

**Introdução:** O gene *roughest (rst)* codifica uma proteína transmembrana unipasso, com cinco domínios imunoglobulina (Ig) na porção extracelular e uma longa cauda citoplasmática, tendo seu envolvimento descrito em diversos processos do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*, tais como direcionamento axonal, histólise de glândulas salivares, fusão de mioblastos durante a formação da musculatura embrionária, diferenciação das células pigmentares durante o processo de formação do olho composto e no desenvolvimento dos ovários. **Metodologia:** Com o objetivo de compreender o papel funcional dos domínios *Ig-like*, selecionamos dois alvos genômicos na região extracelular de *rst* passíveis de sofrerem edição pela metodologia de CRISPR/Cas9, visando principalmente, para além de mutações pontuais, a ocorrência da deleção completa do fragmento compreendido entre os dois alvos – 441 aa contendo os cinco domínios *Ig-like*. Utilizamos a estratégia de Co-CRISPR, que edita o gene de interesse junto a gene de fenótipo visível, neste caso, *ebony*. Embriões da linhagem *nos-Cas9* foram coletados, decorionados e microinjetados com uma solução composta pelo par de plasmídeos clonados com os gRNAs para a deleção de *rst* e o plasmídeo com o gRNA para *ebony*. Após uma sequência de cruzamentos para o *screening* dos animais, 14 linhagens balanceadas carregando possíveis eventos de mutação em *rst* foram obtidas e analisadas para novos fenótipos nos olhos e ovários. A natureza e a localização das possíveis mutações em *rst* foram determinadas por meio do sequenciamento das regiões do gene onde se localizam os alvos de CRISPR. **Resultados:** Das 14 linhagens, 13 apresentaram a deleção de um códon triptofano (TGG) na região de um dos alvos; 12 linhagens tiveram a deleção de dois nucleotídeos na região do segundo alvo, perda que causou uma mudança na fase de leitura do gene, produzindo uma proteína truncada com 558 aa, na qual a região intracelular foi removida praticamente por completo devido à presença de um stop códon prematuro. Nenhuma linhagem apresentou a deleção completa do fragmento de 441 aa. Nos animais adultos, encontramos fenótipos semelhantes ao observado em mutantes já estudados de *rst* nos olhos e cerdas da cabeça, e verificamos possível correção funcional feita pelo gene parálogo *kirre* na formação da retina ao gerarmos linhagens deficientes das duas proteínas. Também observamos ovários de tamanho reduzido nas fêmeas homozigotas; no entanto, estes animais produzem ovos morfologicamente normais e viáveis. **Conclusão:** Apesar de objetivarmos explorar a função dos domínios *Ig-like*, a mutação encontrada nas novas linhagens, ainda que localizada na porção extracelular do gene, foi responsável por produzir uma proteína truncada cujos fenótipos

estão mais associados à depleção da região intracelular da proteína. De maneira geral, pode-se concluir que a integridade da proteína Roughest é importante nos contextos de desenvolvimento dos órgãos analisados nesse projeto.