

Instituto Politécnico de Lisboa
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

**Otimização do método de Criopreservação de embriões de
*Drosophila melanogaster***

Ana Rita Gonçalves Pereira

Orientador: Doutora Edna Soraia Ribeiro – Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa – ESTeSL

Orientador: Doutora Isabel Dantas de Campos - Fundação Champalimaud

Mestrado em
Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, setembro 2023

Instituto Politécnico de Lisboa
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Otimização do método de Criopreservação de embriões de *Drosophila melanogaster*

Ana Rita Gonçalves Pereira

Orientadores:

Doutora Edna Soraia Ribeiro – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa –
ESTeSL

Doutora Isabel Dantas de Campos - Fundação Champalimaud

Júri:

Presidente: Doutora Carina Alexandra Ladeira – Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa – ESTeSL

Arguente: Doutora Patrícia Carla Rodrigues – Centro Médico de Assistência à
Reprodução - CEMEARE

Mestrado em **Tecnologias Clínico-Laboratoriais**

Lisboa, setembro 2023

Otimização do método de Criopreservação de embriões de *Drosophila melanogaster*

Ana Rita Gonçalves Pereira

2023

Este projeto foi desenvolvido na instituição **Fundação Champalimaud**, numa plataforma científica, sob supervisão da Doutora Isabel Dantas de Campos.

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar a presente dissertação e de a divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor.

Copyright© 2023 – Ana Rita Pereira

Agradecimentos

Queria agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras, em especial à Doutora Isabel Campos, por todo o apoio e conhecimento científico transmitido, sem a sua ajuda nada teria sido possível.

Em segundo lugar à Catarina, amiga e colega de trabalho que ajudou incansavelmente em tudo o que podia, desde transmitir o seu conhecimento por este modelo animal, até ao apoio psicológico quando mais precisei e ao João, amigo e colega que me deu apoio imprescindível durante também todo este longo período.

Às colegas da Fly Facility da Fundação Champalimaud, que ajudaram sempre em tudo o que foi preciso e principalmente que forneceram todo o material necessário para a realização deste projeto. Aos colegas do Biotério também da Fundação, que garantiram que muito do meu trabalho continuasse a ser realizado na minha ausência.

Aos meus amigos, que compreenderam as minhas ausências e que estiveram sempre lá, e talvez a mais importante, à minha mãe que me apoiou sempre nestas aventuras e que me fez chegar até aqui.

Resumo

Introdução: A manutenção de organismos-modelo, como a *Drosophila melanogaster*, é essencial para o desenvolvimento da investigação biomédica. Isso pode ser feito através de cruzamentos ou criopreservação. A criopreservação oferece vantagens, incluindo estabilização genética, redução de custos e prevenção de perda de stocks. No entanto, a criopreservação de insetos, como a *Drosophila melanogaster*, era desafiadora até recentemente. Um protocolo eficaz foi desenvolvido em 2021, tornando-se crucial, pois insetos são usados cada vez mais em investigação científica, incluindo manipulação genética. Isso é especialmente importante para centros de investigação e distribuição de stocks, impactando toda a comunidade científica.

Objetivo específico: Otimizar a criopreservação de embriões de diferentes linhas de *Drosophila melanogaster*, incluindo linhas amplamente utilizadas e garantir a recuperação bem-sucedida de animais saudáveis após a descongelação.

Material e métodos: Os embriões são recolhidos em placas de petri, a partir de uma garrafa avultada de moscas com idades entre ~4-5 dias. Vinte e duas horas depois (incubação a 20°C), estes são descorionados e permeabilizados, passando de seguida ao processo de desidratação e entrada intra-embrionário do agente crioprotetor. Segue-se a congelação em azoto líquido provocando a congelação por vitrificação dos embriões. Para descongelação, estes são transferidos para sucrose e criotampão para a saída do CPA e transferidos para meio Schneider para posterior incubação.

Resultados: Os resultados obtidos demonstraram a existência de uma percentagem muito reduzida de embriões desenvolvidos até estruturas larvais após descongelamento, nas três temperaturas testadas. No geral a percentagem de embriões desenvolvidos para larvas rondou entre 1,3 e 4,7%, enquanto a percentagem de larvas com locomoção/vivas rondou entre 1,2 e 2,7%. No que diz respeito a moscas eclodidas a partir das larvas vivas, as percentagens não foram além dos 0,1 e 0,2%. De um modo geral, os dados obtidos demonstraram que a permeabilização dos embriões não foi eficiente, condicionado todo o restante processo de criopreservação.

Conclusão: Os resultados indicam que a criopreservação de embriões de *D. melanogaster* é uma técnica desafiadora, requerendo adaptações às diferentes linhas genéticas e a fatores ambientais. A temperatura ambiente, entre 18-25°C, parece ser a ideal para a incubação pós-descongelamento, com melhores taxas de desenvolvimento larvar. No entanto, a maioria dos embriões não alcança o estágio larvar após o descongelamento nas três temperaturas testadas e menos de 1% chega a moscas eclodidas. Para melhorar o protocolo, é sugerido que a permeabilização adequada dos embriões no estágio de desenvolvimento correto seja crucial para o sucesso da vitrificação. **Palavras-chave:** criopreservação; vitrificação, *D. melanogaster*, embriões, desenvolvimento embrionário.

Abstract

Introduction: Model-organism maintenance, such as *Drosophila melanogaster*, is essential for the development of biomedical research. That maintenance can be done through crosses or cryopreservation. Cryopreservation offers advantages, including genetic stabilization, cost reduction and prevention against the loss of stocks. However, insect cryopreservation, like *Drosophila melanogaster*, has been very challenging to achieve. Recently, in 2021, It was developed an effective protocol, which is vital to all researchers given the usage of this model in all scientific research, including genetic manipulation. This is very important for research centers and stocks distribution, having impact in all scientific community.

Aim: Optimize embryo cryopreservation of different strains of *Drosophila melanogaster*, including strains widely used and guarantee the successful revival of frozen embryos into healthy adult flies.

Methods and materials: Embryos are harvest in petri dishes from flies with 4-5 days old in a cage. Twenty-two hours later (incubation at 20°C), embryos are dechorionated and permeabilized. After which cell dehydration and cryoprotective agent entrance begin. Afterwards, embryos are frozen into Ln2 by vitrification. For thaw, embryos are transferred to a solution containing sucrose and a cryobuffer that leads to the release of CPA from inside of the embryo. Embryos are then transferred to Schneider medium following by incubation.

Results: All the results obtained show a very small percentage of developed embryos that into larval structures after thawing, in all three different temperatures tested. In general, percentages of embryos that developed into larvae are between 1,3% and 4,7%, Although percentages of live larvae were between 1,2% and 2,7%. When considering hatched flies that came from alive larvae (after thawing) the percentages were around 0,1% and 0,2%. These results shown that embryo permeabilization was not effective, conditioning all the cryopreservation process.

Conclusion: Results show that *D. melanogaster* embryo cryopreservation is a very defiant technique, requiring adaptations to different strains and also ambiental factors. Room temperature between 18-25° seems to be ideal for incubation after thawing, with better results on the larvae development. However, mostly of the embryos do not reach the larval stage after thawing, in all three different temperatures tested and less than 1% reaches the adult fly. To improve the protocol, it is suggested that an efficient permeabilization of embryos in the correct embryo stage it is crucial for the vitrification success.

Keywords: cryopreservation, vitrification, *D. melanogaster*, embryos, embryonic development.

Índice geral

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Índice geral.....	IX
Índice tabelas.....	XI
Índice de figuras.....	XIII
Abreviaturas.....	XIV
1. Capítulo 1- Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	2
2. Capítulo 2 - Estado de arte.....	3
2.1 Contextualização histórica da investigação com <i>D. melanogaster</i>	3
2.2. Descobertas importantes com recurso a <i>D. melanogaster</i>	4
2.3 Vantagens da utilização de <i>D. melanogaster</i> em estudos experimentais.....	6
2.4 Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	8
2.5. Fertilização e desenvolvimento embrionário.....	10
2.6. Breve descrição das divisões embrionárias de <i>D. melanogaster</i> – Embriogénese	11
2.6.1 Estádio 16 de desenvolvimento embrionário.....	14
2.7 Criopreservação.....	17
2.7.1 Congelamento lento.....	19
2.7.2 Vitrificação.....	20
2.8 Criopreservação de embriões de dípteros (insetos).....	24
3. Capítulo 3 – Materiais e métodos.....	26
3.1 Variáveis em estudo.....	26
3.2. Linhagens usada para o estudo.....	26
3.4 Procedimentos.....	27
3.4.1 Recolha de embriões.....	27
3.4.2 Descorionação – remoção do córion.....	29
3.4.3 Permeabilização.....	31
3.4.4 Desidratação, entrada do CPA (crioprotetor) e congelação.....	32
3.4.5 Descongelação e recuperação de embriões.....	34
3.4.6 Armazenamento contínuo de embriões criopreservados em azoto líquido (N ₂)	35
4. Capítulo 4 - Resultados e Discussão.....	36

4.1.1 Testagem da temperatura de incubação pós-descongelamento de embriões da linha w ¹¹¹⁸	37
4.1.2 Testagem da temperatura de incubação pós-descongelamento de embriões da linha attP40	41
4.1.3 Testagem na permeabilização	42
4.1.3.1 Permeabilização com protocolo inicial, sem processo de entrada de CPA (etilenoglicol) e sem congelação.	42
4.1.3.2 Permeabilização com protocolo inicial, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol).....	43
4.1.3.3 Aumento de exposição na permeabilização, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol).....	44
4.1.3.4 Protocolo inicial de permeabilização, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol) contendo corante Rodamina B.	45
4.1.3.5 Protocolo inicial de permeabilização, com exposição de 5 e 10 min. a solução com Rodamina B, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol).	46
4.1.3.6 Menor tempo de recolha de embriões, com protocolo inicial de permeabilização, com exposição de 10 min. a uma solução com Rodamina B e com entrada e saída de CPA (etilenoglicol).	47
4.2 Discussão dos resultados	48
5. Capítulo 5 - Considerações finais	53
5.1. Conclusões	53
5.2. Limitações ao estudo e Perspetivas futuras	54
6. Capítulo 6 - Referências bibliográficas	56
7. Apêndices	65
7.1. Apêndice I: Tabela 7.1 – Recolha de dados das três temperaturas testadas pós-descongelamento (temp. ambiente 18-25°C, 25°C e 22°C).	65
7.2. Apêndice II: Reagentes	66

Índice tabelas

Tabela 1: Representação em percentagens dos resultados pós-descongelamento da linha attP40	41
Tabela 2 - embriões com processo de descorionação com permeabilização	42
Tabela 3: embriões com processo de descorionação, permeabilização e entrada e saída de CPA	43
Tabela 4: embriões com processo de descorionação e com aumento de tempo na permeabilização e Schneider	44
Tabela 5: embriões com processo de descorionação, com aumento de tempo na permeabilização, entrada e saída de CPA, sucrose e Schneider	44
Tabela 6: embriões com processo de descorionação, permeabilização, exposição ao etilenoglicol juntamente com rodamina B, sucrose e Schneider	45
Tabela 7: embriões com processo de descorionação, permeabilização, exposição por 5 minutos á solução aquosa de Rodamina B, exposição ao etilenoglicol, sucrose e Schneider	46
Tabela 8: embriões com processo de descorionação, permeabilização, exposição por 10 minutos á solução aquosa de Rodamina B, exposição ao etilenoglicol, sucrose e Schneider	46
Tabela 9: embriões com redução na recolha para 30 minutos, expostos à descorionação, permeabilização, rodamina B, etilenoglicol 13 e 39%, sucrose e Schneider.	48

Índice de figuras

Figura 2. 1 - Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Figura 2. 2 - Ovo/embrião de <i>Drosophila melanogaster</i> visto do exterior, em visão lateral e dorsal.....	11
Figura 2. 3 - Doze desenhos de embriões de idades crescentes para ilustrar os principais eventos do desenvolvimento embrionário de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Figura 2. 4 - De (A) a (E) são cortes parasagitais de um embrião em estágio 16.....	15
Figura 2. 5 - (D) e (E) seções horizontais de um estágio 16 tardio de embrião de <i>Drosophila</i>	16
Figura 3. 1 – Esquema de manutenção de stock e recolha de embriões.....	29
Figura 3. 2 – cesto - 70 µm rede de Nylon. 2,5 cm de largura.....	29
Figura 3. 3 - Esquema do processo de descorionação.	30
Figura 3. 4 – Embriões à florescência.....	31
Figura 3. 5 - Embriões em etilenoglicol	33
Figura 3. 6 – Criorede e criorede com embriões para congelação em azoto líquido	33
Figura 3. 7 - Placas para processo de descongelação e posterior incubação.	35
Figura 3. 8 – Caixa de armazenamento de embriões em arca de azoto líquido.	36
Figura 4. 1 – Linha cronológica do desenvolvimento dos embriões pós-descongelamento e incubação overnight, na três temperaturas testadas na linha w1118.....	38
Figura 4. 2 – Representação gráfica da análise em percentagens dos resultados da descongelação da linha w1118.....	39
Figura 4. 3 – Representação gráfica da análise em percentagens de larvas vivas e moscas eclodidas após descongelação na linha w1118.	40
Figura 4. 4 – Linha cronológica do desenvolvimento dos embriões pós-descongelamento e incubação overnight a 22°C, na linha attP40.	41
Figura 4. 5- Embriões corados com rodamina B.	47

Abreviaturas

CPA	Agente crioprotetor
W¹¹¹⁸	Linha white
<i>y[1], w[67c23];P(CaryP)attp40;;</i>	Linha attp40
NL₂	Azoto líquido
CPAs	Agentes crioprotetores
NP-CPAs	agentes crioprotetores não permeáveis
P-CPAs	Agentes permeáveis
EG	Etilenoglicol

1. Capítulo 1- Introdução

A manutenção e preservação de amostras biológicas para utilização nas áreas clínicas e investigação é uma prática bem estabelecida e de utilidade inquestionável para o funcionamento da própria atividade (Jungare et al., 2022) (Bojic et al., 2021).

Em diversas áreas de investigação biomédica, o objeto de interesse não é um tecido, um órgão ou fração, mas antes um organismo completo que importa estudar vivo. Em particular, quando se faz uso de organismos-modelo, geram-se animais mutantes e transgênicos de interesse experimental. A manutenção destes organismos tem de ser assegurada para a continuidade dos estudos e tal pode acontecer de duas formas: manutenção dos animais vivos através de cruzamentos e reprodução das linhas ao longo das gerações; ou, em alternativa, criopreservação dos animais, suas formas embrionárias ou linhas germinativas para recuperação posterior (Matthews, 1994).

Um exemplo destes organismos que tem de ser mantidos *in vivo*, é a *Drosophila melanogaster*, mais conhecida como mosca-da-fruta. Neste momento existem mais de 160.000 genótipos exclusivos de *Drosophila* mantidos em laboratórios de investigação individuais e em centros de stocks em todo o mundo (Zhan et al., 2021). Só em 2019, mais de 76.191 culturas de stocks de *Drosophila melanogaster* estavam a ser mantidas em Bloomington Drosophila Stock Center, nos EUA para investigação e conservação (DeBardlabon et al., 2022).

Este organismo-modelo é amplamente usado por investigadores de todo o mundo e aquele onde as ferramentas de manipulação genética estão mais desenvolvidas (Jordan Gladman, 2016).

Atualmente, a manutenção de stocks de linhas de *Drosophila* e seus métodos de criação requerem manutenção manual regular (DeBardlabon et al., 2022), através de transferência frequente de animais adultos para tubos com meio de cultura fresco, o que acarreta grandes custos tanto a nível de recursos humanos como a nível de consumíveis.

Os custos associados à manutenção desta espécie de díptero podem ser reduzidos se os stocks foram mantidos a uma temperatura sub-ótima que retarda o metabolismo e desenvolvimento, nomeadamente utilizando temperaturas de 18°C em vez de 25°C. Nestas condições, em vez das típicas 2 semanas até o organismo adulto (e 4 semanas até a necessidade de renovação do meio de cultura), de 4 semanas até ao organismo adulto e 6 semanas até à necessidade de mudança de meio de cultura. Outra estratégia interessante a ser implementada é a criopreservação, que é um método confiável e muito

mais económico a longo prazo, já em uso para armazenamento e conservação de germoplasma masculino e feminino, bem como de embriões (DeBardlabon et al., 2022).

A criopreservação de embriões de *Drosophila* irá oferecer enormes vantagens, tais como, proteção contra derivação genética estabilizando genótipos e permitindo estudos genéticos e evolutivos, diminuição de custos de manutenção de stocks, redução do risco de perda de stocks preciosos devido a contaminação ou mistura acidental com um outro stock (Zhan et al., 2021) (Jordan Gladman, 2016) perda de colónias devido a doenças, mutações e endogamia (DeBardlabon et al., 2022).

A criopreservação de embriões de espécies de vertebrados organismos-modelo em investigação biomédica (por ex. peixe-zebra ou murganho) é uma prática já bem estabelecida em muitos institutos de investigação, no entanto, a criopreservação de insetos, em particular *Drosophila melanogaster* não é ainda possível de forma fiável e reprodutível.

Até há bem pouco tempo, ainda não se tinha conseguido um protocolo eficaz para a criopreservação de embriões destes animais, quer devido à falta de reprodutibilidade, quer ao nível de complexidade do processo e dos dispositivos especializados que são necessários (Zhan et al., 2021). Em 2021, Zhan e colegas publicaram um protocolo de criopreservação de *Drosophila* com resultados bastantes promissores em todos os aspetos, nomeadamente na recuperação de animais depois da descongelação do embrião e na reprodutibilidade em diferentes linhas.

O desenvolvimento de protocolos de criopreservação de insetos, mesmo em pequena escala, está a tornar-se mais importante à medida que insetos de importância económica estão sendo cada vez mais usados em investigação, incluindo manipulação genética (Rajamohan et al., 2015)

Para centros distributivos de stocks e plataformas de apoio à investigação com recurso a este modelo, uma solução de criopreservação das linhas de interesse reveste-se de maior importância e tem um impacto em toda a comunidade científica.

1.1 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi otimizar a criopreservação de embriões de *Drosophila melanogaster* em estágio inicial, de forma a contribuir para a comunidade científica biomédica, reduzindo horas de trabalho despendidas na manutenção de stocks

de *Drosophila melanogaster* e respetivos gastos envolvidos, trazendo benefícios para todos os grupos de investigação que usem este modelo animal. Como objetivo específico, este trabalho pretende criopreservar por vitrificação linhas de interesse e de grande utilização por parte da comunidade científica, tanto linhas base como linhas transgênicas (mutantes). Posteriormente à criopreservação, será crucial testar o processo de descongelamento, tendo como objetivo conseguir animais vivos e saudáveis, com todas as características adjacentes às linhas de partida.

2. Capítulo 2 - Estado de arte

2.1 Contextualização histórica da investigação com *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* tem sido amplamente utilizada como organismo experimental em estudos de genética desde o início de 1900. Atualmente, este organismo é amplamente utilizado não apenas em genética molecular, mas também, em bioquímica, técnicas biológicas e fisiológicas celulares, e também para pesquisa de problemas que requerem uma abordagem multidisciplinar, como os da biologia do desenvolvimento e da neurobiologia (Rubin, 1988).

Estudos genéticos com *Drosophila* começaram no laboratório de T. H. Morgan na Universidade da Columbia em 1909 (Rubin, 1988). Um ano depois, Morgan descreveu o isolamento do primeiro mutante de *Drosophila*, com olho branco, e a observação de que a herança desta característica estava ligada ao cromossoma sexual. Estes estudos levaram Morgan a concluir que a característica do olho branco, a que ele chamou de *gene branco*, deverá ser transportada no cromossoma X o que, por sua vez, levou à descoberta da hereditariedade ligada ao sexo (Morgan, 1910).

As descobertas sobre o papel desempenhado pelo cromossoma na hereditariedade, levaram a que Thomas Hunt Morgan recebesse o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina em 1933 (Markow, 2015) (Jennings, 2011).

As abordagens genéticas dominaram os primeiros 50 anos de pesquisa em *Drosophila melanogaster*, entre 1910 e 1960, com foco em dissecar os princípios da herança. O uso de uma riqueza inigualável de ferramentas, neste período, permitiu também descobertas importantes no desenvolvimento e função do sistema nervoso (Bellen et al., 2010).

A mosca da fruta tem desempenhado um papel cada vez mais importante na criação de modelos animais de doenças humanas. De facto, o número de investigadores que usa a *D. melanogaster* como modelo para estudo de doenças humanas está a aumentar constantemente, especialmente na área de distúrbios complexos, como doenças cardíacas, mentais, neurológicas e obesidade (Markow, 2015).

Atualmente, a *Drosophila* é um dos organismos modelo mais utilizado em investigação em neurociências e doenças neurodegenerativas, incluindo Huntington, Alzheimer e Parkinson (Marsh & Thompson, 2006) (Stephenson & Metcalfe, 2013). Isso é possível porque a mosca da fruta possui um sistema nervoso que permite executar tarefas neuronais complexas, como aprendizagem e memória, semelhantes às dos humanos. O sistema nervoso da *Drosophila* é composto por cerca de 100.000 neurónios e, apesar do cérebro de uma mosca ter uma estrutura anatómica diferente da humana, muitas características-chave do desenvolvimento e função desse sistema permanecem as mesmas (Whitworth J. A et al., 2006).

Após a conclusão da sequenciação do genoma da *D. melanogaster*, estimou-se que 61% dos genes humanos associados a doenças tinham sequências homólogas em mosca e, para algumas doenças como o cancro, este número subia para 68% (Rubin et al., 2000). Mais tarde, descobriu-se que até 77% dos genes associados a doenças genéticas humanas têm alta semelhança com genes em *Drosophila* (Reiter et al., 2001).

Usando melhores ferramentas para deteção de mutações, estudos de associação e análise de todo o genoma, o número de genes humanos associados a doenças genéticas está a aumentar constantemente. Os modelos de *Drosophila* podem contribuir para a investigação de doenças humanas de várias maneiras, nomeadamente estabelecendo o papel normal de produtos génicos durante o desenvolvimento, elucidando o mecanismo subjacente à patologia da doença e até identificando agentes terapêuticos candidatos para o tratamento de doenças humanas (Pfleger & Reiter, 2008).

2.2. Descobertas importantes com recurso a *D. melanogaster*

As ferramentas e métodos mais importantes desenvolvidos em investigação com *Drosophila* no período entre os anos 1910-1960, incluem os cromossomas balanceadores (Muller, 1927). Os cromossomas balanceadores impedem a recombinação homóloga e permitem que os investigadores mantenham mutações em stocks heterozigotos de *D. melanogaster*, sem ter que genotipar os animais para reprodução posterior. Assim, mutações em genes essenciais podem ser facilmente estudadas. A *D. melanogaster*

ainda é o único organismo multicelular no qual mais de 95% das mutações em genes essenciais podem ser mantidas de forma fácil e eficaz (Bellen et al., 2010).

Após a descoberta do gene branco por Thomas Hunt Morgan, também houve descobertas em neurociência e neuro-desenvolvimento, como a importância do *Notch* no desenvolvimento embrionário, identificado por Poulson em 1937 (Poulson, 1937).

Herman J. Muller, posteriormente ao Prêmio Nobel de Morgan em 1933, recebeu também ele o prêmio em 1946 “pela descoberta da produção de mutações por meio de irradiação de raios X” (Muller, 1927) (Muller, 1928). Este descobriu que o número de mutações genéticas observadas nas moscas-das-frutas aumentava quando expostas aos raios-x, descobrindo assim que quanto maior a dose de raios-x e outras radiações ionizantes às quais as moscas foram expostas, maior o número de mutações que ocorreram (Site “The Nobel Prize”). No final da década de 1960, também ocorreu outra grande descoberta em *D. melanogaster* sobre a base dos ritmos circadianos, descrito por Seymour Benzer (Benzer, 1967). Em 1995, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido a Edward Lewis pelos seus estudos com *Drosophila* para elucidar estruturas de genes, bem como a Eric Weischaus e a Christiane Nüsslein-Volhard pelos seus trabalhos pioneiros em embriogênese e na identificação de um grande número de genes envolvidos em todos os aspectos do desenvolvimento da *Drosophila*, incluindo a segmentação (Lewis, 1978) (Nüsslein-Volhard C. & Wieschaus E., 1980).

Christiane e Eric identificaram e classificaram 15 genes de importância fundamental na determinação do plano corporal e na formação de segmentos corporais da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, enquanto Edward Lewis estudou o próximo passo – genes homeóticos que governam o desenvolvimento de um segmento larval num segmento corporal específico. ‘Homeótico’ significa que algo foi transformado à semelhança de outra coisa. Lewis encontrou uma co-linearidade no tempo e no espaço entre a ordem dos genes do complexo bitóraxico e as respectivas regiões de efeito nos segmentos (Site “The Nobel Prize”).

Alguns anos depois da sequenciação de todas as regiões eucromáticas da *Drosophila* (Myers et al., 2000), o projeto do genoma humano também foi concluído (*Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome International Human Genome Sequencing Consortium**, 2004). A análise de ambos os genomas revelou altas homologies entre os dois organismos e confirmou a importância da *Drosophila* como modelo para estudos de doenças humanas (Adams et al., 2000).

Em 2011 Jules A. Hoffmann também recebeu o prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia, devido às “descobertas sobre a ativação da imunidade inata” em *Drosophila*. Hoffmann demonstrou que um gene particular, denominado “*Toll*”, era necessário para as moscas da fruta combaterem uma infecção fúngica (Hoffmann et al., 1996); (Lemaitre et al., 1996). Quando Hoffmann infetou as moscas-das-frutas com bactérias ou fungos, descobriu que os mutantes *Toll* morriam porque não conseguiam “construir” uma defesa eficaz. Consequentemente concluiu que o produto do gene *Toll* estava envolvido na detecção de microrganismos patogênicos e a ativação de *Toll* era necessária para uma defesa bem-sucedida contra eles (Hoffmann et al., 1996).

Mais recentemente, em 2017, este prêmio foi concebido aos Drs. Hall, Rosbash e Young, pela “descoberta dos mecanismos moleculares que controlam o ritmo circadiano” também em *Drosophila melanogaster* (Lorenz et al., 1989; Van Laake et al., 2018).

Como total este modelo animal já contribuiu, em pesquisa científica, até aos dias de hoje para cinco prêmios Nobel da Fisiologia ou Medicina, todas elas com contribuições bastante importantes para a ciência e medicina deste então.

2.3 Vantagens da utilização de *Drosophila melanogaster* em estudos experimentais

A *Drosophila* oferece várias vantagens exclusivas que garantem que seja um organismo de pesquisa de primeira linha por muitos anos. As manipulações sofisticadas que podem ser realizadas em *Drosophila* são insuperáveis em qualquer outro organismo modelo multicelular (Venken & Bellen, 2005). Essas manipulações permitem que os investigadores coloquem hipóteses precisas sobre processos de sinalização, comportamentos celulares individuais, desenvolvimento de órgãos e comportamento em adulto (Bellen et al., 2010).

Duas características-chave experimentais deste modelo são nomeadamente, a remoção e a adição bem-sucedida e eficiente de genes únicos ou produtos génicos, relevantes para que qualquer organismo modelo seja usado com sucesso em laboratório, o que acontece com a *D. melanogaster* (Bellen et al., 2010). É possível remover 65% dos genes deste organismo de forma direcionada (Bellen et al., 2004), e, alternativamente, é possível projetar mutações no *locus* de interesse por meio da remoção seletiva ou substituição de sequências de genes, a chamada tecnologia de *knockout* direcionado, desenvolvida originalmente por Golic e seus colegas (Rong & Golic, 2001). (Rong et al., 2002).

A adição de genes únicos ou construções de genes em moscas através da transformação mediada pelo elemento P está disponível desde 1982 (Rubin & Spradling, 1982). Esta metodologia tem sido extremamente importante, pois permite a transformação eficiente de moscas com apenas uma única cópia do DNA de interesse – o que não se verifica em muitas outras espécies modelo - e permitiu algumas das manipulações mais sofisticadas do mundo animal (Venken & Bellen, 2007). Este protocolo de transformação foi recentemente significativamente melhorado, usando a tecnologia P[acman], permitindo que pedaços pequenos a muito grandes de DNA sejam inseridos em locais de encaixe específicos espalhados por todo o genoma (Venken et al., 2006). Esta transformação eficiente permitiu o desenvolvimento do sistema de recombinação flipase (FLIP)- *flipase recognition target* (FrT), que permite a criação de regiões de células homocigotas mutantes, inseridas num tecido e contexto de células heterocigotas para a mutação (Golic & Lindquist, 1989). Também permitiu o desenvolvimento do sistema UAS/Gal4, um ativador transcricional em levedura (Stephenson & Metcalfe, 2013), para direcionar a expressão de um gene de interesse para um tecido específico, ou seja, qualquer gene pode ser expresso ectopicamente em quase qualquer tecido ou célula (Brand & Perrimon, 1993). Outra característica interessante na *D. melanogaster* é a análise de mosaico com um sistema de marcador celular repressível (MARCM) e interface de ácido ribonucleico (RNAi), disponíveis para manipulação e facilidade de introduzir genes humanos na mosca (Stephenson & Metcalfe, 2013).

Outros benefícios no uso de *D. melanogaster* estão relacionados com ser muito menos dispendioso e demorado de usar do que um modelo de murganho, por exemplo (Chan & Bonini, 2000), devido ao seu rápido tempo de reprodução e vida útil curta, ou seja, um ciclo de vida muito curto (Rubin, 1988), - cerca de 10 dias a 25°C de um embrião até a mosca totalmente adulta - (Popis et al., 2018); possuir um genoma pequeno; ter alta fecundidade - cada fêmea é capaz de colocar até cerca de 100 ovos por dia, até 20 dias - (Popis et al., 2018) e facilidade na recuperação de mutações (Jordan Gladman, 2016), proporcionando maior rendimento nas experiências. Por outro lado, o facto do genoma ser pequeno também facilita a análise genética molecular (Rubin, 1988)(Parvathi et al., 2009). É ainda relevante ressaltar que a utilização de *Drosophila* para fins experimentais, são abrangidos pela legislação de proteção de animais para fins experimentais (Yamaguchi & Yoshida, 2018).

2.4 Ciclo de vida de *D. melanogaster*

As moscas da fruta são insetos holometábolos, o que significa que sofrem uma metamorfose da sua forma larvar para a passagem à forma adulta (Tyler, 2000; Markow Therese Ann, 2015).

O ciclo de vida da *D. melanogaster* é bastante distinto das espécies vertebradas (Popis et al., 2018) e inclui quatro fases distintas: embrião, larva, pupa e adulto (Flagg, 1981). A primeira fase embrionária, dura cerca de um dia após a fertilização (Popis et al., 2018) e finda com a eclosão da larva tipicamente 18 a 24h após a postura do ovo. No entanto, se o substrato de oviposição disponível não for favorável, as fêmeas podem reter os ovos já fecundados, que são colocados num estágio de desenvolvimento embrionário avançado e eclodem em menos tempo após a postura (Prasad & Joshi, 2003). Após 24h de desenvolvimento embrionário, eclode uma larva que passa os seguintes quatro/cinco dias de desenvolvimento em alimentação e crescimento contínuos (Popis et al., 2018) (Ong et al., 2014).

O desenvolvimento larval dura 4/5 dias e contempla três estádios, L1, L2 e L3. Os dois primeiros estádios larvais têm cerca de 24h de duração cada, enquanto o terceiro dura cerca de 48h (Bakker, 1959) e é a maior das formas larvais (figura 2.1). Neste estágio, a larva começa a subir para fora da comida, de modo a ficar numa área relativamente limpa e seca para entrar no processo de pupação, transformando-se em pupa aproximadamente 30 horas depois (Tyler, 2000).

A cutícula no terceiro estágio larval endurece e escurece para se dar a passagem a pupa que é a fase em que ocorre a metamorfose (Flagg, 1981).

Da fase de pupa, que dura cerca de quatro dias, resulta uma mosca adulta. A maioria dos tecidos pertencentes ao embrião inicial e à larva são descartados durante o estágio de pupa. Na metamorfose, o organismo adulto completo desenvolve-se a partir de populações conservadas de células conhecidas como discos imaginais, induzidas no início do desenvolvimento embrionário (Popis et al., 2018). Estes discos imaginais são constituídos por células diplóides de epitélio indiferenciado, que acabarão por contribuir para o desenvolvimento de estruturas externas de moscas adultas (Ong et al., 2014) tais como as asas, patas, olhos, aparelho bucal e ductos genitais (Tyler, 2000) (Yamaguchi & Yoshida, 2018). Estes discos estão já presentes na larva, onde crescem em tamanho, mas não se diferenciam. Durante o estágio de pupa, eles invertem-se e diferenciam-se

em estruturas adultas (Tyler, 2000), enquanto a maioria dos tecidos larvais sofre autofagia e morte celular (Aguila et al., 2007).

A eclosão da pupa numa *Drosophila* adulta está sob o controlo de um relógio circadiano, e na maioria das linhas do tipo selvagem o pico de eclosão ocorre logo após a transição do escuro para o claro (Pittendrigh & Skopik, 1970).

O tempo médio para o primeiro acasalamento é de 12 a 20 horas após a eclosão da mosca, embora o acasalamento se possa iniciar passado apenas 8-10h. Normalmente, as fêmeas começam a postura de ovos 24 a 48 horas após a eclosão (Prasad & Joshi, 2003), mas atingem o pico de produção entre o quarto e o sétimo dia após a eclosão. Durante esse período, põem ovos quase continuamente a uma taxa de 50 a 70 ovos por dia (Tyler, 2000).

Uma *D. melanogaster* mantida em laboratório vive cerca de 30 a 40 dias se for fêmea e 5 a 10 dias mais, se for macho. No entanto, o tempo de vida dos indivíduos varia consideravelmente, entre os 10 e os 80 dias (Rose et al., 1992). A 21°C, uma cultura fresca de *D. melanogaster* produzirá novos adultos em duas semanas, oito dias em ovo e larva e seis dias na fase de pupa (Flagg, 1981), mas a 25°C, o ciclo pode ser concluído em cerca de 10 dias (Parvathi et al., 2009). Já a 18°C o ciclo pode durar cerca de 19 dias (Matthews, 1994). A exposição contínua a temperaturas acima de 30°C pode resultar em esterilização ou em morte, e a baixas temperaturas a viabilidade das moscas é prejudicada e o ciclo de vida prolongado (Parvathi et al., 2009).

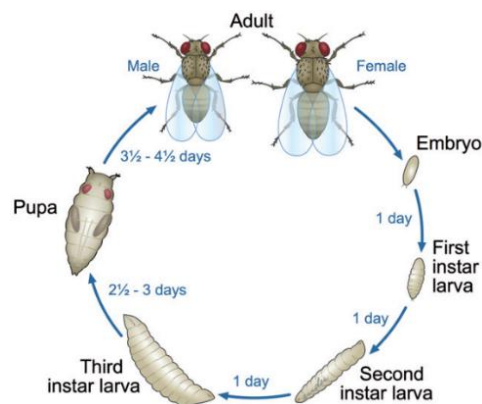


Figura 2. 1 - Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Adaptado de: Ong C, Yung L. L, Cai Y, Bay BH, Baeg G. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 2014; 9(3): 396–403. DOI: 10.3109/17435390.2014.940405.

2.5. Fertilização e desenvolvimento embrionário

Após o acasalamento, o esperma desloca-se através do pênis masculino para o útero feminino, onde depois nada para o receptáculo seminal feminino e espermatecas, onde é armazenado para posterior fertilização (Tyler, 2000). As fêmeas acasaladas armazenam em média 650 espermatozoides, que são usados de maneira altamente eficiente para fertilização posterior. A fertilização em *D. melanogaster* é interna e ocorre após a descida dos oócitos ovulados no útero (Loppin et al., 2015).

Enquanto a ativação do ovo ocorre durante a descida do oócito pelo oviduto, a fertilização ocorre no útero, com a liberação de um único espermatozoide da espermateca e sua entrada no citoplasma do oócito através do micrópilo na parte anterior do ovo (Avilés-Pagán & Orr-Weaver, 2018). O micrópilo é um pequeno canal na membrana vitelina, na extremidade anterior do óvulo, através do qual o espermatozoide entra para o fertilizar (figura 2.2) (Tyler, 2000);(Parvathi et al., 2009);(Hartenstein & Campos-Ortega, 1985). Os oócitos maduros podem ser mantidos no ovário por períodos prolongados se a fêmea não tiver acasalado ou se as condições ambientais não forem as favoráveis. À medida que o oócito passa para o oviduto e é fecundado, ocorrem mudanças dramáticas que são agrupadas sob o título de *ativação do ovo* (Horner & Wolfner, 2008).

Essas alterações começam com o esperma, que fornece dois elementos exclusivos para o novo embrião: o conteúdo de DNA haploide paterno e um único centríolo. A entrada de espermatozoides é coordenada com a conclusão da meiose II, de modo que o pronúcleo feminino mais proximal migra em direção ao pronúcleo masculino, levando à aposição pró-nuclear e ao início da primeira divisão mitótica. A fertilização marca a fase final da transição oócito-embrião, pois as contribuições do DNA materno e paterno são combinadas para gerar um genoma zigótico diploide. A fusão dos cromossomas maternos e paternos ocorre na telófase da primeira divisão mitótica, e é seguido por divisões mitóticas rápidas e sincronizadas. Como a expressão do genoma zigótico não começa até a transição materno-zigótica, as divisões embrionárias iniciais são controladas por stocks maternos de mRNAs e proteínas (Avilés-Pagán & Orr-Weaver, 2018).

As fêmeas acasaladas podem colocar até 100 ovos por dia ou, durante o pico de postura, 8 a 10 ovos a cada 20 minutos (Rabinowitz, 1941). No decorrer da oviposição, os ovos emergem do ovipositor da fêmea (extremidade posterior), que os oviposita preferencialmente numa superfície húmida de alimento. Se a atmosfera estiver muito seca, a fêmea pode-se alimentar, mas não irá ovipositar (Tyler, 2000).

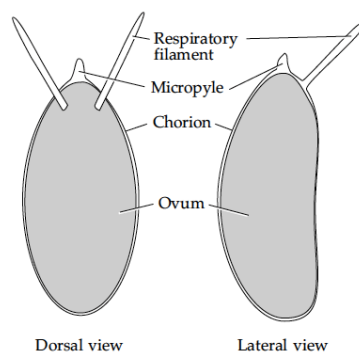


Figura 2. 2 - Ovo/embrião de *Drosophila melanogaster* visto do exterior, em visão lateral e dorsal.

Adaptado de: Tyler Mary S., *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study*. Chapter 8. Development of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. Second Edition, 2000., Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA., ISBN 0-87893-843-5

O ovo de *Drosophila melanogaster* tem cerca de 0,5 milímetros de comprimento. Contém uma membrana externa de revestimento, o córion, que é opaca e mostra um padrão de marcações hexagonais (Parvathi et al., 2009). O córion sendo grosso e duro, é uma estrutura complexa, consistindo em lâminas internas e externas limitando uma camada de pequenas bolsas de ar que se conectam anteriormente com uma extensa malha de espaços aéreos nos filamentos respiratórios. Este design maximiza as trocas gasosas e minimiza a perda de água (Tyler, 2000).

O par de filamentos respiratórios, estendendo-se da superfície ântero-dorsal, evitam que o ovo afunde no alimento macio sobre o qual pode ser depositado (Parvathi et al., 2009) e são responsáveis pela respiração do embrião (figura 2.2) (Tyler, 2000).

O embrião possui cinco camadas de revestimento que são elas (de dentro para fora): a membrana vitelina, a camada cerosa, a camada coriônica interna, o endocório e o exocório (Rand, 2014).

2.6. Breve descrição das divisões embrionárias de *D. melanogaster* – Embriogénese

Após a fertilização, os embriões de *Drosophila* passam por ciclos de divisão nuclear altamente sincronizados (Markow Therese Ann, 2015). Durante a embriogénese inicial o embrião passa por 13 ciclos de divisão nuclear rápidos e sincronizados num citoplasma comum, levando à formação de uma blastoderme sincicial (Avilés-Pagán & Orr-Weaver, 2018); (Hartenstein & Campos-Ortega, 1985) que contém ~6000 núcleos

(Avilés-Pagán & Orr-Weaver, 2018). Após os primeiros nove ciclos de divisão nuclear, a maioria dos núcleos move-se para a zona cortical do embrião onde se dão as últimas quatro divisões nucleares antes da celularização (Markow Therese Ann, 2015).

Os núcleos resultantes destes primeiros 13 ciclos de divisão, celularizam simultaneamente para formar uma blastoderme celular, localizada na zona cortical (figura 2.3 estágio 5). Após a celularização, ocorre a gastrulação e, por fim, o processo de segmentação.

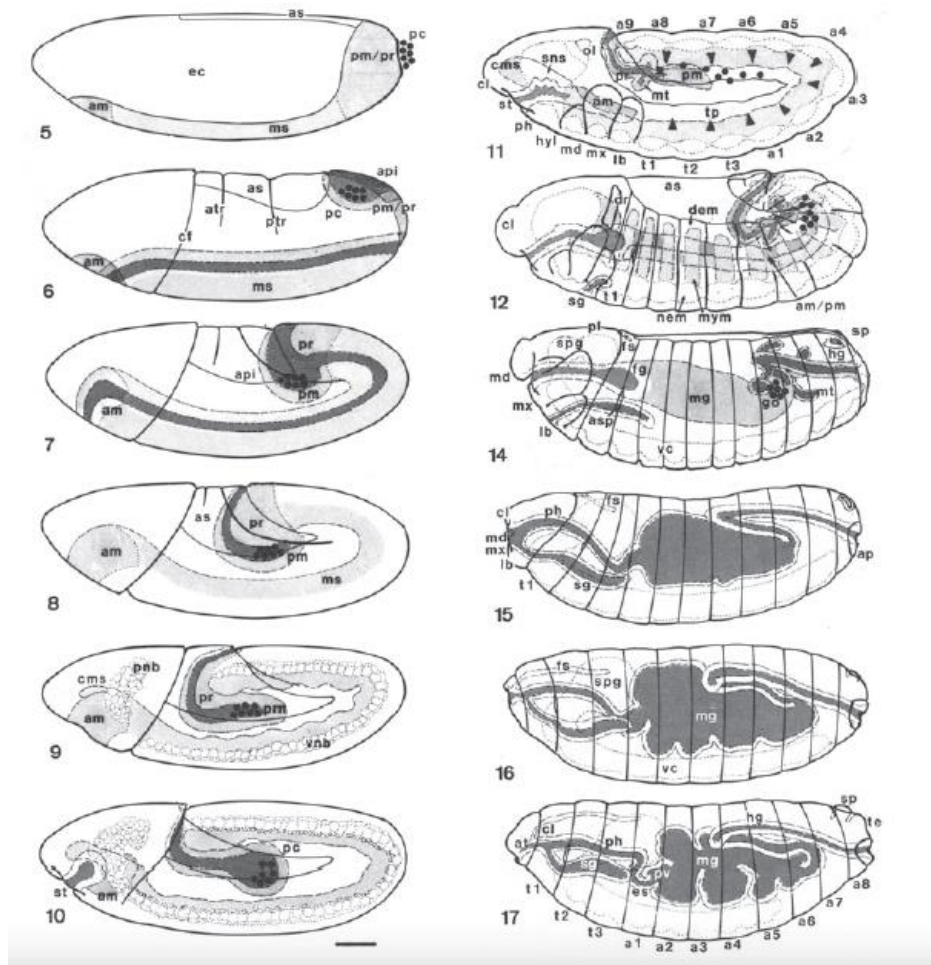


Figura 2. 3 - Doze desenhos de embriões de idades crescentes para ilustrar os principais eventos do desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster*.

O número no canto inferior esquerdo de cada desenho indica o estágio embrionário. A barra corresponde a 50 μm .

-O estágio 5 mostra a blastoderme no fim da celularização.

Ligeiramente sombreados estão o anágeno larval que irá invaginar durante a gastrulação, ou seja, o primórdio endodérmico do intestino médio anterior (*am*), mesoderme (*ms*), primórdio posterior do intestino médio (*pm*).

- O estágio 6 ilustra os movimentos de morfogénia durante a gastrulação.

Mesoderme (*ms*) e endoderme (*am*, *pm*) completaram a invaginação, as regiões invaginadas são sombreadas em uma projeção lateral (espaços vazios - lúmen - neste e nos desenhos seguintes são eclodidos), as células do polo (*pc*) estão incluídas no primórdio posterior do intestino médio.

- No estágio 7 dá-se o início do alongamento da banda germinativa.

O sulco cefálico reclinna na direção caudal; sulcos transversais aproximam-se uns dos outros; a invaginação amnioproctodeal (*api*) aprofundou-se ainda mais.

- Durante o estágio 8, o alongamento da banda germinativa prossegue; o lúmen do primórdio mesodérmico (*ms*) e do intestino médio anterior (*am*) desaparece e os primórdios do intestino médio posterior e proctodeu (*pr*) tornam-se individualizados.

- No estágio 9, o alongamento da banda germinativa entra em sua fase lenta; a mesoderme (sombreado) apresenta protuberâncias segmentares correspondentes a uma segmentação transitória; começa a segregação de neuroblastos (neuroblastos ventrais (*vnb*) e neuroblastos procefálicos (*pnb*)); (*ems*) mesoderme cefálica.

- No estágio 10 ocorre a invaginação stomodeu (*st*); a segregação dos neuroblastos continua; ocorrem as primeiras divisões de neuroblastos que dão origem às células-mãe ganglionares.

- No estágio 11 a segmentação epidérmica torna-se evidente (*t1-t3* segmentos torácicos; segmentos abdominais *a1-a10*; broto mandibular (*md*); (*mx*) gema maxilar; botão labial (*lb*); surgem os primórdios do sistema nervoso estomatogástrico (*sns*) e dos túbulos de Malpighi (*mt*). Os triângulos pretos indicam a posição das fossas traqueais (*tp*). (*cl*) clipeolabrum; mesoderme cefálica (*sem*); (*hyl*) lobo hipofaríngeo; (*ol*) ampliação dos lobos ópticos; (*ph*) faringe; (*pm*) intestino médio posterior; (*pr*) proctodeu; (*sl*) estomodeu.

- A banda germinativa retrai durante o estágio 12; o desenho mostra as etapas finais dessa retratação. Durante este processo ocorre a fusão dos primórdios do intestino médio anterior e posterior (*am/pm*) e aparecem os limites segmentares definitivos. Os vários elementos dos segmentos, dornómeros (*dem*), neurómeros (*nem*) e miómeros (*mym*) tornam-se óbvios. As glândulas salivares (*sg*) e a crista dorsal (*dr*) também aparecem. (*as*) amnioserosa.

- No estágio 14 inicia-se o fecho dorsal do intestino médio (mg) da epiderme e a involução da cabeça. Abreviaturas: (*asp*) espiráculos anteriores; (*fg*) intestino; (*fs*) saco frontal; (*hg*) intestino posterior; (*lb*) botão labial; broto mandibular (*md*); túbulos de Malpighi (*mt*); (*mx*) gema maxilar; lobo procefálico (*pl*); gânglio supraesofágico (*spg*); (*sp*) espiráculos posteriores; (*v*) cordão ventral.

- No estágio 15 a involução da cabeça está bem avançada. Crescimento bastante visível do intestino posterior. Abreviaturas: placa anal (*ap*); (*cl*) clipeolabrum; (*fs*) saco frontal; (*lb*) botão labial; gemas mandibulares e maxilares (*md/mx*); (*ph*) faringe; glândulas salivares (*sg*); (*tl*) protórax.

- No estágio 16, a involução da cabeça está quase completa; aparecem circunvoluções do intestino médio (*mg*); começa a contração na corda do ventre (*ve*); (*fs*) saco frontal; gânglio supraesofágico (*spg*).

- O estágio 17 corresponde ao embrião totalmente desenvolvido. Abreviaturas: segmentos torácicos e abdominais (*t1-a8*); no átrio; (*cl*) clipeolabrum; (*es*) esôfago; (*hg*) intestino posterior; (*mg*) intestino médio; (*ph*) faringe; (*pv*) proventrículo; (*sg*) glândulas salivares; (*sp*) espiráculos posteriores; (*te*) télson.

Adaptado de: Hartenstein V, Campos-Ortega J. The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, (1985), Edition 1.

Os estádios embrionários são definidos por características proeminentes, facilmente distinguíveis no embrião vivo por observação direta à lupa, enquanto imerso em vários meios diferentes.

2.6.1 Estádio 16 de desenvolvimento embrionário

O estágio 16 de desenvolvimento embrionário dura cerca de 3 h e inicia-se quando os sulcos intersegmentares podem ser distinguidos nos níveis médio-dorsais e termina quando a crista dorsal supera completamente a ponta do clipeolabrum que, portanto, fica incluído no átrio. Durante esta fase, várias constrições aparecem no intestino médio. Outros estádios de citodiferenciação ocorrem durante o estágio 16, como mostra a figura 2.4. A secreção da cutícula começou na epiderme, na árvore traqueal e no intestino anterior e posterior. Surgem o proventrículo e os cecos gástricos. O proventrículo, ou válvula cardíaca, forma-se na junção do intestino anterior e médio com elementos exclusivamente derivados do stomodeu, e os quatro cecos gástricos evaginam na base do proventrículo a partir de células do intestino médio do epitélio de origem ectodérmica. O esôfago, já com cutícula secretada no seu lúmen, insere-se profundamente no proventrículo em continuação com o epitélio do intestino médio, que é desprovido de cutícula; o epitélio reverte caudalmente circundando o esôfago, sendo contíguo com a porção anterior do intestino médio, o chamado ventrículo. No ventrículo aparecem quatro evaginações no intestino médio, que são chamadas de cecos gástricos. As cristas faríngeas também aparecem. O corpo gorduroso pode ser visto lateralmente estendendo-se das gônadas até aos níveis torácicos anteriores. O padrão larval da musculatura somática e dos órgãos sensoriais torna-se distinguível. O coração também se formou na posição médio-dorsal (Hartenstein & Campos-Ortega, 1985).

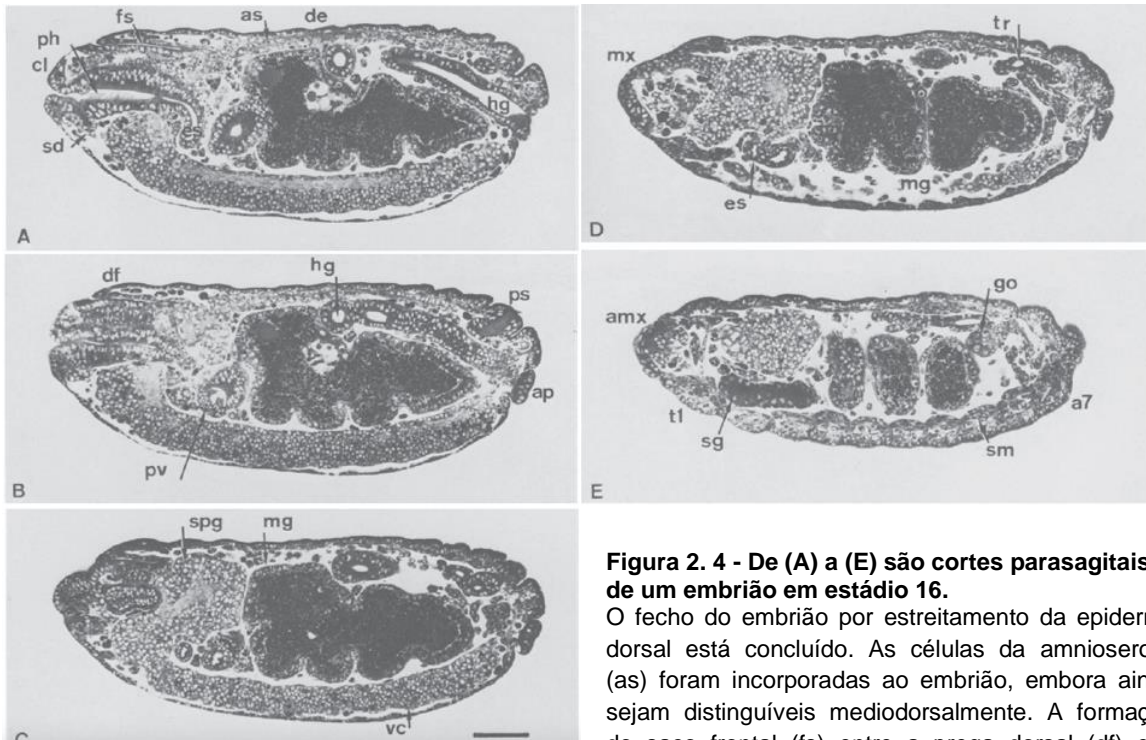


Figura 2. 4 - De (A) a (E) são cortes parasagitais de um embrião em estágio 16.

O fecho do embrião por estreitamento da epiderme dorsal está concluído. As células da amnioserosa (as) foram incorporadas ao embrião, embora ainda sejam distinguíveis mediodorsalmente. A formação do saco frontal (fs) entre a prega dorsal (df) e o

clípeolabrum (cl) progrediu metade do caminho e a formação do proventrículo começou. Também as constrições do intestino médio (mg), para dar origem às suas diferentes porções, são distinguíveis.

Abreviaturas: (amx) complexo anteno-maxilar; (ap) placa anal; (asp) espiráculo anterior; (es) esôfago; (go) gônadas; (hg) intestino posterior; (mu) musculatura somática; (mx) maxila; (ph) faringe; (ps) espiráculo posterior; (sd) ducto salivar; (sg) glândula salivar; (tr) árvore traqueal; (vc) cordão ventral. Barra 50 µm.

Adaptado de: Hartenstein V, Campos-Ortega J. The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, (1985), Edition 1.

2.6.1.1 - O intestino médio (ponto fulcral na identificação do desenvolvimento do embrião em estágio 15 e 16):

Durante o estágio 15, o intestino médio apresenta uma forma característica de coração, essa forma desaparece com a formação consecutiva de três constrições da parede do intestino médio. Estas constrições levam à formação das quatro circunvoluções intestinais presentes no intestino do embrião em estágio 16 (figura 2.5) (Hartenstein & Campos-Ortega, 1985). No estágio 16 aparecem também quatro evaginações na base mais anterior das circunvoluções, o chamado ventrículo, a partir do qual se desenvolvem os cecos gástricos. O proventrículo desenvolve-se na junção entre o intestino anterior e o médio. O proventrículo consiste numa porção interna esofágica que é inserida e coberta por uma porção externa do intestino médio, sendo ambas as partes ligadas por células aparentemente derivadas do intestino anterior. O desenvolvimento do proventrículo ocorre muito tardiamente na embriogênese, durante os estádios 16 e 17. Após o fecho dorsal, a

porção oral do intestino médio circunda a ponta caudal do esôfago como um funil. À medida que as constrições do intestino médio aparecem nos estágios 15 e 16, o funil do intestino médio cresce lentamente na porção esofágica para formar a válvula gástrica no estágio 17 (Hartenstein & Campos-Ortega, 1985).



Figura 2. 5 - (D) e (E) seções horizontais de um estágio 16 tardio de embrião de *Drosophila*.

As diferentes partes do intestino médio (mg) são evidentes, as invaginações para dar origem ao ceco do intestino médio (gc) estão presentes.

Abreviaturas: (ap) placa anal; (es) esôfago; (go) gônadas; (hg) intestino posterior; (sd) ducto salivar; (sg) glândula salivar.

Adaptado de: Hartenstein V, Campos-Ortega J. The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, (1985), Edition 1.

2.7 Criopreservação

A criopreservação é um processo que usa temperaturas extremamente baixas para preservar células e tecidos vivos estruturalmente intactos (Pegg, 2015). Este processo, implica o arrefecimento de células e tecidos a temperaturas abaixo de zero, a fim de interromper toda a atividade biológica e preservá-los para uso futuro (Rienzi et al., 2018). Pensa-se que a criobiologia teve origem no antigo Egito, onde temperaturas frias eram usadas para parar o sangramento, reduzir a inflamação e como anestesia local.

A maioria dos primeiros trabalhos em criobiologia foi realizada em espermatozoides, que estão prontamente disponíveis e a sua motilidade pode ser usada como um índice de viabilidade pós-descongelamento (Ali et al., 2017). As primeiras tentativas cientificamente formuladas para alcançar a criopreservação de espermatozoides foram da responsabilidade de Basile J. Luyet, pioneiro desta área na década de 1930 (Luyet & Hodapp, 1938), embora tenha sido Polge e seus colaboradores que, em 1949, criopreservaram os primeiros espermatozoides usando o glicerol como crioprotector e obtendo resultados mais promissores do que até então (Polge et al., 1949). Em 1971, Whittingham conseguiu pela primeira vez congelar parcialmente a -79°C blastocistos de murganho em polivinilpirolidina, (Whittingham G. D., 1971), enquanto no mesmo ano Leibo e Mazur descobriram que para evitar a formação de gelo intracelular em células do tamanho de embriões de murganho, o congelamento não deve ser mais rápido que -1°C por minuto (Leibo & Mazur Peter, 1971).

O sucesso na criopreservação de embriões ocorreu quando as habilidades no manuseamento de embriões de David Whittingham, foram combinadas com os conhecimentos criobiológicos de Peter Mazur e Standey Leibo em 1972 (Ali et al., 2017), tendo sido criopreservados embriões de murganho a -196°C em azoto líquido e a -269°C em hélio líquido, com uma taxa de sucesso de descongelamento e sobrevivência entre os 50% e 70%, usando como crioprotector o DMSO (dimetilsulfóxico) (Whittingham et al., 1972).

A criopreservação de embriões foi um passo crucial para a difusão e conservação dos recursos genéticos animais (Pereira & Marques, 2008), pois permite a conservação de muitas linhagens de organismos geneticamente modificados num espaço pequeno com recurso a equipamento de aquisição e manutenção ao alcance de muitos, nomeadamente uma arca de criopreservação com azoto líquido.

Todos os embriões sofrem danos morfológicos e funcionais consideráveis durante a criopreservação, mas a extensão da lesão, bem como as diferenças nas taxas de sobrevivência e desenvolvimento podem ser altamente variáveis dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento do embrião (Pereira & Marques, 2008). O sucesso de uma criopreservação depende ainda de outros dois fatores: evitar a formação de gelo intracelular e controlar a toxicidade dos agentes crioprotetores (CPAs), nomeadamente mantendo as suas concentrações intracelulares em níveis não tóxicos para a célula (Mazur et al., 1992). Os CPAs, são agentes químicos que protegem as células contra danos intracelulares, atuando na prevenção da formação de cristais de gelo, bem como na estabilização das estruturas e membranas intracelulares durante a desidratação da célula (Rienzi et al., 2018). Para um processo de criopreservação eficaz, as células devem estar permeáveis tanto à água como ao crioprotetor (Mazur P et al., 1992). A utilização de diferentes CPAs em processos de criopreservação apresenta vantagens relativas dependentes do tipo de célula, da taxa de arrefecimento e da taxa de aquecimento (Pegg, 2015) (Whaley et al., 2021)

A taxa de arrefecimento é proporcional à probabilidade de formação de gelo intracelular. Para que não exista formação de gelo no interior da célula, a água deve deixar a célula à medida que a temperatura do meio (crioprotetor) diminui (Mazur, 1963).

O arrefecimento a temperaturas muito baixas não é uma condição fisiológica normal a todos os organismos, de modo que os sistemas biológicos envolvidos carecem de mecanismos internos de defesa eficientes contra o alto arrefecimento. A formação de gelo e os danos por ele provocados são a razão pela qual os cientistas lutam incessantemente para fornecer proteção externa adequada para as células (Rienzi et al., 2018). Pensa-se que os cristais de gelo podem provocar danos na célula via dois mecanismos. Por um lado, poderá haver um efeito mecânico dos cristais que rompem as membranas celulares (Rienzi et al., 2018; Whaley et al., 2021) comprometendo a integridade estrutural da célula e provocando choque osmótico. Por outro lado, a formação de cristais de gelo leva a um aumento de concentração da fração não cristalizada que poderá provocar toxicidade por efeito de soluto (Rienzi et al., 2018). A dinâmica de arrefecimento e a utilização de crioprotetores são duas variáveis chave para evitar a formação de gelo e os danos daí decorrentes. As respostas criobiológicas podem variar muito dependendo do tipo de célula devido a variações na composição celular e tecidual. Portanto, as características biofisiológicas e biológicas específicas da célula devem ser consideradas durante a

criopreservação para maximizar a viabilidade pós-crio para cada tipo de célula (Gao & Critser, 2000).

Atualmente, existem dois métodos para criopreservação de gametas e embriões: congelamento lento e vitrificação (Pereira & Marques, 2008).

Ambos os métodos são baseados nos mesmos princípios de proteção das células contra danos devido à formação de gelo intracelular, desidratação celular excessiva e alterações nas concentrações de soluto, mas estes objetivos são atingidos de forma diferente (Marques et al., 2019).

2.7.1 Congelamento lento

A criopreservação de embriões e gâmetas começou por ser realizada com utilização do processo de congelamento lento. O congelamento lento é um sistema controlado e gradual, onde o equilíbrio do embrião é alcançado com uma concentração relativamente baixa de crioprotetor e onde a taxa de arrefecimento é muito lenta comparativamente à vitrificação (Son & Tan, 2009). Este processo consiste em baixar a temperatura de uma forma lenta e controlada para valores abaixo de zero, seguindo-se um passo final de arrefecimento rápido conseguido por colocação direta da amostra em azoto líquido para o seu armazenamento (Liu et al., 2012). A desidratação progressiva e gradual, encolhimento da célula, e o aumento da concentração de soluto intracelular ocorre devido ao aumento da osmolaridade na solução extracelular durante o processo gradual de arrefecimento (Son & Tan, 2009). É possível evitar a formação de gelo intracelular neste processo porque a concentração de solutos é ligeiramente maior no meio intracelular do que no meio extracelular durante a desidratação, diminuindo assim o ponto de congelamento dentro da célula (Son & Tan, 2009), ou seja, a água extracelular cristaliza resultando em gradiente osmótico que retira a água do compartimento intracelular até que ocorra a vitrificação (momento da entrada da amostra no azoto líquido) (Saragusty & Arav, 2011).

A desidratação gradual das células, permite concentrações de CPAs relativamente baixas e efeitos da sua toxicidade reduzidos. Em congelação de embriões e oócitos, por exemplo, são usadas concentrações que rondam 1,5M de agentes crioprotetores permeantes (P-CPAs) e 0,3M de agentes crioprotetores não permeantes (NP-CPAs), com taxas de arrefecimento lento obtidas com recurso a uma máquina de congelamento programável, que fornece parâmetros de arrefecimento regulados e consistentes durante

todo o processo (Edgar & Gook, 2012). Uma vez colocadas em recipientes especialmente projetados, as amostras de embriões são arrefecidas a cerca de $-6^{\circ}\text{C}/-8^{\circ}\text{C}$ (a $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$), e é neste momento que é feito o *seeding* que irá induzir a nucleação e formação de gelo na solução, o que permite maior desidratação das células devido, como já foi referido, ao aumento da concentração de soluto extracelular ao longo do arrefecimento. Acredita-se que ocorra desidratação até por volta dos -30°C , (Edgar & Gook, 2012). Finalmente, a temperatura é reduzida rapidamente (em torno de $>10.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) para -196°C , quando a amostra é mergulhada diretamente em azoto líquido onde se manterá armazenada (Edgar & Gook, 2012).

Como já foi referido, o primeiro sucesso na criopreservação de embriões de murganho foi da responsabilidade de Whittingham, Leibo e Mazur em 1972, e por recurso ao processo de congelamento lento. Desde então, muitos mais embriões de outras espécies foram criopreservados com recurso a esta técnica (Arav, 2014).

O congelamento lento tem como principais desvantagens o facto de necessitar de equipamento especializado e sofisticado para o arrefecimento controlado e o facto de ter tempos procedimentais longos. A sua principal vantagem é a utilização de CPAs a baixas concentrações que provoca efeitos tóxicos menores (Saragusty & Arav, 2011).

2.7.2 Vitrificação

A vitrificação é um processo de transformação, em que uma solução altamente concentrada, quando arrefecida, torna-se um fluido muito viscoso semelhante a um “vidro”. Este fluido tem a estrutura molecular de um líquido, mas as propriedades mecânicas de um sólido (Ali et al., 2017) (Liu et al., 2012), ou seja, é uma transição de soluções aquosas do estado líquido para o estado vítreo (sólido não estruturado), contornando o estado cristalino. No contexto da temática dos processos de criopreservação, também se chama ‘vitrificação’ a um processo alternativo de congelamento em que se dá o aumento extremo de viscosidade por ação de taxas de arrefecimento ultrarrápidas, na presença de crioprotetores a uma concentração muito elevada (Ambrosini et al., 2006), que evitam a formação de cristais de gelo intracelulares (Mukaida & Oka, 2012).

Em 1985, foi feita a primeira vitrificação bem-sucedida de embriões de murganho. Rall e Fahy, usando uma amostra de volume relativamente grande, recorreram a uma mistura de DMSO (dimetilsulfóxido), acetamida, propilenoglicol e etilenoglicol como CPA, para

congelarem embriões de murganho acondicionados num capilar de vidro, mergulhando-o diretamente em nitrogénio líquido (Rall & Fahy, 1985). Esta nova técnica de arrefecimento rápido leva apenas alguns segundos para criopreservar embriões e não requer equipamentos caros especializados para controlar o arrefecimento (Son & Tan, 2009).

Na vitrificação são usadas grandes concentrações de CPAs, nomeadamente entre os 3 e os 7M de CPAs permeantes e 0,5M de CPAs não permeantes (Ambrosini et al., 2006) (Edgar & Gook, 2012). Nestas concentrações, estes agentes são de tal maneira tóxicos que a célula só pode ser exposta à solução crioprotetora por um período muito curto e a temperaturas muito baixas (Pereira & Marques, 2008). Ainda assim, a toxicidade do CPA é o principal problema no uso do método de vitrificação (Pegg, 2015).

A solução crioprotetora tem de ser capaz de penetrar na membrana celular (Pegg, 2015), ser adicionada de forma gradual a temperaturas próximas de 0°C (Wowk, 2007) e poderá ser também uma combinação entre dois ou três CPAs diferentes (Fahy et al., 1984).

De uma forma geral, os diferentes protocolos de vitrificação envolvem uma primeira incubação de alguns minutos do CPA em concentrações relativamente baixas e uma segunda incubação, muito curta (<1min), a uma concentração de CPA alta, seguida de arrefecimento muito rápido por colocação direta em azoto líquido (Whaley et al., 2021)(Liu et al., 2012).

Os CPAs são adicionados na fase que antecede a vitrificação (entrada em azoto líquido) e permitem que as células sejam expostas a um gradiente hipertónico (ambiente hiperosmótico) e a um aumento da concentração do soluto extracelular. Gera-se assim um gradiente osmótico através da membrana celular, que causa a saída de água da célula levando à sua desidratação e à entrada do crioprotetor (Ambrosini et al., 2006).

No descongelamento ocorre a remoção do crioprotetor das células, que inicialmente incham devido ao influxo de água extracelular e, em seguida, voltam ao estado normal, para um volume isotónico à medida que o crioprotetor deixa as células. (Si et al., 2006). Ambos os processos, o da entrada do CPA (desidratação da célula) e o da reidratação (saída do CPA da célula e entrada de água), são determinados pela permeabilidade da membrana plasmática e por fatores externos como a composição de CPAs e o tempo e a temperatura de exposição da célula a este agente (Liu et al., 2012).

O sucesso do processo de vitrificação depende de 3 fatores críticos: as taxas de arrefecimento e aquecimento, a viscosidade do meio de suspensão ou eficiência da transição vítrea da solução a baixas temperaturas e o volume vitrificado (Arav, 2014).

A viscosidade do meio em que os embriões são suspensos ou a eficiência da transição do estado líquido para o estado vítreo da solução a baixas temperaturas é definida pela concentração e comportamento dos vários CPAs usados durante a vitrificação. Assim sendo, quanto maior é a concentração de CPAs, maior a temperatura de transição vítrea, diminuindo assim a hipótese de nucleação e cristalização de gelo (Arav, 2014).

No caso da vitrificação são usadas altas taxas de arrefecimento, pois quanto mais rápido o arrefecimento, menor será a concentração crítica de soluto intracelular necessária para obter a vitrificação sem formação de gelo (Liu et al., 2012). De facto, foi demonstrado para oócitos e embriões que um arrefecimento mais rápido aumenta a taxa de sobrevivência em 37% (Saragusty & Arav, 2011).

A velocidade do arrefecimento depende também da amostra e da sua área de superfície. O arrefecimento será tanto mais rápido, quanto maior a relação superfície/volume. Esta relação de área da superfície da célula em relação ao volume criopreservado é um fator importante na fase da desidratação da célula, pois a desidratação de células maiores irá ser mais lenta em comparação com células menores (Whaley et al., 2021). Em células maiores as taxas de arrefecimento rápidas não dão tempo suficiente para que a maior parte da água saia antes que ocorra a vitrificação, fazendo com que a concentração de água intracelular permaneça alta e a probabilidade de formação de cristais de gelo seja elevada (Sieme et al., 2016). Perante isto, devem ser feitos ajustes durante a criopreservação com base no tamanho da célula para permitir que um volume suficiente de água saia antes que ocorra a vitrificação (Whaley et al., 2021).

Quanto à velocidade de aquecimento no descongelamento, deve também ser elevada para evitar a recristalização da água (Baboo et al., 2019). Segundo a termodinâmica, a água vitrificada existe num estado de maior energia em comparação com a sua forma cristalizada. O aquecimento rápido minimiza a tendência natural de reorganização das moléculas de água vitrificadas em cristais de gelo de menor energia (Benson et al., 2012).

2.7.3 Crioprotetores (CPAs)

Os agentes crioprotetores são produtos químicos usados na criopreservação para evitar a formação de gelo e minimizar o efeito de choque osmótico provocado pelo processo (Pereira & Marques, 2008). Com base na sua capacidade de atravessar as membranas celulares e entrar no citoplasma, os CPAs podem ser classificados como permeáveis (P-CPAs) ou não-permeáveis (NP-CPAs) (Rienzi et al., 2018).

Os crioprotetores **permeáveis** penetram facilmente nas membranas das células devido ao seu tamanho relativamente pequeno, enquanto a sua natureza anfifílica permite que formem ligações por pontes de hidrogénio com as moléculas de água intracelular (Chang et al., 2011)(Pereira & Marques, 2008)(Wowk, 2007). A temperatura de congelamento da mistura resultante diminui, fazendo com que o ponto de congelamento da água intracelular seja reduzido pois existe um menor número de moléculas de água disponíveis para interagir entre si e formar locais de nucleação críticos que levem à formação de cristais de gelo (Mandumpal et al., 2011). O propilenoglicol (1,2- propanodiol; PROH) é o P-CPA mais comumente usado, mas outros crioprotetores permeáveis, tais como o etilenoglicol (EG), o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) também estão entre os mais usados (Pereira & Marques, 2008).

Por outro lado, crioprotetores **não permeáveis** permanecem no espaço extracelular, são geralmente moléculas hidrofílicas grandes, não tóxicas (açúcares, proteínas ou aminoácidos) com um efeito protetor diferente. Devido à incapacidade de atravessarem a membrana plasmática, estas substâncias criam uma pressão osmótica extracelular que diminui a temperatura de congelamento do meio e diminui a formação de gelo extracelular (Mosca et al., 2016). A pressão osmótica extracelular, também contribui para a remoção de água do interior da célula, causando a sua desidratação e a entrada do P-CPA (Ambrosini et al., 2006). Os protocolos de criopreservação geralmente usam uma alta concentração de crioprotetores não permeáveis durante a fase de descongelamento e recuperação do material. O crioprotetor não permeável mais comumente usado é a sucrose (Jain & Paulson, 2006), mas outros dissacarídeos, como a galactose, o sorbitol e a trealose também podem ser usados (Pereira & Marques, 2008).

2.8 Criopreservação de embriões de dípteros (insetos)

Desde a década de 1990, têm sido relatados protocolos de criopreservação otimizados para insetos dípteros de importância económica e científica, onde se inclui a *Drosophila melanogaster*. O armazenamento de embriões de insetos é uma alternativa à criação contínua que pode reduzir custos, desde que os embriões possam ser facilmente recuperados. No entanto, existem imensos desafios que impedem a adoção generalizada da criopreservação de embriões de insetos (Rajamohan et al., 2015). Várias espécies de insetos já foram criopreservadas com sucesso, mas cada nova espécie requer um protocolo de criopreservação personalizado, mesmo que taxonomicamente intimamente relacionada com outra onde o processo já foi otimizado. Isto deve-se a variações embrionárias nos aspetos anatómicos e fisiológicos, tais como a espessura do córion, composição da cera, idade embrionária e coesão tecidual, desenvolvimento embrionário, tolerância à toxicidade do solvente, teor inicial de água, entre outros (DeBardlabon et al., 2022).

Outro problema na criopreservação de embriões de dípteros é o facto de serem extremamente sensíveis ao arrefecimento. Este obstáculo foi apontado por Mazur como determinante para o abandono da técnica de congelamento lento, que tem sido frequentemente utilizada na criopreservação de embriões de vertebrados. Consequentemente, a técnica de vitrificação desenvolvida por Rall e Fahy foi usada na conceção dos dois protocolos semelhantes para *Drosophila melanogaster* por Mazur et al. em 1992 e Steponkus e Caldwell em 1990. A vitrificação é essencial para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação para embriões de dípteros, porque a taxa de arrefecimento rápida necessária para obter o estado vítreo e sem gelo, ainda que com utilização de crioprotectores altamente concentrados, evidentemente contorna os efeitos nocivos provocados ao usar a técnica de congelamento lento (Wang et al., 2000)

Um grande desafio na criopreservação de embriões de insetos, é a obtenção de um número suficiente de embriões de qualidade, sincronizados no desenvolvimento, a partir de pequenas colónias de insetos mantidos em laboratório. Ao contrário dos embriões de mamíferos em que a criopreservação em diferentes estágios iniciais de desenvolvimento é possível, os embriões de dípteros só podem ser criopreservados num estágio de desenvolvimento preciso durante a organogénese tardia (Rajamohan et al., 2015), que é aproximadamente o equivalente ao estágio 16 em *Drosophila melanogaster* (DeBardlabon

et al., 2022). De todas as características que devem ser consideradas ao desenvolver um protocolo de criopreservação de inseto, a seleção do estágio de desenvolvimento é geralmente considerada a mais importante (DeBardlabon et al., 2022).

Investigadores procuraram desenvolver métodos para a criopreservação de embriões de *D. melanogaster* usando apenas a linhagem de tipo selvagem (Oregon R), como foi o caso de Steponkus em 1990 (Steponkus L. P. et al., 1990) e Mazur em 1992 (Mazur P et al., 1992), no entanto, esses protocolos não foram adotados devido à sua complexidade, exigência de dispositivos especializados e falta de reprodutibilidade. Tanto quanto conseguimos apurar e temos conhecimento, nenhum protocolo foi implementado com sucesso para criopreservar uma ampla coleção de linhas de *D. melanogaster*, tanto de tipo selvagem como de mutantes.

Os principais desafios da criopreservação de embriões de *Drosophila* incluem a entrada do CPA, vitrificação em grande escala/quantidade, e a variabilidade da taxa de sobrevivência pós-tratamento que parece depender da idade do embrião e dos antecedentes genéticos de cada linha (Zhan et al., 2021). Uma outra dificuldade que se encontra na criopreservação de embriões de *Drosophila* é que estes são circundados por uma membrana vitelina que é impermeabilizada por ceras. Para alcançar a preservação criobiológica, esses compostos de barreira devem ser removidos sem lesão (Mazur P et al., 1992).

Dos estudos até agora efetuados, concluiu-se que a taxa de sobrevivência de embriões de *Drosophila* após recuperação é mais alta quando estes são criopreservados no estágio 16, comparativamente a estádios de desenvolvimento imediatamente anteriores ou posteriores

(Zhan et al., 2021)(Mazur P et al., 1992). Em *Drosophila*, os estádios de desenvolvimento 15, 16 e 17 podem ser distinguidos por características anatômicas específicas, tais como a presença de 3 ou 4 bandas de intestino, a presença do complexo maxilar-mandibular e um intestino médio e posterior com pregas e disperso (DeBardlabon et al., 2022).

No entanto, estes marcadores anatômicos podem muitas vezes ser difíceis de identificar. Várias estratégias têm sido testadas na criopreservação de embriões de dípteros para aumentar a viabilidade pós criopreservação, como tempo otimizado na colheita e seleção do correto estágio de desenvolvimento por monitorização, para identificação de marcadores embrionários específicos (Rajamohan et al., 2015). Estas estratégias podem ser dificultadas tendo em conta que as fêmeas podem reter os embriões no útero por um período antes da postura, fazendo com que os embriões já estejam num estágio mais avançado aquando da postura (Hartenstein & Campos-Ortega, 1985).

Estudos anteriores sobre criopreservação de insetos (Rajamohan et al., 2015), observaram também que a viabilidade dos embriões na criopreservação pode ser aumentada, garantindo um número maior de embriões num estágio de desenvolvimento específico no momento da vitrificação e não no momento dos pré-tratamentos, como a descorionação (remoção do córion) e a permeabilização da membrana vitelina (DeBardlabon et al., 2022).

Com toda esta informação foi então tentada uma nova estratégia de criopreservação de embriões de *D. melanogaster*, criada por Li Zhan e os seus colaboradores em 2021, que reportam um protocolo robusto e de fácil implementação, apresentando inovações na permeabilização e na entrada do agente crioprotetor. Com ele obtiveram bons resultados na sobrevivência pós-descongelamento para diferentes linhas *wild type* e mutantes de *Drosophila*.

3. Capítulo 3 – Materiais e métodos

3.1 Variáveis em estudo

No presente estudo a variável independente em estudo define-se em conseguir “congelar embriões de *Drosophila melanogaster* pela técnica de vitrificação”, enquanto as variáveis dependentes definem-se em “conseguir animais vivos e viáveis depois da descongelação”, e a “implementação do protocolo de congelação de embriões de *Drosophila* numa plataforma de investigação”.

As variáveis de temperatura de incubação e de postura de embriões são variáveis que podem alterar facilmente, pondo em causa o objetivo do trabalho, tendo tipo sempre em causa que existisse o mínimo de alterações possíveis.

3.2. Linhagens usada para o estudo

O procedimento/protocolo de congelação, seguindo as principais diretrizes do publicado por Zhan et al. (2021), foi realizado com duas linhas geneticamente diferentes de *Drosophila melanogaster*, a *W^[1118]*; e a *y[1], w^[67c23];P(CaryP)attP40*; que para uma maior simplicidade serão referidas daqui em diante por *w¹¹¹⁸* e *attP40* respetivamente. A linha *w¹¹¹⁸*, é uma linha transgénica bastante usada para formação de outras linhas transgénicas, pois devido a conter o gene White mutado no primeiro cromossoma é

possível inserir um *miniwhite* no plasmídeo de integração e obter moscas com olhos laranjas/vermelhos como marcador. Não possuindo mais mutações nos outros cromossomas que constituem o seu genoma, são também boas candidatas a inserções aleatórias de mutações. A *attP40* é uma linha bastante usada para inserção de mutações dirigidas a um local específico do genoma, especificamente no segundo cromossoma, com boas taxas de eficiência e sobrevivência. Ambas as linhas têm um bom historial de postura de ovos e devido a todos estes fatores a sua existência em stocks na maioria dos laboratórios que trabalham com *Drosophila* é vulgar.

3.4 Procedimentos

Os procedimentos de criopreservação deste projeto (colheita de embriões, descorionação, permeabilização, congelação e descongelação) foram baseados no protocolo de Li Zhan et al (2021).

3.4.1 Recolha de embriões

Etapa 1: Para a recolha de embriões para os dados experimentais, foi usado o sistema de gaiolas (*cages*), com um número avultado de moscas (≈ 500 moscas), de ambos os sexos numa proporção x:y (m:f).

Estas moscas provêm de garrafas com meio de cultura de *Drosophila*, onde foram flipadas/passadas moscas 10 dias antes que, colocadas a 25°C, com ciclos de luz de 12h/12h e humidade controlada (70% HR), produzem a descendência adulta a ser utilizada. No dia antes da colheita das moscas para as *cages* (gaiolas), estas garrafas são flipadas, tirando todos os adultos do seu interior, isto para garantir que no dia seguinte tem somente moscas adultas que eclodiram durante essa noite. No final do dia seguinte, transferiu-se todas as moscas eclodidas (com 1 dia de idade) para as *cages* (figura 3.1), construídas com recurso a copos de plástico 7x7cm perfurado, para permitir a entrada de ar e tapados com uma placa de petri 60mm de agar com sumo de maçã. É nesta placa que se fará a postura de ovos/embriões que são facilmente recolhidos por troca de placa (figura 3.1). As gaiolas são mantidas a 25°C durante 4 dias, pois observa-se que empiricamente tem de haver uma adaptação por parte dos animais à gaiola e ao novo ambiente, o que irá ajudar significativamente numa maior postura de ovos na placa. Este passo foi alterado por nós, tendo em conta que os autores faziam estas gaiolas somente

no dia antes à recolha de embriões nas placas, não havendo este período de adaptação. Ao longo dos três primeiros dias as placas de sumo de maçã são trocadas duas a três vezes por dia, para descartar todos os ovos postos até então e haver espaço para as próximas posturas, para ovos mais recentes. Ao quarto dia a placa é trocada por uma nova logo ao início da manhã (9h da manhã), e neste momento as moscas terão aproximadamente 4 a 5 dias de idade, idade essa referida como a mais adequada para a recolha dos embriões para o processo de congelação, e a idade mais favorável para que as fêmeas coloquem maior número de embriões (Zhan et al., 2021) (Tyler, 2000). Este processo é repetido mais duas vezes, às 10h e 11h da manhã, sendo que estas placas são descartadas, devido ao processo já referido de os ovos poderem ser retidos no interior do útero da fêmea após a fertilização por um período. Fazendo esta mudança de placa de hora a hora faz com que se consiga ovos mais recentes e consequentemente em estágio de desenvolvimento inicial, sendo que é o pretendido (Tyler, 2000).

A placa colocada às 11h da manhã foi recolhida às 12h, logo de seguida procede-se à contagem do total de embriões na placa, com recurso a uma lupa e uma aplicação de contagem. A placa com embriões foi colocada numa incubadora a 20°C com ciclo de luz de 12h/12h (Aralab 2020 CP9000), durante 22 horas. Para identificação da placa esta deve ter a hora da recolha, que neste caso será as 12h da tarde, e o número de embriões nela contida.

Neste projeto foram feitas 3 rondas de congelação por semana, o que significa que a cada semana foram recolhidas placas com embriões durante 3 horas seguidas. A primeira às 12h da tarde, a segunda às 13h e a terceira às 14h da tarde, para início do processo de congelação, às 10h, 11h e 12h da manhã do dia seguinte, respetivamente. Todos estes horários foram ajustados para que o desenvolvimento embrionário desejado acontecesse num horário conveniente ao dia de trabalho.

Quando se retira a placa da incubadora, os embriões deverão estar no estágio certo para o processo de congelação e este deverá começar logo de seguida.



Figura 3. 1 – Esquema de manutenção de stock e recolha de embriões.

(A) garrafas com meio de cultura onde são mantidos os stocks de moscas de ambas as linhas em estudo; (B) Cages (gaiolas) com moscas *Drosophila melanogaster*, com placa de agar e sumo de maçã e uma porção de pasta de levedura na base; (C) posterior postura de embriões na placa de petri de agar com sumo de maçã. Fonte própria.

3.4.2 Descorionação – remoção do córion

Para manuseio dos embriões durante todo o procedimento de permeabilização e congelação foi usado um cesto (fisherbrand 22363548) de rede de *nylon* e uma estrutura de polipropileno com aproximadamente 2,5 cm de diâmetro (figura 3.2). Este cesto comercializado foi adotado por nós para a realização de todo o protocolo, ao contrário dos autores e criadores do protocolo que usaram um cesto feito *homemade* somente com rede *nylon*.



Figura 3. 2 – cesto - 70 µm rede de Nylon. 2,5 cm de largura.

Fonte própria

Etapa 2: Na manhã do dia seguinte à recolha, aproximadamente 15 minutos antes da 22h de incubação, com ajuda de um pincel e de água destilada, retiraram-se os embriões da placa de petri para dentro do cesto. Para dar início ao processo de descorionação, remoção do córion, coloca-se o cesto numa placa de petri vazia e enche-se a placa de lixivia diluída (50:50) até esta cobrir a totalidade dos embriões. Logo de seguida agita-se o cesto durante 1 a 2 minutos em movimentos circulares para que os embriões choquem entre eles e nas paredes do cesto, seguindo sempre o processo numa lupa (figura 3.3 A e

B). Quando a maioria dos embriões já tiverem perdido o córion e estejam a boiar, passa-se o cesto por água destilada corrente durante sensivelmente 1 minuto, para que haja uma remoção total da lixívia dos embriões, pois esta pode ser tóxica e prejudicial ao seu desenvolvimento.

Após a lavagem coloca-se o cesto numa placa de petri de vidro de 35mm com 3 ml de criotampão e confirma-se novamente à lupa se o córion foi removido com sucesso. Com a ajuda do pincel certifica-se que os embriões ficam em monocamada e à superfície do criotampão, pois é importante que estejam nestas condições para que os reagentes seguintes cheguem a todos de igual modo (figura 3.3 C).

A confirmação do estágio de desenvolvimento é sempre feita nesta fase do processo, com auxílio de lupa de fluorescência e fazendo uso da autofluorescência natural do intestino em formação (figura 3.4). É necessário observar o desenvolvimento do intestino do embrião e verificar se se encontra com as características correspondentes ao estágio 16.

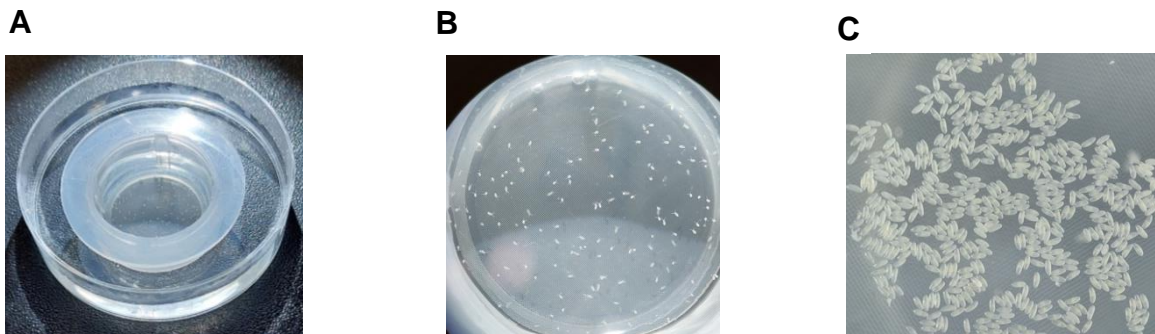


Figura 3. 3 - Esquema do processo de descorionação.

(A) embriões no interior do cesto numa da placa de petri com lixívia para descorionação. **(B)** embriões vistos à lupa no processo de descorionação; nesta imagem a maioria dos embriões ainda não está descorionada como se pode verificar pela observação dos apêndices dorsais do córion. **(C)** embriões após a remoção do córion já no criotampão. Fonte própria

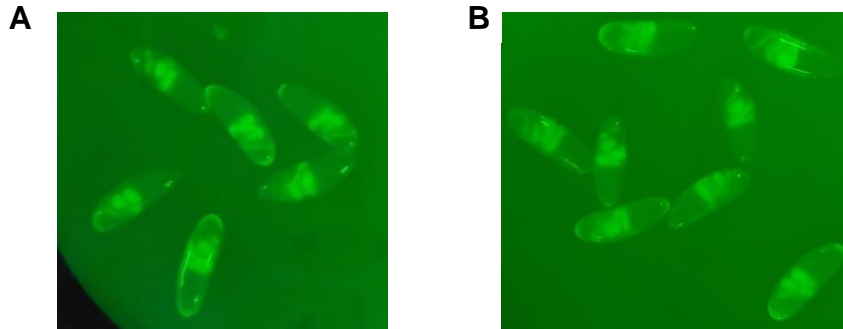


Figura 3. 4 – Embriões à fluorescência.

(A) e (B) embriões após descoronação, vistos em lupa de fluorescência onde se pode observar com clareza o intestino médio para identificação do estágio embrionário no estágio 16. Fonte própria

3.4.3 Permeabilização

Etapa 3 - Permeabilização: Retira-se o cesto com os embriões do criotampão e seca-se bem com papel. De seguida, coloca-se o cesto numa placa de petri de 35mm em vidro, com 4 ml de isopropanol durante 10 segundos - os embriões irão ficar no fundo do cesto. Retira-se o cesto e remove-se o excesso de isopropanol com papel e de seguida seca-se ao ar até a rede ficar totalmente seca na zona dos embriões. Este passo com isopropanol permite a remoção total de água à superfície do embrião antes do passo seguinte. No entanto, é importante remover todo o isopropanol no fim, pois a combinação do isopropanol com o heptano, a utilizar de seguida, é tóxica para os embriões.

De seguida mergulha-se o cesto numa outra placa de vidro com 3 ml de D-limoneno com heptano (1:4 v/v), durante 10 segundos, onde os embriões devem afundar novamente. Este passo servirá para permeabilizar a membrana vitelina do embrião, para que haja a entrada do crioprotetor na etapa seguinte. A placa de vidro deve ser trocada a cada ronda de permeabilização.

Retira-se o cesto, remove-se o excesso com papel e logo de seguida mergulha-se o cesto noutra placa de vidro com 3 ml de heptano, durante 5 segundos, onde os embriões devem permanecer no fundo. Remove-se o excesso de líquido com papel e deixa-se secar ao ar até a rede ficar novamente totalmente seca. Este passo irá remover o D-limoneno que se encontra em redor do embrião, pois este não é facilmente removido por evaporação. Logo de seguida, o cesto volta para o criotampão onde, com a ajuda da lupa e do pincel, colocam-se todos os embriões em monocamada e à superfície novamente, para permitir trocas gasosas do embrião. Todo este processo demora entre 1 e 2 minutos.

3.4.4 Desidratação, entrada do CPA (crioprotetor) e congelação

Etapa 4: Depois de colocar todos os embriões em monocamada no criotampão, retira-se o cesto e seca-se com papel. De seguida coloca-se o cesto numa outra placa de vidro de 35 mm com ~4 ml de etilenoglicol (CPA) a 13% (m/v), durante 25 minutos à temperatura ambiente. Nos primeiros 3 minutos é observado à lupa se os embriões estão a ficar com 'rugos' na sua superfície, significando que estes estão a perder água do seu interior devido à maior osmolaridade no exterior (figura 3.5 A). Após os primeiros 3 minutos a placa de petri é colocada numa camara húmida (caixa com água no interior) durante o restante tempo. Nesta fase é importante os embriões ficarem à superfície do etilenoglicol, para que ocorram as trocas gasosas/respiração. Após os 25 minutos os embriões são vistos à lupa para conferir se voltaram à sua forma inicial, indicando que o crioprotetor entrou após ter sido removida toda a água do seu interior.

O cesto é retirado do etilenoglicol a 13%, removido o excesso com papel e logo de seguida colocado numa outra placa de petri de vidro com ~ 5 ml de etilenoglicol a 39% (m/v), previamente mantida em gelo com temperatura a rondar os 0 e os -3°C, durante 9 minutos. Os embriões terão de ficar novamente à superfície e no centro do cesto, tanto quanto possível. No final destes 9 minutos é possível verificar à lupa que os embriões voltam a encolher e a formar novamente 'rugos' por consequência do aumento da osmolaridade no exterior do embrião, devido à maior concentração de CPA (figura 3.5 B). Depois dos 9 minutos, com auxílio de uma criorede, feita com uma pequena porção de rede de *nylon* com uma pega de poliestireno (figura 3.6 A), sem retirar o cesto do etilenoglicol, pressiona-se suavemente a criorede contra os embriões para que estes fiquem colados à base da rede de *nylon*, removendo-os do etilenoglicol. A criorede com os embriões 'colados' à sua superfície, é virada para cima (figura 3.6 B), e com a ajuda de papel remove-se o excesso de CPA que fica em redor dos embriões pelo lado oposto a que estão colados e, rapidamente, mergulha-se a criorede em azoto líquido (NL₂), num movimento rápido na direção vertical. Este último passo não poderá demorar mais que 20 segundos, devido à temperatura ambiente estar mais elevada em relação ao crioprotetor, e com isso poder aumentar a toxicidade do CPA, diminuindo assim a sobrevivência dos embriões depois do descongelamento. A 'criorede' terá de ser anteriormente identificada com toda a informação necessária da linha que se está a congelar e data da congelação. Neste momento teremos os embriões criopreservados por vitrificação, onde poderão ficar até uso futuro e por tempo indeterminado.

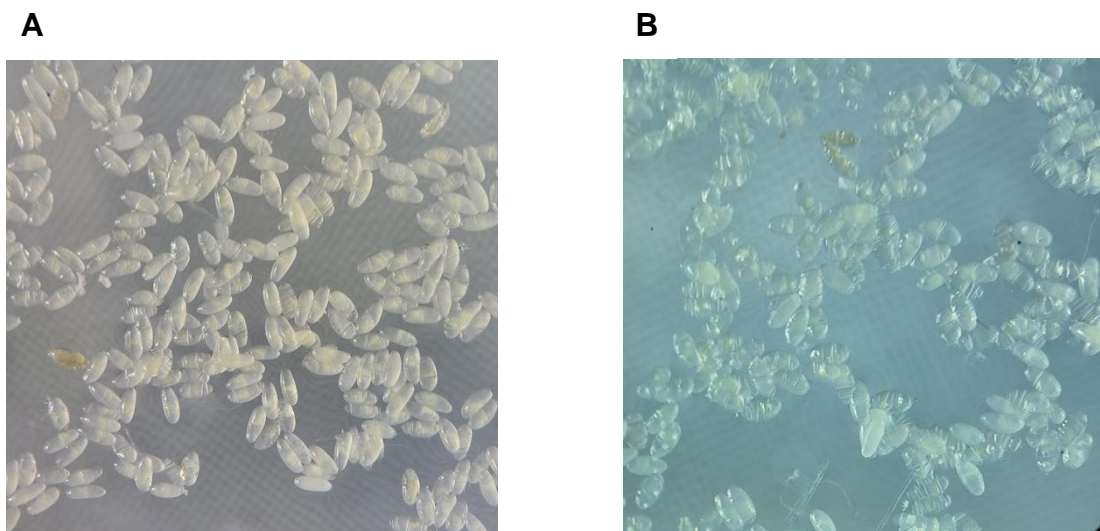


Figura 3.5 - Embriões em etilenoglicol (CPA)

(A) embriões após 3 minutos no etilenoglicol a 13% com algumas 'rugas' na superfície; **(B)** embriões após os 9 minutos em etilenoglicol a 39% no gelo, com mais rugas devido à maior osmolaridade do exterior do que no interior no embrião. Fonte própria

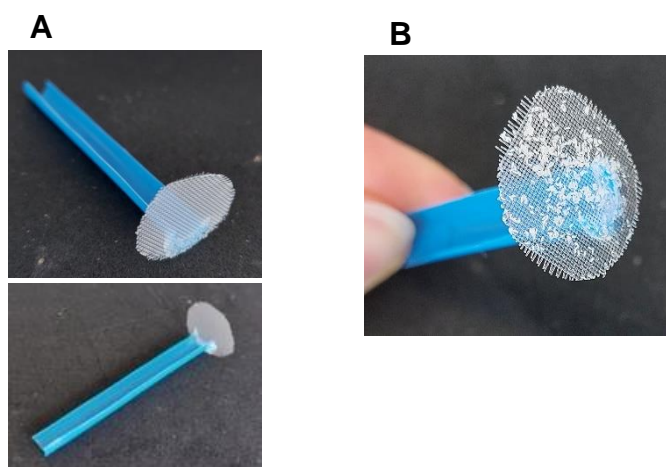


Figura 3.6 – Criorede e criorede com embriões para congelação em azoto líquido

(A) criorede (rede de nylon com uma pega de poliestireno) Feito homemade; **(B)** criorede com embriões colados na base para mergulho direto em azoto líquido. Fonte própria

3.4.5 Descongelamento e recuperação de embriões

Etapa 5: para o descongelamento é preparado uma placa com 6 poços de 35 mm cada, em que o primeiro poço terá ~10ml de sucrose a 30 wt% (m/v), preparada previamente com criotampão, no segundo com ~10ml de sucrose a 15 wt% (m/v), também preparada previamente com o criotampão, o terceiro e quarto poços com ~10ml de criotampão. Todos estes reagentes devem estar à temperatura ambiente (figura 3.7 A).

Retira-se a criorede do azoto líquido deixando ao vapor deste durante 3 segundos, logo de seguida mergulha-se a criorede com a rede de *nylon* para baixo, na vertical, no primeiro poço com a sucrose a 30 wt% durante 5 segundos. Neste já está mergulhado previamente um cesto novo para que os embriões assim que se descolarem da rede fiquem no seu interior. Após estes 5 segundos, passa-se o cesto já com os embriões para o segundo poço com a sucrose a 15 wt%, durante 3 minutos. Aqui é possível verificar à lupa que os embriões começam a perder as rugas que tinham e começam a voltar à sua forma normal, significando que a água está a entrar dentro do embrião e o CPA a sair. Passados os 3 minutos retira-se o cesto da sucrose, seca-se o excesso desta com papel e coloca-se no terceiro poço com criotampão, durante 10 minutos. Por último, retira-se e mergulha-se logo de seguida o cesto no quarto poço com os últimos 10 ml de criotampão por mais 10 minutos.

A sucrose aqui irá funcionar como crioprotetor não permeante e irá fazer com que o CPA saia lentamente do interior do embrião no início do descongelamento, enquanto os 20 minutos no criotampão são suficientes para ajudar a que toda a concentração de CPA saia do interior deste e que entre novamente água (criotampão) dentro do embrião.

Durante os últimos 10 minutos no criotampão é preparada uma outra placa de 4 poços de 10x10,5mm, onde é colocado num poço 1 ml de meio Schneider. Após estes últimos 10 minutos a criorede é retirada do criotampão e seca com papel. Com a ajuda de um pincel, todos os embriões são transferidos para o meio Schneider, onde devem ficar à superfície novamente, para que ocorram as trocas gasosas. Esta placa é colocada numa câmara húmida, ficando *overnight* até ao dia seguinte (figura 3.7 B). Foram testadas 3 temperaturas de incubação: temperatura de ambiente (18-25°C), 22°C e 25°C.

Após 18 a 24 horas do descongelamento e incubação, esta placa é observada à lupa para contagem e recolha de larvas eclodidas. As larvas são retiradas com ajuda do pincel para uma placa de petri vazia, para a remoção total deste meio em redor das larvas e são posteriormente transferidas para um tubo que contenha meio de cultura de mosca.

Previamente são feitos cortes à superfície do meio com o auxílio de uma espátula, e as larvas são colocadas nestes cortes, o que facilita a sua alimentação e desenvolvimento. Por fim, coloca-se um pouco de água destilada no tubo para facilitar a locomoção das larvas amolecendo o meio. O tubo de comida é então mantido a 25°C durante 10 dias, até que as larvas passem por todo o processo de desenvolvimento até moscas adultas.

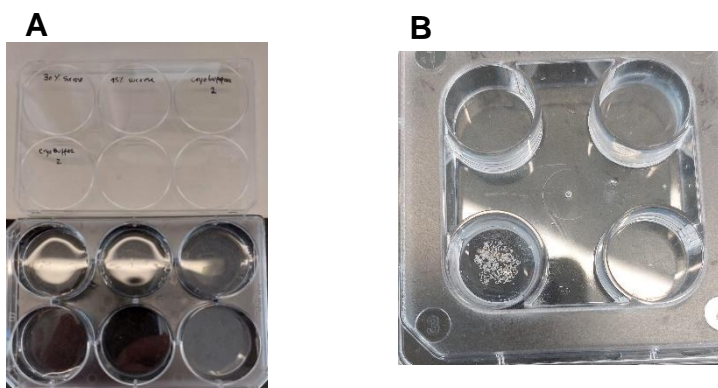


Figura 3.7: Placas para processo de descongelação e posterior incubação.

(A) placa de 6 poços com meios de descongelação; **(B)** placa de 4 poços com embriões em meio Schneider para incubação pós-descongelação. Fonte própria

3.4.6 Armazenamento contínuo de embriões criopreservados em azoto líquido (NL₂)

Este passo não foi mencionado pelos autores do protocolo original seguido, tendo sido pensado e executado por nós.

Para um armazenamento a longo prazo dos embriões, foram adquiridas caixas de cartão de 13x13 cm de 7x7 e divisórias para o seu interior com ~2x2cm em cada compartimento (figura 3.8 A). Esta medida corresponde à medida de cada criorede com os embriões criopreservados (figura 3.8 C). Estas caixas são colocadas em estruturas de inox de igual largura e capacidade até 7 caixas em armazenamento vertical. As estruturas em inox contendo as caixas de cartão com as crioredes e embriões, são armazenadas em criocarcas com azoto líquido (NL₂).

Para que o azoto entre dentro de cada caixa de cartão durante o armazenamento em criocarca, foram feitos quatro furos na sua tampa. Os furos permitem a entrada de azoto na caixa, mas a localização na tampa não permite a saída de azoto no momento de remoção da caixa da arca para acesso aos embriões (figura 3.8 B).

Para identificação de cada caixa e respetivo conteúdo do seu interior, será escrita uma letra em cada caixa, começando em A, e criada uma base de dados que irá conter toda a

informação de cada compartimento da divisória de cada caixa. Cada criorede terá também a informação, como nome da linha e data de congelação, escrita no seu interior.

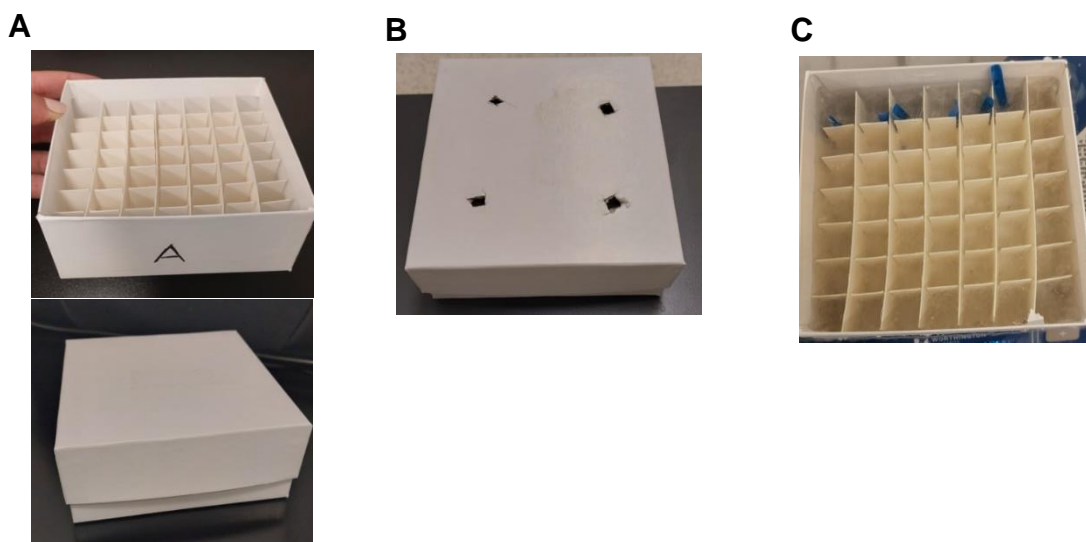


Figura 3.8 – Caixa de armazenamento de embriões em arca de azoto líquido.

(A) caixa de cartão com divisórias 7x7 para armazenamento da criorede com os embriões; **(B)** caixa tapada com pequenos furos na parte superior da tampa para entrada de azoto líquido; **(C)** caixa com azoto no interior e com crioredes nas primeiras divisórias. Fonte própria

4. Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Ao longo deste trabalho, a recolha de ovos foi conseguida através de duas *cages* com placas de sumo de maçã e agar na base, com ~400 moscas cada uma, e recolha da placa de uma em uma hora. Inicialmente, foi seguido o protocolo tal como descrito por Zhang *et al* (2021), mas testando diferentes temperaturas de incubação *overnight* (18h-24h) dos embriões após descongelação, passo que não é mencionado pelos autores. Para esta otimização, foram escolhidas três temperaturas diferentes: a temperatura ambiente da sala (por recurso a medições com *datalog* sabemos que varia diariamente entre 18-25°C) e as temperaturas de 22 e 25°C, utilizando incubadoras com controlo de temperatura e humidade que foi mantida a 70% HR.

4.1.1 Testagem da temperatura de incubação pós-descongelamento de embriões da linha w¹¹¹⁸

4.1.1.1 Temperatura ambiente (variação diária entre 18-25°C)

Na testagem da incubação dos embriões após o descongelamento à temperatura ambiente da sala, foram feitas 17 réplicas do protocolo, com uma média de 160 embriões cada uma, num total de 2935 congelados em azoto líquido, sendo todos eles descongelados 4 a 5 horas após a sua congelação (apêndice I). Nesta temperatura de incubação obtiveram-se os seguintes resultados (figura 4.1 A):

- Total de embriões congelados e descongelados: 2935
- Total de embriões recuperados que atingiram o estágio larval: 137 (4,7% em relação ao total de embriões congelados);
- Total de larvas vivas transferidas para meio de cultura: 78 (56,9% das larvas totais);
- Total de moscas eclodidas: 6 (7,7% do total de larvas vivas)

4.1.1.2 Temperatura a 25°C

No processo de incubação a 25°C após descongelamento, foram efetuadas somente 8 réplicas do protocolo e congelados um total de 4212 embriões (apêndice I).

A totalidade destes embriões foram recuperadas obtendo-se (figura 4.1 C):

- Total de embriões congelados e descongelados: 4212
- Total de embriões recuperados que atingiram o estágio larval: 92 (2,2% em relação ao total de embriões congelados);
- Total de larvas vivas transferidas para meio de cultura: 75 (81,5% das larvas totais);
- Total de moscas eclodidas: 8 (10,7% do total de larvas vivas)

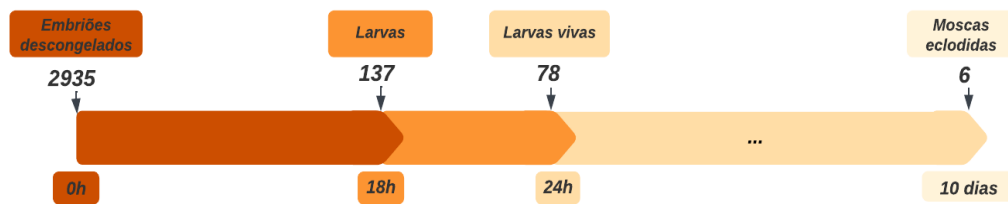
4.1.1.3 Temperatura a 22°C

Na testagem em temperatura de incubação de 22°C, foram realizadas 22 réplicas do protocolo com um total de 13508 embriões congelados (apêndice I).

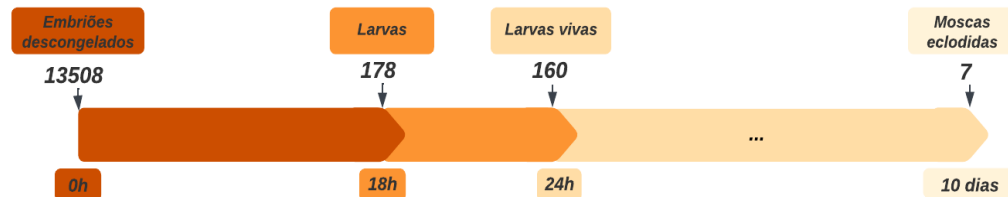
Após descongelamento de todos os embriões obteve-se (figura 4.1 B):

- Total de embriões congelados e descongelados: 13508
- Total de embriões recuperados que atingiram o estágio larval: 178 (1,3% em relação ao total de embriões congelados);
- Total de larvas vivas transferidas para meio de cultura: 160 (89,9% das larvas totais);
- Total de moscas eclodidas: 7 (4,4% do total de larvas vivas)

A



B



C

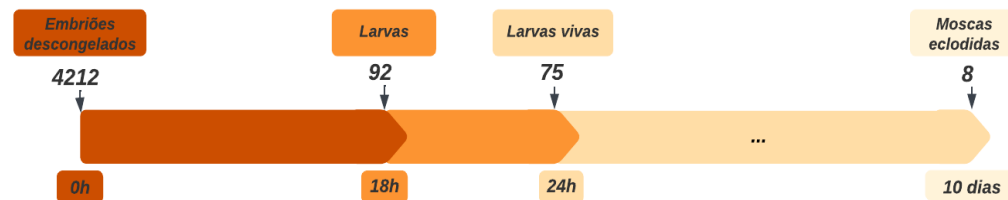


Figura 4. 1 – Linha cronológica do desenvolvimento dos embriões pós-descongelamento e incubação overnight, na três temperaturas testadas na linha w1118.

(A) Embriões descongelados e incubados *overnight* à temperatura ambiente (18-25°C); 18h depois registados 137 embriões em estruturas larvais; entre as 18 e 24h recolhidas 78 larvas com locomoção/vivas em que destas, 6 eclodiram para mosca após 10 dias em meio de cultura. **(B)** embriões descongelados e incubados *overnight* a 22°C, 18h depois registados 178 embriões em estruturas larvais; entre as 18 e 24h recolhidas 160 larvas com locomoção/vivas em que destas, 7 eclodiram para mosca após 10 dias em meio de cultura. **(C)** embriões descongelados e incubados *overnight* a 25°C, 18h depois registados 92 embriões em estruturas larvais; entre as 18h e 24h recolhidas 75 larvas com locomoção/vivas em que destas, 8 eclodiram para mosca após 10 dias em meio de cultura. A linha cronológica não se encontra à escala real.

O número de moscas eclodidas foi, para todas as temperaturas de incubação, uma ordem de grandeza abaixo do total de larvas vivas recolhidas: 6/78 (7,7%), 7/160 (4,4%) e 8/75 (10,7%) para as temperaturas de incubação temperatura ambiente, 22 e 25°C, respetivamente. No entanto, analisando a (figura 4.2), podemos ver que as percentagens de embriões que atingiram estádios larvais ou posteriores foram sempre baixas e até muito baixas (na ordem das décimas percentuais) se estivermos a falar da percentagem de moscas eclodidas em relação ao total de embriões congelados, para qualquer uma das três temperaturas de incubação.

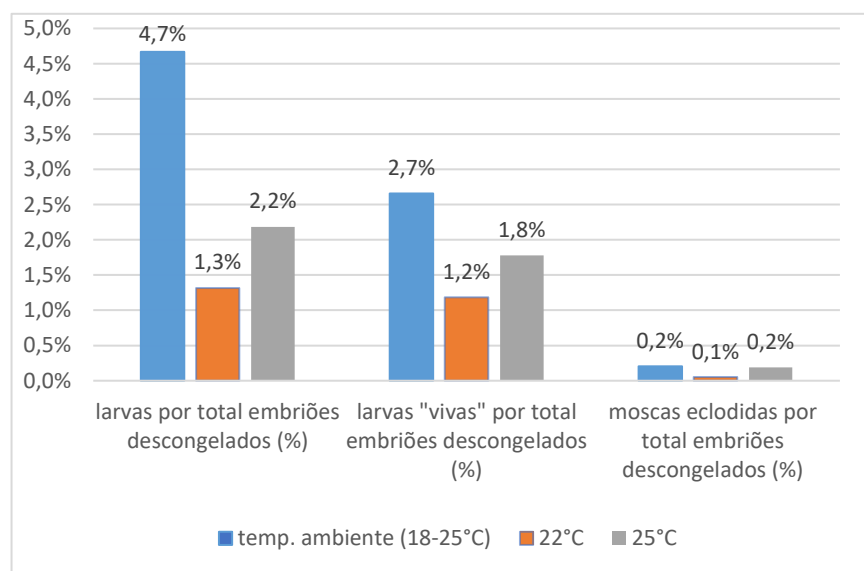


Figura 4. 2 – Representação gráfica da análise em percentagens dos resultados da descongelação da linha w1118.

Relação de embriões desenvolvidos para estágio larval por número de embriões descongelados; larvas vivas por número total de embriões descongelados e número de moscas eclodidas por total de embriões descongelados, nas três diferentes temperaturas testadas (temperatura ambiente (18-25°C), 22°C e 25°C).

Analisando a figura 4.2, relacionado a percentagem de embriões que passaram a estágio larval e o número de larvas que apresentavam locomoção indicando que estariam vivas, com o total de embriões congelados/descongelados nas três diferentes temperaturas, podemos talvez concluir que o ambiente mais propício à incubação dos embriões *overnight* após descongelamento será a temperatura ambiente, pois mesmo com valores percentuais muito pequenos foi a que obteve melhores resultados nestas duas variáveis. Em termos gerais verifica-se que existe logo após a congelação um grande declínio de embriões descongelados viáveis, sendo que só menos de 5% desenvolvem estruturas larvais e menos de 3% chegam a larvas vivas com sinais de locomoção.

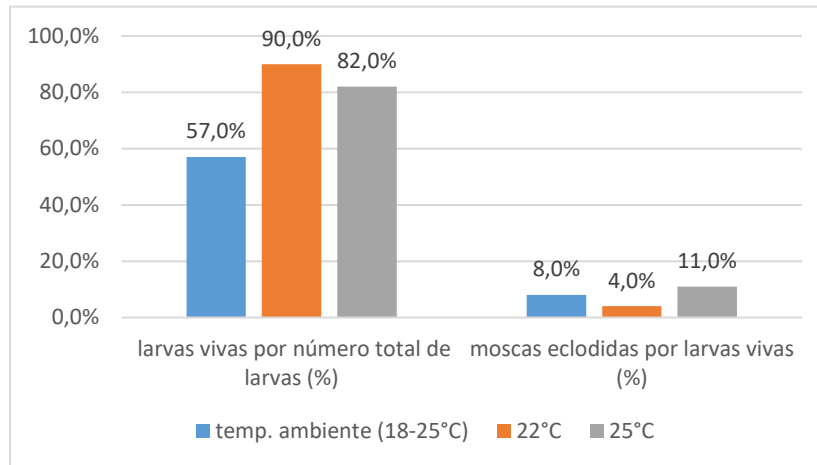


Figura 4. 3 – Representação gráfica da análise em percentagens de larvas vivas e moscas eclodidas após descongelamento na linha w1118.

Relação do total de larvas com locomoção/vivas por o número total de embriões desenvolvidos até estruturas larvais após descongelamento; número de moscas eclodidas por o total de larvas com locomoção/vivas, nas três diferentes temperaturas testadas (temperatura ambiente (18-25°C), 22°C e 25°C).

Na figura 4.3, relacionamos o número de larvas que apresentavam locomoção com o número total de embriões que se desenvolveram até a formação de estruturas larvais. A temperatura de incubação de 22°C foi aquela com que se obteve melhores resultados, já que 90% das formas com estruturas larvais visíveis eram de facto larvas vivas com sinais de locomoção. Tal já não aconteceu para o número de moscas eclodidas para o total de larvas vivas que foi ligeiramente mais elevado nos casos em que o desenvolvimento até ao estado larval também se deu à temperatura de 25°C.

Todas as larvas vivas das três temperaturas foram colocadas em tubos com meio de cultura de *Drosophila* com uma porção de pasta de levedura, que ajudará no seu desenvolvimento, a 25°C. Esta temperatura vai fazer com que as larvas desenvolvam em aproximadamente 10 dias, até à mosca adulta eclodida.

Todas as moscas eclodidas que resultaram nas três diferentes temperaturas, eram moscas visivelmente saudáveis, fenotipicamente correspondentes à sua linha de origem e todas geraram descendência após cruzamento, sendo que esta descendência também ela deu progenia, em cruzamentos mantidos a 25°C.

4.1.2 Testagem da temperatura de incubação pós-descongelamento de embriões da linha attP40

Em termos da testagem utilizando a linha attp40, esta foi somente testada na temperatura de incubação pós-descongelamento de 22°C. Foram realizadas 15 réplicas do protocolo em que no total 8835 embriões foram sujeitos à criopreservação.

Os resultados foram os seguintes (figura 4.4):

- Total de embriões congelados e descongelados: 8835
- Total de embriões recuperados que atingiram o estágio larval: 67 (0,8% em relação ao total de embriões descongelados);
- Total de larvas vivas transferidas para meio de cultura: 62 (92,5% das larvas totais);
- Total de moscas eclodidas: 4 (6,5% por total de larvas vivas)

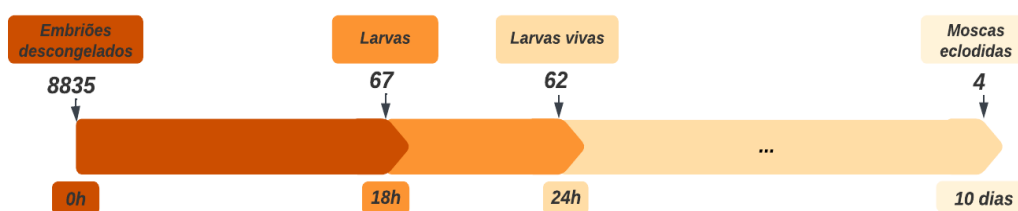


Figura 4. 4 – Linha cronológica do desenvolvimento dos embriões pós-descongelamento e incubação *overnight* a 22°C, na linha attP40.

Embriões descongelados e incubados *overnight* à temperatura de 22°C; 18h depois registados 67 embriões em estruturas larvais; entre as 18 e 24h recolhidas 62 larvas com locomoção/vivas, em que destas 6 eclodiram para mosca após 10 dias em meio de cultura. A linha cronológica não se encontra à escala real.

Temperatura	Nº larvas por total embriões descongelados (%)	Nº larvas vivas por total embriões descongelados (%)	Nº larvas vivas por nº de larvas (%)	Nº moscas eclodidas por nº larvas vivas (%)
22°C	0,8%	0,7%	92,5%	6,5%

Tabela 1: Representação em percentagens dos resultados pós-descongelamento da linha attP40

de: embriões desenvolvidos para estágio larval por total descongelados; larvas com locomoção/vivas por total de embriões descongelados; número de larvas com locomoção/vivas por total de embriões em estágio larval e número de moscas eclodidas por total de larvas com locomoção/vivas.

À semelhança da linha w¹¹¹⁸ também nesta linha foram feitos cruzamentos com todas as moscas eclodidas, e todos os cruzamentos deram descendência. Estes cruzamentos foram mantidos a 25°C.

Dos resultados acima pode-se concluir que a esmagadora maioria de embriões, de ambas as linhas, sujeitos ao processo de congelação e recuperação, morre antes de desenvolver estruturas larvais.

Os embriões podem estar a morrer como resultado do processo até ao congelamento, devido ao congelamento em si mesmo ou no processo de recuperação.

Um dos passos do processo que se sabe ser delicado é o passo inicial de permeabilização, no caso feito através das seguintes etapas:

- 1 a 2 minutos com lixívia;
- Lavar com água destilada corrente
- 10 segundos em isopropanol;
- 10 segundos com D-limoneno e heptano;
- 5 segundos com heptano

4.1.3 Testagem na permeabilização

4.1.3.1 Permeabilização com protocolo inicial, sem processo de entrada de CPA (etilenoglicol) e sem congelação.

Para testar se os embriões estão a morrer por efeito da permeabilização, parou-se o protocolo nesse ponto e colocaram-se os embriões em meio Schneider para desenvolvimento *overnight* a 22°C.

Os resultados foram os seguintes: 90% dos embriões sujeitos à permeabilização desenvolveram para o estágio larval, ficando apenas 10% por desenvolver.

Tempo permeabilização: 10s,10s,5s			
Descorionação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + Schneider			
linha	Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
	585	60	525
%		10%	90%

Tabela 2 - embriões com processo de descorionação com permeabilização

Estes resultados indicam que a maioria dos embriões resiste ao tratamento de permeabilização e não será esta a principal causa de morte.

4.1.3.2 Permeabilização com protocolo inicial, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol).

Quisemos depois testar se os embriões estão a morrer por ação do CPA. Para testar esta possibilidade os embriões foram descorionados, permeabilizados como no teste anterior e de seguida colocados primeiramente em 13% de CPA e depois a 39%, como protocolado. Apesar de não ter sido realizado o passo da congelação, mas devido ao facto de se ter usado o etilenoglicol, foi necessário passar estes embriões pelo processo de recuperação em sucrose a 30 e a 15 wt%, e pelo criotampão durante os 20 minutos, para que se efetuasse a remoção do CPA do interior dos embriões. Também estes foram transferidos para meio de cultura Schneider logo de seguida e incubados a 22°C.

Feita esta testagem obtiveram-se os seguintes resultados:

Tempo permeabilização: 10s,10s,5s			
Descorionação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + etilenoglicol (13% e 39%) + sucrose + Schneider			
	Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
	498	42	456
%		8%	92%

Tabela 3: embriões com processo de descorionação, permeabilização e entrada e saída de CPA

Dos resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, conclui-se que o passo crítico que leva à morte dos embriões não parecem ser nem a permeabilização, nem o contacto com o CPA, adensando-se a hipótese de os embriões morrerem no passo da congelação.

Um dos motivos de possibilidade de dano durante a congelação é não haver efeito do CPA por ineficiência de penetração deste composto. Uma possibilidade de aumentar a eficiência de penetração de CPA no embrião é aumentando a permeabilização do embrião, por exemplo, pelo aumento de exposição aos agentes permeabilizantes.

4.1.3.3 Aumento de exposição na permeabilização, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol).

Foram então testados 615 embriões, onde foi feito o processo de descorionação e de permeabilização com um aumento de tempo de exposição aos solventes D-limoneno + heptano e heptano para 20 e 10 segundos, respetivamente. Como anteriormente foram colocados em meio Schneider e incubados *overnight* a 22°C. No dia seguinte os resultados eram estes:

Tempo permeabilização: 10s,20s,10s		
Descorionação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + Schneider		
Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
615	455	160
%	74%	26%

Tabela 4: embriões com processo de descorionação e com aumento de tempo na permeabilização e Schneider.

Este processo foi novamente repetido a um total de 352 novos embriões, mas desta vez com o acréscimo novamente à exposição dos embriões ao CPA (13% e 39%) e obtiveram-se os seguintes resultados após *overnight* a 22°C:

Tempo permeabilização: 10s,20s,10s		
Descorionação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + etilenoglicol (CPA) (13% e 39%) + sucrose + schneider		
Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
352	347	5
%	99%	1%

Tabela 5: embriões com processo de descorionação, com aumento de tempo na permeabilização, entrada e saída de CPA, sucrose e Schneider.

Dos resultados dos 2 ensaios anteriores, pode-se concluir que o aumento na exposição aos agentes de permeabilização foi prejudicial ao desenvolvimento dos embriões, ficando com uma percentagem de sobrevivência muito baixa em relação aos ensaios passados.

4.1.3.4 Protocolo inicial de permeabilização, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol) contendo corante Rodamina B.

Posto os resultados anteriores, voltámos ao tempo de permeabilização protocolado e decidimos verificar se efetivamente a membrana dos embriões estaria a ficar realmente permeabilizada para a entrada do CPA. Para isso foi adicionado um corante à solução de etilenoglicol chamado de Rodamina B, para testar se efetivamente o CPA estaria a entrar, o que coraria os embriões no seu interior de rosa/vermelho.

Foi então feita uma nova solução de etilenoglicol de 13 e 39% juntamente com 0,01g de rodamina B. Foi feito todo o processo de permeabilização de acordo com os tempos iniciais, passando para o etilenoglicol com a rodamina B nos tempos protocolados, pela sucrose e pelo Schneider, com incubação a 22°C. Após desenvolvimento *overnight* foram feitas as seguintes contagens:

Tempo permeabilização: 10s,10s,5s			
Descoronação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + etilenoglicol (CPA) c/ Rodamina B (0,01g) (13 e 39%) + sucrose + Schneider			
	Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
	791 (40 rosa)	65	726
%	5% rosa	8%	92%

Tabela 6: embriões com processo de descoronação, permeabilização, exposição ao etilenoglicol juntamente com rodamina B, sucrose e Schneider.

O número de embriões corados foi muito baixo, o que reforça a hipótese de os embriões não estarem a ser corretamente permeabilizados, e a entrada do CPA (+corante) não estar a fazer-se para o seu interior.

Os dados anteriores apontam para que o CPA não esteja de facto a penetrar nos embriões. Hipoteticamente, tal pode acontecer por incapacidade de entrada do CPA, ou, de forma independente, por incapacidade de entrada de qualquer composto.

4.1.3.5 Protocolo inicial de permeabilização, com exposição de 5 e 10 min. a solução com Rodamina B, com processo de entrada e saída de CPA (etilenoglicol).

Para testar se o embrião estaria permeável a uma solução aquosa de rodamina, após a permeabilização, incubámos em 3 ml de uma solução de 100ml de água destilada com 0,01g de Rodamina B, os embriões depois de secos, durante 5 minutos. Paralelamente, noutro *batch* de embriões, fizemos o mesmo, mas incubando em solução aquosa de Rodamina durante 10 minutos. Após os 5 ou 10 minutos e sucessivas lavagens, os embriões foram colocados num poço em placa com meio Schneider (3ml), *overnight* a 22°C. Os resultados que se obtiveram foram os seguintes:

Tempo permeabilização: 10s,10s,5s			
Descorionação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + Rodamina B (5 min.) + etilenoglicol (CPA) (13% e 39%) + sucrose + schneider			
	Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
	430 (37 rosa)	70 (20 rosa)	380
%	9% rosa	12% (29% rosa)	88%

Tabela 8: embriões com processo de descorionação, permeabilização, exposição por 5 minutos á solução aquosa de Rodamina B, exposição ao etilenoglicol, sucrose e Schneider

Tempo permeabilização: 10s,10s,5s			
Descorionação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + Rodamina B (10 min.) + etilenoglicol (CPA) (13% e 39%) + sucrose + schneider			
	Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
	661 (44 rosa)	110 (35 rosa)	551
%	7% rosa	17% (32% rosa)	83%

Tabela 7: embriões com processo de descorionação, permeabilização, exposição por 10 minutos á solução aquosa de Rodamina B, exposição ao etilenoglicol, sucrose e Schneider

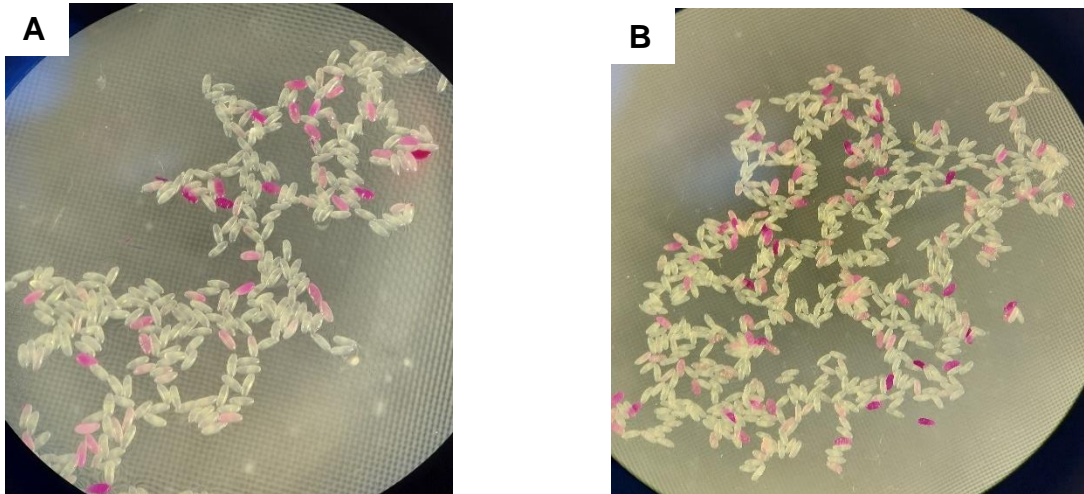


Figura 4. 5- Embriões corados com rodamina B.

(A) embriões corados com exposição a 10 minutos de rodamina B e **(B)** embriões corados com exposição à rodamina B juntamente com etilenoglicol. Pode-se verificar que muito poucos embriões ficavam corados após o tempo de exposição ao corante.

Como podemos observar nas imagens acima (figura 4.5 A e B), obtivemos embriões com diferentes tonalidades de corante no seu interior. Este facto é compatível com a hipótese de os embriões não estarem a ficar corretamente permeabilizados. Mesmo que haja entrada de algum crioprotetor (e corante), pode não ser o suficiente para que ocorra uma proteção eficaz contra a formação de cristais de gelo intracelulares.

4.1.3.6 Menor tempo de recolha de embriões, com protocolo inicial de permeabilização, exposição de 10 min. a uma solução com Rodamina B e com entrada e saída de CPA (etilenoglicol).

Sabemos que um dos problemas que também poderá estar associado ao não sucesso do protocolo de congelação é o estágio de desenvolvimento embrionário não estar correto no início do protocolo, pois foi referido como sendo um ponto crucial a ter em conta. Para testar esta hipótese, o tempo de recolha dos embriões foi reduzido de 60 para 30 minutos. Diminuir o tempo de postura de ovos, permite a obtenção de uma janela de estádios de desenvolvimento mais estreita e, potencialmente, enriquecemos a amostra para os embriões no estágio certo.

Com os embriões recolhidos desta forma, foi feito todo o processo de permeabilização tal como no protocolo inicial, exposição a rodamina B por 10 minutos, incubação em etilenoglicol a 13 e 39%, sucrose e Schneider. Após a incubação a 22°C destes embriões foram obtidos os seguintes resultados:

Tempo permeabilização: 10s,10s,5s		
Descorinação + permeabilização (Isopropanol; D-limoneno + heptano; Heptano) + Rodamina B + etilenoglicol (CPA) 13% e 39% + sucrose + schneider		
Nº embriões	nº embriões não desenvolvidos	nº larvas vivas
310 (80 rosa)	103 (61 rosa)	207
26% rosa	33%	67%

Tabela 9: embriões com redução na recolha para 30 minutos, expostos à descorinação, permeabilização, rodamina B, etilenoglicol 13 e 39%, sucrose e Schneider.

Logo após a exposição à rodamina B observou-se imediatamente que já existiu um ligeiro aumento de embriões corados em relação aos testes feitos anteriormente com rodamina, querendo dizer que possivelmente o ajuste de tempo de recolha de embriões é um ponto a ter em conta e a ser explorado futuramente, podendo ser ajustado também com os tempos de exposição dos solventes de permeabilização.

4.2 Discussão dos resultados

No decorrer deste estudo foi possível congelar e revitalizar embriões de *Drosophila melanogaster*, no entanto, com taxas de eficiência muito reduzidas, pelo que não nos permite afirmar que neste momento é possível implementar esta técnica de criopreservação de uma linha de *D. melanogaster* de forma totalmente segura.

Os resultados obtidos demonstram que, replicando o protocolo utilizado por Zhan e seus colaboradores em 2021, foi difícil obter resultados positivos e consistentes com uma incubação dos embriões descongelados tanto à temperatura ambiente, como a 22 e a 25°C. Analisando os resultados de forma direta, de entre as três temperaturas testadas em w¹¹¹⁸, é possível observar que à temperatura ambiente, que variava entre 18-25°C, foi como se obteve a maior percentagem do total de embriões descongelados que chegaram ao estágio larval e foi também a esta temperatura que se verificou o maior número de larvas que apresentavam locomoção, ou seja, que estariam vivas, em relação ao total de

embriões descongelados. Isso poderá explicar-se no sentido em que a temperatura ambiente abrange um leque maior de temperaturas favoráveis ao desenvolvimento embrionário de *Drosophila* (Chong et al., 2018).

Um acontecimento notado em muitas das rondas do protocolo após o descongelamento e nas três temperaturas de incubação testadas, foi o facto de os embriões ficarem com um grande retardamento no seu desenvolvimento até à fase larval, fazendo até por vezes com que desenvolvimento ficasse interrompido levando à morte do embrião. Os embriões descongelados demoram no mínimo mais 18h do que o normal até passar ao estado larval, a partir do estágio de desenvolvimento em que estavam antes à congelação (estádio 16, com 22h de incubação a 20°C). Em ocasiões normais de desenvolvimento um embrião leva 24h a chegar ao estágio 17, a uma temperatura entre os 20 e os 21°C (DeBardlabon et al., 2022). Isto poderá ter acontecido devido a todos os processos químicos a que os embriões foram sujeitos anteriormente no protocolo (descorionação, permeabilização e entrada do CPA), que poderão interferir no normal desenvolvimento do embrião (Rajamohan et al., 2018). Foi de observar também que no início da testagem do protocolo, quando se testou a temperatura ambiente na incubação após-descongelamento, na fase de transferir todos os embriões descongelados para o meio Schneider, existia sempre uma grande percentagem de larvas que após a *overnight* de incubação encontravam-se mortas. Este facto pode ser devido ao meio de cultura Schneider ser muito sensível à contaminação por bactérias (Rajamohan et al., 2003), o que era observável pelo aspeto turvo que apresentava, o que pode contribuir para a morte das larvas após eclosão. Isto aconteceu principalmente nas primeiras réplicas de testagem do protocolo, quando foi testada a incubação à temperatura ambiente, o que pode explicar a menor quantidade de larvas vivas/com locomoção desenvolvidas a esta temperatura. Este problema foi resolvido quase a 100% depois da implementação de medidas como limpar cuidadosamente com álcool a 70% a placa para onde iriam ser transferidos os embriões com o meio Schneider e ter bastante cuidado com o seu manuseamento para não existir contaminação cruzada nesta transferência. Contudo também poderia ter sido adicionada ao meio gentamicina em baixa concentração, do qual iria inibir o crescimento de bactérias (Rajamohan et al., 2003). Este meio é o ideal para usar neste passo de incubação, pois fornece ao embrião nutrientes essenciais para um melhor desenvolvimento e um ambiente aquoso para descarga contínua do CPA intra-embrionário (Zhan et al., 2021). Nas duas outras temperaturas testadas e principalmente a 22°C de incubação pós-descongelamento, que o número de larvas vivas já foi

consideravelmente mais elevado, devido possivelmente a este paço ter sido introduzido no processo.

Em relação ao número de moscas eclodidas por desenvolvimento das larvas sobreviventes, registou-se um número ligeiramente superior a 25°C de incubação pós-descongelamento em comparação com as outras duas temperaturas testadas. Todas as larvas vivas eram transferidas para tubos com meio de cultura (todos eles com a mesma dieta) e depois colocados em câmara de 25°C com humidade controlada (70% Hr). Esta foi a temperatura de desenvolvimento escolhida, porque acelera um pouco o desenvolvimento até à fase de mosca adulta, fazendo com que se obtivesse resultados mais rapidamente, sensivelmente em 10 dias (Chong et al., 2018). Outro fator que se notou em todas as rondas experimentais, foi que todas as larvas sobreviventes, resultantes de qualquer uma das temperaturas testadas, estavam bastante fragilizadas, com pouca mobilidade e ligeiramente mais pequenas do que o normal. Provavelmente, isto deve-se de novo ao facto de os embriões terem sido expostos a todos os solventes químicos utilizados ao longo do processo, fazendo com que tivessem um desenvolvimento mais condicionado (Rajamohan et al., 2018). Um outro fator que pode ter também contribuído para estas percentagens tão baixas, terá sido o tipo de dieta (meio de cultura) não ser a mais adequada para estas larvas em específico, que eram visivelmente muito mais fragilizadas que o normal. Em criopreservação da mosca da fruta do mediterrâneo (*Ceratitis capitata*) por exemplo, foi usada uma outra dieta à base de agar que melhorou bastante a percentagem de pupação das larvas resultantes da descongelação (Rajamohan et al., 2003). Os nutrientes e sais essenciais são lixiviados/removidos do embrião durante o tratamento com este protocolo e só são recuperados por incubação em um meio de cultura de células de inseto rico em nutrientes (meio de cultura Schneider) e uma dieta larvar fortificada (Rajamohan et al., 2003).

Relativamente à linha attp40, foram realizadas experiências somente com a temperatura de incubação pós-descongelamento de 22°C. Os valores para esta linha também foram bastante baixos, não chegando a 1% de embriões descongelados que chegaram ao estágio larval, podendo-se afirmar que à semelhança do que aconteceu com a linha w¹¹¹⁸, quase 100% dos embriões morre ainda antes de chegar ao estágio larval, por consequência dos procedimentos até à congelação, ou durante a congelação ou durante a descongelação. A percentagem de larvas com locomoção/vivas que chega a moscas eclodidas foi de somente 6,5%, não muito diferente da linha w¹¹¹⁸ à mesma temperatura.

Analisando os resultados da testagem à permeabilização como protocolado, com o passo de entrada do CPA e sem o passo de entrada do CPA (tabela 2 e 3), pode-se observar

que ambos os testes não afetaram o desenvolvimento dos embriões sujeitos ao processo, tendo-se obtido uma taxa de larvas vivas a rondar os 90% em ambos os casos. Isto poderá significar que o problema poderá não estar na permeabilização nem na entrada do CPA, ou, em alternativa, que o embrião não está a permeabilizar e o CPA nem chega a entrar. Numa tentativa de nos tentarmos assegurar que o embrião ficava efetivamente permeável ao CPA, tentámos um aumento de exposição aos agentes de permeabilização alterando o tempo de exposição ao D-limoneno com heptano e ao heptano para o dobro (20 segundos e 10 segundos respetivamente). Quando estes passos foram seguidos de incubação com etilenoglicol (CPA), praticamente nenhuma larva sobreviveu (5 em 352). Quando as alterações aos tempos de permeabilização não foram seguidas de incubação em etilenoglicol, 26% dos embriões desenvolveram-se em larvas (tabela 4). Estes resultados apontam para o facto de ser prejudicial para os embriões o aumento de tempo de exposição ao D-limoneno com o Heptano, ou ao Heptano sozinho, pelo menos com estas concentrações, pois em outros protocolos de permeabilização foi possível permeabilizar corretamente embriões de *D. melanogaster* em estágio tardio de desenvolvimento, com uma proporção de 1:1 de D-limoneno com heptano (Schulman et al., 2013).

Efetivamente, estes solventes permeabilizam a camada cerosa (D-limoneno) e a membrana vitelina (heptano) do embrião, mas, em concentrações mais elevadas e com maior tempo de exposição, poderão vir a ser tóxicos para os embriões, levando mesmo à morte quando estes se encontram em estádios de desenvolvimento mais iniciais (Rand et al., 2010). Nestes nossos ensaios isso foi notório, pois em ambas as testagens no final do processo houve registo de embriões pretos no seu interior, dando a sensação que existiu necrose dos tecidos devido à toxicidade provocada pelo aumento de tempo de exposição a estes solventes na permeabilização. Quando o tratamento de permeabilização 'aumentado' foi seguido da incubação com etilenoglicol, o efeito ainda foi mais drástico e mais de 90% dos embriões não desenvolveram (tabela 5). Portanto poderá concluir-se que este tempo de exposição ou superior a ele, não são favoráveis ao embrião de *D. melanogaster*.

Para verificação da correta permeabilização da membrana dos embriões com o protocolo de permeabilização inicial, decidiu-se adicionar corante Rodamina B à solução de etilenoglicol de 13 e 39%. O racional foi, se a membrana estiver permeabilizada e o CPA entrar, os embriões ficarão corados (Zhan et al., 2021) (Rand et al., 2010). No entanto, observou-se que somente 5% de embriões coraram (tabela 6) e 90% chegaram a larva viva. Se não houve entrada de corante para o interior dos embriões, também não houve

entrada do CPA. Estes resultados adensam a hipótese de o problema estar no processo de permeabilização da membrana dos embriões. Ainda foi testado uma solução de Rodamina B isolada do etilenoglicol, com tempos de exposição de 5 e 10 minutos e verificou-se que não existiu um aumento de embriões corados (tabela 7 e 8), levando a crer que apenas uma solução aquosa também não estaria a entrar. Uma das potenciais causas de falha da permeabilização, prende-se com o estágio de desenvolvimento dos embriões. Está reportado, que todo o processo de permeabilização, vitrificação e, portanto, o sucesso da criopreservação, depende muito do correto estágio de desenvolvimento embrionário (Mazur P et al., 1992; Rajamohan et al., 2003; Zhan et al., 2021). Manipulando a temperatura de incubação, podemos controlar o tempo de desenvolvimento dos embriões, mas teremos sempre uma gama de estádios correspondente ao tempo dado para postura dos ovos. Se diminuirmos a janela temporal de postura de ovos, podemos recolher embriões mais sincronizados no seu desenvolvimento e, portanto, uma maior percentagem de embriões no estágio de desenvolvimento ideal para o processo de criopreservação (Rajamohan et al., 2003). Efetivamente, foi testado fazer uma recolha de embriões num período mais curto, 30 minutos e foi notório que houve um ligeiro aumento de embriões corados com Rodamina B, levando a crer que existiu um aumento da sincronização de embriões em estágio de desenvolvimento inicial, levando a ter melhores resultados (tabela 9).

Mesmo com tempos de recolha curtos, é possível que nem todos os embriões estejam sincronizados no seu desenvolvimento. Este fenómeno pode-se explicar pela capacidade de retenção de ovos fertilizados no interior da fêmea, característica que pode variar entre as diferentes linhas de *Drosophila melanogaster* (Markow et al., 2009) (Horváth & Kalinka, 2018), fazendo com que seja mais difícil otimizar um protocolo para a recolha, incubação e tratamento pré-criopreservação dos embriões de diferentes linhas genéticas.

5. Capítulo 5 - Considerações finais

5.1. Conclusões

Resumidamente, com resultados os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que a técnica de criopreservação de embriões de *D. melanogaster* é uma técnica difícil de replicar, requerendo muita adaptação às diferentes linhas genéticas desta espécie e aos fatores que podem influenciar o correto procedimento de todo o protocolo.

Em suma obteve-se os seguintes resultados no presentes estudo:

- Em w¹¹¹⁸
 - A temperatura ambiente que ronda entre os 18-25°C, entre as três temperaturas testadas, será a melhor para a incubação pós-descongelamento, onde se obteve melhores resultados tanto a nível de embriões que desenvolveram até estrutura larvar, como de larvas que apresentavam locomoção, ou seja, que estariam vivas.
 - Nas três temperaturas a percentagem de embriões que não desenvolve para estrutura larvar após descongelamento e incubação é inferior a 50%, ou seja, mais de metade dos embriões sujeitos ao protocolo de vitrificação não chega a desenvolver para larva após a descongelação.
 - Menos de 1% dos embriões, nas três temperaturas de incubação testadas, chegam a moscas eclodidas.
 - Em termos de relação de número de larvas que apresentavam locomoção com o número de embriões que desenvolveram até estrutura larvar, a temperatura a 22°C foi a que se obteve melhor resultado, ou seja, 90% das larvas apresentavam locomoção.
- Em attP40
 - As percentagens de embriões desenvolvidos para estrutura larvar e de larvas com locomoção/vivas, com relação ao total de embriões descongelados, foi ainda mais baixo em comparação à linha w¹¹¹⁸ à mesma temperatura, não chegando a 1%.
 - O número de moscas eclodidas também não foi significativo em relação à linha w¹¹¹⁸.

Em suma, e pelos resultados das testagens à permeabilização, chegou-se à conclusão de que possivelmente um dos problemas dos baixos resultados deste protocolo dever-se-á ao facto de os embriões não estarem a ficar corretamente permeabilizados, levando com que não haja entrada de CPA para o seu interior e com que não haja saída de água consequentemente. Este problema ocorreu muito provavelmente devido aos embriões não se encontrarem no estágio de desenvolvimento correto no início do protocolo, pois

porque quando se encurtou o tempo na recolha destes para 30 minutos, verificou-se que existiu um ligeiro aumento de embriões corados com Rodamina B, ou seja, com uma maior permeabilidade na membrana plasmática. Este resultado vem a confirmar o que muito autores afirmam, que o estágio de desenvolvimento do embrião, nas diferentes espécies de dípteros, é um dos fatores mais importantes para o sucesso do protocolo de vitrificação.

5.2. Limitações ao estudo e Perspetivas futuras

Para estudos futuros seria de grande interesse para a comunidade científica que usa este modelo animal, fazer novos estudos sobre este protocolo de criopreservação, como por exemplo a nível da testagem de pequenas alterações na temperatura de incubação pré-tratamentos, para verificar se é possível ajustar o estágio de desenvolvimento dos embriões e testar se todo o restante processo teria mais sucesso. A temperatura desta incubação pré-tratamento é um ponto crucial para também conseguir o estágio de desenvolvimento correto do embrião, e por vezes uma mudança de 1°C pode mudar significativamente a proporção do estágio de desenvolvimento predominante (DeBardlabon et al., 2022).

Juntamente com a testagem de diferentes temperaturas de incubação no pré-tratamento, outro ponto que também achamos que seria importante de avaliar será a recolha de embriões, onde seria importante testar recolhas em períodos ainda mais curtos, para ter com isto mais certezas de que são recolhidos embriões novos, que estejam em fase inicial de desenvolvimento e não embriões que ficaram algum período retidos no útero da fêmea, como já foi referido possível de acontecer. Com este teste tentar também encontrar um padrão entre as diferentes linhas genéticas de *D. melanogaster*.

Uma outra variante que será possível testar é a permeabilização das membranas com outras concentrações da mistura de D-limoneno com heptano e outros tempos à sua exposição, e testar também outros solventes como o hexano e o butanol, usados em estudos anteriores de permeabilização de membrana de *D. melanogaster* (Mazur P et al., 1992), testando de seguida se a entrada do CPA e conseqüentemente a congelação ocorrem corretamente.

Um ponto importante que já foi implementado neste estudo de tese, mas que poderá ser melhorado, será evitar condições estressantes de incubação como a abertura das câmaras de incubação regularmente e com isto ter a certeza que não existe nenhuma oscilação de temperatura e humidade, o que afetaria um desenvolvimento que se

pretende padronizado para recolha de embriões no preciso estágio de desenvolvimento (DeBardlabon et al., 2022).

É de grande importância para a comunidade científica a otimização e implementação em larga escala de um protocolo de criopreservação de *D. melanogaster*. Tal tarefa tem-se revelado difícil e é preciso ter sempre em mente que a otimização pode ser complexa e morosa. Será preciso testar diferentes identidades, concentrações e tempos de incubação dos agentes permeabilizantes, bem como dos crioprotetores permeáveis e não permeáveis, cuja natureza e concentração relativa tem consequências grandes tanto na capacidade crioprotetora como na toxicidade provocada. Acresce ainda, diferenças apreciáveis na tolerância a todos estes agentes de diferentes linhas genéticas e ao longo de diferentes estágios de desenvolvimento (Zhan et al., 2021).

6. Capítulo 6 - Referências bibliográficas

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Craig Venter, J. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, *287*, 2185–2195. <http://science.sciencemag.org/>
- Aguila, J. R., Suszko, J., Gibbs, A. G., & Hoshizaki, D. K. (2007). The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, *210*(6), 956–963. <https://doi.org/10.1242/jeb.001586>
- Ali, J., AlHarbi, N. H., & Ali, N. (2017). Historical background on gamete and embryo cryopreservation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1568, pp. 3–20). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6828-2_1
- Ambrosini, G., Andrisani, A., Porcu, E., Rebellato, E., Revelli, A., Caserta, D., Cosmi, E., Marci, R., & Moscarini, M. (2006). Oocytes cryopreservation: State of art. *Reproductive Toxicology*, *22*(2), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.04.024>
- Arav, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. In *Theriogenology* (Vol. 81, Issue 1, pp. 96–102). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.011>
- Avilés-Pagán, E. E., & Orr-Weaver, T. L. (2018). Activating embryonic development in *Drosophila*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *84*, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.019>
- Baboo, J., Kilbride, P., Delahaye, M., Milne, S., Fonseca, F., Blanco, M., Meneghel, J., Nancekievill, A., Gaddum, N., & Morris, G. J. (2019). The Impact of Varying Cooling and Thawing Rates on the Quality of Cryopreserved Human Peripheral Blood T Cells. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39957-x>
- Bakker, K. (1959). Feeding period, growth, and pupation in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *2*(3), 171–186. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1959.tb00432.x>
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., Hoskins, R. A., & Spradling, A. C. (2004). The BDGP gene disruption project: Single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics*, *167*(2), 761–781. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026427>

- Bellen, Tong, & Tsuda (2010). 100years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nature* .
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. In *Theriogenology* (Vol. 78, Issue 8, pp. 1682–1699). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
- Benzer, S. (1967). Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Genetics*, 58, 1112–1119. <https://www.pnas.org>
- Bojic, S., Murray, A., Bentley, B. L., Spindler, R., Pawlik, P., Cordeiro, J. L., Bauer, R., & de Magalhães, J. P. (2021). Winter is coming: the future of cryopreservation. In *BMC Biology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 1–20). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>
- Brand, H. A., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* , 118 (2), 401–415.
- Chan, H., & Bonini, N. M. (2000). *Drosophila* models of human neurodegenerative disease. *Nature*. www.nature.com/cdd
- Chang, C. C., Nel-Themaat, L., & Nagy, Z. P. (2011). Cryopreservation of oocytes in experimental models. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(3), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.01.007>
- Chong, J., Amourda, C., & Saunders, T. E. (2018). Temporal development of *Drosophila* embryos is highly robust across a wide temperature range. *Journal of the Royal Society Interface*, 15(144), 1–11. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0304>
- DeBardlabon, K. M., Rajamohan, A., & Rinehart, J. P. (2022). Vitrification of manually stage-selected embryos of *Drosophila* have significantly higher survival and emergence – Consequences for insect germplasm storage. *Cryobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.01.002>
- Edgar, D. H., & Gook, D. A. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 18(5), 536–554. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms016>
- Fahy, G. M., Macfarlane, D. R., Angell, C. A., & Meryman, H. T. (1984). Vitrification as an Approach to Cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407–426.
- Finishing the euchromatic sequence of the human genome International Human Genome Sequencing Consortium**. (2004). <http://www.genome.gov/10000923>.
- Flagg, R. O. (1981). *Carolina drosophila manual*. Carolina Biological Supply Co.
- Gao, D., & Critser, A. K. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR J.*, 41(4), 187–196. <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/>

- Golic, K. G., & Lindquist, S. (1989). The FLP Recombinase of Yeast Catalyzes Site-Specific Recombination in the *Drosophila* Genome. In *Cell* (Vol. 59).
- Hartenstein, V., & Campos-Ortega, J. A. (1985). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster* (Edition 1). Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02454-6>
- Hoffmann, J. A., Reichhart, J.-M., & Hetru, C. (1996). Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology*, 8, 8–13.
- Horner, V. L., & Wolfner, M. F. (2008). Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation. *Developmental Dynamics*, 237(3), 527–544. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21454>
- Horváth, B., & Kalinka, A. T. (2018). The genetics of egg retention and fertilization success in *Drosophila*: One step closer to understanding the transition from facultative to obligate viviparity. *Evolution*, 72(2), 318–336. <https://doi.org/10.1111/evo.13411>
- Jain, J. K., & Paulson, R. J. (2006). Oocyte cryopreservation. In *Fertility and Sterility* (Vol. 86, Issue 4 SUPPL., pp. 1037–1046). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1478>
- Jennings (2011). *Drosophila*-a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*, 14, 190–195.
- Jordan Gladman (2016). NIH Workshop: CryoPreservation of *Drosophila* Strains. *Orlando World Center Marriott, Orlando, FL*. <https://doi.org/https://orip.nih.gov/cryopreservation-drosophila-strains>
- Jungare, K. A., Radha, R., & Sreekanth, D. (2022). Cryopreservation of biological samples - A short review. *Materials Today: Proceedings*, 51, 1637–1641. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.11.203>
- Leibo, P. S., & Mazur Peter. (1971). The Role of Cooling Rates in Low-Temperature Preservation. *Cryobiology*, 8, 447–452.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., & Michaut, L. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spä* *tzle*/*Toll*/*cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. In *Cell* (Vol. 86).
- Lewis. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, vol.276, 565–570.
- Liu, J., Phy, J., & Yeomans, E. (2012). Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. In *Theriogenology* (Vol. 78, Issue 8, pp. 1641–1652). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.003>

- Loppin, B., Dubruille, R., & Horard, B. (2015). The intimate genetics of *Drosophila* fertilization. In *Open Biology* (Vol. 5, Issue 8). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rsob.150076>
- Lorenz, L. J., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1989). Expression of a *Drosophila* mRNA is under circadian clock control during pupation. In *Development* (Vol. 107).
- Luyet, J. B., & Hodapp, I. E. (1938). Revival of Frog's Spermatozoa Vitrified in Liquid Air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 39, 433–434.
- Mandumpal, J. B., Kreck, C. A., & Mancera, R. L. (2011). A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(9), 3839–3842. <https://doi.org/10.1039/c0cp02326d>
- Markow. (2015). THE NATURAL HISTORY OF MODEL ORGANISMS The secret lives of *Drosophila* flies. *eLife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.06793.001>
- Markow, T. A., Beall, S., & Matzkin, L. M. (2009). Egg size, embryonic development time and ovoviviparity in *Drosophila* species. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(2), 430–434. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01649.x>
- Marques, L. S., Fossati, A. A. N., Rodrigues, R. B., Da Rosa, H. T., Izaguirry, A. P., Ramalho, J. B., Moreira, J. C. F., Santos, F. W., Zhang, T., & Streit, D. P. (2019, December 1). Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. *Nature*, 9(15353). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51696-7>
- Marsh, J. L., & Thompson, L. M. (2006). *Drosophila* in the Study of Neurodegenerative Disease. In *Neuron* (Vol. 52, Issue 1, pp. 169–178). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.025>
- Matthews, K. A. (1994). Care and Feeding of *Drosophila melanogaster*. In *Methods in cell biology* (Vol. 44, pp. 13–32). Academic Press, Inc.
- Mazur, P. (1963). Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *Journal of General Physiology*, 47(2), 347–369.
- Mazur P, Cole W K, Hall W J, Schreuders D P, & Mahowald P A. (1992). Cryobiological Preservation of *Drosophila* Embryos. *SCIENCE*, 258(5090).
- Mazur, P., Schneider, U., & Mahowald, A. P. (1992). Characteristics and Kinetics of Subzero Chilling Injury in *Drosophila* Embryos. In *CRYOBIOLOGY* (Vol. 29).
- Morgan. (1910, July). Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*.
- Mosca, F., Madeddu, M., AbdelSayed, A., Zaniboni, L., Iaffaldano, N., & Cerolini, S. (2016). Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the

- quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology*, 73(3), 343–347.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.001>
- Mukaida, T., & Oka, C. (2012). Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 26, Issue 6, pp. 789–803). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2012.07.001>
- Muller, H. J. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66, 84–87.
- Muller, H. J. (1928). The production of mutations by X-rays. In *Amer. J. Physiol* (Vol. 13, Issue 2).
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H. J., Remington, K. A., Anson, E. L., Bolanos, R. A., Chou, H. H., Jordan, C. M., Halpern, A. L., Lonardi, S., Beasley, E. M., Brandon, R. C., Chen, L., ... Venter, J. C. (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. In *Science* (Vol. 287, Issue 5461, pp. 2196–2204). <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2196>
- Nüsslein-Volhard C., & Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, vol.287, 795–801.
- Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2014). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. In *Nanotoxicology* (Vol. 9, Issue 3, pp. 396–403). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>
- Parvathi, D. v, Amritha, A. S., & Paul, S. F. (2009). WONDER ANIMAL MODEL FOR GENETIC STUDIES-*Drosophila Melanogaster*-ITS LIFE CYCLE AND BREEDING METHODS-A REVIEW INTRODUCTION. In *Sri Ramachandra Journal of Medicine: Vol. II*.
- Pegg, D. E. (2015). Principles of cryopreservation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1257, pp. 3–19). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_1
- Pereira, R. M., & Marques, C. C. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. In *Cell and Tissue Banking* (Vol. 9, Issue 4, pp. 267–277). <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9075-2>
- Pfleger, C. M., & Reiter, L. T. (2008). Recent efforts to model human diseases in vivo in *Drosophila*. *Fly*, 2(3), 129–132. <https://doi.org/10.4161/fly.6332>
- Pittendrigh, C. S., & Skopik, S. D. (1970). Circadian Systems, V. The Driving Oscillation and the Temporal Sequence of Development. *Proceeding of the National Academy of Science*, 65(3), 500–507.

- Polge, C., Smith, U. A., & Parkes, S. A. (1949, October 15). Revival of spermatozoa after Vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 666.
- Popis, M., Borowiec, B., & Jankowski, M. (2018). *Drosophila melanogaster* research: History, breakthrough and perspectives. In *Medical Journal of Cell Biology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 182–185). Sciendo. <https://doi.org/10.2478/acb-2018-0028>
- Poulson, D. F. (1937). Chromosomal deficiencies and the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 23(3).
- Prasad, N. G., & Joshi, A. (2003). What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? In *Journal of Genetics* (Vol. 82, Issue 2).
- Rabinowitz, M. (1941). Studies on the cytology and early embryology of the egg of *Drosophila Melanogaster*. *Journal of Morphology* , 69, 1–49. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050690102>
- Rajamohan, A., Leopold, R. A., Wang, W. B., Harris, M., McCombs, S. D., Peabody, N. C., & Fisher, K. (2003). Cryopreservation of Mediterranean fruit fly embryos. In *CryoLetters* (Vol. 24).
- Rajamohan, A., Rinehart, J. P., & Leopold, R. A. (2015). Stage selection and restricted oviposition period improves cryopreservation of dipteran embryos. *Cryobiology*, 70(2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.004>
- Rajamohan, A., Rinehart, J. P., & Leopold, R. A. (2018). Effect of cryopreservation on the pre-hatching behavior in the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* Loew (Diptera, Tephritidae). *Cryobiology*, 80, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.007>
- Rall, F. W., & Fahy, M. G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by Vitrification. *Nature*, 313, 573–575.
- Rand, M. D. (2014). A method of permeabilization of *Drosophila* embryos for assays of small molecule activity. *Journal of Visualized Experiments*, 89. <https://doi.org/10.3791/51634>
- Rand, M. D., Kearney, A. L., Dao, J., & Clason, T. (2010). Permeabilization of *Drosophila* embryos for introduction of small molecules. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(11), 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.07.007>
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>

- Rienzi, L. F., Iussig, B., Doveve, L., Fabozzi, G., Cimadomo, D., & Ubaldi, F. M. (2018). Perspectives in Gamete and Embryo Cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 36(5), 253–264. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1677463>
- Rong, Y. S., & Golic, K. G. (2001). A Targeted Gene Knockout in *Drosophila*. *Genetics*, 157, 1307–1312.
- Rong, Y. S., Titen, S. W., Xie, H. B., Golic, M. M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B. M., Brodsky, M., Rubin, G. M., & Golic, K. G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes and Development*, 16(12), 1568–1581. <https://doi.org/10.1101/gad.986602>
- Rose, M. R., Vu, L. N., Park, S. U., & Graves, J. L. (1992). Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila Melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 27, 241–250.
- Rubin, G. M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an Experimental Organism. In *Decp. Biol* (Vol. 119, Issue 17). www.sciencemag.org
- Rubin, G. M., & Spradling, A. C. (1982). Genetic Transformation of *Drosophila* with Transposable Element Vectors. *Science*, 348–353. www.sciencemag.org
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., ... Lewis, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. In *Science* (Vol. 287, Issue 5461, pp. 2204–2215). <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2204>
- Saragusty, J., & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. In *Reproduction* (Vol. 141, Issue 1, pp. 1–19). <https://doi.org/10.1530/REP-10-0236>
- Schulman, V. K., Folker, E. S., & Baylies, M. K. (2013). A method for reversible drug delivery to internal tissues of *Drosophila* embryos. *Fly*, 7(3), 193–203. <https://doi.org/10.4161/fly.25438>
- Si, W., Benson, J. D., Men, H., & Critser, J. K. (2006). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, 53(3), 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.09.001>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>

- Son, W. Y., & Tan, S. L. (2009). Comparison between slow freezing and vitrification for human embryos. *Expert Review of Medical Devices*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1586/17434440.6.1.1>
- Stephenson, R., & Metcalfe, N. H. (2013). *Drosophila melanogaster*: A fly through its history and current use. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 43(1), 70–75. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2013.116>
- Steponkus L. P., Myres P. S., Lynch V.D., Gardnes L., Bronshteyn V., Leibo P.S., Rall F. W., Pitt E. R., Lin T. T., & MacIntyre J. R. (1990, May 10). Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, 170–172. <https://www.researchgate.net/publication/343205326>
- Tyler, M. S. (2000). Development of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. In *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study: Vol. Chapter 8* (Second Edition).
- Van Laake, L. W., Lüscher, T. F., & Young, M. E. (2018). The circadian clock in cardiovascular regulation and disease: Lessons from the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017. In *European Heart Journal* (Vol. 39, Issue 24, pp. 2326–2329). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx775>
- Venken, K. J. T., & Bellen, H. J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 3, pp. 167–178). <https://doi.org/10.1038/nrg1553>
- Venken, K. J. T., & Bellen, H. J. (2007). Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. In *Development* (Vol. 134, Issue 20, pp. 3571–3584). <https://doi.org/10.1242/dev.005686>
- Venken, K. J. T., He, Y., Hoskins, R. A., & Bellen, H. J. (2006). P[acman]: A BAC Transgenic Platform for Targeted Insertion of Large DNA Fragments in *D. melanogaster*. *Science*. <https://www.science.org>
- Wang, W. B., Leopold, R. A., Nelson, D. R., & Freeman, T. P. (2000). Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) embryos. *Cryobiology*, 41(2), 153–166. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2278>
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. T. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 30, 1–12. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- Whittingham, D. G., Leiba, S. P., & Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *OAK Ridge National Laboratory*.

- Whittingham G. D. (1971). Survival of Mouse Embryos after Freezing and Thawing. *Nature*, 233, 125–126.
- Whitworth J. A, Wes D.P, & Pallanck J. L. (2006). Drosophila models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discovery Today*.
- Wowk, B. (2007). How Cryoprotectants Work. In *Alcor life extension foundation* (pp. 3–7). www.alcor.org
- Yamaguchi, M., & Yoshida, H. (2018). Drosophila as a model organism. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1076, pp. 1–10). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_1
- Zhan, L., Li, M. gang, Hays, T., & Bischof, J. (2021). Cryopreservation method for *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22694-z>

7. Apêndices

7.1. Apêndice I: Recolha de dados das três temperaturas testadas pós-descongelamento (temp. ambiente 18-25°C, 25°C e 22°C) na linha W¹¹¹⁸.

Nº embriões congelados	Tempo de congelação	Nº larvas após descongelamento	Nº larvas vivas	Nº moscas eclodidas	% de moscas eclodidas por larvas vivas	% larvas vivas por nº embriões congelados	Temp. de embriões descongelados (overnight)
80	4-5h	5	3	2	17%	4%	temp. ambiente (18 -25°C)
110	4-5h	12	8			7%	
138	4-5h	17	1			1%	
165	4-5h	24	21	3	9%	13%	temp. ambiente (18 -25°C)
152	4-5h	0	0			0%	
166	4-5h	13	13			8%	
100	4-5h	5	0	0	0	0%	temp. ambiente (18 -25°C)
72	4-5h	0	0			0%	
96	4-5h	4	4			4%	
246	4-5h	18	0	1	5%	0%	temp. ambiente (18 -25°C)
131	4-5h	19	19			15%	
315	4-5h	3	3			1%	
265	4-5h	5	0	0	0	0%	temp. ambiente (18 -25°C)
187	4-5h	5	1			1%	
246	4-5h	2	0			0%	
282	4-5h	4	4	0	0	1%	temp. ambiente (18 -25°C)
184	4-5h	1	1			1%	

Tabela 1: recolha de dados na testagem à temperatura ambiente (18-25°C)

Nº embriões congelados	Tempo de congelação	Nº larvas após descongelamento	Nº larvas vivas	Nº moscas eclodidas	% de moscas eclodidas por larvas vivas	% larvas vivas por nº embriões congelados	Temp. de embriões descongelados (overnight)
505	4-5h	4	4	0	0	1%	25°C
539	4-5h	6	3			1%	
563	4-5h	9	5			1%	
714	4-5h	20	13	6	18%	2%	25°C
299	4-5h	20	20			7%	
470	4-5h	20	20			4%	
441	4-5h	8	8	2	7%	2%	25°C
681	4-5h	5	2			0	

Tabela 2: recolha de dados na testagem a 25°C

Nº embriões congelados	Tempo de congelação	Nº larvas após descongelamento	Nº larvas vivas	Nº moscas eclodidas	% de moscas eclodidas por larvas vivas	% larvas vivas por nº embriões congelados	Temp. de embriões descongelados (overnight)	
745	4-5h	0	0	1	5%	0%	-	
419	4-5h	10	10			2%	22°C	
669	4-5h	6	5			1%		
678	4-5h	0	0			0%		-
577	4-5h	8	4			1%		22°C
697	4-5h	10	0			0%		
993	4-5h	27	27	2	7%	3%		22°C
153	4-5h	2	2	1	1%	1%	22°C	
659	4-5h	30	30			5%		
910	4-5h	42	42			5%		
373	4-5h	2	2			1%		
965	4-5h	6	5	0	0	1%	22°C	
348	4-5h	1	1			0%		
667	4-5h	1	1	0	0	0%	22°C	
650	4-5h	4	4			1%		
494	4-5h	5	5	0	0	1%	22°C	
277	4-5h	2	2			1%		
351	4-5h	2	2	3	17%	1%	22°C	
435	4-5h	16	14			3%		
427	4-5h	1	1			0%		
859	4-5h	0	0	0	0	0%	22°C	
1162	4-5h	3	3			0%		

Tabela 3: recolha de dados na testagem a 22°C

7.2. Apêndice II: Reagentes

Criotampão - 20 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 4 mM MgCl₂, 13 mM MgSO₄, 60 mM Glicina, 60 mM ácido glutâmico e 5 mM ácido málico; com pH 6,8 e esterilizado por filtração – homemade

Etilenoglicol 99,8% - (CPA) (thermo scientific, 433810010) - 13% (2,1M) e a 39% (6,3 M) (m/v) com criotampão.

Sorbitol 98% (Power) - (Alfa Aesar, 36404) - 9% (m/v) (2M) – usado juntamente com o etilenoglicol 39% e criotampão.

D (+) Sucrose – (thermo scientific, 424500010) - 30 wt% (m/v) (0,9 M) e a 15 wt% (m/v) (0,4 M) com criotampão.

Isopropanol - (thermo scientific, 149320025)

D-limoneno 96% - (thermo scientific, 4733) (m/v)

n-Heptano 99+% - (Alfa Aesar, 44457) (m/v)

Meio Shneider – (biowest MS01MK1005)

Lixívia a 50%

Água destilada

Rodamina B – (thermo scientific, A13572)