

CIÊNCIA ET AL
PROGRAMA
EDUCATIVO
i3S - INSTITUTO DE
INVESTIGAÇÃO
E INOVAÇÃO EM
SAÚDE



Drosophilas na sala de aula

GUIA DO PROFESSOR



O KIT CONSISTE EM:

Hands-on *Drosophila* contém:

4 tubos de moscas com os seguintes genótipos:

Wild type (tipo selvagem; white (com olhos brancos); ebony (com cor do corpo escura); vestigial (com asas vestigiais ou ausentes).

4 tubos com papa para a primeira transferência.

Autor: Augusta Monteiro.

Revisão: Marta Teixeira Pinto. Design: Anabela Nunes

Bibliografia:

Markstein, Michele. *Drosophila* workers Unite! A Laboratory manual for working with *Drosophila*. (2018). Published under a Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC-BY-NC) International License, version 4.0.

A. Prokop, A Rough Guide to *Drosophila* Mating Schemes, figshare, (2013), <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.106631>

ESTUDAR COM MOSCA DA FRUTA NA SALA DE AULA

Este guia tem como objetivo ensinar a trabalhar em sala de aula com ***Drosophila melanogaster*** (nome científico da mosca da fruta). Vamos dar a conhecer a *Drosophila*, o seu **ciclo de vida**, as vantagens do seu **uso em investigação**, assim como **métodos** para estabelecer **cruzamentos** e reconhecer **marcadores genéticos dominantes e recessivos**.

Para fazer cruzamentos com sucesso, é preciso **distinguir macho e fêmea**, **recolher fêmeas virgens**, **adormecer as moscas para as manipular**, e **fazer meio de cultivo** (para manter a espécie viva mais tempo).

PORQUÊ USAR *DROSOPHILA*?

A utilização da mosca da fruta para estudar doenças humanas parece, à primeira vista, estranha. Como é que um inseto pode ser usado para estudar a biologia humana?

A resposta é simples, deve-se à **semelhança celular e molecular que a mosca da fruta tem conosco**.

A *Drosophila* é usada para estudar processos fundamentais de divisão celular, genética e até comportamento, de modo a descobrir novas estratégias para tratar e prevenir doenças. Ficamos a conhecer melhor estas moscas, quando na viragem do século, em 2000, um grupo de cientistas publicou o **genoma completo da *Drosophila***. Elas têm cerca de **14000 genes** (um número menor que os 21000 genes dos humanos). No entanto, o mais impressionante é que cerca de 65% dos genes associados a doenças humanas têm um gene correspondente (homólogo) em *Drosophila*. Isto significa que podemos estudar na mosca da fruta muitos dos genes e as suas implicações no ser humano.

O uso de *Drosophila* como modelo animal experimental tem imensas vantagens, incluindo ser um animal pequeno, fácil de manter em laboratório, e cuja alimentação é barata. Para além destas características, as moscas da fruta têm um ciclo de vida muito rápido, e que cada fêmea é capaz de deixar uma descendência numerosa, de modo a permitir uma larga amostragem experimental.

Neste guia você pode encontrar informação e atividades sobre:

A. Ciclo de vida da mosca da fruta (*Drosophila*)

B. Manutenção de *Drosophila* em tubos/ Preparação de meio de cultivo / Adormecer as moscas

C. Preparação de cruzamentos genéticos/ Distinção de macho fêmea/ Recolha e identificação de fêmeas virgens

A. CICLO DE VIDA E MANUTENÇÃO DA MOSCA DA FRUTA

A mosca da fruta adulta pode depositar **30 a 50 ovos** por dia durante o seu **ciclo de vida**, que a temperatura ambiente (**20-25°C**) **pode ser de 9 a 11 dias** (figura1). No seu habitat natural as moscas aproveitam a altura da abundância de fruta madura para aumentar a sua população em larga escala.

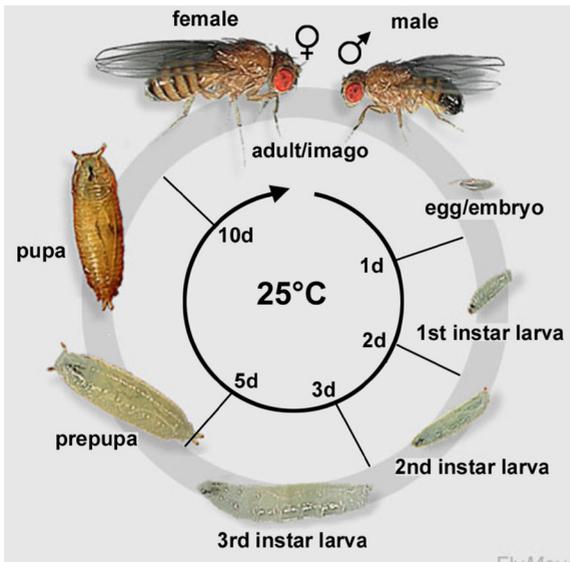


Figura 1: Ciclo de vida da *Drosophila*. (adaptado de A. Prokop, A rough guide to *Drosophila* mating schemes)

As leveduras fermentam a fruta madura quando entra em decomposição o que apresenta uma vantagem dupla para a mosca, que se alimenta desses açúcares e aproveita para **colocar aí os seus ovos**.

Os ovos eclodem em **larvas**, num ambiente rico em alimento, passando **3 estádios de fases larvares**, neste alimento, até formar a **pupa**, onde ocorre várias transformações até eclosão das moscas adultas. Efetivamente, o ciclo de vida destas moscas, em particular na **fase de pupa, passa por metamorfose** assim como outros animais que conhecemos, o bicho da seda, a borboleta ou a rã.

Quando a temperatura desce e há menos abundância de alimento, o ciclo de vida estende-se. Existem moscas da fruta em todo o Globo, com exceção do Polo Sul.

ATIVIDADE PROPOSTA: OBSERVAÇÃO DO CICLO DE VIDA

Palavras chave: *Ciclo de vida, metamorfose, reprodução, maturidade sexual.*

Material necessário

- *Drosophila* em tubos de cultivo.
- Lupas simples ou binoculares.

Observações:

- * Reconhecer as fases do ciclo de vida da *Drosophila*.
 - * Fazer o registo das observações na folha de registo.
- Os alunos aprendem o conceito de ciclo de vida e de metamorfose, reconhecendo as suas fases, na *Drosophila*. Podem ainda comparar o ciclo de vida da *Drosophila* com o de outros seres vivos.
- Introdução do conceito de reprodução sexuada e maturidade sexual, uma vez que conseguem distinguir os estádios juvenis (embrião, larva e pupa) que não estão prontos para acasalar.

Folha de registo (Anexo 1)

B. MANUTENÇÃO DE *DROSOPHILA* EM TUBOS/ PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO / ADORMECER AS MOSCAS

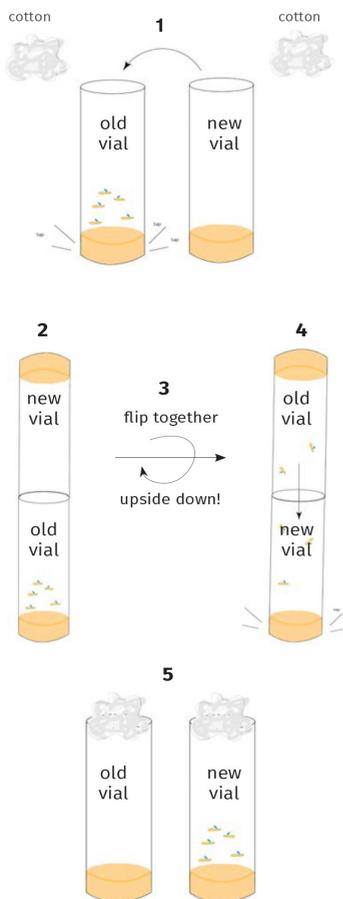


Figura 2: Representação esquemática da viragem dos tubos. (adaptado de Michele Markstein, *Drosophila* Workers Unite! A laboratory manual for working with *Drosophila*)

Para conseguir fazer mais propostas de atividades com a turma, além da observação dos mutantes e o ciclo de vida (que pode deixar acontecer no tubo que enviamos), terá de **fazer mais meio de cultivo** e aprender a **“virar os tubos com adultos” para tubos ou frascos novos** com comida fresca.

Como exemplificado na Figura 2 deve:

1. Bater com o tubo de moscas, na bancada, para elas permanecerem no fundo durante a transferência removendo rapidamente as tampas de algodão dos tubos com moscas a transferir e tubo vazio;

2. Alinhar verticalmente o bocal do tubo vazio com bocal do tubo com moscas;

3-4. Virar os tubos de forma a que o tubo vazio fique pousado na mesa de trabalho.

5. Para que todas as moscas desçam para o tubo novo, bater novamente na bancada, fechar novamente o tubo com a tampa de algodão. Não descartar o tubo inicial.

Para **ampliar o stock** de moscas deverá fazer a **viragem para um tubo novo 4 a 5 dias** após os adultos terem sido colocados no tubo de papa que receberam. Para quê? Desta forma, os adultos depositam bastantes ovos no meio de cultivo onde estavam inicialmente. Estes ovos vão desenvolver-se normalmente após a transferência dos adultos para um novo tubo onde voltam a colocar mais ovos. Poderá repetir-se este passo de passagem dos adultos o número de vezes necessário para terem as cópias que necessitam. Só estão **limitados à idade das moscas (pais), que podem durar até cerca de 40 dias.**



Figura 3: Ampliação de stock. (adaptado de Michele Markstein, *Drosophila* Workers Unite! A laboratory manual for working with *Drosophila*)

Na figura 3 podem ver estes tubos representados. Este método de viragem de tubos é normalmente utilizado em laboratório de forma a **manter as inúmeras linhas (stocks)** de moscas. Neste caso, em que o objetivo é manter o stock, só se faz a viragem do tubo quando a nova geração de moscas nascer, aproximadamente 14 dias a 25°C, mas se tiverem uma sala mais fresca para as colocarem, no mínimo até 18°C, poderão adiar esta passagem até às 5-6 semanas.

CURIOSIDADE

O ciclo de vida é mais longo com a diminuição de temperatura e as moscas adultas também vivem mais tempo a baixa temperatura.

ATIVIDADE PROPOSTA: FAZER MEIO DE CULTIVO

Reúna os seguintes materiais e certifique-se que tem tudo numa bancada para não ter de se ausentar durante a cozedura.

Material e Ingredientes:

- Gobelet (tamanho ajustado ao volume a preparar, ver tabela 1)
- Panela
- Fogão
- Varinha mágica
- Colher de Pau
- Balança
- Termómetro até 100°C
- Tabuleiro com tubos (sarstedt, refª 58.490)
- Algodão para tapar os tubos
- Melaço (Provida, #109115B)
- Farinha de Milho (Provida, #102018B)
- Levedura (Provida, #110103C)
- Agar agar (Provida, #G401104C)
- NIPAGIN (Methyl 4-hidroxybemnzooato; VWR, refª25604.290)

Ingrediente/Fornecedor/Referência	½ L	1L	1.5L
Melaço/ Provida/ 109115B	30mL	60mL	90mL
Farinha de Milho/ Provida/ 102018B	35 g	70g	105g
Levedura/ Provida/ 110103C	15g	30g	45g
Agar agar/ Provida/ G401104C	5g	10g	15g
Água	550mL	1100mL	1650mL
NIPAGIN	12.5mL	25mL	37.5mL

Tabela 1: Lista de ingredientes e volumes necessários para a preparação de diferentes quantidades de meio de cultivo.

Procedimento

1 - Depois de reunir todo o material necessário, siga para a balança para pesar os ingredientes secos da comida das moscas. Começa por pesar o Agar e, utilizando metade da água, coloca o agar e a água na panela. Pode ligar o fogão e começar a aquecer.



2 - Pese os restantes ingredientes para o gobelet, vertendo a outra metade da água para o gobelet, aqui a varinha mágica é útil para desfazer quaisquer grumos que se possam ter formado. De seguida verta esta mistura para a panela.

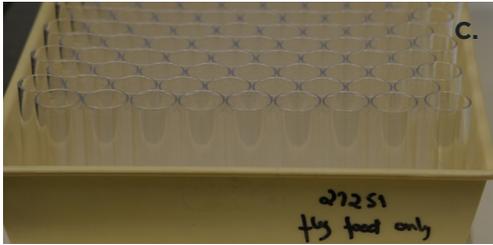
3 - Sem parar de mexer, com a colher de pau, deixe aquecer até levantar fervura.

4 - Desligue o fogão e deixe arrefecer até 55°C.

5 - Preparar separadamente uma solução a 10% (m/v) de Methyl 4-hidroxybenzoato (NIPAGIN, VWR, refº25604.290). Como exemplo pesar 10g e dissolver em 100mL de Álcool absoluto (~100%), esta solução pode ser guardada à temperatura ambiente. O NIPAGIN é um antifúngico para aumentar o tempo de vida do meio de cultivo. Esta solução depois de feita deve ser mantida numa garrafa fechada para evitar a evaporação do álcool.



6 - Apenas quando a papa atinge os 55°C (confirme com o termómetro) deve juntar a solução de NIPAGIN (ver volumes na última linha da Tabela 1).



7 - Uma vez adicionada esta solução de NIPAGIN, podem distribuir o meio de cultivo pelos tubos, colocar uma rede ou pano que permita trocas gasosas com o exterior, para arrefecer.

Importante - proteger estes tubos da entrada de moscas exteriores, a rede ou pano servem para esse efeito.



8 - Deixe secar a papa 5 a 6 horas, ou durante a noite, e depois tapar os tubos individualmente com bolas de algodão. Guarde a 4°C para aumentar o tempo de vida do meio de cultivo.

Figura 4: Preparação de meio de cultivo A- pesagem dos ingredientes (passo 1); B- homogeneização dos ingredientes (passo 2); C - distribuição do meio pelos tubos (passo 7); D- rede de proteção a usar durante o período de arrefecimento.

ATIVIDADE PROPOSTA: ADORMECER AS MOSCAS

1. MONTAGEM DA CÂMARA DE ADORMECER



Material

- Frasco de vidro alto (pode ser uma garrafa de vidro de um sumo ou um frasco de café solúvel, ~500ml)
- Falcon ou tubo de ensaio de plástico
- Funil
- Algodão
- Éter
- Agulha de cozer
- Isqueiro

Procedimento

1. Perfurar o fundo do tubo de plástico com uma agulha previamente aquecida, 5 a 6 furos.
2. Colocar algodão no interior do frasco de vidro
3. Embeber umas gotas de éter no algodão, ir aumentando as gotas se as moscas demorarem a adormecer, em demasia podem morrer.
4. Colocar o tubo de plástico dentro do frasco de vidro, mas sem que este contacte diretamente o algodão.



Figura 5: A - Tubo com furos; B - Montagem da câmara de adormecer

2. ADORMECER MOSCAS

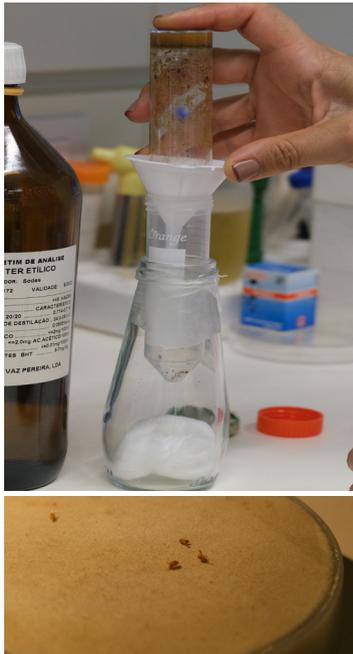


Figura 6: Adormecer e observar moscas

Procedimento

1. Bater suavemente nas paredes do tubo de cultura para que as moscas se afastem da rolha e do topo do tubo.
2. Retirar o algodão e inverter o tudo sobre o funil da câmara de adormecimento, rápida e cuidadosamente para evitar a fuga de moscas. Bater ligeiramente no fundo do tubo para que todas as moscas caiam no funil.
3. As moscas deverão estar anestesiadas ao final de alguns segundos
4. Uma vez imóveis, as moscas estarão prontas para serem observadas. Para melhor observação deve colocá-las sobre um papel branco
5. No final da observação, colocar as moscas novamente no tubo de cultura e deixar os tubos na horizontal até as moscas recuperarem da anestesia.

C. PREPARARÃO DE CRUZAMENTOS GENÉTICOS/DISTINÇÃO MACHO E FÊMEA/ IDENTIFICAR E RECOLHER FÊMEAS VIRGENS

GENÉTICA DA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Tal como o *Homo Sapiens*, a *Drosophila melanogaster* é um organismo **diplóide**, isto significa que tem duas cópias de cada conjunto de cromossomas. Recebe um conjunto de cromossomas do pai e outro conjunto de cromossomas da mãe. Nos humanos um conjunto de cromossomas (1n) são 23 cromossomas enquanto em *Drosophila* são **4 cromossomas** (1n). O primeiro par são os **cromossomas sexuais, X e Y**, e os outros **3 pares são cromossomas autossómicos, 2, 3 e 4**. A figura seguinte (Figura 7) representa o genótipo da *Drosophila*.

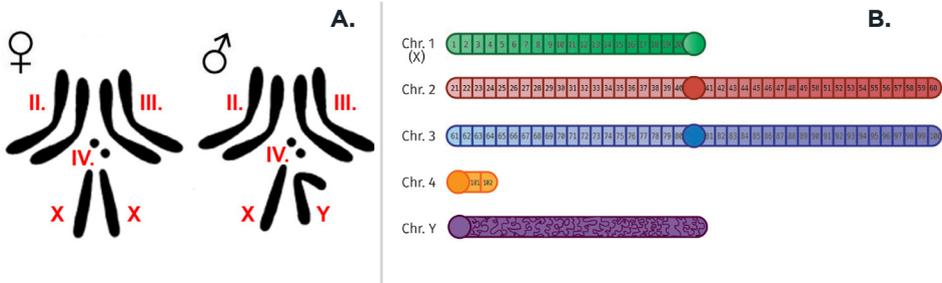


Figura 7: Cromossomas de *Drosophila*. A- imagens citológicas de cromossomas de fêmea e de macho; B- O cromossoma X é designado de Cromossoma 1 e lá se encontra 20% do genoma da mosca; cada um dos Cromossoma 2 e 3 contém cerca de 40% do genoma, sendo que o cromossoma Y contém menos de 1% da informação genética da mosca. (Adaptado de de A. Prokop, A rough guide to *Drosophila* mating schemes e de Michele Markstein, *Drosophila* Workers Unite! A laboratory manual for working with *Drosophila*)

Palavras chave: cromossomas sexuais e autossomas, genótipo e fenótipo, marcadores genéticos, etiquetar, mutantes, homocigotia ou heterocigotia, dominante e recessivo

Os cientistas usam todo o genoma da mosca, para induzir alterações genéticas, mas preferencialmente o cromossoma X, 2 e 3. Os cromossomas Y e 4 são muito pequenos, ou seja, codificam para um pequeno número de genes e por isso não são muito utilizados. (Figura 7).

Os mutantes enviados para a escola têm mutações nestes cromossomas (X, 2 e 3).

IDENTIFICAR GENETICAMENTE: ETIQUETA CORRETA NO TUBO

Cada tubo está identificado com uma **etiqueta indicativa do genótipo**. Como já foi referido, as *Drosophilas* são **diplóides** e por isso o **par de cromossoma é separado por uma barra “/”** e os **genótipos** dos diferentes cromossomas é separado um **ponto e vírgula “;”**. Assim, as fêmeas têm os cromossomas: 1/1; 2/2; 3/3 e os machos: 1/y; 2/2; 3/3.

Os mutantes escolhidos para o kit escola podem ser **dominantes** se com apenas uma cópia da mutação ela for visível, ou **recessivos** se precisarem de duas cópias da mutação para ser vista a alteração. Estes mutantes são normalmente utilizados como marcadores genéticos pelos cientistas.



Figura 8: Macho de *Drosophila* Wild Type

Para um genótipo de **Wild type**:

Fêmea: +/+; +/+; +/+ |

Macho: +/Y; +/+; +/+

Fenotipicamente uma *Drosophila* **Wild type** tem asas retas, corpo acastanhado, olhos vermelhos (figura8).

Um genótipo de **white**, é um **genótipo homocigótico** para uma mosca com **mutação (recessiva)** no gene white: Fêmeas $w-/w-$; $+/+$; $+/+$ ou podemos abreviar para $w-/+/+$.

Uma mosca que seja **geneticamente heterocigótica** para a mutação white tem o seguinte genótipo:

$w-/+$; $+$; $+$ um macho é hemizigótico.

Fenotipicamente uma *Drosophila white* tem asas retas, corpo acastanhado, olhos brancos (figura9).



Figura 9: Fêmea de *Drosophila White*

Mais mutantes que podem receber e suas características.

- **ebony** – corpo escuro, etiqueta ($+$; $+$; e/e) (figura10);
- **curly** – asas enroladas, etiqueta ($+/+$; Cyo ; $+/+$) ou simplificado ($+$; Cyo ; $+$) (figura11);
- **yellow** – corpo amarelo, etiqueta (y/y ; $+/+$; $+/+$) ou y/y ; $+$; $+$ (figura12);
- **vestigial** – asas vestigiais, pouco desenvolvidas, etiqueta ($+$; vg/vg ; $+$) (figura 13);
- **lobe** – o formato de olho é lobado, etiqueta ($+/+$; L ; $+/+$) (figura 14);

Nas figuras que se seguem consegue visualizar estas diferenças fenotípicas entre as moscas Wild type e os diferentes mutantes. Na sala de aula poderão verificar mesmo a olho nu as características que as diferenciam.



Figura 10: Ebony, corpo escuro.

Figura 11: Curly white, asas enroladas e olhos brancos.



Figura 12: Yellow, corpo amarelo

Figura 13: Vestigial, asas vestigiais, pouco desenvolvidas



Figura 14: Lobe - o formato de olho é lobado

CRUZAMENTO GENÉTICO

Os cruzamentos genéticos são a base dos estudos genéticos e envolvem vários passos preparatórios: é necessário saber **identificar as fêmeas** de um stock genético e **machos** de outro stock genético de forma a poder combiná-los num frasco e obter ovos fertilizados. Será ainda necessário **colher as fêmeas virgens** e só depois será possível fazer o cruzamento.

ATIVIDADE PROPOSTA: DISTINGUIR MACHOS DE FÊMEAS

Na figura 15 temos as imagens que representam as **diferenças entre machos e fêmeas**. Se se virarem ventralmente, com o abdômen para cima, e olharmos para os genitais verificámos que o **macho tem a parte final do abdômen mais escura do que a fêmea**.

O **macho normalmente é menor que a fêmea**. Se tivermos uma lupa binocular que nos acompanhe, os **machos** também podem ser identificados pela presença de **pelos escuros no par de patas frontais**, chamados de pente sexual.

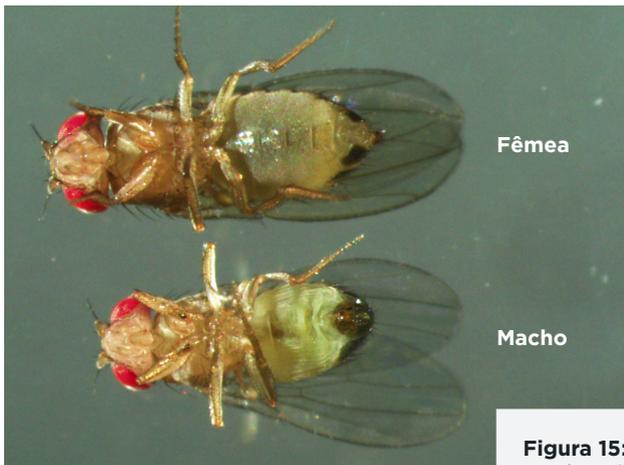


Figura 15: Fêmea e macho wild type.

A IMPORTÂNCIA DAS FÊMEAS VIRGENS

A utilização da *Drosophila* em estudos genéticos foi bem-sucedida pela facilidade com que se cruzam e pela facilidade em identificar o fenótipo da descendência. Existe um senão, as moscas **fêmeas** controlam a fertilização dos seus óvulos uma vez que **podem armazenar esperma de parceiros diferentes**, num órgão denominado espermateca.

Portanto, **antes de fazer um cruzamento temos de garantir que as fêmeas são virgens**, que não têm qualquer esperma armazenado, de forma a **assegurar que o cruzamento será apenas com os machos de genótipo selecionado**.

ATIVIDADE PROPOSTA: COLHER VIRGENS

Apesar de existirem vários métodos de colheita de virgens, descreve-se aqui o mais usado pelos cientistas dada a sua simplicidade e eficácia. O **método do relógio** permite a colheita de número elevado de virgens.

O método do relógio envolve dois passos muito importantes, o primeiro é **"limpar" o tubo do stock de todos os adultos existentes, deixando só as pupas que não eclodiram**. Ou seja, eliminar os adultos ou passá-los para outro tubo e assim manter o stock.

O segundo passo consiste em **recolher as fêmeas virgens**. A **colheita deve ser feita num intervalo até 18h** (desde o momento de retirada dos adultos), isto se o **tubo** de cruzamento tiver sido **mantido a 18°C**. Se o tubo estiver à temperatura ambiente (**22°C**), uma vez que o ciclo de vida depende da temperatura, deve-se considerar um intervalo menor de **8h até 12h**. Se o tubo de cruzamento estiver a **25°C**, as virgens devem ser colhidas entre **6 e 8h** no máximo.



Figura 16:
Fêmea, distinção de fêmeas virgens, mancha de flyconium.

Reconhecer virgens pela morfologia de uma mosca nova

As moscas acabadas de eclodir têm uma aparência inconfundível, **são muito claras e parecem uma ‘pipoca’** acabada de explodir. As moscas com esta aparência nova são fáceis de identificar e são obviamente virgens. No entanto, pretende-se **recolher fêmeas**, por isso, é muito importante olhar para a genitália e separar as fêmeas. Podemos ainda identificar as moscas acabadas de eclodir se tiverem uma **mancha escura no abdómen, que tipicamente está presente nas suas 2 a 3 horas iniciais de vida adulta**. A mancha escura é o equivalente ao mecónio que nas moscas se chama de **flyconium**. Esta mancha será expulsa nas primeiras 3 horas de vida adulta, por isso se se tiverem esquecido de ‘limpar’ o tubo ainda podem recolher as moscas fêmeas mais jovens, selecionando-as através da visualização desta marca.

Quando tiverem recolhido no mínimo três a quatro fêmeas virgens por cruzamento, podem avançar.

ATIVIDADE PROPOSTA: CRUZAMENTO GENÉTICO

Esta atividade envolve planeamento e ter o **conhecimento de todas atividades anteriores**.

Fêmeas e os machos juntos no mesmo tubo temos o cruzamento feito.

Começando as fêmeas a depositar ovos fertilizados, podemos **prever a data do nascimento** da geração seguinte de acordo com a **temperatura**.

É importante fazer a **viragem dos tubos de cruzamento 3 a 4 dias** após se terem junto da primeira vez. Com isso impedimos que a comida se torne escassa para uma população muito densa.

Se não quiserem várias cópias de cruzamento podem eliminar os adultos e ficarem à espera da primeira geração.

As cópias são úteis se tiverem várias turmas para fazer a mesma experiência.

Nesta atividade o ideal seria fazer um **quadro de mapeamento genético**, usando como inspiração a **primeira lei de Mendel**.

Segue abaixo um **exemplo para um mutação de olhos brancos**. Por ser uma mutação ligada aos cromossomas sexuais.

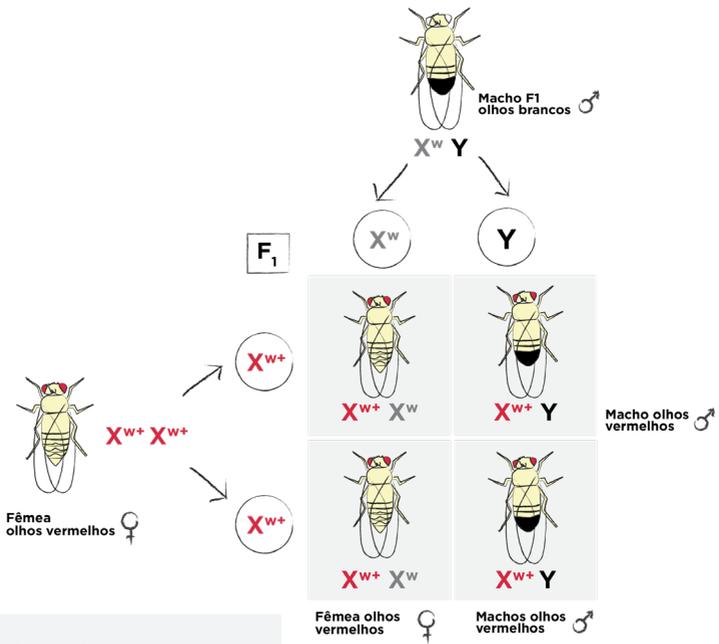
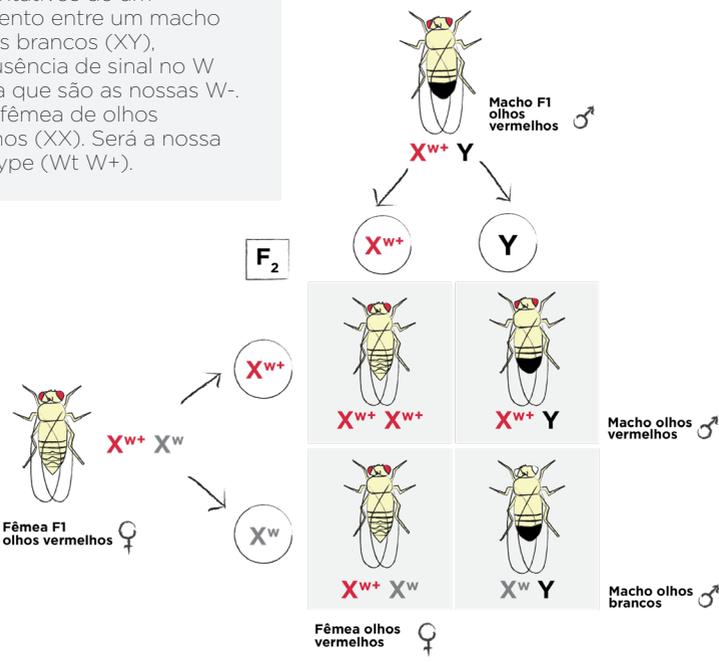


Figura 17: Quadros representativos de um cruzamento entre um macho de olhos brancos (XY), aqui ausência de sinal no W significa que são as nossas W-. E uma fêmea de olhos vermelhos (XX). Será a nossa Whild type (Wt W+).



3s



RUA ALFREDO ALLEN, 208
4200-135 PORTO, PORTUGAL
PHONE: +351 226 074 900
EMAIL: ESCOLAS@I3S.UP.PT

Anexo 1

Folha de registo (grupo ou individual) - Ciclo de vida da mosca da fruta

Aluno/grupo:

Temperatura a decorrer a observação:

Dia 1 Desenha o que vês	Dia 2 Desenha o que vês	Dia 3 Desenha o que vês	Dia 4 Desenha o que vês	Dia 5 Desenha o que vês
Dia 6 Desenha o que vês	Dia 7 Desenha o que vês	Dia 8 Desenha o que vês	Dia 9 Desenha o que vês	Dia 10 Desenha o que vês

Dia 11 Desenha o que vês	Dia 12 Desenha o que vês	Dia 13 Desenha o que vês	Dia 14 Desenha o que vês	Dia 15 Desenha o que vês
Dia 16 Desenha o que vês	Dia 17 Desenha o que vês	Dia 18 Desenha o que vês	Dia 19 Desenha o que vês	Dia 20 Desenha o que vês