

PROTOCOLO - Utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª Parte



Rui Artur P. L. Gomes

Departamento de Biologia Vegetal
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Edifício. C2 - Piso 4, Campo Grande
1749-016 Lisboa

Vantagens da utilização de *Drosophila* em Genética

Drosophila melanogaster, conhecida entre nós por mosca do vinagre mas denominada “fruit fly” a nível internacional, é um excelente modelo biológico para realizar análise genética. Cruzando indivíduos que diferem em características facilmente visíveis (como sejam o tamanho das asas e a cor dos olhos ou do corpo) e estendendo esta análise até aos seus netos (F2), é possível determinar, ao fim de um mês, quantos genes estão envolvidos, quais os alelos dominantes e os recessivos e se o padrão de herança está, ou não, ligado ao sexo.

São diversas as vantagens que *Drosophila* apresenta para a análise genética, quer ao nível da investigação de ponta, quer como modelo para ensinar os princípios básicos da hereditariedade. Este insecto é intensivamente estudado há cerca de um século e o seu genoma foi completamente sequenciado no ano 2000. Existem colecções significativas de mutantes para os mais diversos fenótipos, bem como de rearranjos cromossómicos úteis no mapeamento genético. A manutenção laboratorial à temperatura ambiente (18-25°C) e as poucas exigências nutricionais e de espaço de cultura, aliadas ao facto da morfologia deste organismo ser facilmente observável com uma lupa que amplie 20-40 vezes, tornam este insecto num modelo adequado ao ensino da Genética mesmo ao nível da escola secundária. Realça-se também o facto das fêmeas serem relativamente profícuas, podendo originar numa semana várias dezenas de descendentes resultantes de uma única fecundação, pois as fêmeas mantêm os espermatozóides vivos durante algum tempo no útero e nuns “armazéns” especiais denominados spermatecas. Decorrem cerca de 12 dias desde o nascimento do indivíduo até ao momento em que ele próprio origina descendência.

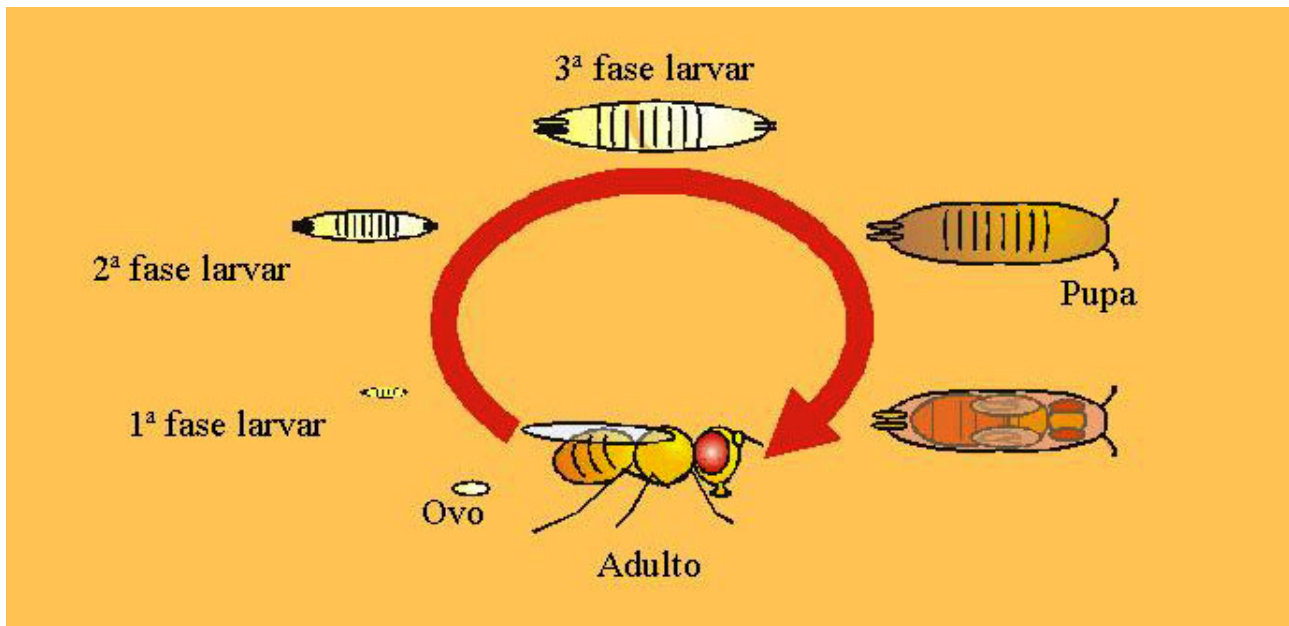


Figura 1 - Ciclo de vida de *Drosophila*

No decurso do seu ciclo de vida (Fig. 1) a *Drosophila* passa por uma fase de ovo (0,5 mm.), decorrendo a embriogénese em cerca de 24 horas. Eclode então uma 1ª forma larvar que, ao fim de um dia, muda de cutícula e se transforma numa larva de 2ª fase. Decorrido mais um dia a larva muda novamente de cutícula e transforma-se numa 3ª fase larvar que aumenta significativamente de tamanho ao longo de três dias (4 mm). Nesta altura, a larva deixa de escavar galerias no meio de cultura semi-sólido e tem tendência a fugir da humidade, deslocando-se para zonas mais secas. Aqui, começa a ficar imóvel, segrega uma cutícula espessa e forma uma espécie de casulo denominada pupa (3 mm). Durante a fase de pupa, que demora cerca de cinco dias, ocorre metamorfose, a qual envolve a degradação de praticamente todos os tecidos larvares e a proliferação significativa dos discos imaginais. Estes são pequenos grupos de células, até então indiferenciados, que irão originar as estruturas do adulto (também conhecido por imago). Da pupa eclode o indivíduo adulto (2 mm), que atinge a maturidade sexual ao fim de 12 horas e que tem uma esperança média de vida de 60 dias. Apenas ao fim de uma hora de eclosão da pupa é que as asas do adulto ficam completamente distendidas, apresentando até esta altura o aspecto de um pára-quadras por desembrulhar. Os adultos eclodem pouco pigmentados, e só ao fim de algumas horas é que se torna óbvia a coloração acastanhada do corpo e o padrão de listas escuras dos segmentos abdominais (Fig. 2).

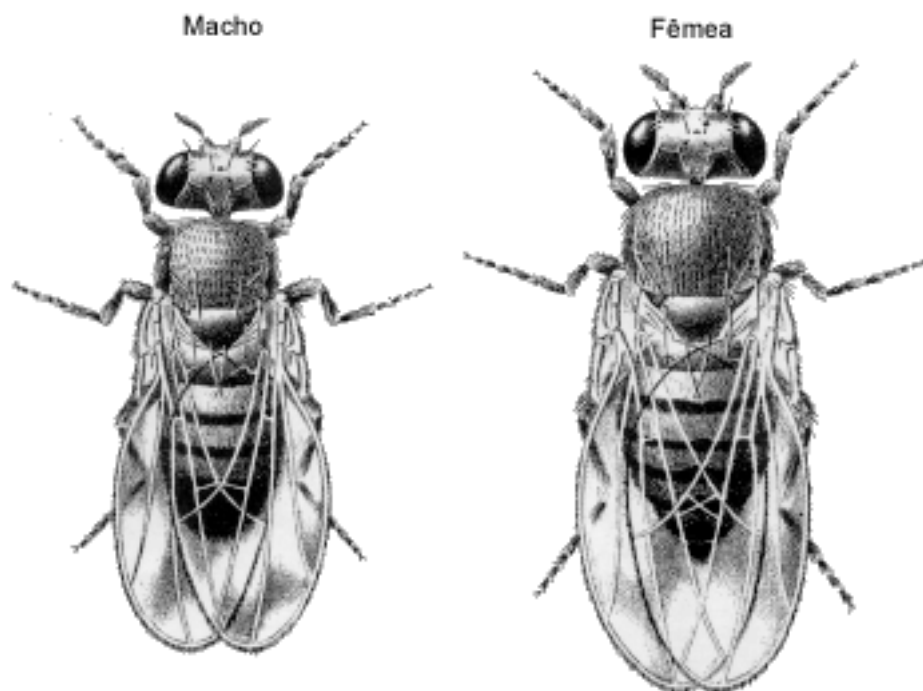


Figura 2 – *Drosophila* macho e fêmea adultos.

Meio de cultura de *Drosophila*

O que é necessário, para além dos insectos:

Material	Reagentes
Algodão cardado e hidrófilo	Agar
Azulejo	Água
Colher de pau	Etanol a 70%
Frasco com tampa (eterizador)	Éter sulfúrico
Funil e meia de vidro - Eterizador	Farinha de milho
Lupa	Levedura de cerveja
Papel de filtro	Melaço de cana
Pincel de guache	Nipagin
Proveta de 500ml (2x)	
Placa térmica ou Microondas	
Recipientes de 1/2 e 1 litro	
Tubos de plástico ou de vidro de base plana	

Para preparar 500 ml de meio de cultura efectuam-se duas misturas em separado:

Mistura I - Agar – 5 g
 Melaço – 60 ml
 Levedura de cerveja – 28 g
 Água – 300 ml

Mistura II - Farinha de milho – 70 g
 Água – 200 ml

Preparar a mistura II em água quente para que a farinha de milho dissolva melhor enquanto se agita. Noutro recipiente, e com ajuda de uma placa térmica ou de um microondas, dissolver bem os ingredientes da Mistura I agitando com frequência até levantar fervura. Adicionar nesta altura a Mistura II e levar a ferver, agitando sempre, até ficar moderadamente pastoso. Retirar do lume e adicionar 50 ml de uma solução de Nipagin a 10% em etanol a 70%. Misturar bem e, antes que o meio de cultura solidifique, verter em cada tubo de cultura um volume que ocupe cerca de 1-2 cm de altura. Vedar cada tubo de cultura com uma rolha de algodão cardado. Deixar secar durante dois dias e embutir um pequeno pedaço de papel de filtro com 2,5 cm de altura para remover a humidade formada à superfície do meio de cultura. Conservar os tubos de cultura a 4°C bem embrulhados num saco plástico se não forem utilizados no prazo de uma semana. Caso o meio de cultura fique ressequido, adicionar uma a duas gotas de água para re-hidratar.

Observação de *Drosophila*

A observação dos diferentes fenótipos e a distinção dos sexos é feita à lupa, mantendo os insectos imóveis durante alguns minutos. Para isso sujeitam-se os indivíduos a uma breve anestesia (durante 30 a 40 segundos) com vapores de éter sulfúrico. Como eterizador pode ser usado um frasco de compota contendo no fundo um pedaço de algodão embebido num pequeno volume de éter sulfúrico. Os insectos não podem contactar directamente este líquido, o que seria fatal. Para que fiquem apenas sujeitos à atmosfera saturada de vapores etéricos, os insectos ficam retidos num funil de plástico cuja extremidade fina foi vedada com um pouco de gaze ou de *collant* de senhora, de forma a permitir a passagem dos vapores. O eterizador tem que estar sempre bem vedado com uma tampa para se formar uma atmosfera saturante, pelo que é apenas aberto na altura da anestesia. Para remover os insectos dos tubos de cultura convém dar umas pequenas pancadas para que os indivíduos se afastem da rolha e, num movimento rápido e decidido, inverter o tubo de cultura sobre a boca larga do funil. Para que os insectos caiam sobre a gaze é conveniente percutir repetidamente o conjunto tubo-funil de forma a impedir as tentativas de fuga da extremidade fina do funil

introduzida no eterizador. Os insectos anestesiados são colocados sobre um azulejo branco ou um pedaço de papel adequado ao seu transporte e manipulação.

Os indivíduos são manipulados com um pincel de guache para que não sofram danos na sua integridade física. Na altura dos insectos serem re-introduzidos nos tubos de cultura deve-se evitar que eles fiquem colados ao meio de cultura. Para isso, os insectos são depositados nas paredes do tubo até recuperarem da anestesia e os tubos devem ser colocados deitados sobre a bancada.

A realização de cruzamentos genéticos implica uma identificação correcta dos machos e das fêmeas. Na realidade existe um dimorfismo sexual bem acentuado no abdómen do adulto. Enquanto que as fêmeas apresentam uma alternância típica de listas claras e escuras nos segmentos abdominais, os machos apresentam a extremidade do abdómen negra devida à fusão (coalescência) dos segmentos terminais (Fig. 2). Porém, estas diferenças não são óbvias nos indivíduos recentemente eclodidos da pupa devido à sua fraca pigmentação. A observação da zona genital masculina e feminina também não permite uma distinção perfeita. O critério verdadeiramente objectivo para distinguir o sexo baseia-se na observação de uma estrutura pilosa, denominada pente sexual, que os machos possuem na base do metatarso do par de patas anterior, ou seja, no primeiro par de patas junto à cabeça (Fig. 3). As fêmeas não possuem esta estrutura em nenhum dos seus três pares de patas, e os machos também não apresentam pente sexual no segundo e no terceiro pares de patas.

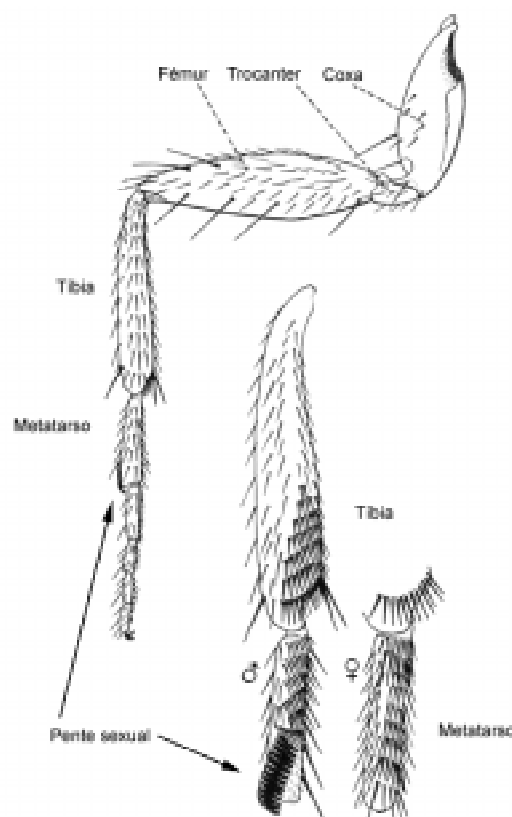


Figura 3 – Pata anterior de um macho e ampliação do metatarso masculino e feminino para evidenciar o pente sexual.

Protocolo de cruzamentos

O protocolo de cruzamentos genéticos deve ter em conta alguns cuidados básicos dos quais se destacam a utilização de linhas puras e de fêmeas virgens e a realização de cruzamentos parentais recíprocos:

Os indivíduos a cruzar devem ser provenientes de linhas puras, isto é de stocks onde todos os indivíduos são iguais para uma determinada característica, por exemplo olhos brancos, e quando cruzados entre si originam sempre esse fenótipo.

As fêmeas utilizadas no cruzamento inicial (cruzamento parental, P) devem estar virgens, isto é, ainda não terem atingido a maturidade sexual, pois caso contrário correr-se-ia o risco de terem sido fecundadas pelos machos do seu stock de proveniência; para ultrapassar este problema os frascos de stock são completamente esvaziados de insectos adultos e ao fim de 6 horas observam-se os indivíduos que entretanto eclodiram da pupa, sendo as fêmeas separadas para um novo tubo até serem cruzadas. Como os machos e as fêmeas apenas atingem a maturidade sexual decorridas 12 horas de eclosão da pupa, as fêmeas assim isoladas estarão certamente virgens.

Devem efectuar-se cruzamentos parentais recíprocos de forma a identificar logo na F1 (primeira geração filial) se algum gene está localizado num cromossoma sexual. Assim, se na geração parental forem cruzados machos de olhos brancos com fêmeas de corpo amarelo deve-se efectuar em paralelo um cruzamento parental recíproco de machos de corpo amarelo com fêmeas de olhos brancos.

O protocolo de cruzamentos tem de ter em conta a duração do ciclo de vida (12 dias) para evitar que as diversas gerações se misturem. Assim, depois de permanecerem 7 dias no tubo de cruzamento, os indivíduos adultos são transferidos para outro tubo, ou eliminados, para que não se cruzem com os seus descendentes, que nessa altura ainda estão na fase de ovo, larva ou pupa. Para manter o controlo, os indivíduos de cada geração são cruzados entre si, o que contrariamente ao que acontece na espécie humana não acarreta qualquer tipo de incompatibilidade.

<u>Primeiro dia</u> –	Realizar o cruzamento parental.
<u>Sétimo dia</u> –	Remover os progenitores do tubo (transferi-los para um novo tubo ou eliminá-los).
<u>Décimo-quarto dia</u> –	Observar o fenótipo da descendência F1, contar e distinguir os sexos. (Atendendo à duração do ciclo de vida, todos os indivíduos que nascerem neste tubo até ao vigésimo-terceiro dia serão certamente da F1).

Cruzar os indivíduos da F1 (F1 x F1) num novo tubo.

Vigésimo-primeiro dia – Remover os adultos da F1 do tubo (transferi-los para um novo tubo ou eliminá-los).

Vigésimo-oitavo dia - Observar o fenótipo da descendência F2, contar e distinguir os sexos. (Atendendo à duração do ciclo de vida, todos os indivíduos que nascerem neste tubo até ao trigésimo-sétimo dia serão certamente da F2).

Concluir quantos genes estão em jogo, quais os alelos dominantes e recessivos e se algum deles se localiza num cromossoma sexual.

Num próximo artigo iremos planificar protocolos concretos de cruzamentos e efectuar a análise genética dos resultados previstos.

Fornecedores

Informações completas sobre *Drosophila* podem ser obtidas através da *Internet* na principal base de dados e nos *links* aí referenciados (<http://flybase.bio.indiana.edu:7081/>).

Stocks de *Drosophila* do tipo selvagem e mutantes existem em algumas Universidades Portuguesas e podem ser adquiridos, por exemplo, na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (ruigomes@cii.fc.ul.pt) ou no *Umea Drosophila Stock Center* (Karin.Ekstrom@genetik.umu.se).

Os tubos de plástico descartáveis ou de vidro (volume mínimo 23 ml - 75 x 23 mm), base plana, para cultura de *Drosophila* podem ser adquiridos à firma Sarstedt, Estrada Nacional 247, Km 70,2 RAL, 2710 Sintra (tel. 219156010).

Levedura de cerveja (ou extracto de levedura), melão de cana e farinha de milho podem ser adquiridos em qualquer supermercado, mercearia ou loja de produtos dietéticos.

Éter sulfúrico, algodão cardado, agár comercial e Nipagin-M podem ser adquiridos à firma José M. Vaz Pereira, Lda., Rua das Maçarocas, 18, Abrunheira 2710 Sintra (tel. 219250144).

Glossário

Alelo – Uma das formas de existência de um gene. Por exemplo, para o gene do albinismo, nós podemos herdar de um progenitor uma cópia normal para a cor da pele (alelo selvagem) e herdar do outro progenitor uma cópia mutada (alelo mutante para o albinismo).

Alelo dominante – Aquele alelo que em heterozigotia no diplóide expressa o seu fenótipo e se sobrepõe à expressão do alelo herdado do outro progenitor.

Alelo recessivo – Aquele alelo que em heterozigotia no dipóide não manifesta o seu fenótipo.

Características – Por exemplo, cor dos olhos, tamanho das asas, cor do cabelo, estatura, etc.

Cruzamento parental (P) – Cruzamento dos progenitores iniciais.

Diplóide – Ser vivo que contém duas cópias de cada gene, um herdado no cromossoma paterno e o outro herdado no cromossoma homólogo materno.

Drosophila (pronuncia-se drosófila) – Mosca do vinagre, *fruit fly*.

F1 (Primeira geração filial) – Descendência obtida do cruzamento parental.

F2 (Segunda geração filial) – Netos do cruzamento parental, descendência obtida do cruzamento dos indivíduos da F1 entre si.

Fenótipo – Aspecto do indivíduo para uma determinada característica. Por exemplo, para a característica “cor dos olhos” o fenótipo normal (selvagem) é olhos vermelhos, mas há mutantes de fenótipo olhos brancos.

Gene – Unidade de informação genética, segmento de DNA que codifica uma cadeia polipeptídica, um RNA ribossomal ou um RNA de transferência.

Genoma – O conjunto dos genes contidos em todos os cromossomas do indivíduo.

Heterozigótico – Híbrido, aquele diplóide que contém dois alelos com informação contrastante.

Homozigótico – O mesmo que linha pura, aquele que contém dois alelos iguais (ambos dominantes ou ambos recessivos).

Ligado ao sexo – Gene localizado num cromossoma sexual.

Linha pura – O mesmo que homozigótico; diz-se dos stocks onde os indivíduos são todos iguais entre si para uma determinada característica, e quando cruzados entre si originam sempre indivíduos com o mesmo fenótipo.

Selvagem – A forma que predomina na Natureza.