilitou a realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (FAEPA) pelo auxílio financeiro destinado a congressos e ao Laboratório de Genético Molecular do Desenvolvimento.

RESUMO

Cendon-Silva, André. Análise do papel das proteínas IRM (Irre Cell Recognition Module) no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário e comportamento de *Drosophila*. 2022. 79p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A família Irre Cell Recognition Module (IRM) é constituída por proteínas transmembranares de adesão celular pertencentes a superfamília das imunoglobulinas. Conservadas evolutivamente, participam de processos do desenvolvimento de diferentes órgãos e tecidos, entre os quais sistema nervoso, musculatura e barreira de filtração são alguns exemplos nos quais atuam, desde invertebrados a mamíferos. Embora o papel das IRMs no desenvolvimento do sistema nervoso adulto de *Drosophila* seja conhecido, pouco se sabe sobre a atuação das IRMs no neurodesenvolvimento embrionário. Desse modo, o presente trabalho buscou estudar o papel das moléculas da família IRM durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de *Drosophila*. Nossas análises mostram que três membros da família – Roughest, Kirre e Hibris – são expressos ao longo do neurodesenvolvimento embrionário, sendo recrutados de forma peculiar para cada estágio do desenvolvimento do sistema nervoso. Hibris surge como marcador das células da glia da linha média, modelo importante para estudos de migração, *ensheathment*, morte e sobrevivência celular. Em uma análise funcional, utilizando diferentes metodologias, as IRMs se mostram necessárias para um perfeito direcionamento axonal no cordão nervoso embrionário. Para além disso, em uma análise do comportamento de *Drosophila*, vemos que a perda da função selvagem das IRMs gera alteração tanto em comportamentos locomotores quanto em comportamentos semelhantes aos afetados no transtorno do espectro autista.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, sistema nervoso, Neurodesenvolvimento, IRM, comportamento.

ABSTRACT

Cendon-Silva, A. Analysis of the role of IRM (Irre Cell Recognition Module) in embryonic nervous system development and behavior of *Drosophila*. 2022. 79p. Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo.

The Irre Cell Recognition Module (IRM) family consists of transmembrane cell adhesion proteins belonging to the immunoglobulin superfamily. Evolutionarily conserved, they participate in developmental processes of different organs and tissues, among which the nervous system, musculature and filtration barrier are some examples, from invertebrates to mammals. Although the role of IRMs in *Drosophila* adult nervous system development has been studied in some detail, little is known about the role of IRMs in embryonic neurodevelopment. Thus, the present work sought to study the role of IRM family during *Drosophila* embryonic nervous system development. Our analyses show that three members of the family – Roughest, Kirre and Hibris – are expressed throughout embryonic neurodevelopment, being recruited in a characteristic way for each stage of nervous system development. Hibris emerges as a marker for midline glial cell, an important model for studies of cell migration, ensheathment, survival, and death. In a functional analysis, using different methodologies, IRMs are shown to be necessary for normal axon pathfinding in embryonic nerve cord. Furthermore, in an analysis of *Drosophila* behavior, we see that loss of IRM wild type function generates abnormal locomotor and autistic-like behaviors.

Key words: *Drosophila melanogaster*, nervous system, neurodevelopment , IRM, behavior.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMG	Anterior Midline Glia”
°C	Graus Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CyO	Curly of Oster
DAPI	4', 6 diamidino-2- phenylindole
deGradFP	“degrade Green Flourescent Protein”
Df	Deficiência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dpp	Gene <i>decapentaplegic</i>
<u>DPP</u>	Proteína Decapentaplegic
<u>EcdRst</u>	Domínio extracelular de Roughest
<u>GFP</u>	Proteína fluoescete verde
<u>Hbs</u>	Gene <i>hibris</i>
Hbs	Proteína Hibris
IRM	Módulo de Reconhecimento Celular Irre
<i>Kirre</i>	Gene <i>kin of irre</i>
Kirre	Proteína Kin of irre
<u>MP</u>	“Midline Precursor”
<u>MNB</u>	Neuroblasto Mediano
Mnb	Neurônios formados a partir do MNB
M	Molar
MG	Miligrama
MI	Mililitro

MI	Milímetro
<u>mM</u>	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Fosfato de sódio dibásico
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	Fosfato de sódio monobásico monohidratado
<u>NaOH</u>	Hidróxido de sódio
<u>N</u>	Proteína Notch
N intra	Dominio intracelular da Proteína Notch
ng	Nanogramas
q.s.p.	Quantidade suficiente para
<u>PBTA</u>	Tampão PBS triton azida
<u>PBT</u>	Tampão triton
PBS	Tampão fosfato salino
pCa18	Inserto de 1,2 kb, original do plasmídio pHc18 clonado no vetor de injeção pCaSpeR hs
pH	Potencial hidrogeniônico
<u>PMG</u>	“Posterior Midline Glia”
<u>RNAi</u>	RNA de interferência
<u>rst</u>	Gene <i>roughest</i>
<u>Rst</u>	Proteína Roughest
<i>sim</i>	Gene <i>single minded</i>
Sim	Proteína Single minded
Sns	Gene <i>sticks and stones</i>
SNS	Proteína Sticks and Stones
SNC	Sistema nervoso central

sog

Gene *short gastrulation*

Sog

Proteína Short gastrulation

UAS

“upstream activating sequence”

%

Porcentagem

Mm

Micrômetro

| μ l

Microlitro

μ g

Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Figura 2. Eventos de neurogênese durante o desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i>	17
Figura 3. Padronização dorso-ventral do embrião e formação da região neurogênica.....	18
Figura 4. Desenvolvimento linha média.....	22
Figura 5. Crescimento e direcionamento axonal dos neurônios do cordão nervoso ventral de <i>Drosophila</i>	24
Figura 6. As IRMs são divididas em duas classes.....	27
Figura 7. Efeito da superexpressão da porção extracelular de Rst no início do desenvolvimento embrionário.....	33
Figura 8. Análise das projeções axonais da corda ventral do SNC.....	34
Figura 9. Análise do embrião Rst-GFP/kirre»GFP no estágio <i>anlage</i>	45
Figura 10. Expressão de Rst-GFP/kirre»GFP no estágio de primórdio.....	46
Figura 11. Expressão de Rst-GFP/kirre»GFP SNC maduro.....	47
Figura 12. Expressão de Hbs- GFP no estágio <i>anlage</i> do SNC.....	49
Figura 13. Expressão de Hbs- GFP no estágio de primórdio do SNC.....	49
Figura 14. Expressão de Hbs- GFP no estágio maduro de SNC.....	50
Figure 15. Hbs é expresso nas células da glia da linha média do cordão nervoso.....	51
Figure 16. Comprometimento da função selvagem dos genes da família IRM gera defeitos de direcionamento axonal em <i>Drosophila</i>	53
Figura 17. Comportamento de <i>crawling</i> e peristaltismo de larvas mutantes para IRMs.....	55

Figura 18. Comportamento de <i>crawling</i> e peristaltismo de larvas silenciadas para IRMs durante o desenvolvimento embrionário.....	56
Figura 19. Comportamento de geotropismo negativo de mutantes para IRMs.....	57
Figura 20. Comportamento de <i>grooming</i> de mutantes para IRMs.....	58

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> modelo em biociências	14
1.2 Desenvolvimentos do sistema nervoso embrionário de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.2.1 Neurogliogenese.....	16
1.2.2 Desenvolvimento da linha média do sistema nervoso central.....	20
1.2.3 Direcionamento axonal, formação das comissuras e papel das diferentes células da linha média.....	23
1.3 A família Irre Cell Recognition Module (IRM).....	26
1.3.1 IRMs e sistema nervoso.....	29
2. Objetivo	35
3. Material e métodos.....	36
3.1 Material	36
3.2 Métodos	40
4. Resultados	44
4.1 Padrão de expressão das IRMs ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso embrionário.....	44
4.2 Análise da expressão do produto proteico de <i>rst</i> e do gene <i>kirre</i> durante o neurodesenvolvimento.....	44
4.3 Análise da expresssão de Hbs no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário.....	48
4.4 IRMs são requeridas para o desenvolvimento correto do sistema nervoso embrionário.....	52
4.5 IRMs são requeridas para um comportamento normal de <i>Drosophila</i>	53

4.5.1 A deficiência de Hbs gera alterações em comportamentos locomotores de <i>Drosophila</i>	53
4.5.2 Mutações dos ortólogos de Klrrel-3 apresentam alterações em comportamentos associados ao transtorno de espectro autista em <i>Drosophila</i>	57
5. Discussão.....	60
5.1 IRMs são expressas de modo complexo ao longo de todos os estágios do neurodesenvolvimento de <i>Drosophila</i>	61
5.2 IRMs são requeridas para o correto desenvolvimento do sistema nervoso embrionário.....	61
5.3 Assim como em vertebrados, IRMs são importantes para o comportamento de invertebrados.....	62
6. Conclusões.....	63
7. Referências	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Drosophila melanogaster* como modelo em biociências.

Drosophila melanogaster é um importante modelo de estudo em biociências, tendo destaque em estudos de diferentes áreas como genética, biologia celular, embriologia e imunologia. Com um ciclo de vida curto, onde em apenas 10 dias de desenvolvimento temos um indivíduo adulto reprodutivamente ativo (Fig.1), a *Drosophila* também tem como vantagens o fato de ser um modelo barato, de baixo custo para manutenção e que necessita de pouco espaço para cultivo (HALES et al., 2015). Em condições ideais, uma fêmea têm capacidade de botar por volta de 100 ovos por dia, o que torna fácil a obtenção de grande número de embriões ou moscas para um experimento quando necessário (STOCKER; GALLANT, 2008). Com um genoma compacto, totalmente sequenciado e com aproximadamente 14.000 genes codificadores de proteínas agrupados em quatro pares de cromossomos (um par XY e 3 pares de autossomos, chamados de 2, 3 e 4), *Drosophila* apresenta ortólogos para 75% dos genes envolvidos em doenças humanas (ADAMS et al., 2000; REITER et al., 2001). Outra vantagem é a existência de cromossomos balanceadores, que facilitam o estabelecimento e estabilização de linhagens mutantes e a realização cruzamentos genéticos mais complexos. Temos ainda que o fato do embrião de *Drosophila* no início do desenvolvimento ser constituído por um sincício facilita o acesso do material genético para o estabelecimento de linhagens geneticamente modificadas (REN et al., 2017).

Além disso, existem para o modelo bancos de estoques com uma ampla gama de coleções disponíveis a um custo acessível. A existência, ainda, de uma verdadeira enciclopédia de informação do modelo, o FlyBase (www.flybase.org), é um facilitador a mais para quem utiliza o invertebrado em suas pesquisas. Temos ainda bem consolidado para *Drosophila* uma diversidade de sistemas de expressão gênica com refinado controle temporal e espacial ou ainda com possibilidade de expressão em padrão mosaico, (MCGUIRE; ROMAN; DAVIS, 2004).

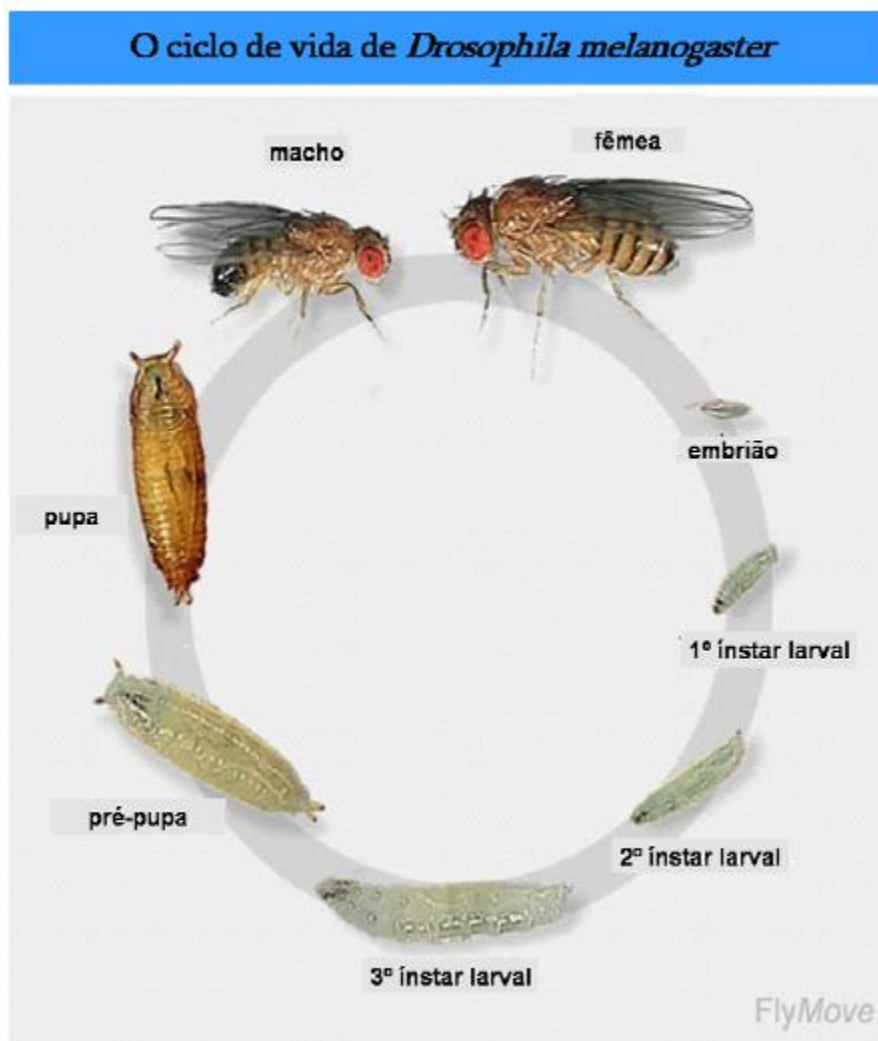


Figura 1| Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Na figura estão representados os estágios: embrionário, larval, pré-pupal, pupal e adulto. O estágio embrionário tem duração de 24 horas; o primeiro e o segundo estágios larvais tem duração de 24 horas cada um e o terceiro estágio larval de 48 horas. O estágio pupal chega ao fim após 5 dias. Tempos de desenvolvimento a 25°C (Figura modificada de www.flymove.uni-muenster.de).

1.2 Desenvolvimento do sistema nervoso de *Drosophila melanogaster*.

O sistema nervoso é composto por uma complexa diversidade de células (neurônios e células da glia) que se organizam de forma a transmitir impulsos elétricos entre diferentes partes do corpo. Ao passo que os neurônios são responsáveis por conduzir os sinais elétricos, as células da glia dão suporte de diferentes formas aos neurônios (nutricionalmente, estimulando seu crescimento, isolando os nervos) para que esses impulsos elétricos sejam

transmitidos de forma efetiva. Os neurônios de *Drosophila* podem ser subdivididos, de maneira simplificada, em três principais tipos: i) interneurônios, que apresentam seus dendritos e axônios restritos ao sistema nervoso central; ii) neurônios motores, os quais possuem projeções celulares que se dirigem para fora do sistema nervoso central e se conectam com a musculatura através de junções neuromusculares; e iii) células neurosecretoras, que são neurônios especializados em produzir hormônios (HARTENSTEIN, 2006; HECKSCHER et al., 2014; GOODMAN & DOE, 1993; (SCHMID; CHIBA; DOE, 1999). Já as células da glia podem ser subdivididas em: *corticais*, neurópilas, de superfície e periféricas, as quais desempenham as mais variadas funções (GRANDERATH; KLÄMBT, 1999; HARTENSTEIN, 2011; HUMMEL; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999). Um fato interessante é que ao se comparar as diferentes classes de células da glia de *Drosophila* e de mamíferos observa-se uma notável equivalência de características morfológicas e funcionais (FREEMAN; DOHERTY, 2005).

1.2.1 Neurogliogênese

O evento responsável por gerar células maduras do sistema nervoso a partir de progenitores recebe o nome de neurogênese. Durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* dois eventos de neurogênese são observados (Figura 2). O primeiro ocorre durante o estágio embrionário, sendo responsável pela formação do sistema nervoso larval. Ao término do desenvolvimento embrionário quase todos os progenitores neurais sofrem apoptose sendo eliminados, no entanto um pequeno número desses neuroblastos (progenitores neurais) se tornam quiescentes e no final do primeiro instar larval ingressam novamente no ciclo celular e participam do segundo evento de neurogênese, que se estende até o estágio pupal, e é responsável por gerar cerca de 90% das células do sistema nervoso do indivíduo adulto (HOMEM, 2012). Como o embrião é o foco do nosso estudo serão discutidas a seguir apenas as etapas do desenvolvimento do sistema nervoso restritas a esse estágio.

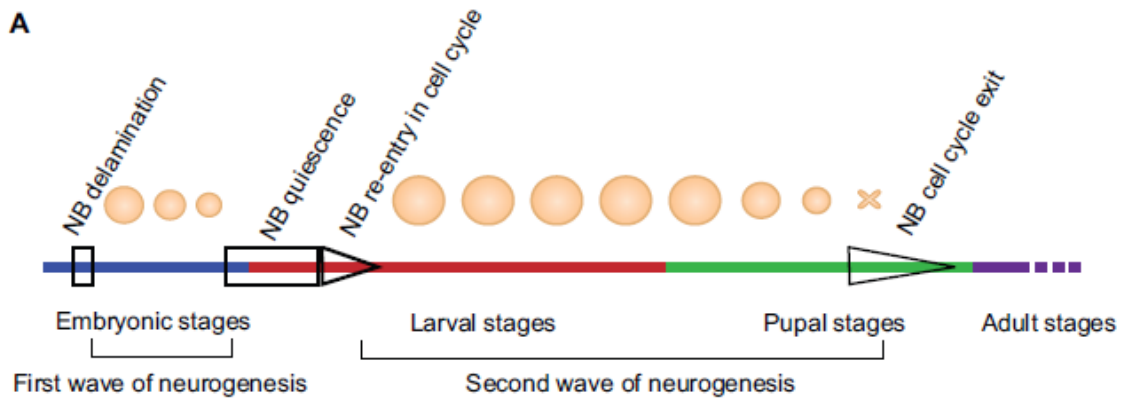


Figura 2| Eventos de neurogênese durante o desenvolvimento de *D. melanogaster*. Dois períodos de neurogênese ocorrem ao longo do desenvolvimento de *Drosophila*. Durante o estágio embrionário ocorre a delaminação dos progenitores neurais (neuroblastos) que irão proliferar para formar o sistema nervoso da larva que irá emergir ao fim do desenvolvimento embrionário. Nos últimos estágios do desenvolvimento embrionário alguns neuroblastos se tornam quiescentes, e só voltarão a entrar no ciclo celular no fim do primeiro instar larval, onde participarão do segundo evento de neurogênese, que se estende até o estágio pupal (modificado de HOMEM; KNOBLICH, 2012).

No reino animal tanto os bilatérios quanto os pré-bilatérios (Cnidários e Ctenóforos) possuem um sistema nervoso e em todos esses animais o sistema nervoso advém de uma camada epitelial, a ectoderme. A formação dos progenitores neurais ocorre a partir do ganho de competência neural por algumas células da ectoderme. Esses progenitores então se separam, migram, proliferam e, por fim, se diferenciam (HARTENSTEIN; STOLLEWERK, 2015). A especificação da região neurogênica no embrião de *Drosophila* tem início com a formação de um gradiente ventro-dorsal de concentração nuclear da proteína Dorsal, (Figura 3A). Dorsal é um regulador da transcrição e, em níveis ideais, ativa a expressão dos fatores de transcrição Snail e Twist fazendo com que as células que os expressam tomem o destino mesodérmico. Duas faixas de células adjacentes a mesoderme apresentam níveis intermediários de Dorsal nuclear, o que ativa o receptor Heartless e a expressão de *romboid*, que juntos inibem *twist* e *snail* conferindo a essas células o destino mesectodérmico, caracterizado pela expressão do gene regulador mestre single minded (*sim* NAMBU; LEWIS; CREWS, 1993). Com a gastrulação, a mesoderme se invagina e as duas faixas de células que compõem a mesectoderme se tornam

justapostas. Em seguida surge no embrião um novo gradiente de concentração no eixo dorso-ventral formado pelas proteínas Decapentaplegic (Dpp) e Short gastrulation (Sog) (Figura 3B). Na região dorsal Dpp é altamente expresso ao passo que na região ventral Sog é predominantemente expresso. Esse gradiente entre Dpp e Sog divide a ectoderme em duas regiões, e faz com que a região ventral adquira capacidade neural (Figura 3C), sendo agora chamada de neuroectoderme (BIEHS; FRANCOIS; BIER, 1996).

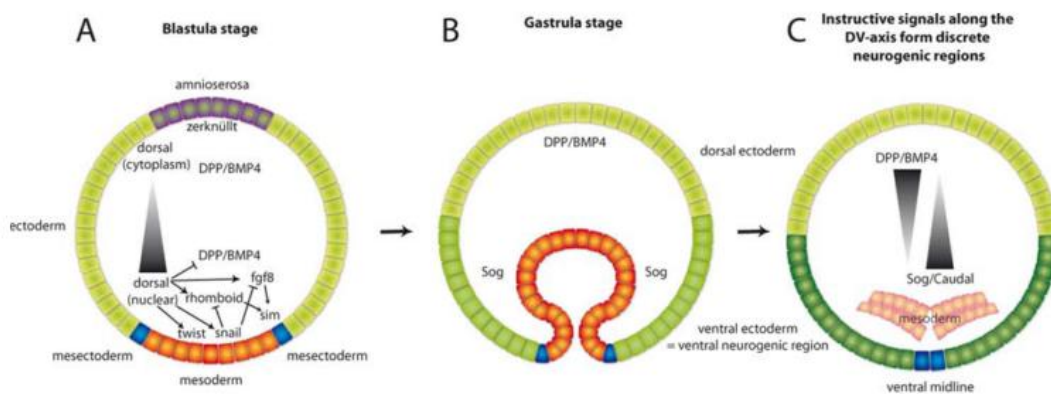


Figura 3| Padronização dorso-ventral do embrião e formação da região neurogênica. A) Na blástula o eixo dorsoventral é estabelecido pela translocação da proteína Dorsal para o núcleo na região ventral do embrião. Um gradiente de Dorsal nuclear induz uma cascata molecular que especifica a mesoderme (laranja) e a mesectoderme (azul). B) Com a gastrulação a mesoderme invagina e as células da mesectoderme se tornam justapostas. Decapentaplegic (DPP) e Short gastrulation (Sog), então, subdividem a ectoderme. C) Ao fim da gastrulação, os gradientes de DPP e Sog dividem a ectoderme em uma metade dorsal, em amarelo, e uma região neurogênica ventral, em verde (modificado de ALTENHEIN, 2015).

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

neuroglioblasto de acordo com os tipos celulares que darão origem (o termo neuroblasto aqui será utilizado de forma redundante) – tem início com a formação de grupos de competência dentro da neuroectoderme (CAMPOS-ORTEGA, 1998; HARTENSTEIN; WODARZ, 2013; SKEATH; THOR, 2003).

No interior do embrião os neuroblastos proliferam por meio de divisões celulares assimétricas gerando novos neuroblastos e, um outro progenitor neural, a célula ganglionar mãe (*ganglion mother cell, GMC*) (HARTENSTEIN; WODARZ, 2013; JAN; JAN, 2001; SKEATH; THOR, 2003; YU; KUO; JAN, 2006). Depois de gerada, a GMC se divide uma única vez dando origem a células precursoras que irão se diferenciar nos diferentes tipos de neurônios e células da glia. Essa diversidade de tipos celulares é governada por uma especificação espacial (já discutida, que diz respeito a região da neuroectoderme que o neuroblasto se delamina) e uma especificação temporal. A especificação temporal é governada por uma cascata de fatores de transcrição que são expressos sequencialmente na seguinte ordem: Hunchback (Hb) → Kruppel (Kr) → Castor (Cas) → Grainyhead (Gh). (KOHWI; DOE, 2013; YASUGI; NISHIMURA, 2016). Além disso, os precursores neurais podem expressar o inibidor de destino neural Glial cell missing (Gcm), se diferenciando em células da glia. Gcm além de autoativar-se, ativa a transcrição de outros fatores que contribuem para a diferenciação glial, como Reverse Polarity, Pointed e Tramtrack (ALTENHEIN, 2015).

1.2.2 Desenvolvimento da linha média do sistema nervoso central

Para além da neuroectoderme, outra região do embrião é responsável por originar células que compõem o sistema nervoso embrionário, a mesectoderme. Essa região, que se encontra entre a mesoderme e a ectoderme neural, dará origem a linha média do sistema nervoso central. A linha média desempenha diferentes funções entre as quais: influencia desenvolvimento da musculatura ventral do embrião (LEWIS; CREWS, 1994); assim como o desenvolvimento de epiderme ventral (KIM; CREWS, 1993); e apresenta papel central no crescimento e direcionamento dos axônios dentro da corda ventral (ARAÚJO; TEAR, 2003; HUMMEL; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999; KEARNEY; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999; KIDD; BLAND; GOODMAN, 1999; NEUHAUS-FOLLINI; BASHAW, 2015; TEAR et al., 1996). Ao fim do desenvolvimento embrionário a linha média é composta por uma grande diversidade de células (Figura 4G): cada um dos segmentos do embrião apresenta 3 células da glia, 2 neurônios motores peptidérgicos (*MP1*), 1 interneurônio dopaminérgico (*H-cell*), 1 interneurônio glutamatérgico (*H-cell sib*), 3 neurônios motores glutamatérgicos/octapaminérgicos (*mVUMs*), 3 interneurônios GABAérgicos (*iVUMs*), 1 neuroblasto mediano (*MNB*) e 8 interneurônios GABAérgicos (*mnbs*) (WHEELER; STAGG; CREWS, 2009).

O início do desenvolvimento da linha média é marcado pela expressão de *Sim*, que desempenha uma função regulatória central nas células da mesectoderme. As duas faixas de células que compõem a mesectoderme se tornam justapostas com a gastrulação e se inter cruzam formando uma linha continua composta por 8 células por segmento com a expansão da banda germinativa. Em seguida as 8 células progenitoras da linha média sofrem uma única divisão celular sincronizada passando cada segmento a conter 16 células, que se encontram organizadas em 8 pares (KLÄMBT; JACOBS; GOODMAN, 1991; NAMBU; LEWIS; CREWS, 1993). As 16 células da linha média se organizam em 3 grupos de equivalência: *MP1*, *MP3* e *MP4* (*Midline Precursor 1, 3 e 4*). Na etapa seguinte, cada um dos grupos de equivalência terá níveis diferentes de sinalização mediada por Notch o que garantirá destinos específicos: células com altos níveis de sinalização por Notch tem o destino neural bloqueado e se tornarão células precursoras gliais ou uma célula

tronco neural; a célula da linha média que apresenta níveis intermediários de sinalização por Notch dará origem ao MP6; com baixos níveis originará o MP5 e as células que apresentam ausência de sinalização por Notch se tornarão MP1, MP3 ou MP4 (WHEELER; STAGG; CREWS, 2008).

As células precursoras gliais dependendo de sua localização anteroposterior dentro da linha média expressam *runt* ou *engrailed* (WATSON et al., 2011). As células que expressam *engrailed* se diferenciarão em PMG (Posterior Midline Glia), já as células que expressam *runt* tomarão o destino *ensheating* (capeamento dos feixes axonais, WATSON et al., 2011) se tornando AMG (Anterior Midline Glia). Os precursores neurais se dividirão apenas uma vez dando origem a 2 neurônios cada um. O MP1 sofre divisão assimétrica dando origem a 2 neurônios MP1 (interneurônios peptidérgicos). O MP3 possui seu destino especificado pela expressão de *gooseberry* e sofre uma divisão assimétrica dando origem a uma H-cell (neurônio dopaminérgico) e uma H-cell sib (neurônio glutamatérgico) (WATSON; CREWS, 2012). Os MP4, MP5 e MP6 sofrem divisões, também de forma assimétrica, dando, cada um, origem a um neurônio motor VUM (Ventral Unpaired Median) e um interneurônio VUM. O neuroblasto mediano (MNB) se prolifera gerando 8 neurônios mnb (interneurônios GABAérgicos), se torna quiescente ao final do desenvolvimento embrionário e participará do segundo evento de neurogênese. Todas as PMG e algumas AMG sofrem apoptose, sendo que ao final do desenvolvimento embrionário a linha média apresenta apenas 3 AMG que participam do ensheathment dos axônios comissurais. Os neurônios MP1 são mantidos apenas nos segmentos A5-A-8/9, sendo eliminados em todos os outros segmentos do embrião (WHEELER; STAGG; CREWS, 2009).

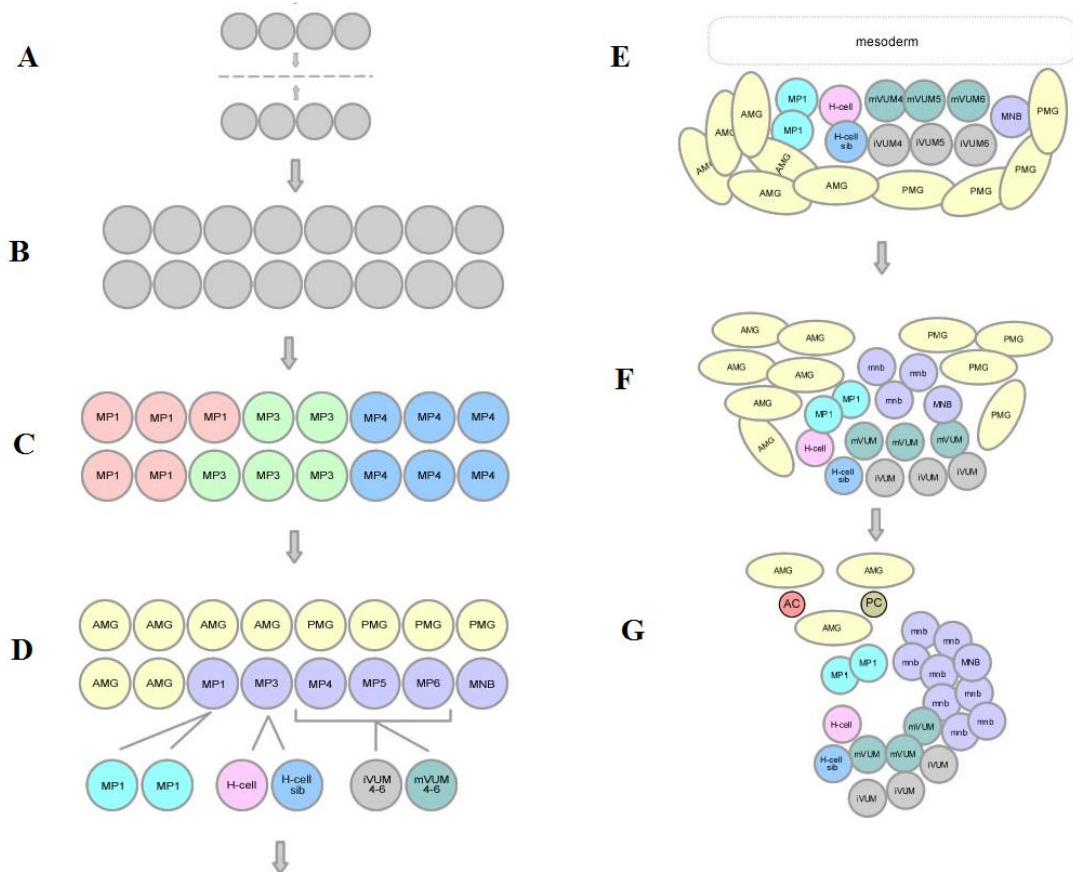


Figura 4| Desenvolvimento linha média. (A) No estágio 6-7, as células da linha média estão organizadas como duas faixas de 4 células por segmento. (B) No estágio 8, as células da mesectoderme sofrem uma divisão celular sincronizada passando de 8 para 16 células. (C) No estágio 10, as células da linha média consistem em 3 grupos de equivalência: o grupo MP1 (vermelho), o grupo MP3 (verde) e o grupo MP4 (azul). (D) No início do estágio 11, a sinalização mediada por Notch resulta na formação de 10 precursoras das células da glia da linha média e 6 progenitores neurais. As precursoras das células da glia da linha média (MG, amarelo) consistem em duas populações: “anterior midline glia” (AMG) e “posterior midline glia” (PMG). Os 6 progenitores neurais, chamados de “Midline Precursors” (MPs) são MP1, MP3, MP4, MP5, MP6 e um neuroblasto mediano (MNB). No fim do estágio 11, o MP1 divide simetricamente gerando dois neurônios MP1. O MP3 divide assimetricamente gerando um neurônio “H-cell” e um neurônio “H-cell sib”. Cada MP4-6 divide assimetricamente gerando um neurônio motor “Ventral Unpaired Median” (VUM) e um interneurônio VUM. (E) No final do estágio 11, a movimentação tanto dos neurônios quanto das células da glia da linha média, faz com que os neurônios sejam cercados pelas células da glia ao longo do eixo anteroposterior ventral. (F) Durante o estágio 12, o MNB começa a gerar sua progênie neural (mnb) que se localiza dorsalmente entre as AMG e as PMG. No estágio 13, as AMG terminam sua migração e começam a sofrer apoptose. As PMG continuam a migrar e se associam com os mnb. (G) Ao fim do desenvolvimento embrionário, todas as PMG foram eliminadas por apoptose, assim como metade das AMG. As AMG remanescentes (3) envolvem completamente as comissuras

anterior (AC) e posterior (PC). Ao fim do estágio 17, os neurônios MP1 também sofrem apoptose, exceto nos segmentos A5-A8/9. O MNB gera 8 neurônios, se torna quiescente e volta a se dividir no período pós-embrionário (modificado de www.midline.bio.unc.edu).

1.2.3 Direcionamento axonal, formação das comissuras e papel das diferentes células da linha média.

Durante sua diferenciação, os neurônios projetam seus axônios e dendritos de forma a alcançarem seus alvos. Dentro do cordão nervoso dois feixes de axônios por segmento atravessam a linha média, formando as comissuras anterior e posterior (Figura5). Cada axônio cruza a linha média apenas uma vez, em seguida se projetam para região anterior do embrião, formando os conectivos (feixes de axônios paralelos à linha média), e permitindo que uma conexão entre as células do cordão nervoso e o cérebro do embrião seja formada (ARAÚJO; TEAR, 2003; HUMMEL; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999; KEARNEY; SCHIMMELPFENG; KLÄMBT, 1999). O que dita essa precisa organização das projeções neuronais é um complexo sistema composto por sinais atrativos e repulsivos emanados da linha média e uma diversidade de receptores desses sinais que são expressos coordenadamente nos diferentes tipos de neurônios, os quais sinalizam para que alterações no citoesqueleto de actina dos cones de crescimento ocorram (O'DONNELL; CHANCE; BASHAW, 2009).

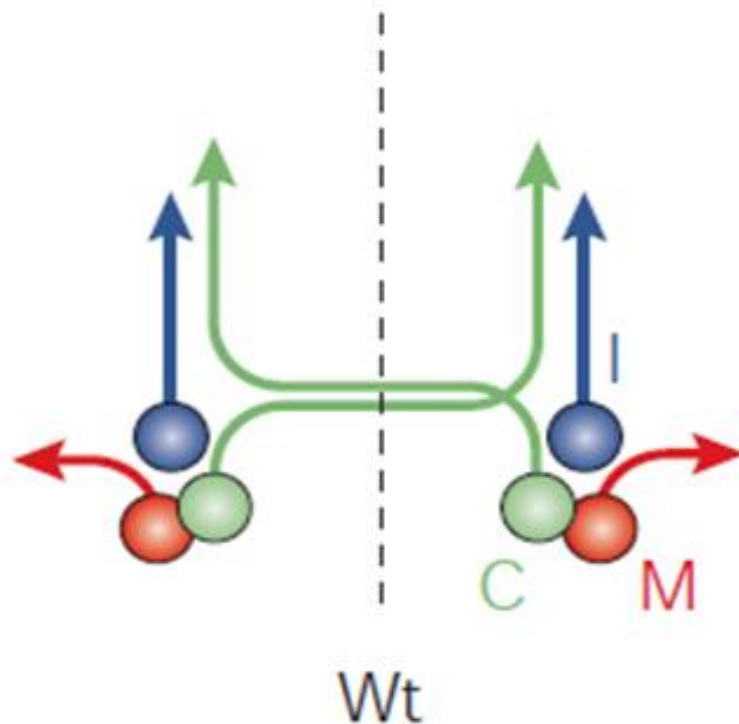


Figura 5| Crescimento e direcionamento axonal dos neurônios do cordão nervoso ventral de *Drosophila*. O esquema simplificado mostra o padrão de projeção axonal dos diferentes tipos de neurônios que compõem o cordão nervoso de *Drosophila*: os neurônios motores (M, vermelho) projetam seus axônios para fora do sistema nervoso central se conectando aos músculos através das junções neuromusculares; os neurônios ipsilaterais (I, azul) tem sua projeção axonal restrita a apenas um lado da corda ventral; e os neurônios comissurais (C, verde) projetam seus axônios contralateralmente, perpassando a linha média e formando, assim, as comissuras anterior e posterior que estão presentes em cada segmento do embrião. Ao cruzar a linha media os axônios são restringidos de cruzá-la novamente e se projetam longitudinalmente em direção a região anterior do embrião se conectando as células do cérebro (ARAÚJO; TEAR, 2003).

Para formação das comissuras, dois principais sistemas bem caracterizados controlam o direcionamento axonal: o sistema Netrina/Frazzled, que desempenha um papel quimioatrativo e o sistema Slit/Robo/Comm, que desempenha um papel quimiorrepulsivo. Os axônios dos neurônios comissurais devem cruzar a linha média e isso tem início com a secreção de Netrina A e B pelas células da glia da linha média e pela expressão do receptor Frazzled que ocorre apenas nos neurônios comissurais. Embriões mutantes para os dois

genes de *netrina* apresentam comissuras mais finas, sugerindo um papel das Netrinas na atração axonal, que no entanto parece depender de outras proteínas (MITCHELL et al., 1996). Ao passo que os axônios alcançam a linha média eles precisam deixá-la pelo lado oposto e não mais cruzá-la. Mutantes do gene *roundabout (robo)* possuem um fenótipo no qual axônios de neurônios ipsilaterais (que normalmente tem sua projeção restrita a um lado da corda ventral) se direcionam para a linha média e, ainda, os axônios que cruzavam a linha média apenas uma vez, agora o fazem várias vezes (KIDD; BLAND; GOODMAN, 1999).

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

Além de perturbações nos sistemas que governam o direcionamento axonal, defeitos no desenvolvimento das células da linha média podem gerar também má formação das comissuras do sistema nervoso. Um exemplo clássico é fornecido pelos mutantes do regulador central do desenvolvimento

da linha média, *sim*. Nos mutantes *sim*, a linha média se degenera, acarretando um colapso das projeções neuronais na corda ventral, com a fusão dos conectivos longitudinais (CREWS et al., 1992). Mutações que comprometem especificamente o desenvolvimento de neurônios ou células da glia da linha média também acabam afetando o correto arranjo das projeções neuronais dentro da corda ventral. Hummel e colaboradores (1999) avaliaram os efeitos dos diferentes tipos celulares da linha média na formação das comissuras. A eliminação dos neurônios da linha média gera um afinamento das comissuras o que sugere que os neurônios sejam responsáveis por governar os sinais quimioatrativos. No caso das células da glia, a eliminação dessas células parece não gerar alteração nos sinais de atração da linha média, no entanto as células da glia parecem ter papel crítico na liberação de sinais repulsivos. Durante o desenvolvimento as comissuras anterior e posterior são formadas unidas e só mais tarde no desenvolvimento as comissuras se separam. Essa separação ocorre pela migração da célula da glia da linha média, que se desloca entre as duas comissuras fazendo com que elas segreguem. Em mutações nas quais o desenvolvimento ou até mesmo a migração das células da glia estão comprometidos ocorre o fenótipo onde as comissuras anterior e posterior permanecem unidas (Hummel et al. 1999).

1.3 A família *Irre Cell Recognition Module* (IRM).

O *Irre Cell Recognition Module* (IRM) compreende uma pequena família de proteínas transmembranares do tipo I. A família é subdividida em duas classes (Figura 6) sendo uma de proteínas menores *RstNeph-like* e uma classe de proteínas maiores, *SNSNefrina-like*, (FISCHBACH et al., 2009). Altamente conservadas evolutivamente, as IRMs apresentam membros descritos em *C. elegans* (SHEN; BARGMANN; FRANCISCO, 2003; SHEN; FETTER; BARGMANN, 2004), *Drosophila melanogaster* (ARTERO; CASTANON; BAYLIES, 2001; BOUR et al., 2000; DWORAK et al., 2001; RAMOS et al., 1993; RUIZ-GOMEZ et al., 2000; STRÜNKELNBERG et al., 2001), *Danio rerio* (ICHIMURA et al., 2013; KRAMER-ZUCKER et al., 2005;

NEUMANN-HAEFELIN et al., 2010), *Gallus gallus* (COSTA et al., 2014; VÖLKER et al., 2012) e são encontradas ainda em mamíferos tendo sido caracterizadas em camundongos e humanos (CHOI et al., 2015; HELMST; MARTIN; HUBER, 2014; KESTILÄ et al., 1998; SELLIN et al., 2002; VÖLKER et al., 2012). Classicamente as IRMs são requeridas em processos do desenvolvimento que requerem adesão, reconhecimento, migração e sinalização celular, atuando através de interações preferencialmente trans-heterofílicas entre membros das duas classes (FISCHBACH et al., 2009).

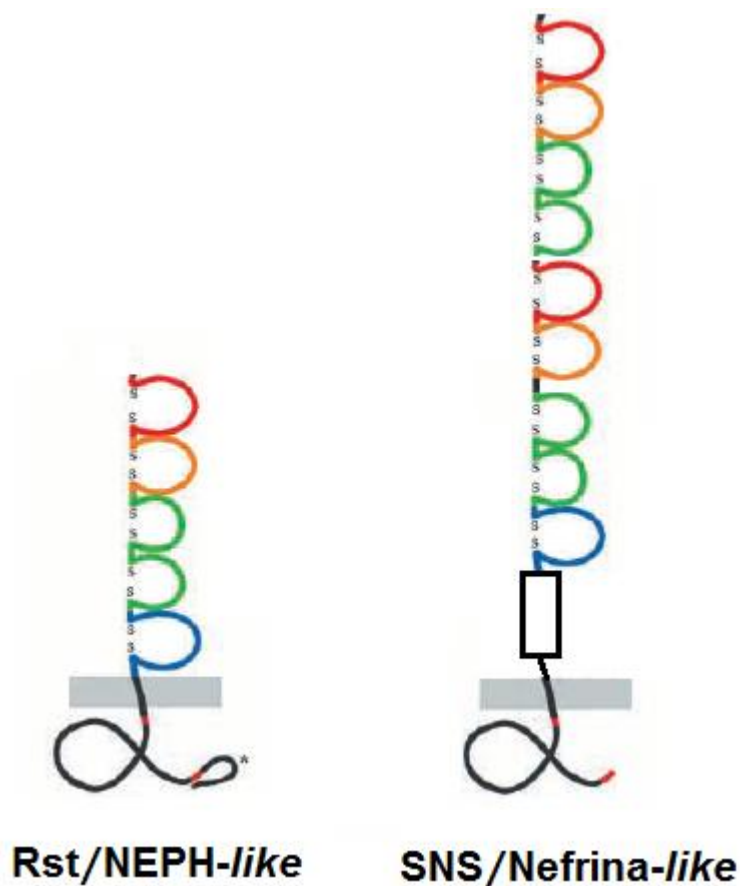


Figura 6| As IRMs são divididas em duas classes, O esquema ilustra a organização das duas classes das IRMs. Os membros da classe *RstNeph-like* apresentam 5 domínios do tipo imunoglobulina na região extracelular da proteína. Proteínas *RstNeph-like* são descritas em *C.elegans* (SYG-1), *Drosophila melanogaster* (Rst e Kirre), *Danio rerio* (zNeph1-2), *Gallus gallus* (GgNeph1-2), *Mus musculus* (Neph1-3) e *humanos* (Neph1-3). Já a classe *SNSNefrina-like* é composta por proteínas maiores que apresentam 9 domínios do tipo imunoglobulina e 1 domínio fribronectina tipo III na região extracelular. Membros da classe *SNSNefrina-like* são

descritos em *C. elegans* (SYG-2), *Drosophila melanogaster* (Hbs e SNS), *Danio rerio* (zNeph), *Mus musculus* (Nefrina) e humanos (Nefrina). (modificado de STRÜNKELNBERG et al., 2001).

Os principais papéis desempenhados pelas IRMs estão na organização do aparato de filtração, no desenvolvimento da musculatura e na formação das conexões neuronais, participando desses processos tanto em vertebrados como em invertebrados. O diafragma da fenda de filtração é o mais elaborado complexo juncional do reino animal. Encontrado nos rins, tem papel importante na formação da barreira de filtração urinaria (GRAHAMMER; SCHELL; HUBER, 2013). Membros da família IRM são os principais componentes do diafragma da fenda tanto em *Danio rerio* (ICHIMURA et al., 2013; KRAMER-ZUCKER et al., 2005; NEUMANN-HAEFELIN et al., 2010) quanto em camundongos (KESTILÄ et al., 1998; SELLIN et al., 2002) com membros das suas classes sendo requeridos para formação do complexo juncional. Em *Drosophila* existe uma estrutura semelhante que auxilia na detoxificação da hemolinfa que, assim como em vertebrados, requer a participação das IRMs para um perfeito funcionamento (ZHUANG et al.2009). Uma conservação semelhante ocorre no papel das IRMs no desenvolvimento da musculatura onde vemos um requerimento da família para um perfeito processo de fusão característico do tecido em *Drosophila*, *Danio rerio* e em camundongos (TAMIR-LAVINE et al.2017; SRINIVAS et al.2007; CHEN; OLSON, 2004).

Para o nosso modelo de estudo, *Drosophila melanogaster*, são descritas 4 proteínas da família das IRMs: Roughest (Rst, RAMOS et al., 1993; STRÜNKELNBERG et al., 2001) e seu parálogo Kin of irre (Kirre, RUIZ-GOMEZ et al., 2000; STRÜNKELNBERG et al., 2001), membros da classe *Rst-Neph-like*, e seus parceiros de interação Hibris (Hbs, ARTERO; CASTANON; BAYLIES, 2001; DWORAK et al., 2001) e Sticks and Stones (SNS, (BOUR et al., 2000), membros da família *SNS-Nefrina-like*. Apresentando uma complexa regulação a nível pós transcricional (MACHADO et al., 2011) e agindo de forma parcialmente redundante (FISCHBACH et al., 2009; LINNEWEBER; WINKING; FISCHBACH, 2015; STRÜNKELNBERG et al., 2001) as IRMs são requeridas em diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento da mosca. Além dos já descritos anteriormente, as IRMs são requeridas durante os seguintes

processos: padronização e especificação do destino celular das células pigmentares na retina pupal (ARAÚJO et al., 2003; BAO; CAGAN, 2005; Ramos et al 1993; REITER et al., 1996; Machado et al 2011, 2018; Wolf and Ready 1991), a padronização dos órgãos sensoriais da antena (VENUGOPALA REDDY et al., 1999); direcionamento axonal no lobo óptico (ARAÚJO et al., 2003; RAMOS et al., 1993; REITER et al., 1996; WOLFF; READY, 1991); autofagia da glândula salivar larval (SIMON et al., 2009), desenvolvimento do disco de asa (LINNEWEBER; WINKING; FISCHBACH, 2015). Mais recentemente foi descrito o papel das IRMs no desenvolvimento dos ovários (VALER, et al 2018, 2022). Além de sua atuação canônica onde atua em parceria com outros membros da família, a proteína Hbs atua de maneira independente (SINGH; MLODZIK, 2012). Mutantes para Hbs apresentam defeitos de desenvolvimento semelhantes aos fenótipos clássicos de mutantes de Notch. Isso ocorre porque Hbs participa da maturação de Presenilina, um dos componentes do complexo γ -secretase que é indispensável para uma efetiva sinalização mediada por Notch (BRAY; FURRIOLS, 2001).

1.3.1 IRMs e sistema nervoso

Desde os primeiros estudos dos membros da família IRM é sabido de sua importância em processos do desenvolvimento do sistema nervoso (BOSCHERT et al., 1990; RAMOS et al., 1993). Passadas algumas décadas, vemos que as IRMs são requeridas em processos que vão além dos clássicos direcionamento axonal e sinaptogênese.

Em um *screening* de mutagenese gerada por elemento P visando encontrar genes relacionados a defeitos de desenvolvimento no lobo óptico de *Drosophila melanogaster* foi encontrado que moscas mutantes para o locus do gene *roughest* apresentam defeitos de direcionamento axonal (RAMOS et al., 1993). Em um trabalho mais recente Sugie e colaboradores (2010) demonstraram que os quatro membros da subfamília IRM são expressos durante o desenvolvimento do sistema visual de *Drosophila*. Enquanto os parálogos *Rst* e *Kirre* são expressos nos neurônios da retina, temos que os *Hbs* e *Sns* são expressos nos neurônios pós-sinápticos da lâmina, sendo

observada uma interação trans-heterófila entre *Rst* e *Hbs* durante a formação do mapa retinotópico e, além disso, que *Rst* é indispensável para um correto arranjo axonal do órgão. É importante notar que o modo canônico de atuação no reconhecimento celular pelo complexo IRM comumente obedece ao mesmo padrão: uma interação heterofílica intercelular entre membros das duas classes da família IRM. Esse padrão não foi só conservado no desenvolvimento de diferentes tecidos e órgãos, bem como ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso em diferentes espécies. Em *C. elegans*, durante o desenvolvimento é criada uma conexão entre o sistema nervoso e a vulva do verme. O neurônio motor hermafrodita específico (HSNL) é a célula dentro do sistema nervoso responsável por essa conexão. O HSNL projeta seus axônios para fora do sistema nervoso e cria uma rede de sinapses com a musculatura da vulva. Esta precisa conexão é mediada por membros da subfamília IRM de maneira que o membro SYG-1, ortólogo de *Rst* e *Neph*, é expresso na superfície do HSNL ao passo que SYG-2 é expresso nas células epiteliais da vulva adjacentes à musculatura. Tanto mutantes SYG-1 quanto SYG-2 apresentam defeitos de sinaptogênese, formando sinapses em locais inapropriados (SHEN et al., 2004; SHEN & BARGMANN, 2003). Além disso, Wanner e colaboradores (2011) mostraram que a expressão *in trans* de SYG-2 não é capaz de resgatar os defeitos de vermes mutantes para SYG-1 e que a expressão *in trans* de SYG-1 resgata apenas parcialmente os defeitos de vermes mutantes para SYG-2. Esses resultados reforçam a especificidade de interação do complexo IRM e que membros de diferentes classes não apresentam redundância funcional. No entanto, um alto grau de conservação interespecies entre membros da mesma classe foi observado, já que a expressão das três isoformas de *Neph* e de *Nefrina* foram capazes de resgatar defeitos sinápticos de mutantes SYG-1 e SYG-2, respectivamente (NEUMANN-HAEFELIN et al., 2010; WANNER et al., 2011).

Para além das conexões neurais as IRMs participam de outros processos durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Em camundongos foi mostrado que a perda de *Neph2* gera defeitos de migração de neurônios do núcleo pontino do cérebro (NISHIDA et al., 2010). No entanto, mais dados a respeito se outros membros da família IRM são requeridos nesse processo de

migração neuronal precisam ser investigados. Recentemente, em *C. elegans*, Qu e colaboradores (2020) demonstraram que o requerimento das IRMs no processo de migração de células neurais não se restringe a mamíferos. No estudo foi demonstrado que SYG-1 é expresso em células da glia *amphic sheath* (glia responsável por capear os neurônios do órgão sensorial chamado de *amphid sensilla*) atua em parceria com o ligante Robo para uma perfeita migração glial. Pela primeira vez foi descrita uma atuação do complexo IRM com membros que não pertencem à subfamília, o que abre precedente para investigações futuras de novos parceiros. Para além da migração celular, outro processo do desenvolvimento que requer as IRM é na orientação do eixo de clivagem da divisão celular. Loyer & Januschke demonstraram que o silenciamento de Rst nos progenitores neurais gera uma perda do padrão de orientação do eixo de clivagem durante a divisão celular. É interessante notar que todos os processos do desenvolvimento aos quais as IRM são requeridas – direcionamento axonal, sinaptogênese, migração celular e orientação do eixo de clivagem – convergem para eventos que requerem uma remodelação do citoesqueleto celular. E embora algumas vias de atuação das IRMs para remodelação do citoesqueleto celular já tenham sido parcialmente elucidadas esse ainda é um gargalo a ser investigado.

Quando chegamos ao papel das IRMs no sistema nervoso de humanos temos que variantes raras de Kirrel-3 são suficientes para gerar indivíduos com deficiência intelectual moderada a severa (GUERIN et al., 2012) e que amostras de pacientes com Transtorno do Espectro do Autismo apontam variantes de Kirrel 3 relacionadas ao risco de desenvolvimento da desordem (TALKOWSKI et al., 2012; DE RUBEIS et al., 2014; IOSSIFOV et al., 2014). Estudos de expressão mostram, ainda, que membros da família são expressos durante o desenvolvimento do sistema nervoso tanto em embriões de *Drosophila* (RAMOS et al., 1993; RUIZ-GÓMEZ et al., 2000, DWORAK et al., 2001), de *Gallus gallus* (COSTA et al., 2014; VOLKER et al., 2012), quanto de camundongos (VOLKER et al., 2012), no entanto não se tem informação de quais processos do neurodesenvolvimento as IRMs são requeridas nem se esses processos são conservados evolutivamente.

Em estudos prévios em nosso laboratório visando elucidar a função das diferentes porções da proteína Rst (MODA et al 2000; MODA; 2008), foi observado que a superexpressão da porção extracelular de Rst (RstEcd) no início do desenvolvimento embrionário gera severos defeitos de formação do sistema nervoso do embrião (Fig. 7). Em uma análise do arranjo axonal do cordão nervoso foi observado, ainda, que o embrião expressando RstEcd apresenta defeitos na formação das comissuras em alguns segmentos, assim como o afinamento dos conectivos (Fig. 8). Pelo fato dos artigos de caracterização de *rst* (RAMOS et al., 1993; STRÜNKELNBERG et al., 2001) e *hbs* (ARTERO; CASTANON; BAYLIES, 2001; DWORAK et al., 2001) mostrarem que ambos os genes são expressos em um mesmo período na linha média do SNC, foi levantada a hipótese que a superexpressão de RstEcd pudesse estar perturbando uma possível interação entres *rst* e *hbs* que fosse necessária para um perfeito desenvolvimento do SNC embrionário. A hipótese foi fortalecida pelo fato de que quando RstEcd foi expresso em um *background* com apenas 50% da dose de *hbs*, ocorreu um aumento na penetrância e severidade do fenótipo de má formação do SNC.

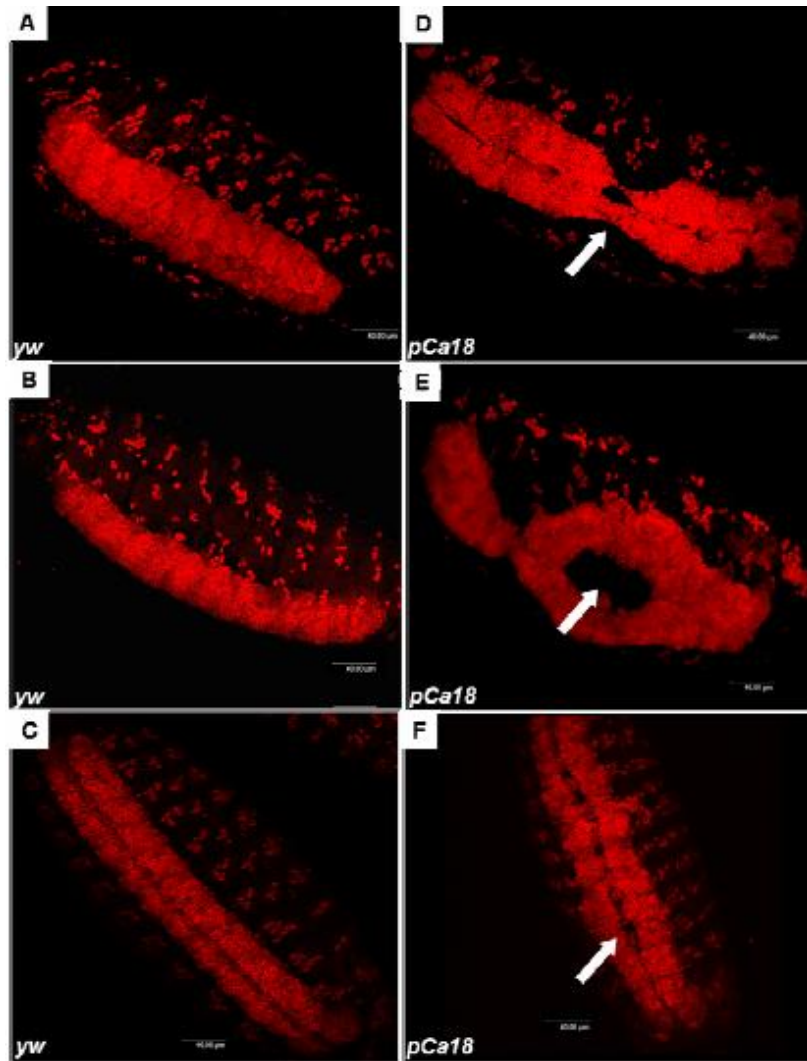


Figura 7| Efeito da superexpressão da porção extracelular de Rst no início do desenvolvimento embrionário. O padrão embrionário do SNC foi visualizado através da imunomarcagem com o anticorpo anti-Elav (marcador paneural). (A-C) Reconstrução dos embriões controle (*yw*), submetidos ao tratamento de choque térmico durante as horas iniciais do desenvolvimento. (D-F) Reconstrução total da linhagem transgene *pCa18*, a qual apresenta a sequência codificadora da porção extracelular da proteína Rst sob o controle de um promotor induzível por choque térmico, submetidos ao mesmo tratamento do controle (modificado de MODA, 2008).

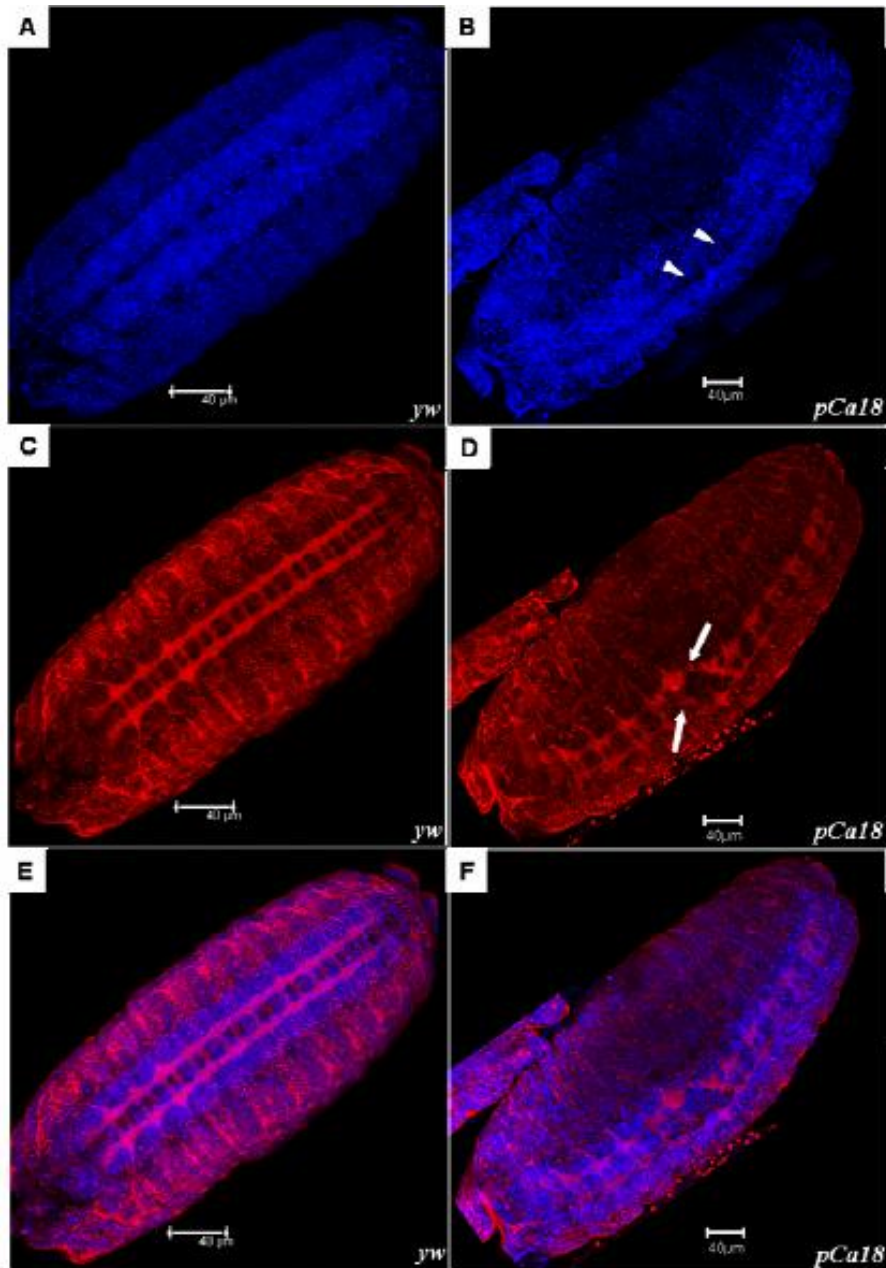


Figura 8 | Análise das projeções axonais da corda ventral do SNC. Embriões no estágio 14-15 marcados com DAPI (azul) para visualizar os núcleos e com faloidina/fodamina (vermelho) permitindo a visualização das comissuras e conectivos da corda ventral. Em (A, C e E) temos o embrião controle (yw) e em (B, D e F) embrião pCa18, ambos submetidos ao tratamento de choque térmico nas primeiras horas do desenvolvimento. (A-B) Marcação com DAPI. (C e D) Marcação com faloidina/fodamina. (E e F) Sobreposição das duas marcações. Notam-se defeitos nas comissuras de alguns dos segmentos do embrião (setas, D) assim como um afinamento dos conectivos (modificado de MODA, 2008).

2. OBJETIVO

O principal objetivo desse trabalho foi estudar o papel das IRMs no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de *Drosophila melanogaster*, caracterizando o padrão espaço-temporal da expressão dos membros a nível celular e relacionando quais os eventos do neurodesenvolvimento em que as IRMs são requeridas. Adicionalmente, objetivou-se estudar a relação da família IRM com o comportamento de *Drosophila*. Para a consecução destes objetivos gerais foram utilizadas as seguintes estratégias:

2.1 Analisar a expressão espaço-temporal das linhagens da coleção MiMic GFP para as IRMs.

2.2 Caracterizar fenotipicamente o neurodesenvolvimento embrionário de linhagens mutantes e deficientes para as IRMs.

2.3 Analisar o efeito fenotípico do silenciamento dos genes das IRMs no neurodesenvolvimento embrionário.

2.4 Caracterizar comportamentos locomotores em linhagens mutantes, deficientes e silenciadas para as IRMs

2.4 Analisar o efeito da perda da função selvagem das IRMs em fenótipos comportamentais semelhantes ao transtorno do espectro autista em *Drosophila*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1 Material Biológico

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

3.1.2 Linhagens de *Drosophila melanogaster* utilizadas

Linhagem	Genótipo	Origem/Referência
Canton S	<i>wild type</i>	Artavanis Lab.
Rst ^{CT}	<i>y rst^{ct}</i>	Fischbach Lab.
Df(1)w ^{67k30}	<i>ywf / Df(1) w^{67k30} fa^g /Y; Dp(1;2) 76e18 ("48w")</i>	Artavanis Lab.
Df(2)(hbs)	Df(2R) XTED1/CyO.GFP	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)
sim-Gal4	<i>w[*]; P{w[+mC]=GAL4-sim.3.7}2, P{w[+mC]=UAS-GFP.btau}2</i>	BDSC stock #26784
elav-gal4	<i>P{w[+mW.hs]=GawB} elav[C155] ! GAL4</i>	BDSC stock #458

UAS-RNAi Rst		ViennaDrosophila ResourceCenter (VDRC) stock #951
UAS-RNAi Hbs		VDRC stock #40898
UAS RNAi Rst/Hbs	VDRC951; VDRC40898	Maiaro Cabral
UAS RNAi Kirre		VDRC stock #3111
Rst-GFP Kirre>>GFP	$y^1 w^* \text{Mi}\{\text{PT-GFSTF.1}\}\text{rst}^{\text{MI04842-}}$ GFSTF.1 kirre ^{MI04842-} GFSTF.1/FM7j, B ¹	BDSC stock #5941
Hbs-GFP	$y[1] w[*]; \text{Mi}\{\text{PT-}$ GFSTF.1}hbs[MI02141- GFSTF.1]	BDSC stock #65321
	BDSC stock #65321;	
	BDSC stock #38425;	
Hbs-GFP/slit.gal4, UAS mcherry.NSL /TM6B	BDSC stock #9580	André Cendon

3.1.3 Meios de cultura

Meio Padrão de Drosophila

Fubá de milho	181,8g
Dextrose	105g
Sacarose	52,4g
Levedura	31,8g
Solução Nipagin*	11,5ml
Mistura de ácidos**	20,2ml
Ágar	20g

Água destilada	1,7261L
----------------	---------

*Solução de Nipagin 10%: ácido fosfórico 0,2%

**Mistura de ácidos: 418ml de ácido propiônico; 41,5ml de ácido fosfórico; água destilada qsp. 1000ml

Meio de Oviposição

Ágar	11g
NaOH 1,25N	5ml
Sacarose	43,5g
Suco de uva	227,5ml
Mistura de ácidos	5,5ml
Água destilada	270ml

3.1.4 Soluções

Soluções para Imunocitoquímica

PBS 10X pH 7.0

NaCl	13 mM
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	70 mM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3 mM

PBT 0,4%

PBS 1X	50ml
Triton X-100	200 µl

PBTA

PBS 10X	5 ml
BSA	0,5g
Triton X-100	25 µl
Azida de Sódio	1 ml
Água destilada q.s.p	50ml

3.1.5 Anticorpos

Anticorpos	Fonte	Diluição empregada
Anticorpo primário monoclonal anti-Elav (rato)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)	1:300
Anticorpo primário monoclonal BP102 anti-CNSaxons (camundongo)	DSHB	1:20
Anticorpo primário anti-GFP (galinha)	Aves Labs	1:500
Anticorpo secundário Alexa Fluor cabra anti-camundongo 633	Life Technologies	1:300
Anticorpo secundário Alexa Fluor cabra anti-rato 568	Life Technologies	1:300
Anticorpo secundário Alexa Fluor cabra anti-galinha 594	Life Technologies	1:300
Anticorpo secundário Alexa Fluor cabra anti-camundongo 488	Life Technologies	1:300
Anticorpo secundário Alexa Fluor cabra anti-rato 488	Life Technologies	1:300

3.2 Métodos

3.2.1 Pré-coleta e coleta de embriões.

Todos os experimentos realizados neste trabalho seguiram o mesmo padrão de pré-coleta e coleta. Sempre a 25°C, eram feitas 4 pré-coletas com duração de 30 minutos em placas contendo meio de oviposição. Este procedimento foi realizado para garantir que a maior parte dos embriões estivesse sincronizada no mesmo estágio de desenvolvimento. Logo após a última pré-coleta, cerca de 50-200 embriões eram coletados e deixados desenvolver na própria placa de oviposição até o estágio desejado (detalhes do estagiamento ver Protocolo de “Coleta de Embrião” em: www.midline.bio.unc.edu). Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

Para a análise dos embriões Rst-GFP/Kirre-GFP e Hbs-GFP foram realizados estagiamentos de acordo com os estágios do desenvolvimento do sistema nervoso embrionário: *anlage* (estágio 5-8), primórdio (estágio 9-12) e maduro (estágio 13-17) (BEARNEY et al., 2004).

3.2.3 Cruzamentos para ensaios utilizando o sistema Gal4/UAS.

Nos experimentos que utilizaram o sistema de expressão Gal4/UAS fêmeas virgens gal4 foram cruzadas com machos jovens UAS em uma proporção de 1:1, sendo a geração F1 analisada nos experimentos.

3.2.4 Imunocitoquímica de embriões de *Drosophila melanogaster*

Preparação dos embriões para imunocitoquímica

Todos os embriões submetidos à imunocitoquímica passaram pelo mesmo tratamento. Para mais detalhes a respeito de imunomarcção em embriões de *Drosophila*, assim como outros protocolos ver PATEL, 1994 MACHADO, 2010. Ainda na placa de oviposição, adicionou-se 2 ml de água

sanitária comum e esperou-se cerca de 2 minutos para os embriões descolarem do meio. Em seguida, foram transferidos para um tubo com uma rede, para que fossem decorionados. O excesso de água sanitária foi retirado com água de torneira, e após isto transferiu-se os embriões para um tubo de vidro com fixador composto de n-heptano e 2% paraformaldeído na proporção 1:1. A fixação foi de 22 minutos a 25°C. Na seqüência, adicionou-se Metanol - 20°C, para remoção da membrana vitelínica. Os embriões devitelinizados foram transferidos para um tubo de 0,5 ml, onde passaram por uma bateria de hidratação com etanol 80%, 50% e 30% e então lavados duas vezes com PBT 0,1%. Um bloqueio de 10 minutos foi realizado com soro de ovelha 0,5%.

Imunomarcção com anticorpo primário e secundário

A incubação com o anticorpo primário era feita por cerca de 16 horas sob agitação a 4°C. Em seguida e eram realizadas cinco lavagens de 5 minutos cada com PBT 0,1%. O anticorpo secundário era adicionado em seguida e a incubação era de 6 horas a 4°C, protegido da luz. Logo depois foram realizadas mais cinco lavagens de 5 minutos com PBT 0,1%. Os embriões foram transferidos para o meio de montagem.

Montagem e observação das lâminas

As lâminas foram montadas com duas lamínulas nas suas laterais, para que os embriões não fossem esmagados quando cobertos com a lamínula. As lâminas foram analisadas através de microscopia confocal por meio do Microscópio Invertido Zeis AxioObserver LSM780 e do Microscópio Leica TCS SP5 ambos do departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

3.2.5 Ensaios de Comportamento.

Nos ensaios de comportamento foram analisados o *crawling*, peristaltismo, geotropismo e *grooming*, de animais mutantes e silenciados, com o driver *sim.gal4* e *elav.gal4*, para as IRMs,. Todos os ensaios foram realizados às cegas, em triplicata biológica, sendo todos os diferentes ensaios realizados no período vespertino e todos genótipos de cada ensaio foram analisados em um mesmo dia. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C no Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento. A construção dos gráficos e análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 9.0.

3.2.5.1 *Crawling*

No ensaio de *crawling* larvas do terceiro instar foram transferidas para uma placa de petri contendo agarose 2% sobre um papel milimetrado e seu comportamento foi gravado durante 1 minuto. Foram analisados os números de linhas cruzadas e o número de mudanças de orientações (Nichols et al, 2012).

3.2.5.2 Peristaltismo

Larvas do terceiro instar larval foram transferidas para uma solução contendo pasta de levedura diluída em água. Com o auxílio de um microscópio de dissecação o número de contrações peristálticas a cada um minuto foi quantificado (Nichols et al, 2012).

3.2.5.3 Geotropismo negativo

Moscas fêmeas jovens adultas foram transferidas para frascos novos de poliestirenos presos a um suporte para tubos. Em seguidas o suporte foi batido levemente três vezes sobre uma superfície de maneira que todas as moscas se dirigissem para a base dos tubos. Após 3 segundos uma imagem foi capturada

a partir de uma câmera colocada na frente do sistema. Por fim a altura de cada mosca na imagem adquirida foi medida (Nichols, 2012).

3.2.5.4 Grooming

Moscas virgens machos e fêmeas foram transferidas para placas transparentes sendo gravadas por 5 minutos. Nos vídeos foram analisados o tempo e o número de eventos de *grooming* (Barradale et al, 2017).

4. RESULTADOS

4.1 Padrões de expressão das IRMs ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso embrionário.

Como primeira etapa, buscamos avaliar a localização subcelular dos produtos proteicos dos genes da família IRM ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso embrionário. Ao longo do projeto não obtivemos sucesso em padronizar um protocolo de imunomarcagem para as IRMs durante o desenvolvimento embrionário, no entanto obtivemos êxito utilizando as linhagens da tecnologia MiMIC GFP. A tecnologia MiMIC (*Minos*-mediated integration cassette) utiliza o elemento de transposição *Minos*, que apresenta preferência de inserção em regiões intrônicas, para integrar uma sequência codificadora de GFP (*green fluorescent protein*) em diferentes *loci* do genoma de *Drosophila* (VENKEN et al., 2011). No estudo foram utilizadas as linhagens Rst-GFP/ kirre»GFP – a qual expressa a proteína Rst fusionada a GFP e a proteína marcadora GFP tem expressão dirigida pelo locus de *kirre* – e Hbs-GFP – a qual expressa a proteína Hbs em fusão com a proteína GFP

4.2 Análises da expressão do produto proteico de *rst* e do gene *kirre* durante o neurodesenvolvimento.

Na análise do estágio inicial do desenvolvimento do sistema nervoso, *anlage* (estágio 5-8), não é encontrada uma marcação GFP⁺ nas células do sistema nervoso em formação. Neste estágio é encontrada apenas uma expressão na região lateral do embrião correspondente as células progenitoras da musculatura embrionária (Figura 9). Já no estágio de primórdio do SNC obtivemos uma marcação GFP⁺ em todas as células que compõem a linha média, sendo uma forte marcação visualizada na superfície celular (Figura 10). Esses resultados são consistentes com as informações de transcrição presentes no banco de dados MidExDB e nos trabalhos prévios de caracterização das IRMs (RAMOS et al., 1993; STRÜNKELNBERG et al., 2001). Ao analisarmos embriões no estágio de SNC maduro (estágio 13-16), onde as células da linha média já estão diferenciadas em neurônios e células

da glia, uma marcação GFP⁺ citossólica ao longo das comissuras e conectivos do cordão nervoso é observada (Figura 11). Durante esse período do desenvolvimento sabemos que *kirre* é expresso em neurônios do cordão nervoso ventral do embrião (RUIZ-GOMES et al., 2000), dado que foi confirmado em nossa análise.

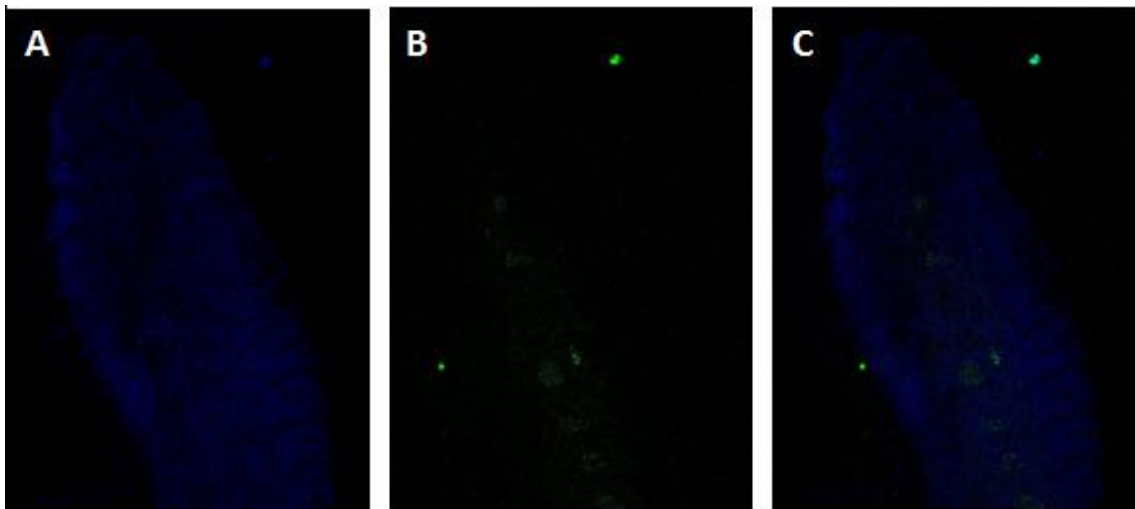


Figura 9| Análise do embrião Rst-GFP/*kirre*»GFP no estágio *anlage* do SNC (estágio 5-9). Imagem confocal. Região anterior está para cima e região ventral está para esquerda. (A) Marcação dos núcleos em azul (DAPI). (B) Anticorpo anti-GFP, verde. (C) Sobreposição das imagens.

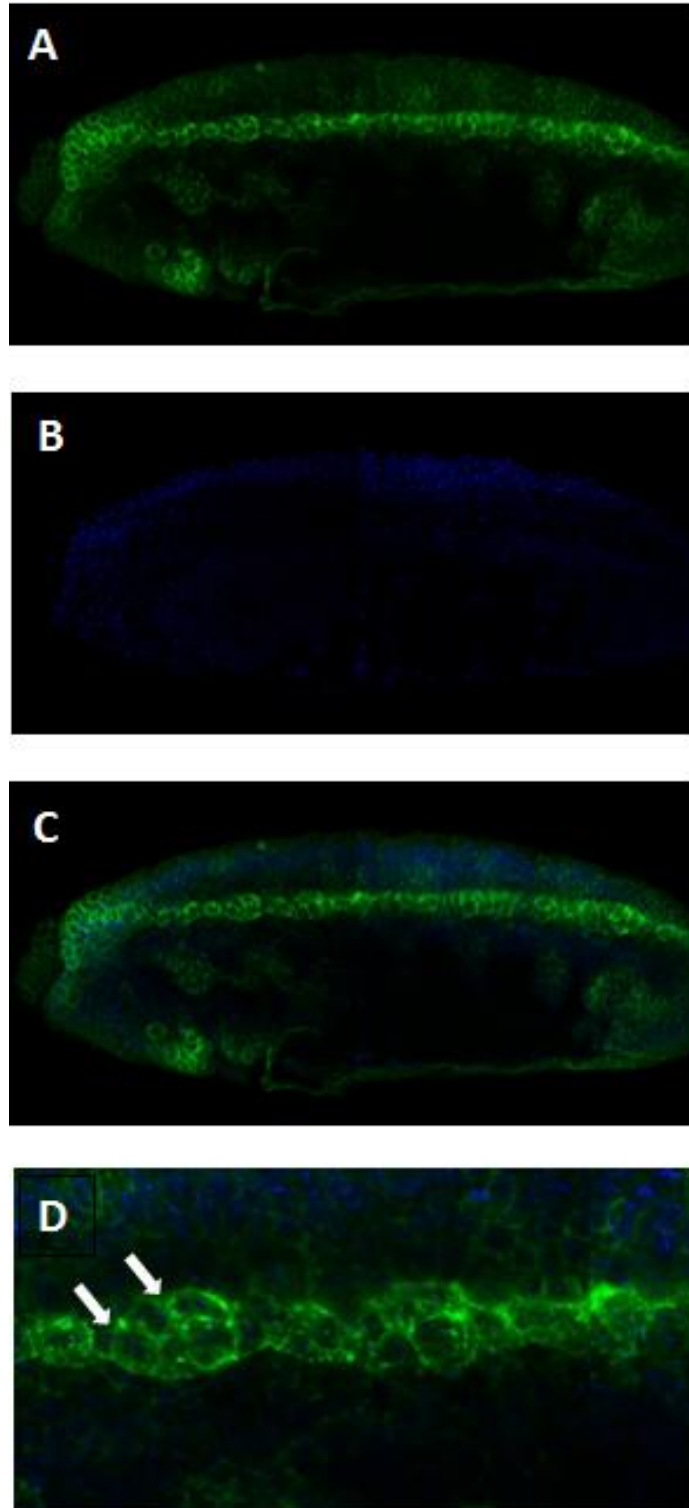


Figura 10| Expressão de Rst-GFP/ kirre»GFP no estágio de primórdio do SN (9-12). Imagem confocal. Captura ventro-lateral. Região anterior está para esquerda. (A e D) Anticorpo anti-GFP, verde. (B) DAPI, azul. (C) Sobreposição das imagens. D) Imagem da sobreposição em maior aumento, com setas mostrando expressão na superfície das células.

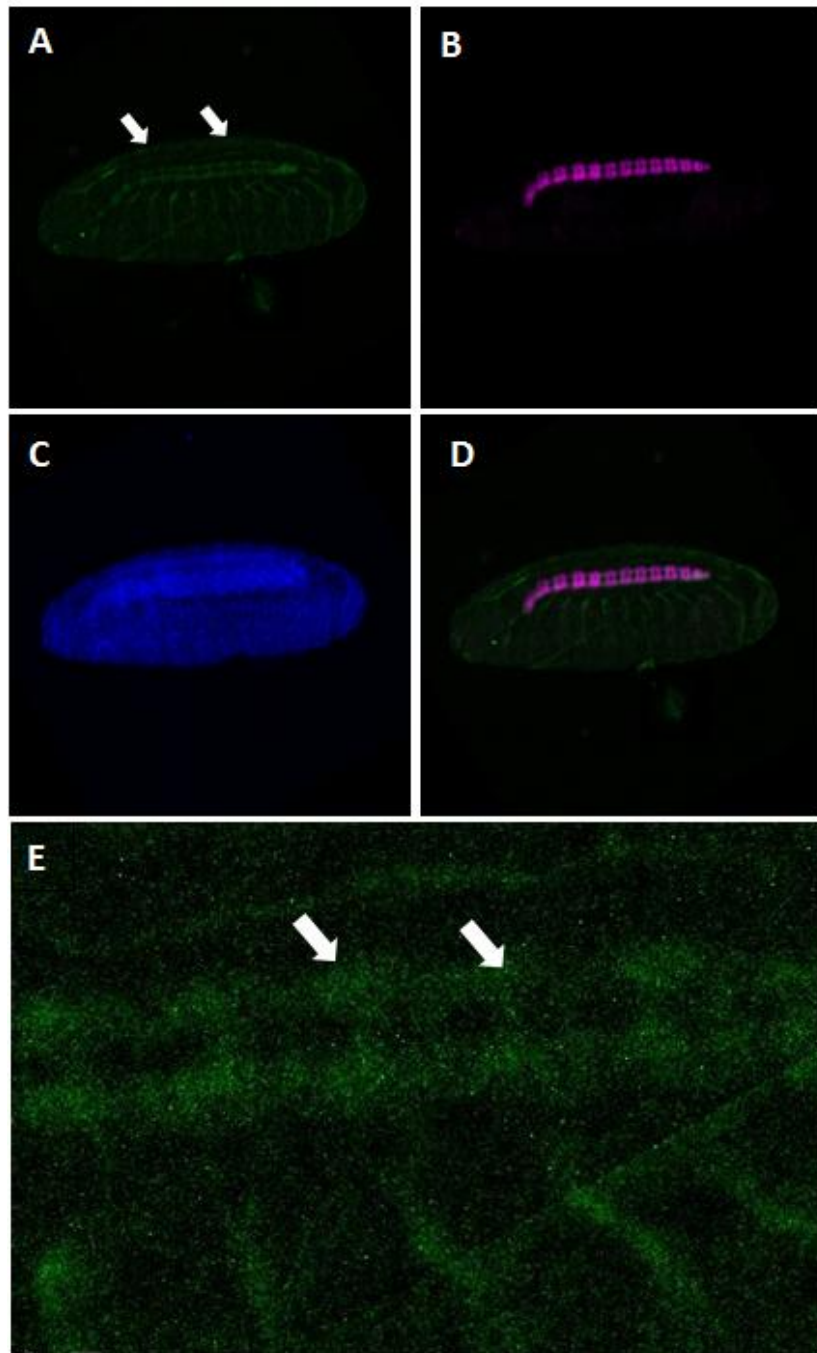


Figura 11| Expressão de Rst-GFP/kirre»GFP no sistema nervoso maduro (estágio 13-16).

Região anterior está para esquerda. (A e E) A marcação anti-GFP, em verde, apresenta um padrão de projeções axonais do cordão nervoso embrionário (setas). (B) Marcação com o anticorpo BP102 exhibe o padrão dos axônios do SNC, em magenta. (C) marcação com DAPI para visualização dos núcleos, em azul. (D) Sobreposição das imagens A e B. Setas apontam o padrão de expressão característico de neurônios comissurais.

4.3 Análises da expressão de Hbs no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário.

Em seguida, analisamos de forma semelhante a expressão da linhagem Hbs-GFP. No estágio *anlage* do SNC, uma marcação GFP⁺ é observada em uma linha de células que cortam o embrião ao meio na região ventral, um padrão característico de células mesectodermiais (Figura12). No estágio de primórdio, observamos que a expressão de GFP continua presente em todas as células do primórdio da linha média (Figura13)., mostrando que a expressão de Hbs simultaneamente à de Rst nesse estágio. No estágio maduro do SNC a marcação GFP⁺, antes contínua, se restringe apenas a uma subpopulação celular de formato oval dentro da linha média (Figura 14), morfologia característica das células que compõem a glia da linha média (CREWS 2010; WHEELER, PEARSON e CREWS 2012). Uma vez que o marcador pan neural Elav não é expresso nas células da glia da linha média (KEARNEY 2004), efetuamos a marcação dos embriões Hbs-GFP com anticorpo anti-Elav visando confirmar a identidade não neuronal destas células (Figura 15). Na análise da dispersão tridimensional do embrião vemos que nas regiões onde Hbs-GFP é expresso, a marcação de Elav está ausente (Figura.15). Quando analisamos a intensidade de fluorescência de Elav na região do embrião do SNC onde a marcação de Hbs-GPF está presente vemos que a intensidade de Elav é fraca (Fig15). Assim, no estágio de sistema nervoso maduro, Hbs surge como um novo marcador para células da glia da linha média. Dado de grande importância já que as células da glia da linha média são as únicas células da glia do sistema nervoso de *Drosophila* que não expressam o marcador glial Repo (XIONG et al. 1994).

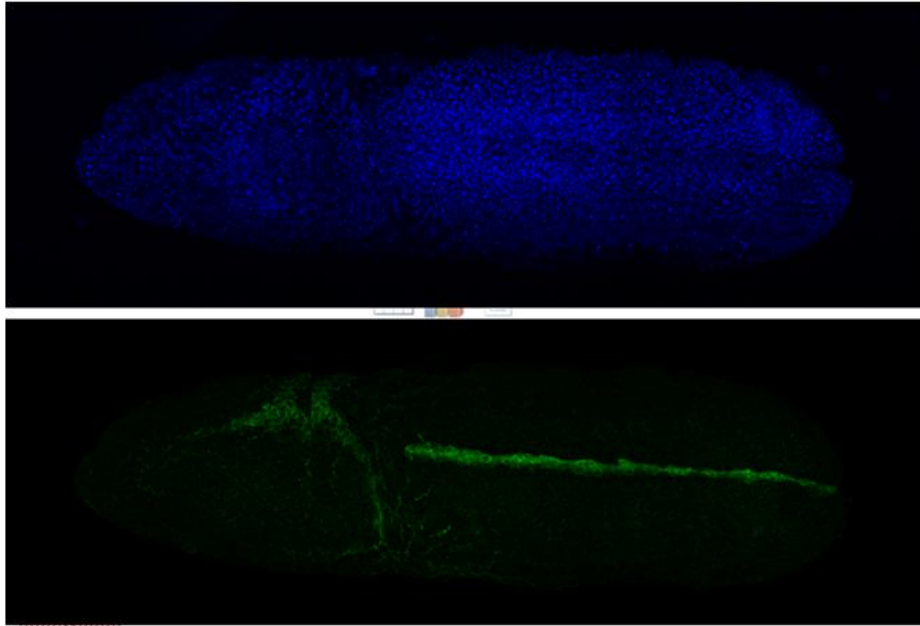


Figura 12| Expressão de Hbs- GFP no estágio *anlage* do SNC. Região anterior está para esquerda. A marcação anti-GFP (verde) e de DAPI (azul).

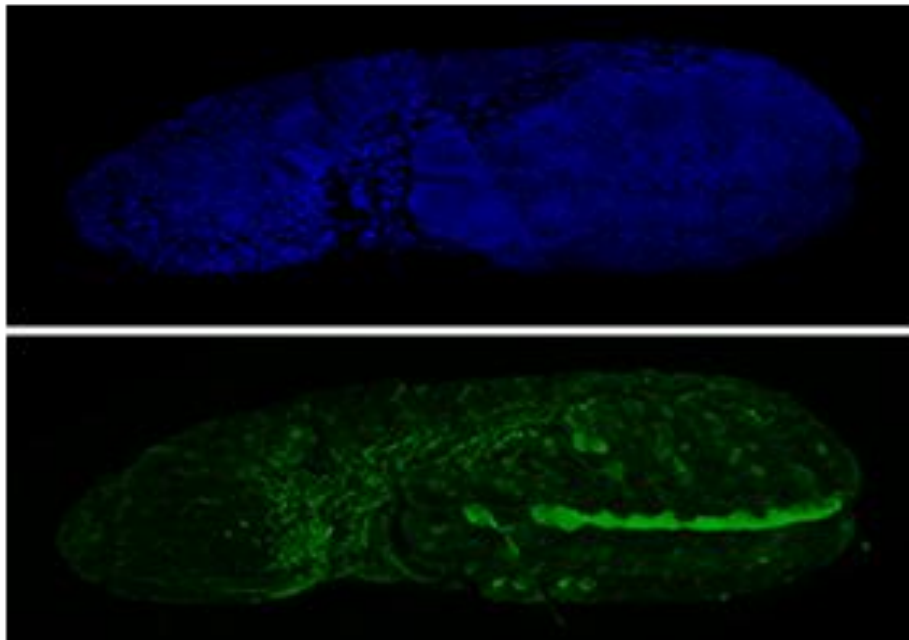


Figura 13| Expressão de Hbs- GFP no estágio de primórdio do SNC. Região anterior está para esquerda. A marcação anti-GFP (verde) e de DAPI (azul).

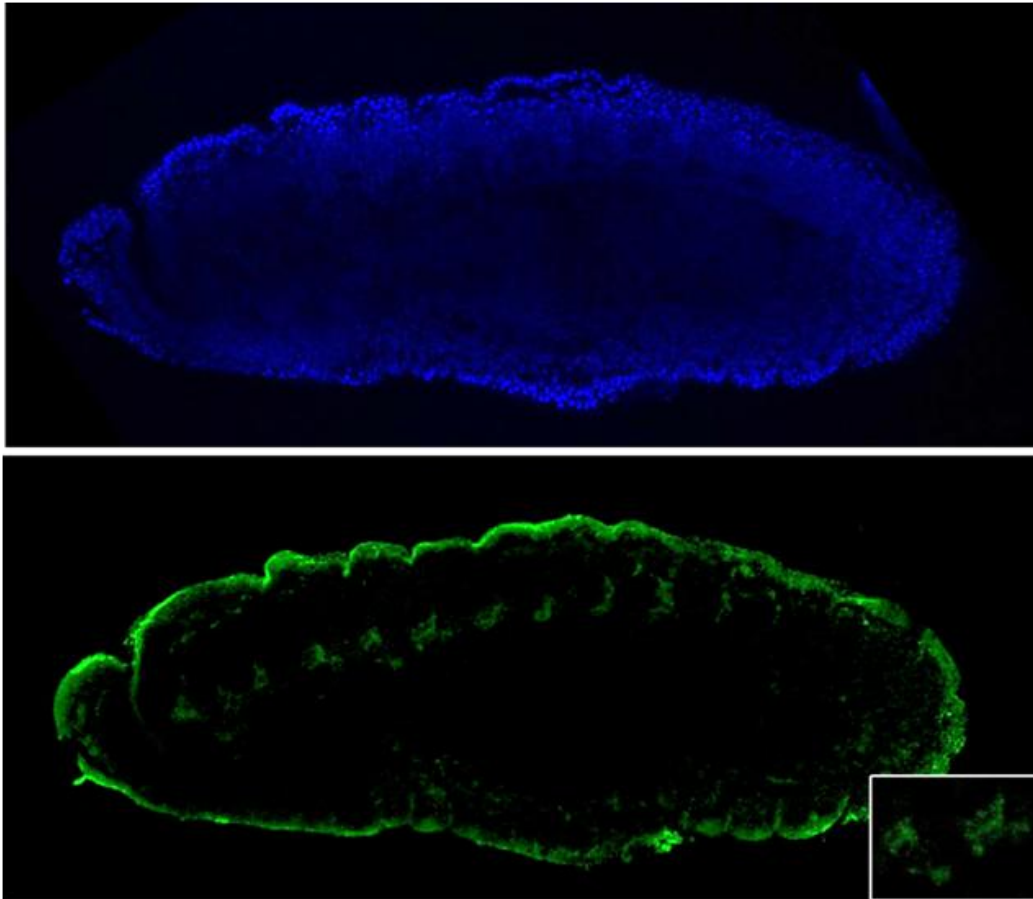


Figura 14| Expressão de Hbs- GFP no estágio maduro de SNC. Região anterior está para esquerda. A marcação anti-GFP (verde) e de DAPI (azul). A inserção no painel inferior mostra a marcação GFP em maior aumento de células com formato oval.

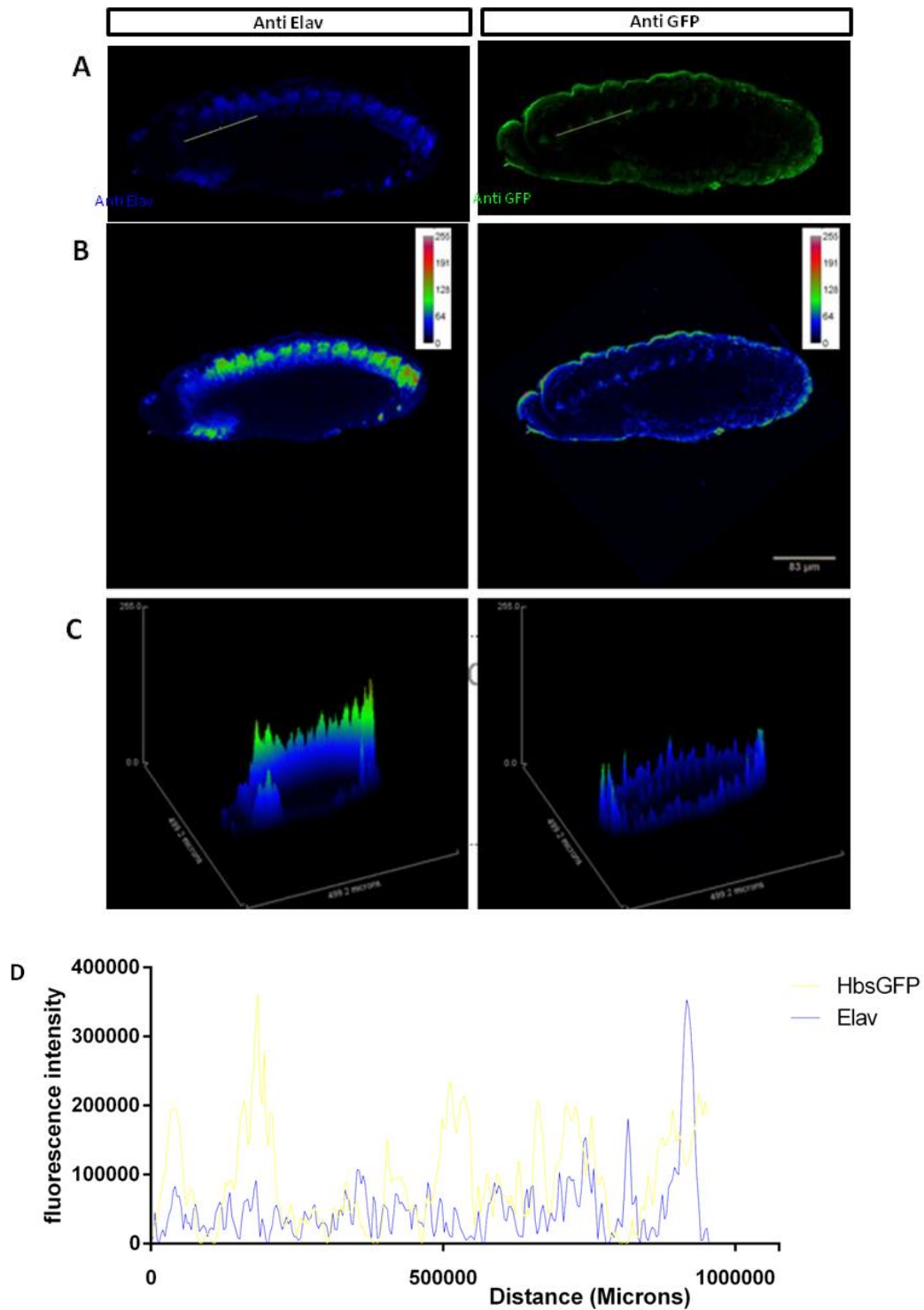


Figure 15| Hbs é expresso nas células da glia da linha média do cordão nervoso. A) embrião Hbs-GFP marcado com anticorpo anti-Elav (azul) e anti-GFP (verde). B) A intensidade de fluorescência é mostrada em LUT (pseudocor), 0 (preto) a 255 (vermelho). C) *surface plot* do embrião Hbs-GFP. D) Comparação da intensidade de fluorescência das marcações de GFP (verde) e Elav (azul) na região onde Hbs-GFP é expresso. A linha em amarelo em (A) indica a região do embrião analisada no gráfico (D).

4.4 IRMs são requeridas para o desenvolvimento correto do sistema nervoso embrionário.

Como mencionado na introdução deste trabalho, a superexpressão da porção extracelular de Rst ao longo do desenvolvimento embrionário, está associada à ocorrência de defeitos no neurodesenvolvimento do embrião (Moda, 2008). Uma vez que em nossas análises identificamos que as IRMs são expressas ao longo de todo o neurodesenvolvimento na linha média do cordão nervoso, estrutura que apresenta papel central na formação das comissuras e conectivos, decidimos investigar se as IRMs estão envolvidas nos eventos de direcionamento axonal do embrião. Com esse objetivo, analisamos a organização dos arranjos axonais do mutante *rst*^{CT} e das deficiências *Df(2)hbs* e *Df(1)w*^{67k30}, balanceadas com CyO e FM7 respectivamente. No mutante *rst*^{CT} – que expressa um produto proteico em que a porção intracelular da proteína Rst encontra-se truncada – a organização das comissuras é indistinguível da dos animais controles (Figura. 16). No entanto, assim como na superexpressão de RstEcd (MODA, 2008), observa-se um afinamento dos conectivos (Figura 16). Um fenótipo idêntico é observado para embriões com a deficiência *Df(1)w*^{67k30} (Figura. 16), que possui os genes *rst* e *kirre* eliminados do genoma. Assim a ausência de ambos os membros da classe *Rst/Neph-like* parece não gerar um agravamento do fenótipo. Ao analisarmos o efeito da ausência de *hbs* através da deficiência *Df(2)hbs* observa-se um severo fenótipo com alteração do padrão das projeções axonais do cordão nervoso ventral, com ausência total de comissuras em alguns segmentos, presença de apenas uma comissura em outros, assim como segmentos que apresentam comissuras ainda unidas (Figura. 16).

A partir desses resultados e visando sua caracterização adicional, realizamos ensaios de silenciamento gênico por RNAi para *rst* e *hbs*. Utilizando o *driver* sim-Gal4 obtemos um silenciamento restrito às células da linha média do embrião. Na análise da geração F1 nenhuma alteração é observada utilizando o RNAi-Rst (Figura.16). Para o RNAi-Hbs é observada uma perfeita formação das comissuras, no entanto os conectivos do embrião apresentam maior espessamento comparado com o controle (Figura16). Surpreendentemente, em moscas expressando simultaneamente RNAi para *rst*

e *hbs* (UAS-RNAi Rst /UAS-RNAi Hbs) sob controle do *driver* sim-Gal4 não é observada qualquer alteração tanto nos conectivos quanto nas comissuras do cordão nervoso ventral (Fig.16)

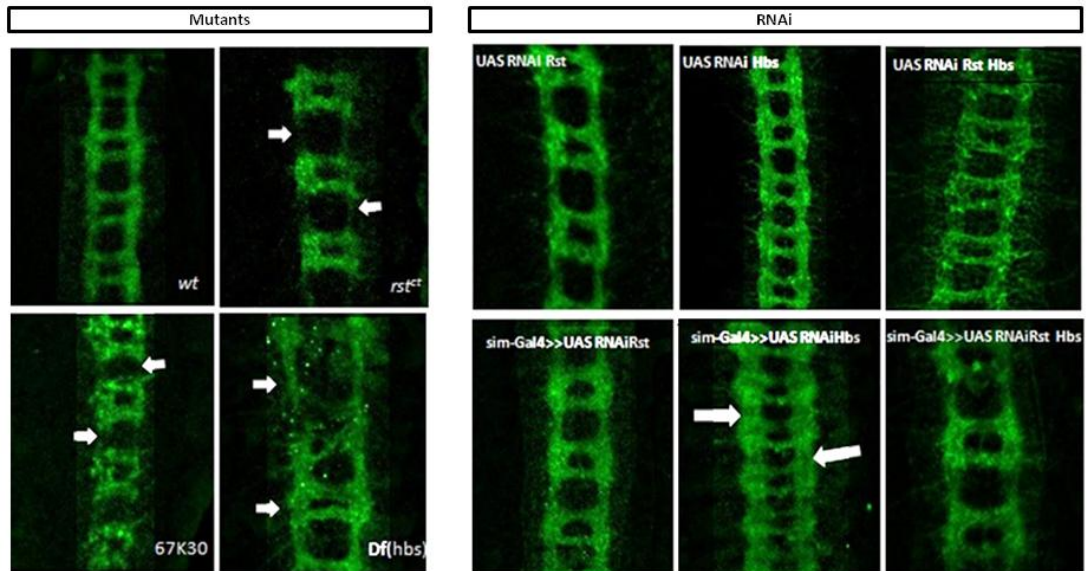


Figure 16| Comprometimento da função selvagem dos genes da família IRM gera defeitos de direcionamento axonal em *Drosophila*. Na análise dos mutantes temos controles selvagem (topo a direita), *rst*^{CT} (no topo a esquerda), Df (1) w^{67k30} (abaixo a direita) e Df(2) *hbs* (abaixo a esquerda). Nos embriões silenciados para as IRMs, controles no topo e silenciados abaixo. Setas brancas indicam as regiões com defeitos nas projeções axonais. Embriões (estágio 15-16) estão marcados com anticorpo anti-axônios do SNC (BP102, verde).

4.5 IRMs são requeridas para um comportamento normal de *Drosophila*.

4.5.1 A deficiência de Hbs gera alterações em comportamentos locomotores de *Drosophila*.

Embora o requerimento das IRMs no comportamento de mamíferos esteja bem estabelecido, para invertebrados essa relação ainda Não foi estudada Desse modo, nessa segunda etapa do projeto focamos em obter mais informações sobre o papel das IRMs no comportamento de *Drosophila*. Primeiramente realizamos uma análise nos comportamentos de locomoção, sendo analisados: *crawling*, peristaltismo e escalada (geotropismo negativo).

Quando distância percorrida ao longo do experimento de *crawling* é analisada, vemos que para o mutante *rst^{CT}* e para a *Df(2)hbs* não se observam diferenças significativas em comparação ao controle. No entanto, quando se analisa a distância percorrida pelas larvas da *Df(1) w^{67k30}* vemos que elas percorrem uma distância significativamente menor (Figura 17).

Nossos resultados indicam ainda que a *Df(2)hbs* gera uma alteração no número de mudanças de orientação ao longo do *crawling*, no comportamento de peristaltismo e, afeta também, a altura escalada pelas moscas no ensaio de geotropismo negativo. Os dados apontam que o número de mudanças de orientação, o número de contrações peristálticas e a altura escalada pela linhagem *Df(2)hbs* foram significativamente menores que da linhagem controle (Figuras. 17 e 19). Assim, temos que a linhagem *Df(2)hbs*, que apresenta severos fenótipos de neurodesenvolvimento embrionário, apresenta também defeitos de comportamento locomotor larval e adulto. nada mesma maneira, a análise do comportamento de geotropismo negativo, mostrou que moscas com a mutação *rst^{CT}* apresentam uma altura escalada significativamente menor que a do grupo controle (Figura 19).

Em seguida analisamos os comportamentos locomotores em animais com a função selvagem alterada por RNAi. Os drives *sim.gal4* e *elav.gal4* foram utilizados para garantir um silenciamento restrito às células que expressam as IRMs. Para a distância percorrida ao longo do *crawling*, o silenciamento de *rst* acarretou um aumento da distância percorrida (Fig.18). Já para o silenciamento de *kirre* tanto o número de mudanças de orientações ao longo do *crawling* assim como o número de contrações peristálticas são maiores quando comparados ao grupo controle (Fig. 18).

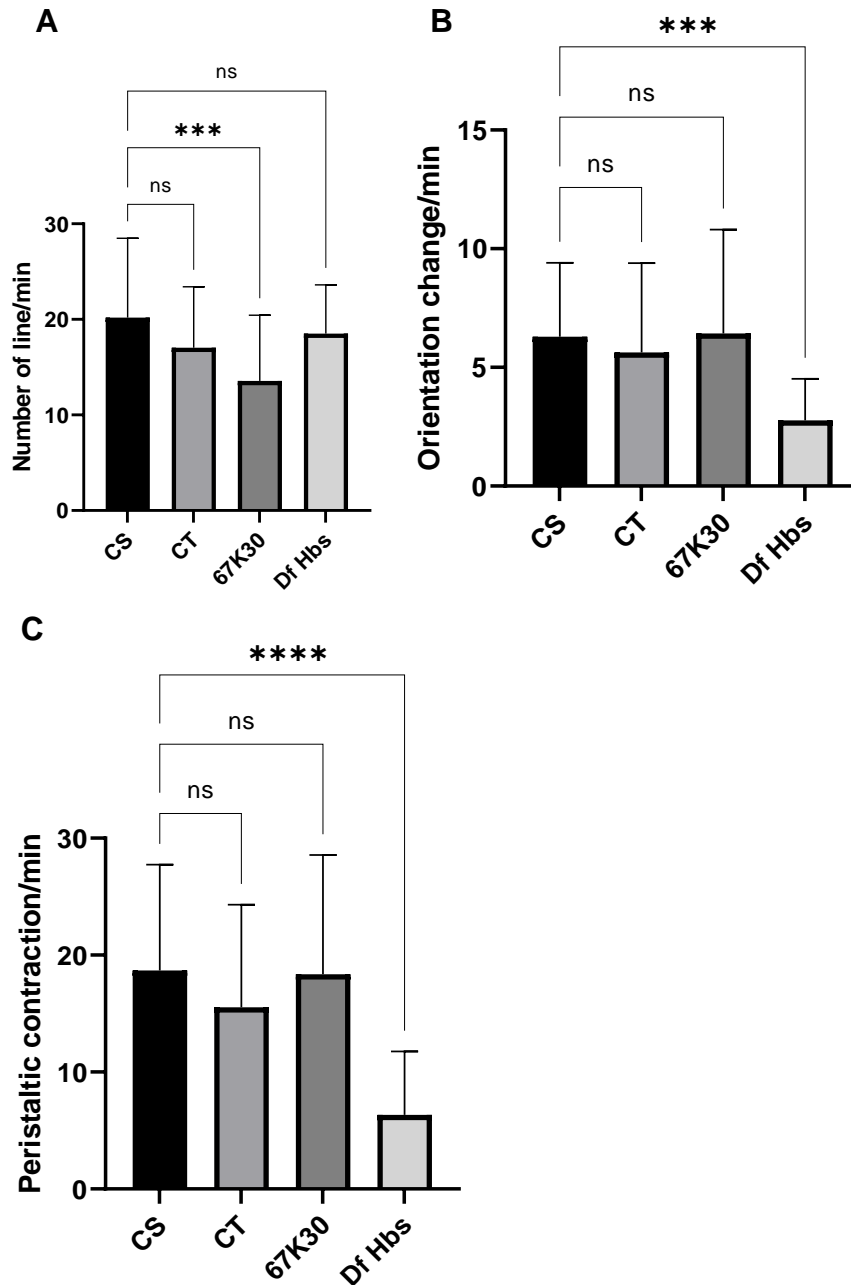


Figura 17| Comportamento de *crawling* e peristaltismo de larvas mutantes para IRMs. O comportamento de larvas mutantes *rst^{CT}*, *Df(1)w^{67K30}* e *Df(2) hbs* foi comparado com o controle Canton S. A cada minuto foi analisado **(A)** número de linhas e **(B)** mudanças de orientações durante o *crawling* e **(C)** o número de contrações peristálticas. n=30,30,30,30,30 e30 (da esquerda para direita) ****p≤0.0001, ***p≤0,001, ns p>0,05 teste ANOVA.

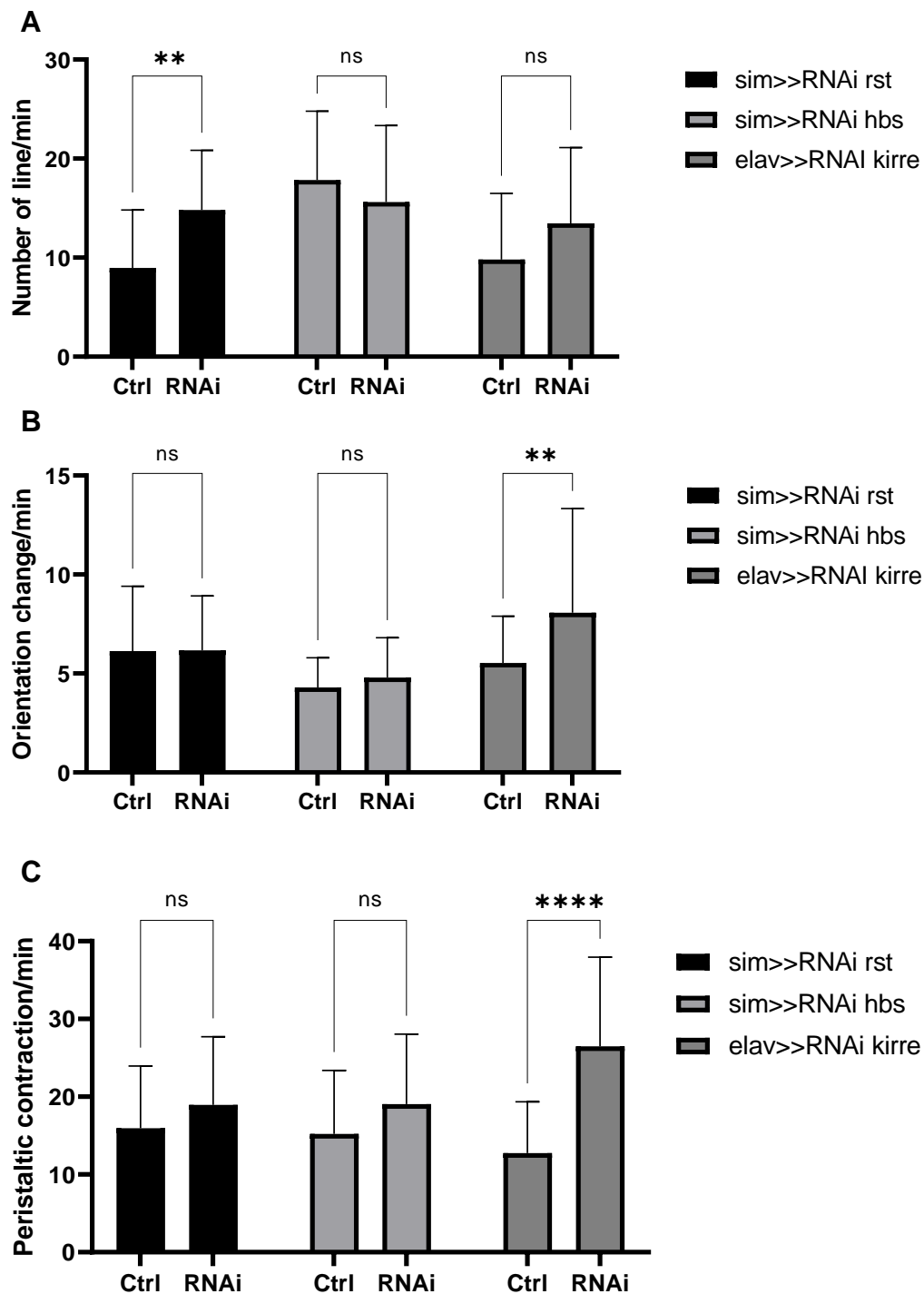


Figura 18| Comportamento de *crawling* e peristaltismo de larvas silenciadas para IRMs durante o desenvolvimento embrionário. Larvas silenciadas para *rst*, *kirre* e *hbs* foram analisadas. A cada minuto foi analisado **(A)** número de linhas e **(B)** mudanças de orientações durante o *crawling* e **(C)** o número de contrações peristálticas. n= 30,30, 30, 30, 30 e 30 (da esquerda para direita) ****p<0.0001, **p<0,01, ns p>0,05 teste 2wayANOVA.

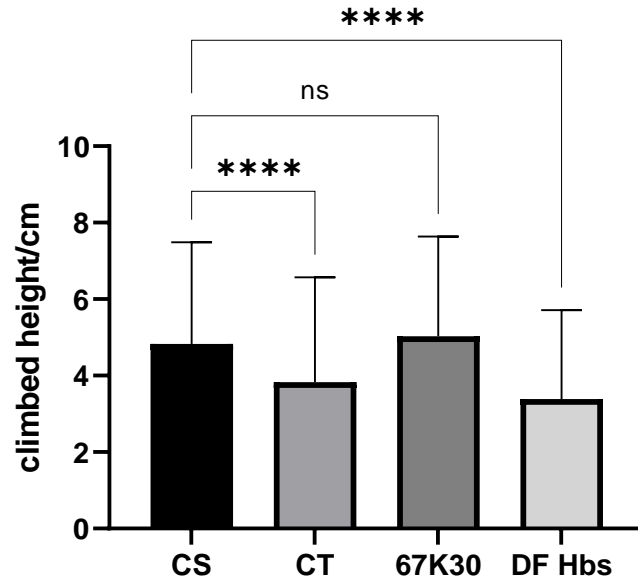


Figura 19| Comportamento de geotropismo negativo de mutantes para IRMs. O comportamento dos mutantes rst^{CT} , $Df(1)w^{67K30}$ e $Df(2) hbs$ foi comparado com o controle Canton S. n=60, 60, 60 e 60 (da esquerda para direita) **** $p < 0.0001$, ns $p > 0,05$ teste ANOVA.

4.5.2 Mutações dos ortólogos de Kirrel-3 apresentam alterações em comportamentos associados ao transtorno de espectro autista em *Drosophila*.

Pelo fato de Kirrel-3 ser um gene relacionado ao risco de desenvolvimento de autismo em humanos, em nossa última abordagem analisamos o comportamento de *grooming* que é considerado comportamento relevante para o estudo de modelos de transtorno de espectro autista em *Drosophila*, já que se caracteriza como um comportamento repetitivo (HOPE et al. 2019). Analisamos o *grooming* do mutante rst^{CT} e das deficiências $Df(2) hbs$ e $Df(1)w^{67K30}$. Para machos rst^{CT} e $Df(2)hbs$ não houve diferença significativa para o tempo e número de eventos de *grooming* quando comparado ao grupo controle. No entanto quando analisadas as fêmeas, vemos que moscas rst^{CT} apresentam um menor tempo de *grooming*. Já em moscas $Df(1)w^{67K30}$ o número de eventos de *grooming* é significativamente maior que o grupo controle. Curiosamente, a $Df(2) hbs$ que tem grande efeito nos comportamentos de locomoção de *Drosophila* não alterou o comportamento de *grooming* (Fig. 20). Assim, nossas análises

sugerem que o *grooming*, um comportamento modelo para o estudo de autismo em *Drosophila*, é alterado apenas por mutações que afetam *rst* e *kirre*, ortólogos de Kirrel-3 – gene de risco de autismo em humanos (TALKOWSKI et al., 2012; DE RUBEIS et al., 2014; IOSSIFOV et al., 2014).

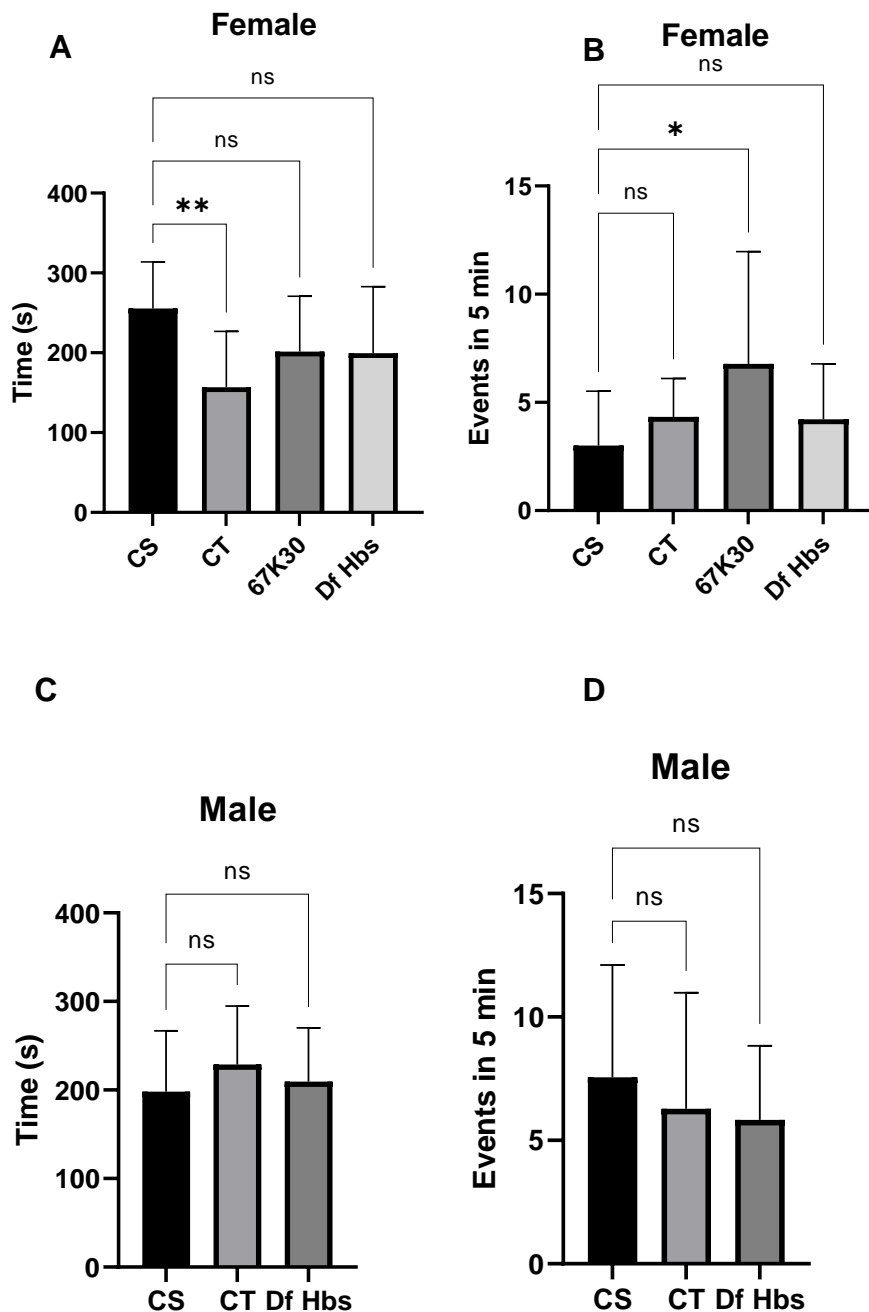


Figura 20| Comportamento de *grooming* de mutantes para IRMs. O comportamento dos mutantes *rst^{CT}*, *Df(1)w^{67K30}* e *Df(2)hbs* foi comparado com o controle Canton S. A cada cinco minutos foi analisado (A e C) tempo de *grooming* e (B e D) eventos de *grooming* em cinco

minutos. n=12, 12,18 e 18 (da esquerda para direita) ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0,05$, ns> 0.05, teste ANOVA em **A** e **B**. n=18,18 e 18 (da esquerda para direita) ns> 0.05 , teste ANOVA em **C** e **D**.

5. DISCUSSÃO

5.1. IRMs são expressas de modo complexo ao longo de todos os estágios do neurodesenvolvimento embrionário de *Drosophila*.

Em nosso trabalho analisamos o padrão de expressão das IRMs com foco no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário. Tanto para o estágio de primórdio quanto para o SNC maduro vemos uma coexpressão de membros de diferentes subclasses da família, uma característica que também está presente no desenvolvimento de outros órgãos/tecidos e em outras espécies (VALER et al. 2018; SUGIE et al.2010; CHAO e SHEN 2008). No estágio *anlage* do SNC é curioso o fato de Hbs ser expresso sem um parceiro nas células da mesectoderme do embrião o que foge do modo canônico de atuação da família IRM. Esse dado nos leva a especular se Hbs poderia estar atuando a partir de uma interação homofílica ou atuando de modo heterofílico com um parceiro de outra família ou, ainda, atuando de um modo que independa de um parceiro de atuação, sendo todas as possibilidades levantadas ainda não descritas para as IRMs em *Drosophila*.

Além disso o fato de SNS ser o único membro da família que não é expresso durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário de *Drosophila* mostra a especificidade do membro para alguns órgãos/tecidos. Ao passo que SNS é requerido para o desenvolvimento da musculatura e olho, (KIM et al.2016; BAO 2014)recentemente o nosso grupo mostrou que sua atuação também é dispensada para o desenvolvimento do ovário (VALER et al 2018) É importante enfatizar a grande importância da coleção MiMIC GFP para o presente trabalho, ferramenta que poderá ter grande utilidade para estudos mais detalhados do desenvolvimento do sistema nervoso assim como em análises de outros órgãos/tecidos de *Drosophila*. Adicionalmente, com estabelecimento de Hbs como marcador das células da glia da linha média, a linhagem MiMIC Hbs GFP adquire grande importância para estudos de direcionamento axonal, morte, migração e *ensheathment* celular.

5.2. IRMs são requeridas para o correto desenvolvimento do sistema nervoso embrionário.

Além de serem expressas durante a neurogenese, as IRMs se mostram necessárias para o desenvolvimento normal do SNC embrionário de *Drosophila*. A partir de diferentes metodologias – análise de mutantes, deficiências, silenciamento por RNAi e superexpressão – vemos que os resultados convergem para fenótipos de defeitos de projeção axonal no cordão nervoso embrionário. Curiosamente a porção final do domínio intracelular de Rst, que é dispensável durante o neurodesenvolvimento adulto se mostra necessária para a função desempenhada por Rst durante o desenvolvimento do sistema nervoso embrionário. Algo parecido ocorre com SYG-1, ortólogo de Rst em *C. elegans*. Chao e colaboradores (2008) demonstraram que a porção intracelular de SYG-1 é dispensável para uma perfeita sinaptogênese no animal adulto, ao passo que para o processo de sinaptogênese no estágio L4 do verme o domínio citoplasmático desta IRM é necessário.

Ainda na análise dos fenótipos de direcionamento axonal, vemos que nenhuma diferença é observada em embriões mutantes para *rst* quando comparados a embriões que apresentam *rst* e *kirre* removidos do genoma, dado que sugere uma menor relevância de *kirre*. No nosso estudo, os embriões deficientes para *hbs* apresentam os fenótipos de desorganização axonal mais severos. Hbs é o único membro da subclasse *SNS/Nephrin-like* a atuar no desenvolvimento do sistema nervoso e ainda é a única IRM expressa em todos os estágios do neurodesenvolvimento embrionário. O fato de Kirre e Hbs serem expressos no estágio maduro do sistema nervoso num padrão característico das vias de direcionamento axonal (receptor expresso em neurônios laterais e ligante expresso nas células da linha média), somado aos fenótipos de defeitos nas projeções axonais e, ainda, a atuação das IRMs no direcionamento axonal no sistema nervoso adulto de *Drosophila* já ser descrita fortalecem a hipótese de atuação das IRMs nas vias de direcionamento axonal do cordão nervoso embrionário. No entanto é preciso ter cautela pelo pleiotropismo conhecido da

família e ao fato das IRMs serem expressas, também, nas células progenitoras e precursoras do sistema nervoso embrionário.

5.3. Assim como em vertebrados, IRMs são importantes para o comportamento de invertebrados.

Em nossa análise final descrevemos o papel das IRMs no comportamento de *Drosophila*, o primeiro estudo das IRMs no comportamento de invertebrados. Hbs parece ter um papel importante em comportamentos locomotores, haja vista que a deficiência de Hbs gera alterações em todos os comportamentos analisados. Já os resultados de Rst demandam uma análise mais complexa. O ensaio de RNAi sugere que o silenciamento de *rst* altera a distância percorrida pela larva durante o *crawling*, ao passo que análise do mutante *rst*^{CT} sugere que a porção intracelular da proteína Rst parece ser dispensável para o correto comportamento larval. Por outro lado, o domínio citoplasmático de Rst parece necessário para o comportamento de escalada. Na análise do “comportamento de *Drosophila* similar ao transtorno de espectro autista temos que apenas alterações genéticas na classe *Rst/Neph-like* geram comportamentos anormais, ou seja em ortólogos de kirrel-3, gene de risco para autismo em humanos.

Por fim é importante enfatizar a necessidade de aprofundar os estudos comportamentais das IRMs expandindo a análises para outras linhagens mutantes. O silenciamento de RNAi para as IRMs encontra um obstáculo que é a existência de um sistema de regulação pós transcricional entre os membros da família que pode acrescentar mais complexidade na análise dos fenótipos (MACHADO et al. 2018). Outro ponto importante é existência de poucas linhagens mutantes para *hbs* e *kirre* disponíveis, tornando necessário esforços visando a obtenção de novas linhagens para esses e outros membros da família IRM.

6. CONCLUSÕES

6.1 A família IRM é expressa de modo complexo ao longo de todo neurodesenvolvimento embrionário de *Drosophila*, sendo os membros recrutados de modo específico para cada estágio do desenvolvimento do sistema nervoso.

6.2 Hibris surge como marcador das células da glia da linha média.

6.3 A alteração da função selvagem das IRMs gera defeitos de direcionamento axonal no cordão nervoso.

6.4 A porção citoplasmática final de Rst, que é dispensável durante o neurodesenvolvimento adulto é importante para a atuação de Rst no desenvolvimento neural embrionário.

6.5 Assim como em vertebrados, as IRMs também atuam no comportamento de invertebrados.

6.6 Em *Drosophila* Hibris parece ter maior envolvimento em comportamentos locomotores, os membros da classe *Rst/Neph-like*, apresentaram envolvimento em comportamentos considerados afins ao transtorno do espectro autista.

REFERÊNCIAS

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

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

ARAÚJO, H. et al. Requirement of the roughest gene for differentiation and time of death of interommatidial cells during pupal stages of *Drosophila* compound eye development. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 5, p. 537–547, 1 maio 2003.

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

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

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

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

BAO, S.; CAGAN, R. Preferential adhesion mediated by Hibris and Roughest regulates morphogenesis and patterning in the *Drosophila* eye. **Developmental cell**, v. 8, n. 6, p. 925–35, 1 jun. 2005.

BARLETTA, G.-M. et al. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19266–71, 23 maio 2003.

BEARNEY, J. B. et al. Gene expression profiling of the developing *Drosophila* CNS midline cells. **Dev Biol.**, v. 2, n. 275, p. 473–492, 2004.

BHALLA, K. et al. Alterations in CDH15 and KIRREL3 in Patients with Mild to Severe Intellectual Disability. **The American Journal of Human Genetics**, v. 83, n. 6, p. 703–713, dez. 2008.

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

Boschert, U.; Ramos, R. G. P.; Technau, S. T. G.; e Karl-F. Fischbach. "Genetic and Developmental Analysis of *irreC*, a Genetic Function Required for Optic Chiasm Formation in *Drosophila*. **J. Neurogenet.** v. 6, p. 153-171. 1990

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

BRAY, S.; FURRIOLS, M. Notch pathway: Making sense of Suppressor of Hairless. p. 217–221, 2001.

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

CAUSSINUS, E. deGradGP: A System to Knockdown GFP-Tagged Proteins. **Methods Mol. Biol.**, v. 1478, p. 177-187, 2016.

CHAO, D. L.; SHEN, K. Functional dissection of SYG-1 and SYG-2, cell adhesion molecules required for selective synaptogenesis in *C. elegans*. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 248–257, out. 2008.

CHEN, E. H.; OLSON, E. N. Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. **Trends Cell Biology**. v.14, n. 8, p. 452-460, 2004.

CHIA, W.; SOMERS, W. G.; WANG, H. *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and

tumorigenesis. **The Journal of cell biology**, v. 180, n. 2, p. 267–72, 28 jan. 2008.

CHOI, S.-Y. et al. Mice lacking the synaptic adhesion molecule Neph2/Kirrel3 display moderate hyperactivity and defective novel object preference. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. July, p. 283, 2015.

COSTA, M. S. A. et al. The Rst-Neph Family of Cell Adhesion Molecules in *Gallus gallus*. **Journal of Neurogenetics**, v. 28, n. 3–4, p. 270–281, 2014.

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

DWORAK, H. A et al. Characterization of Drosophila hibris, a gene related to human nephrin. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 21, p. 4265–4276, 2001.

DE RUBEIS, S. et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. **Nature**. v.7526, n. 515, p.209-215, 2014.

FISCHBACH, K.-F. et al. The irre cell recognition module (IRM) proteins. **Journal of neurogenetics**, v. 23, n. 1–2, p. 48–67, 2009.

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

GRAHAMMER, F.; SCHELL, C.; HUBER, T. B. The podocyte slit diaphragm — from a thin grey line to a complex signalling hub. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 10, p. 587–598, 2013.

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

GUERIN, A. et al. Interstitial deletion of 11q-implicating the KIRREL3 gene in the neurocognitive delay associated with Jacobsen syndrome. *American Journal Of Medical Genetics*, v. 158A, n. 10, p. 2551-2556, 2012

HALES, K. G. et al. Genetics on the fly: A primer on the drosophila model system. **Genetics**, v. 201, n. 3, p. 815–842, 2015.

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

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

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

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

HATTORI, D. et al. Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 223–227, 13 set. 2007.

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

HELMST, M.; MARTIN, H.; HUBER, T. B. A Brief Overview on IRM Function Across Evolution. v. 7063, n. April, p. 1–6, 2014.

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

HOPE, K. A. et al. The Drosophila Gene Sulfateless Modulates Autism-Like Behaviors. **Frontiers in Genetics**.v.574, n.10, 2019.

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

ICHIMURA, K. et al. Developmental localization of nephrin in zebrafish and medaka pronephric glomerulus. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 61, n. 4, p. 313–24, abr. 2013.

IOSSIFOV, I. et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. **Nature**. v.515, p.216-221, 2014.

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

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

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

KESTILÄ, M. et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. **Molecular cell**, v. 1, n. 4, p. 575–82, mar. 1998.

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

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

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

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

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

KRAMER-ZUCKER, A. G. et al. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephtrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. **Developmental biology**, v. 285, n. 2, p. 316–29, 15 set. 2005.

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

LINNEWEBER, G. A.; WINKING, M.; FISCHBACH, K.-F. The Cell Adhesion Molecules Roughest, Hibris, Kin of Irre and Sticks and Stones Are Required for Long Range Spacing of the *Drosophila* Wing Disc Sensory Sensilla. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128490, 8 jun. 2015.

LÜTHY, K. et al. The irre Cell Recognition Module (IRM) Protein Kirre Is Required to Form the Reciprocal Synaptic Network of L4 Neurons in the *Drosophila* Lamina. **Journal of neurogenetics**, v. 7063, n. November 2013, p. 1–11, 2014.

MACHADO, M. C. R. et al. Transcriptional Activity Influences kirre mRNA Concentration in the Drosophila Pupal Retina during the Final Steps of Ommatidial Patterning. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22536, 8 ago. 2011.

Machado, M. C. R.; Valer, F. B.; Couto-lima, C. A.; **Ramos, R. G. P.**. “Transcriptional Cross-regulation of the IrreC Recognition Module (IRM) Members in the Drosophila Pupal Retina”. *Mechanisms of Development* 154:193-202 (2018).

MCGUIRE, S. E.; ROMAN, G.; DAVIS, R. L. Gene expression systems in Drosophila: A synthesis of time and space. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 8, p. 384–391, 2004.

MINER, J. H. Life without nephrin: it’s for the birds. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 23, n. 3, p. 369–71, mar. 2012.

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

MODA, L.; **Dissecção funcional in vivo da molécula de adesão celular Roughest durante o desenvolvimento embrionário de Drosophila melanogaster.** Tese de Doutorado. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

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

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

NEUMANN-HAEFELIN, E. et al. A model organism approach: Defining the role of Neph proteins as regulators of neuron and kidney morphogenesis. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 12, p. 2347–2359, 2010.

NICHOLS, C. D.; BECNEL, J.; PANDEY, U. B. Methods to assay Drosophila behavior. **JoVE**. v3795, 2012.

NISHIDA, K. et al. Ptf1a directly controls expression of immunoglobulin superfamily molecules Nephrin and Neph3 in the developing central nervous system. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 1, p. 373–80, 1 jan. 2010.

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

PATEL, N. H. Chapter 24 Imaging Neuronal Subsets and Other Cell Types in Whole-Mount Drosophila Embryos and Larvae Using Antibody Probes. **Methods in Cell Biology**, v. 44, n. C, 1994.

PUTAALA, H. et al. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2001.

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

RAMOS, R. G. P. et al. The irregular chiasm C-roughest locus of Drosophila, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein. **Genes and Development**, v. 7, n. 12 B, p. 2533–2547, 1993.

RAMOS, R. G. P.; MACHADO, L. C. H.; Moda, L. M. R. “Fluorescent Visualization of Macromolecules in Drosophila Whole Mounts”. *In Methods in Molecular Biology: Immunocytochemical Methods and Protocols*. (C. Oliver and MC Jamur Eds) pp 165-179 Humana Press (2010).

REITER, C. et al. Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in

the *Drosophila* retina: the role of the IrreC-rst protein. **Development (Cambridge, England)**, v. 122, n. 6, p. 1931–40, jun. 1996.

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

REN, X. et al. Genome editing in *Drosophila melanogaster*: from basic genome engineering to the multipurpose CRISPR-Cas9 system. **Science China Life Sciences**, v. 60, n. 5, p. 476–489, 1 maio 2017.

ROH, J. D. et al. Increased Excitatory Synaptic Transmission of Dentate Granule Neurons in Mice Lacking PSD-95-Interacting Adhesion Molecule Neph2/Kirrel3 during the Early Postnatal Period. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. March, p. 81, 2017.

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

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

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

SCHMUCKER, D. et al. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. **Cell**, v. 101, n. 6, p. 671–84, 9 jun. 2000.

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

SCHWABE, T.; GONTANG, A. C.; CLANDININ, T. R. More than just glue The diverse roles of cell adhesion molecules in the *Drosophila* nervous system. v. 3, n. 1, p. 36–42, 2009.

SELLIN, L. et al. NEPH1 defines a novel family of podocin-interacting proteins. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 1, p. 115–7, 1 nov. 2002.

SERIZAWA, S. et al. A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 1057–69, 1 dez. 2006.

SHEN, K.; BARGMANN, C. I.; FRANCISCO, S. The Immunoglobulin Superfamily Protein SYG-1 Determines the Location of Specific Synapses in *C. elegans*. v. 112, p. 619–630, 2003.

SHEN, K.; FETTER, R. D.; BARGMANN, C. I. Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 869–81, 19 mar. 2004.

SIMON, C. R. et al. Precise temporal regulation of *roughest* is required for correct salivary gland autophagic cell death in *Drosophila*. **genesis**, v. 47, n. 7, p. 492–504, jul. 2009.

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

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

SRINIVAS, B. et al. A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. **Nature Genetics**. v.39, p.781-786, 2007.

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

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

SUGIE, A. et al. Recognition of pre- and postsynaptic neurons via nephrin/NEPH1 homologs is a basis for the formation of the *Drosophila* retinotopic map. **Development**, v. 137, n. 19, p. 3303–3313, 1 out. 2010.

SULLIVAN, W.; ASHBURNER, M.; HAWLEY, R. S. **Drosophila protocols**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

TALKOWSKI, M. E. et al. Sequencing Chromosomal Abnormalities Reveals Neurodevelopmental Loci that Confer Risk across Diagnostic Boundaries. **Cell**.v. 149, n. 3, p. 525-537, 2012.

TAMIR-LIVNE, Y. et al. Adhesion molecule KIRREL3/Neph2 is required for the elongated shape of myocytes during skeletal muscle differentiation. **Int J Dev Biol**. v. 61, p. 337-345, 2017)

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

VALER, F. B.; MACHADO, M. C. R.; SILVA-JUNIOR, R. M. P.; **RAMOS, R. G. P.** “Expression of Hbs, Kirre and Rst during *Drosophila* Ovarian Development.” *Genesis* 56:e23242 (2018).

FELIPE BERTI VALER, F. B.; SPEGIORIM, G. C.; ESPREAFICO, E. M.; **RAMOS, R. G. P.** “The IRM cell adhesion molecules Hbris, Kin of irre and Roughest control egg morphology by modulating ovarian muscle contraction in *Drosophila*” *J. Insect Phys* 136:104344 (2022)

VENUGOPALA REDDY, G. et al. Irregular chiasm-C-roughest, a member of the immunoglobulin superfamily, affects sense organ spacing on the *Drosophila*

antenna by influencing the positioning of founder cells on the disc ectoderm. **Development Genes and Evolution**, v. 209, n. 10, p. 581–591, 20 out. 1999.

VÖLKER, L. A. et al. Comparative analysis of Neph gene expression in mouse and chicken development. p. 355–366, 2012.

WANNER, N. et al. Functional and Spatial Analysis of *C. elegans* SYG-1 and SYG-2 , Orthologs of the Neph / Nephrin Cell Adhesion Module Directing Selective Synaptogenesis. v. 6, n. 8, p. 1–10, 2011.

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

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

WHEELER, S. R. et al. Neurexin IV and Wrapper interactions mediate Drosophila midline glial migration and axonal ensheathment. **Development**, v. 1157, p. 1147–1157, 2009.

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

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

WIMMER, E. A. Innovations: Applications of insect transgenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 3, p. 225–232, mar. 2003.

WOJTOWICZ, W. M. et al. Alternative Splicing of Drosophila Dscam Generates Axon Guidance Receptors that Exhibit Isoform-Specific Homophilic Binding. **Cell**, v. 118, n. 5, p. 619–633, 3 set. 2004.

WOLFF, T.; READY, D. F. Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. **Development (Cambridge, England)**, v. 113, n. 3, p. 825–39, nov. 1991.

XIONG, W. C. et al. repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. **Genes & development**, v. 8, n. 8, p. 981–94, 15 abr. 1994.

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

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

Zhongwei, Q.; Zhang, A.; Yan, D. Robo functions as an attractive cue for glial migration through SYG-1/Neph. *eLife*. v.57921, n. 9, p.1-15, 2020.

ZHUANG, S. et al. Sns and Kirre, the *Drosophila* orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 14, p. 2335–44, 15 jul. 2009.