

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**ÉRIKA GARCIA EISENHARDT**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA MICROINJEÇÃO EM  
INSETOS UTILIZANDO *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO**

**SÃO GABRIEL**

**2016**

**ÉRIKA GARCIA EISENHARDT**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA MICROINJEÇÃO EM  
INSETOS UTILIZANDO *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Pampa, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Andrés Delgado Cañedo

**SÃO GABRIEL**

**2016**

**ÉRIKA GARCIA EISENHARDT**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA MICROINJEÇÃO EM  
INSETOS UTILIZANDO *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Pampa, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 02/12/2016.

Banca examinadora:

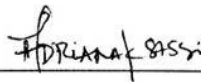


---

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador

UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Adriana Koslovski Sassi

UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa

UNIPAMPA

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus amados pais Sergio Alfonso Eisenhardt e Cecilia Garcia Eisenhardt, à minha irmã Rafaela e minha querida avó Ilda, pelo amor, apoio, compreensão e paciência que precisei nestes anos de estudo. Meu porto seguro, amo vocês!

Á UNIPAMPA, por tornar possível a formação de novos profissionais.

Ao Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo, pela orientação e contribuição neste trabalho, paciência, apoio e por todos os ensinamentos durante estes anos.

Aos mestres, por todo aprendizado, incentivo, paciência e pela disposição para sanar minhas dúvidas.

Aos técnicos, principalmente à Adri, a Susi e o Adriano, por sempre estarem dispostos a ajudar e ensinar, contribuindo ainda mais para minha formação.

Aos meus colegas de laboratório, pelos momentos de descontração, lamentação (muitas, eu diria) e pela contribuição no meu trabalho.

Aos amigos que fiz aqui, minha segunda família, por todo amor, compreensão, paciência, puxões de orelha e por estarem comigo na alegria e no choro. Eli, Laisa e Josi, amo vocês. E aos meus amigos que, mesmo longe, nunca deixaram de me apoiar e de ouvir meus ataques de desespero, também amo vocês!

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.” Vocês são estes gigantes. Á vocês, minha eterna gratidão! Muito obrigada!

## RESUMO

*Drosophila melanogaster* é uma das espécies mais utilizadas em experiências genéticas, sendo de extrema importância para a biologia. Ao longo dos últimos anos houve um aumento do uso de ferramentas moleculares que auxiliam nos estudos que envolvem análises biológicas. Vários estudos revolucionários com diferentes organismos modelos vem sendo realizados, desde sequenciamento completo de genomas até a produção de organismos transgênicos utilizando, por exemplo, elementos transponíveis. Elementos transponíveis, conhecidos como DNA móvel, são sequências de DNA que se movem de um local para outro no genoma. Um dos sistemas mais utilizados nos últimos anos, é o transposon *piggyBac*, que apresenta uma ampla gama de hospedeiros, que vão desde os insetos até o uso em mamíferos. A técnica mais utilizada para produzir insetos geneticamente modificados é a microinjeção, que consiste na entrega do DNA exógeno diretamente no núcleo da célula que se pretende transformar. Sabendo disso, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de microinjeção de baixo custo para a criação e desenvolvimento de insetos transgênicos utilizando *D. melanogaster* como organismo modelo. O plasmídeo utilizado para estabelecer o protocolo de microinjeção foi o *pBac[3xp3-EGFPattB]*. As agulhas utilizadas na microinjeção foram feitas utilizando quatro tipos de configurações do aparelho PC-10. Para obter ovos de *D. melanogaster*, transferimos as moscas para meios de oviposição e duas receitas foram testadas. Para realizar a decorionação, dois métodos foram testados: No primeiro método, foi utilizado uma solução de  $\text{CaCl}_2$  a 1% em água destilada. No segundo método, os ovos foram banhados em água destilada e álcool etílico 92,8°. Após estes processos, 10 ovos foram fixados em cada lâmina de microscópio com fita dupla-face transparente e cobertos com óleo mineral. Em cada ovo foi injetado 1  $\mu\text{L}$  do plasmídeo *pBac[3xp3-EGFPattB]* com concentração de 181  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . 40 ovos foram injetados, 2 se desenvolveram e atingiram a fase adulta. Os melhores resultados foram obtidos utilizando agulhas com diâmetro em torno de 45  $\mu\text{m}$ . Os dois meios de oviposição foram eficientes. Na decorionação, a água destilada mais o álcool 92,8° apresentou melhor remoção do córion, e o óleo mineral Naturol foi eficaz contra a dessecação. Não foi possível a análise da expressão do plasmídeo, pois o constructo não possuía o gene da transposase, o que impediu a estabilidade do DNA exógeno no genoma. Nossos objetivos principais foram alcançados, um protocolo de baixo custo de consumíveis foi desenvolvido. Porém, mais testes são necessários utilizando um conjunto de plasmídeos que permita a observação da integração do DNA exógeno no genoma.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*. Insetos transgênicos. Microinjeção.

## ABSTRACT

*Drosophila melanogaster* is one of the most used species in genetic experiments, being of extreme importance for biology. Over the last few years there has been an increase in the use of molecular tools that aid the development of biological studies. Several revolutionary studies with different model organisms have been carried out, from complete genome sequencing to the production of transgenic organisms using, for example, transposable elements. Transposable elements, also known as mobile DNA, are DNA sequences that move from one place to another in the genome. One of the most widely used systems in recent years is the transposon *piggyBac*, which features a wide range of hosts, ranging from insects to mammalian use. The technique most used to produce genetically modified insects is microinjection, which consists in the delivery of exogenous DNA directly into the nucleus of the target cell. Taking this in account, the objective of this work was to establish a microinjection protocol for the creation and development of transgenic insects using *D. melanogaster* as a model organism. The plasmid used to establish the microinjection protocol was the *pBac[3xp3-EGFPattB]*. The needles used in microinjection were made using four types of PC-10 configurations. To obtain eggs of *D. melanogaster*, we transferred the flies to oviposition media and two recipes were tested. In order to perform the dechoriation, two methods were tested: The first method was performed by using, 1% CaCl<sub>2</sub> solution in distilled water was used. The second method, the eggs were bathed in distilled water and ethyl alcohol 92,8°. After these processes, 10 eggs were fixed on each microscope slide with transparent double-sided tape and covered with mineral oil. In each egg was injected 1 µL of *pBac [3xp3-EGFPattB]* plasmid (181 ng/µL). 40 eggs were injected, 2 were developed and reached adulthood. The best results were obtained using needles with a diameter ranging from 45 µm. The two oviposition media were efficient. In the dechorionated, distilled water plus 92,8° alcohol presented better removal of the chorion, and natural mineral oil was effective against desiccation. It was not possible to analyze the expression of the plasmid because the construct did not possess the transposase gene, which able the stability of exogenous DNA in the genome. Thus, our main objectives were achieved, establishing a low cost of consumables microinjection protocol. However, further testing will be required to aiming the expression of exogenous DNA into the model organism.

Keywords: *Drosophila melanogaster*. Transgenic insects. Microinjection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do aparelho reprodutor feminino de <i>D. melanogaster</i> .....	11
Figura 2 - Clivagens do embrião de <i>D. melanogaster</i> .....	11
Figura 3 - Fases de desenvolvimento embrionário da <i>D. melanogaster</i> .....	12
Figura 4 - Classificação dos elementos transponíveis.....	13
Figura 5 - Transposons ativos em insetos.....	14
Figura 6 - Transposons mais utilizados para transformação de insetos.....	15
Figura 7 - Mecanismo de inserção utilizado pelo transposon <i>piggyBac</i> .....	16
Figura 8 - Microinjeção em embriões de <i>D. melanogaster</i> .....	17
Figura 9 - Mapa genômico do plasmídeo <i>pBac[3xP3EGFPattB]</i> .....	19
Figura 10 - Meio de cultivo.....	20
Figura 11 - <i>D. melanogaster</i> no meio de oviposição.....	22
Figura 12 - Lâminas com os ovos fixados e banhados em óleo mineral com diferentes porções, prontos para injeção.....	23
Figura 13 - Microinjeção de violeta de metila em ovos de <i>D. melanogaster</i> .....	24
Figura 14 - Agulhas produzidas utilizando a configuração 3. a) Agulha vista a olho nú. b) Análise do diâmetro da agulha no <i>MF-900 Microforge</i> .....	25
Figura 15 - Meios de oviposição. a) Meio 1. b) Meio 2 Os pontos brancos são os ovos de <i>D. melanogaster</i> .....	26
Figura 16 - Dois ovos de <i>D. melanogaster</i> . O primeiro, sem a presença do córion; o segundo, apresentando sua membrana de proteção.....	27
Figura 17 - Ovos de <i>D. melanogaster</i> após os procedimentos de decorionação. A e B utilizando o método com $\text{CaCl}_2$ . C e D utilizando água destilada mais álcool 92,8°.....	27
Figura 18 - <i>D. melanogaster</i> adultas após a injeção.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de configurações usadas na fabricação de agulhas com diâmetro original igual à 1mm.....	21
Tabela 2 - Receita dos meios de oviposição.....	22
Tabela 3: Consumíveis utilizados neste protocolo que apresentaram melhores resultados.....	29



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1 Organismo modelo <i>Drosophila melanogaster</i> .....	10
1.2 Linhagens Transgênicas.....	13
1.3 Microinjeção.....	16
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
3.1 Plasmídeo .....	19
3.2 Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	20
3.3 Agulhas.....	21
3.4 Preparação dos embriões.....	21
3.5 Microinjeção.....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
4.1 Agulhas.....	25
4.2 Meios de oviposição.....	26
4.3 Métodos de remoção do córion.....	27
4.4 Microinjeção.....	28
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>



## 1 Introdução

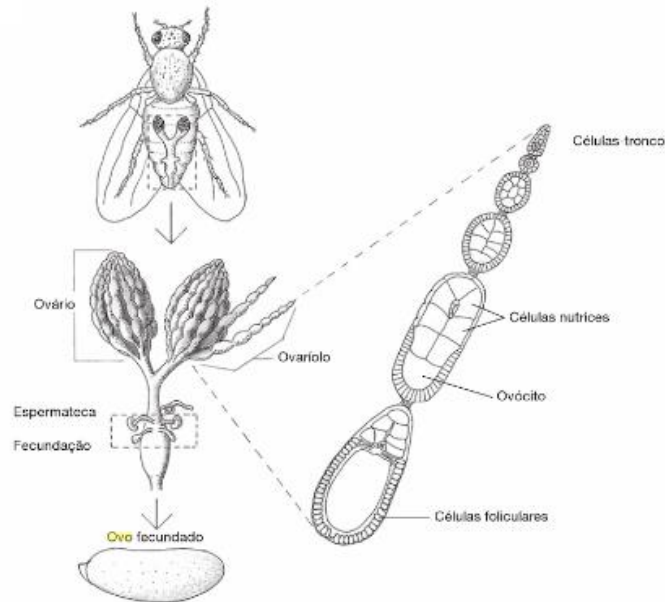
### 1.1 Organismo modelo *Drosophila melanogaster*

As moscas são insetos da ordem Diptera, e seu representante mais estudado é a *D. melanogaster*. As drosófilas são insetos pequenos, que se alimentam de leveduras em frutos já caídos e em estado de decomposição, não sendo prejudiciais para a agricultura e por isso ficaram conhecidas como as moscas das frutas. Esta espécie de mosca apresenta dimorfismo sexual. As fêmeas têm cerca de 2,5 milímetros (mm), apresentam uma alternância típica de listas claras e escuras no abdômen. Os machos, além de serem, geralmente, menores que as fêmeas, apresentam a extremidade do abdômen negra. Esta espécie é uma das mais utilizadas em experiências genéticas, sendo de extrema importância para a biologia<sup>1</sup>. Usada como um organismo modelo por mais de um século, é considerada um sistema atrativo por várias razões: fácil manipulação e poucas exigências alimentares, tornando-a um modelo biológico de baixo custo. Além disso, muitos sistemas e órgãos de mamíferos têm homólogos bem conservados em drosófilas<sup>2</sup>. Inicialmente, a mosca da fruta foi um organismo essencial para se chegar às informações de genética clássica, sendo reconhecida e utilizada posteriormente como ferramenta para estudos de diferentes problemas biológicos. Nos últimos 50 anos, estudos genéticos usando este organismo modelo vêm sendo aplicados para decifrar os principais mecanismos que sustentam uma variedade de fundamentos biológicos e seus processos, incluindo sinalização celular, ciclo celular, sistema nervoso, comportamento, desenvolvimento e aspectos de doenças humanas<sup>3</sup>. Seu genoma possui 180 milhões de pares de bases de DNA localizadas em quatro pares de cromossomos, três pares de cromossomos autossomos e um par de cromossomo sexual que determina o sexo do indivíduo. As fêmeas possuem dois cromossomos X, e sexo masculino é heterogamético, possuindo os mesmos cromossomos autossomos, mais um cromossomo X e um Y<sup>4</sup>.

A vida da mosca da fruta começa quando machos adultos inseminam as fêmeas. Um único espermatozoide penetra no óvulo maduro e os núcleos haploides do espermatozoide e do óvulo se fecundam para formar um núcleo zigótico<sup>5</sup>. A ovogênese ocorre nos ovários, que coletivamente formam os ovários. A formação do ovócito começa quando uma célula germinal sofre uma divisão mitótica, que origina dois tipos de células: uma célula tronco, e um citoblasto. O citoblasto se divide, originando 16 células, onde 15 serão células nutrices e uma célula originará o ovócito. As células nutrices e o ovócito ficam circundados por uma camada de células foliculares, que são responsáveis pela formação da casca do ovo composta pela membrana vitelina e o córion. Quando o ovócito está maduro, as células nutrices e as células

foliculares são descartadas, o ovo é liberado no oviduto, onde ocorre a fecundação, e após é liberado no meio (Figura 1)<sup>4,6</sup>.

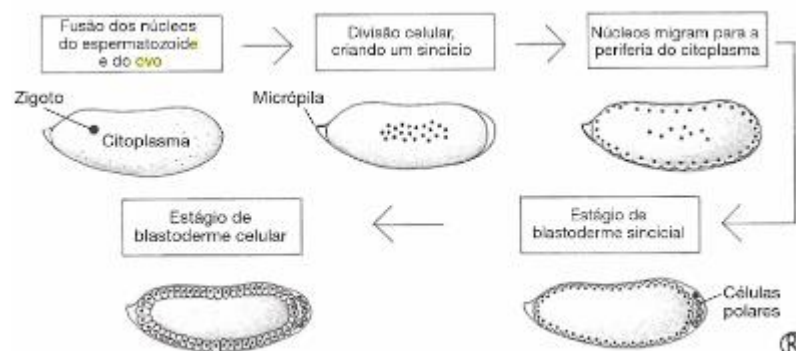
Figura 1 - Representação do aparelho reprodutor feminino de *D. melanogaster*.



Fonte: GARCIA S. M. L; FERNANDEZ G. C; Embriologia, 2009.

Após a fecundação, o núcleo do zigoto passa por uma série rápida de nove divisões celulares sem citocinese, gerando uma estrutura chamada blastoderme sincicial, onde os núcleos migram para proximidades da membrana plasmática. Depois de mais algumas divisões, extensões da membrana plasmática do ovócito introduzem-se entre os núcleos, tornando-se células individuais, criando o blastoderma celular (Figura 2). Todo esse processo ocorre nas primeiras 24 horas do estágio embrionário na fase do ovo.<sup>6</sup>

Figura 2 - Clivagens do embrião de *D. melanogaster*.

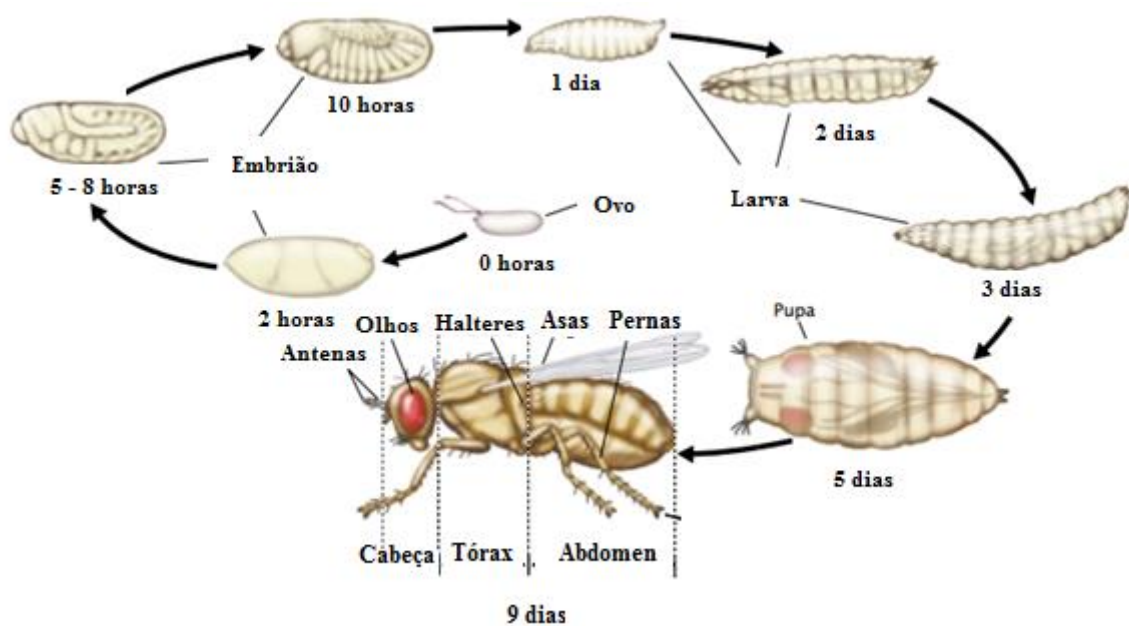


Fonte: GARCIA S. M. L; FERNANDEZ G. C; Embriologia, 2009.

Quatro núcleos se desenvolvem em células polares na extremidade do embrião, que, eventualmente, vão dar origem às células germinativas. O embrião, em seguida, passa por um maior desenvolvimento em três fases distintas: 1) o eixo anterior-posterior e o eixo dorsal-ventral do embrião são estabelecidos; 2) o número e a orientação dos segmentos corporais são determinados; e 3) a identidade de cada segmento individual é estabelecida. Um conjunto de genes controlam cada uma destas três fases<sup>4,6</sup>.

Após 24 horas o embrião atinge o estágio de larva que, ao fim de um dia, muda sua cutícula e se transforma em uma larva de segunda fase. 24 horas mais tarde, a cutícula sofre mais alterações e assim atinge a terceira fase larval conferindo um aumento de tamanho. Cerca de cinco dias após a fertilização a larva atinge um estado imóvel, formando um casulo onde sofre diversas alterações: a pupação. Dentro da pupa, a larva sofre uma metamorfose onde ocorre a degradação dos tecidos larvais e a formação de células que irão originar as estruturas do organismo adulto. O estado de pupa possui uma duração de, mais ou menos, cinco dias. Após este período, se origina um indivíduo adulto. Uma mosca adulta possui três partes básicas do corpo: cabeça, tórax e abdômen. O tórax é constituído por três segmentos, onde o primeiro apresenta um par de pernas, o segundo um par de pernas mais um par de asas e o terceiro um par de pernas e o halteres. Já o abdômen é formado por nove segmentos (Figura 3)<sup>6,7</sup>.

Figura 3 - Fases de desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*.



Fonte: Adaptado de PIERCE; BENJAMIN A; Genetics, a conceptual approach, 2014.





## 1.2 Linhagens Transgênicas

Ao longo dos últimos anos houve um aumento significativo de ferramentas moleculares que auxiliam nos estudos que envolvem análises biológicas, entre elas o surgimento da engenharia genética. Graças a esse advento da biologia, vários estudos revolucionários com diferentes organismos modelos vem sendo realizados, desde sequenciamento completo de genomas até a produção de organismos transgênicos que utilizam, por exemplo, elementos transponíveis<sup>8,9</sup>. A criação de insetos transgênicos é tecnicamente desafiadora, mesmo em sistemas avançados como *D. melanogaster*, porque a contínua manutenção de linhas transgênicas pode ser um procedimento de alto custo. Por isso, houve um grande interesse no desenvolvimento e na utilização de sistemas de expressão que tornem a técnica mais acessível aos diferentes laboratórios<sup>9</sup>.

Elementos transponíveis (TEs), também chamados de DNA saltitante ou DNA móvel, foram descobertos em 1940 por Bárbara MacClintock e definidos como sequências de DNA que se movem de um local para outro no genoma, e frequentemente se duplicam no processo<sup>10</sup>.

Esses elementos podem ser classificados de duas maneiras: a primeira é relacionada a autonomia para realizar a inserção, sendo classificados em autônomos e não autônomos. Os autônomos codificam a maquinaria proteica necessária a transposição, e os não autônomos necessitam da maquinaria produzida por outros elementos transponíveis com os quais possuem parentesco<sup>11</sup>. Também são classificados quanto ao seu mecanismo de transposição, ou seja, qual intermediário é utilizado. A primeira classe é representada pelos retrotransposons, que utilizam um intermediário de RNA, e que ainda são subdivididos em retrotransposons que possuem longas repetições terminais (LTR) em sua extremidade, chamados LINEs, e os que não possuem LTR, os SINEs. A segunda classe, os transposons, que utilizam um intermediário de DNA (Figura 4)<sup>12</sup>.

Figura 4 – Classificação dos elementos transponíveis.

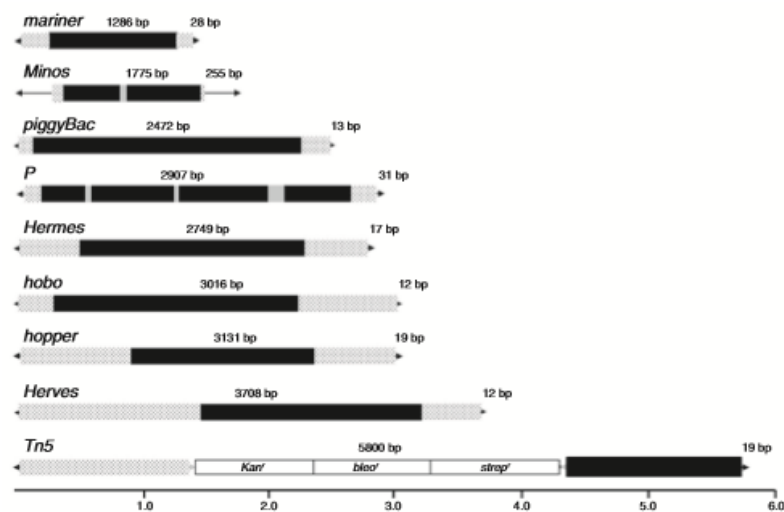
Elemento	Transposição	Estrutura	Tamanho	Nº de cópias	Fração do genoma
LINEs	Autônomos		1–5 kb	20,000–40,000	21%
SINEs	Não autônomos		100–300 bp	1,500,000	13%
DNA transposons	Autônomos		2–3 kb	300,000	3%
	Não autônomos		80–3000 bp		

Fonte: Adaptado de <http://keytoflyaway.weebly.com/key-to-fly-away/the-mystery-of-the-transposons>, 2014.

Os transposons de DNA são uma classe diversificada de TEs, que possuem organizações e modos de transposição simples. Em geral, esses elementos deslocam seu DNA por meio de um processo *cut-and-paste* no qual as repetições terminais invertidas (TIRs) do elemento são reconhecidas pela enzima transposase, codificada pelos elementos autônomos desta classe. Após a interação da enzima com os TIRs, o DNA hospedeiro sofre uma quebra de dupla fita nas regiões que flanqueiam o TE, liberando-o para a inserção em um outro ponto alvo do genoma. Ambas as reações de quebra e ligação de DNA envolvidas neste procedimento são catalisadas pela enzima transposase<sup>11-13</sup>.

Como exemplo desta classe e que se encontram ativos em insetos, citam-se os transposons da família *Mariner*, *Hermes*, *P*, *piggyBac*, entre outras (Figura 5). Esses elementos provaram ser máquinas moleculares versáteis com capacidades robustas para a geração de transgenes, tornando-se indispensáveis para a genômica funcional de insetos<sup>13</sup>.

Figura 5 – Transposons ativos em insetos.



Fonte: BENEDICT, M. Q; Transgenic Insects, Techniques and Applications, 2014.

O potencial dos transposons para serem utilizados como vetores de genes para introdução de novas sequências de DNA em genoma de insetos foi descoberto logo após o isolamento do elemento *P* em *D. melanogaster*<sup>14</sup>. Desde então, tem ocorrido um aumento constante na frequência e número de transposons sendo utilizados como vetores e do número de espécies de insetos geneticamente transformados utilizando este sistema (Figura 6)<sup>13</sup>.

Figura 6 – Transposons mais utilizados para transformação de insetos.



Fonte: Adaptado de BENEDICT, M. Q; Transgenic Insects, Techniques and Applications, 2014.

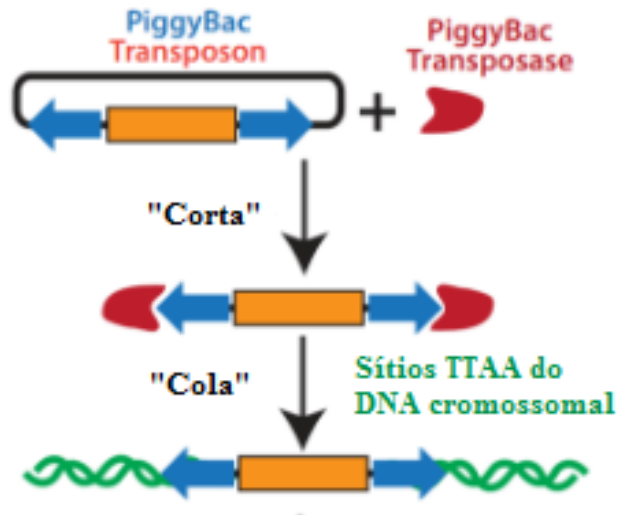
Um dos sistemas mais utilizados nos últimos anos, é o transposon *piggyBac*. Esse transposon de DNA foi descoberto no ano de 1980 no genoma da traça *Trichoplusia ni*, um inseto lepidóptero pertencente à família Noctuidae. Seu comprimento total é de 2472 pares de bases (pb) e suas repetições terminais invertidas com 13 pb. Possui uma única fase de leitura aberta de codificação para uma proteína, a transposase, e integram-se nos sítios TTAA do genoma, utilizando o mecanismo *cut-and-paste* (Figura 7). Apresenta uma ampla gama de hospedeiros, que vão desde os insetos até o uso em mamíferos. Até o momento, 37 espécies de insetos já foram transformadas utilizando o *piggyBac*<sup>13,15</sup>. Esse sistema utilizado em manipulações genéticas é combinado, principalmente, com genes de proteínas fluorescentes para que seja possível a visualização da integração do elemento de interesse no DNA genômico<sup>15</sup>.

Marcadores genéticos são componentes importantes para o desenvolvimento eficaz da tecnologia de transformação de insetos, pois permite o reconhecimento dos indivíduos transformados. Genes que determinam a cor dos olhos são muitas vezes utilizados como marcadores de transformação em insetos portadores de mutações na cor dos olhos, permitindo a identificação de transformantes por seleção de mutantes<sup>16</sup>. Um sistema marcador foi desenvolvido com base nas propriedades das proteínas fluorescentes como, por exemplo, a proteína verde fluorescente (GFP) e suas variantes. O gene que codifica a proteína GFP foi isolado a partir da medusa *Aequorea victoria* e seu uso está bem estabelecido, uma vez que é facilmente detectável *in vivo* e tem demonstrado ser funcional em diferentes tecidos de muitos sistemas heterólogos. Para o controle da expressão de GFP vários promotores são utilizados. Os promotores constitutivos ativos em todas as células têm a vantagem de permitir a seleção de



transformantes em todas as etapas de vida, desde embriões vivos até a fase adulta<sup>17</sup>. Sendo assim, para se obter linhagens transgênicas é fundamental a criação de um constructo confiável que é a peça chave para o sucesso de transformação de indivíduos<sup>13</sup>.

Figura 7 – Mecanismo de inserção utilizado pelo transposon *piggyBac*



Fonte: Adaptado de <http://www.bioscience.co.uk/products/piggybac-transposon-vector-construction>, 2016.

### 1.3 Microinjeção

Diversas técnicas foram desenvolvidas a fim de tornar possível a transformação de diferentes organismos. Dentre elas, podemos citar a biobalística<sup>18</sup>, a eletroporação<sup>19</sup>, o uso de lipossomos catiônicos<sup>20</sup>, e a mais utilizada em insetos: a microinjeção<sup>13</sup>.

A técnica de microinjeção foi proposta há mais de cem anos atrás por Dr. Marshall A. Barber. Ele desenvolveu este método inicialmente para clonar as bactérias e para confirmar a teoria dos germes de Koch e Pasteur. Mais tarde, ele refinou sua abordagem e foi capaz de manipular núcleos em protozoários e implantar as bactérias em células vegetais<sup>21</sup>. Este é um processo mecânico, que envolve um microscópio invertido com um alto poder de ampliação. O sistema necessita do auxílio de agulhas ou pipetas de vidro, para realizar a entrega do DNA diretamente no núcleo da célula que se pretende transformar. Por capilaridade, o constructo montado contendo o gene de interesse é colhido pela agulha quando colocados em contato e posteriormente liberado pelo fluxo de ar, controlando o volume injetado (Figura 8)<sup>22</sup>.

Figura 8 - Microinjeção em embriões de *D. melanogaster*.



Fonte: Adaptado de GOMPEL, N. *Drosophila* germline transformation, 2005.

Outro ponto importante, é a fabricação das agulhas de microinjeção, a ferramenta mais crítica durante a produção de insetos transgênicos e um dos principais determinantes do sucesso de todo o processo. O tempo gasto fazendo uma boa agulha é o tempo economizado na execução das injeções, que estão condenadas a falhas por causa da má forma das agulhas. As agulhas devem possuir a extremidade fina, para que não haja danificação da célula que irá ser injetada. Assim, o diâmetro da ponta depende do organismo que está sendo trabalhado. Existem aparelhos específicos para confecção das agulhas que utilizam dois fatores para obter a ponta desejada: o peso da puxada e a temperatura aplicada ao capilar. Estes fatores devem ser regulados de acordo com o diâmetro que se deseja obter na ponta da agulha<sup>23</sup>.

A microinjeção é um processo considerado demorado, devido à eficiência diminuída por causa da morte das células/indivíduos microinjetados e também um procedimento de alto custo, pelos aparelhos e consumíveis utilizados. Por outro lado, a microinjeção possui diversas vantagens. Como, por exemplo, sua simplicidade, facilidade de aplicação, a forma segura de entrega do DNA exógeno exatamente no lugar desejado e a sua aplicabilidade em diversas espécies, são algumas destas vantagens<sup>24</sup>. Por isto, é um dos procedimentos mais utilizados na geração de organismos transgênicos<sup>13</sup>.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de microinjeção para a criação e desenvolvimento de insetos transgênicos, utilizando *D. melanogaster* como organismo modelo.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Determinar o melhor diâmetro de agulhas para microinjeção em insetos;
- Testar o melhor meio de oviposição e meio de cultura para o desenvolvimento de *D. melanogaster*;
- Estabelecer o uso de consumíveis de baixo custo;
- Realizar a microinjeção utilizando o sistema de transposon *piggyBac* portador do gene repórter GFP.

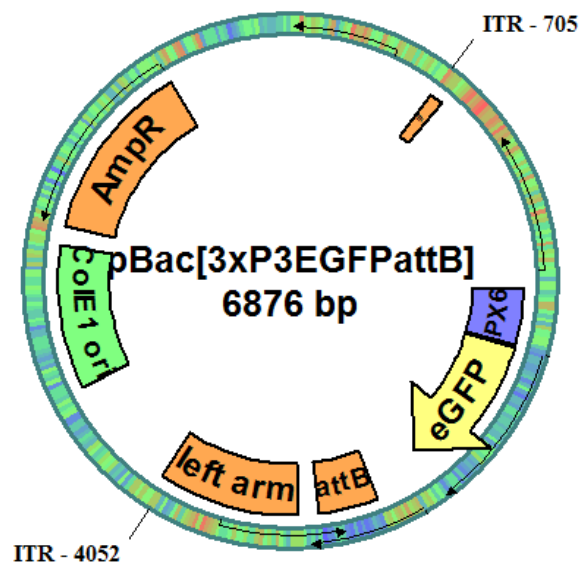
### 3 Metodologia

#### 3.1 Plasmídeo

O plasmídeo utilizado para estabelecer o protocolo de microinjeção foi o *pBac[3xp3-EGFPattB]* (Figura 9) gentilmente cedido pelo professor Élgion Lucio da Silva Loreto, da Universidade Federal de Santa Maria. O plasmídeo contém o transposon *piggyBac* e suas repetições terminais invertidas, o gene marcador GFP, gene resistente a ampicilina (AmpR), origem de replicação (ColE1ori) e o promotor Pax-6. Este promotor apresenta uma forte regulação no desenvolvimento do olho e do cérebro, estando presente no desenvolvimento embrionário. Combinado com GFP, a fluorescência é detectada na região ocular do inseto<sup>25</sup>.

Após recebido, o plasmídeo foi clonado em linhagens DH5 $\alpha$  eletrocompetentes de *Escherichia coli*, utilizando o método de eletroporação<sup>26</sup>. Após o choque, as bactérias foram transferidas para um meio de cultura contendo ampicilina e permaneceram incubadas em 37°C por 24 horas. A presença de ampicilina no meio, permitiu a seleção dos transformantes. As colônias transformadas com o plasmídeo, foram isoladas e cultivadas em um meio de cultura LB líquido em torno de 24 horas<sup>27</sup>. Posteriormente, passaram por um processo de purificação de DNA plasmidial. O método de purificação escolhido foi uma técnica de *salting-out* utilizando sulfato de amônio<sup>28</sup>. Purificado, o plasmídeo foi avaliado no espectrofotômetro *Nanovue plus* (GE Healthcare, USA) para avaliação de pureza e concentração avaliando a solução de plasmídeo nos comprimentos de onda 230 nm, 260 nm e 280 nm.

Figura 9 - Mapa genômico do plasmídeo *pBac[3xP3EGFPattB]*.



Fonte: Autor, 2016.

### 3.2 Cultivo de *Drosophila melanogaster*

Inicialmente, foi preparada uma mistura de farinhas para servir como alimento para moscas, contendo: 1kg de farinha de milho grossa, 800g de farinha de milho média, 250g de germen de trigo, 1 xícara de café de açúcar, 2 colheres de sopa de leite em pó, 1 colher de sopa de sal, 1 colher de sopa de farinha de soja e 1 colher de sopa de farinha de centeio. Após a preparação, um volume da mistura foi dissolvido em três volumes de água, com algumas gotas do antifúngico *nipagin* (metilparabeno). Aqueceu-se até ferver bem e engrossar<sup>42</sup>.

Com o auxílio de um funil, o meio foi vertido em frascos de vidro, vedado com uma esponja e levado a autoclave para deixar o meio de cultura livre de qualquer contaminação. No meio frio já autoclavado, foi adicionado fermento biológico fresco e então as moscas foram transferidas para o frasco. Os frascos foram levados para incubadora com temperatura controlada onde foram mantidas a 25°C. Em torno de 200 indivíduos foram usados por procedimento (Figura 10).

Figura 10 - Meio de cultivo.



Fonte: autor, 2016.

### 3.3 Agulhas

Para a fabricação das agulhas utilizadas na microinjeção, foram utilizados capilares de vidro de micro hematócritos sem heparina com comprimento de aproximadamente 75 mm, diâmetro equivalente à 1,5 mm, da marca *Precision Glass Line* e que foram manipulados na estação de confecção de microagulhas formada pelos aparelhos *PC-10 Puller*, *MF-900 Microforge* e *EG-401 Microgrinder* (Narishige, Japão). O aparelho *PC-10 Puller* (Narishige, Japão) foi usado para produzir a ponta fina da agulha. Este aparelho configura o valor de aquecimento, o peso, e se os capilares serão puxados em uma ou em duas etapas. Puxar em apenas uma etapa faz pipetas flexíveis, enquanto duas etapas faz pipetas firmes.<sup>29</sup>

As agulhas foram feitas utilizando quatro tipos de configurações (Tabela 1), que posteriormente foram testadas na microinjeção para avaliar qual a melhor configuração para trabalhar com ovos de insetos.

Tabela 1 - Tipos de configurações usadas na fabricação de agulhas com diâmetro original igual à 1mm.

	Diâmetro em micrômetros ( $\mu\text{m}$ )	Etapas	Temperaturas	Peso
Configuração 1	10 – 15 $\mu\text{m}$	Duas etapas	70 °C / 70°C	1 peso
Configuração 2	50 – 100 $\mu\text{m}$	Duas etapas	70°C / 55°C	1-3 pesos
Configuração 3	3 – 10 $\mu\text{m}$	Duas etapas	65°C / 75°C	4 pesos
Configuração 4	0,5 $\mu\text{m}$	Duas etapas	65°C / 85°C	2-4 pesos

Fonte: Adaptado de NARISHIGE WEB NEWS; Setting Values in the PC-10 Puller, 2007.

O aparelho *MF-900 Microforge* (Narishige, Japão)<sup>30</sup> foi usado para corte, dobra, polimento e também para determinar o diâmetro da ponta da agulha, utilizando a ocular micrométrica. O acabamento final nas agulhas foi feito no aparelho *EG-401 Microgrinder* (Narishige, Japão) que lixa a ponta da agulha diminuindo suas imperfeições, dando bisel de agulha à mesma<sup>31</sup>.

### 3.4 Preparação dos embriões

A microinjeção deve ser realizada em embriões, pois para um DNA exógeno invadir um novo genoma, principalmente quando se trata de TEs, ele deve chegar até as células reprodutivas do novo hospedeiro. Na fase de embrião, os indivíduos apresentam pouca diferenciação, o que ajuda na integração do DNA exógeno<sup>13</sup>. Então, para obter ovos de *D.*

*melanogaster*, transferimos as moscas para meios de oviposição e duas receitas foram testadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Receita dos meios de oviposição.

<b>MEIO 1 (100mL)</b>	<b>MEIO 2 (160mL)</b>
100mL de água destilada	160mL de água destilada
1,5g de ágar em pó	4,8g farinha de centeio
15g de mel	4,4g de fermento biológico
10g de fermento biológico	1,2g de ágar em pó
50-100 gotas de corante vermelho	10 gotas metilparabeno
Ferver no micro-ondas	22g de banana
	7,6g de mel
	Ferver no micro-ondas
	Levar ao recipiente
	Adicionar gotas de ácido acético

Fonte: Adaptado de Wallau, G. L. 2010.

Esta transferência foi feita 2 horas antes do processo de microinjeção. Após 30 minutos, o meio de oviposição foi descartado e substituído por um novo meio. Isto foi feito para evitar embriões mais velhos parcialmente desenvolvidos no momento da microinjeção (Figura 11).

Figura 11 - *D. melanogaster* no meio de oviposição.



Fonte: Autor, 2016.

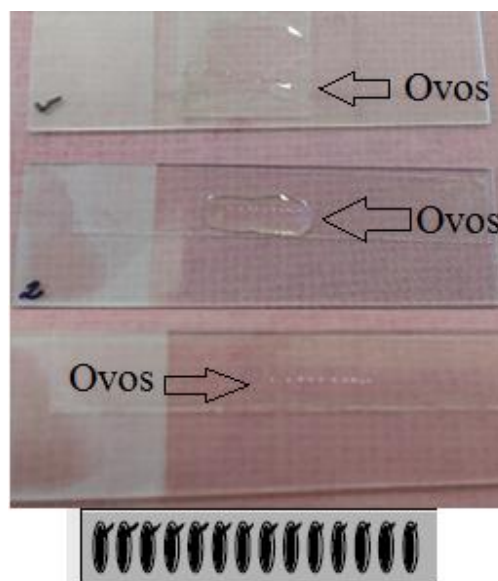
Após a troca, as moscas seguiram em contato com o meio de oviposição por 1 hora ou até que houvesse um número de ovos suficientes para realizar a injeção.

Antes da microinjeção, os ovos passam por um processo de decorionação, que consiste na remoção da camada externa de proteção do ovo, o córion<sup>32</sup>.

Dois métodos de decorionação foram testados: No primeiro método, foi utilizado o tratamento dos ovos em solução de  $\text{CaCl}_2$  a 1% em água destilada durante 5-10 minutos. Os ovos foram embebidos nesta solução, e depois passados para um filtro eliminando o excesso do líquido e melhorando a coleta. No segundo método, foi utilizado água destilada e álcool etílico 92,8°. Primeiro, os ovos foram embebidos em água destilada por 5 minutos, após este período, o álcool foi adicionado por mais 5 minutos, banhando os ovos, e então foram levados ao filtro, onde foi adicionado mais água destilada para remover o excesso de álcool, e assim coletados.

Após a decorionação, com um auxílio de um pincel de ponta fina os ovos foram fixados em lâminas para microscópio lisa tamanho 2,6x7,6 centímetros (cm) utilizando fita dupla-face transparente. Em cada lâmina, dez ovos foram fixados e banhados em uma pequena quantidade de óleo mineral para evitar a morte dos embriões por dessecação (Figura 12). Após 10 minutos da adição do óleo mineral, as placas foram levadas ao micromanipulador para efetuar a injeção. Diferentes porções de óleo mineral também foram testadas: a primeira porção foi adicionada com um conta gotas (1 gota) sendo a maior quantidade testada, e outra porção foi adicionada com o auxílio do mesmo pincel utilizado na coleta dos ovos, sendo a menor porção testada.

Figura 12 - Lâminas com os ovos fixados e banhados em óleo mineral com diferentes porções, prontos para injeção.





### 3.5 Microinjeção

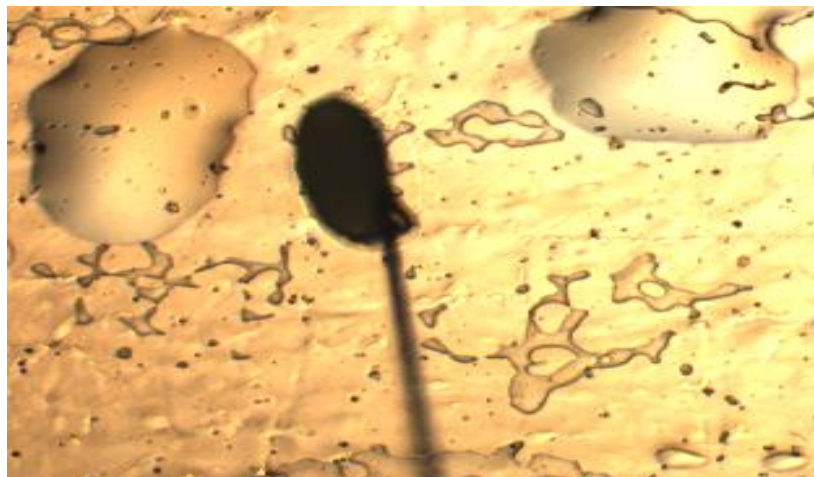
Para realizar a injeção, foi utilizado o microscópio invertido *Olympus IX71* com sistema de comandos e adaptadores para micromanipulação *Narishige* (Japão).

Para treinar o sistema, foi utilizado na injeção o corante violeta de metila, também chamado de violeta cristal (Figura 13). Com o sistema bem adaptado, em cada ovo foi injetado 1 microlitro ( $\mu\text{L}$ ) do plasmídeo *pBac[3xp3-EGFPattB]* com concentração de  $181 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .

O processo foi dividido em quatro etapas, onde dez ovos foram injetados por vez. Os dez primeiros ovos foram retirados do meio de oviposição 1 e o óleo mineral foi adicionado na lâmina com o conta gotas. Na segunda tentativa, mais dez ovos foram retirados do meio de oviposição 2 e com quantidade de óleo mineral igual ao anterior. A terceira e quarta etapa, correspondem aos mesmos meios de oviposição da primeira e da segunda, respectivamente, porém neste procedimento o óleo mineral foi adicionado com um auxílio de um pincel de ponta fina em menor quantidade.

Para ter certeza de que o plasmídeo foi injetado, deve-se observar a formação de uma gota na extremidade dos ovos onde foi feita a injeção assim que a agulha está sendo retirada. Após a injeção, os ovos foram transferidos para o meio de cultivo e mantidos em incubadora para seu desenvolvimento.

Figura 13 - Microinjeção de violeta de metila em ovos de *D. melanogaster*.



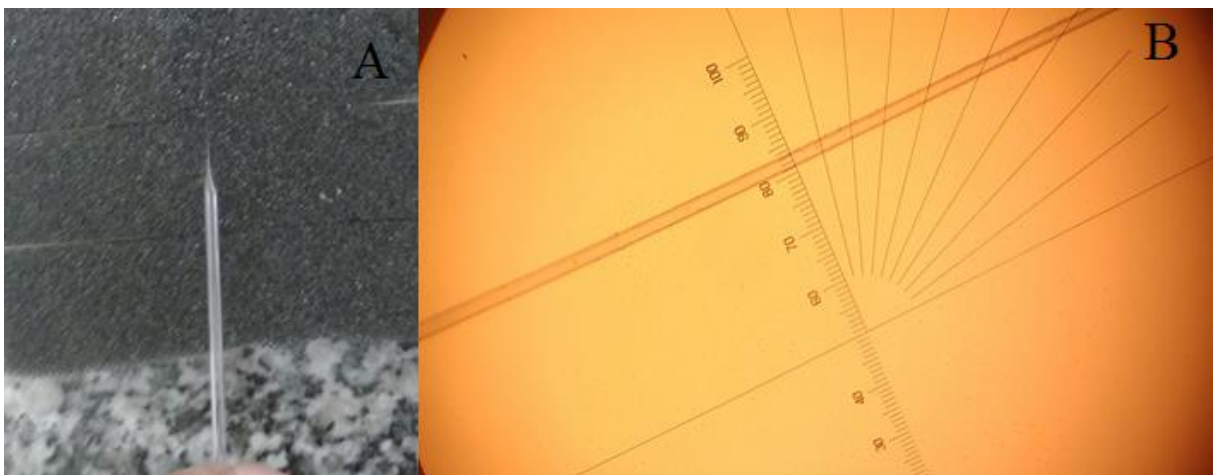
Fonte: Autor, 2016.

## 4 Resultados e Discussões

### 4.1 Agulhas

Testadas as diferentes agulhas, os melhores resultados foram obtidos quando utilizadas as agulhas de configuração 3. Quando comparada às outras agulhas, estas mostraram-se mais rígidas e com menor possibilidade de danos nas células. Os diâmetros das agulhas foram determinados com ocular micrométrica. O valor do diâmetro, ficou em torno de 45  $\mu\text{m}$  (Figura 14). A tabela que utilizamos como base para a fabricação das agulhas, foi desenvolvida para capilares com diâmetro original igual a 1mm. Por esta razão, as agulhas fabricadas em todas configurações apresentaram um aumento no diâmetro final quando comparadas com os dados na tabela 1.

Figura 14 - Agulhas produzidas utilizando a configuração 3. a) Agulha vista a olho nú. b) Análise do diâmetro da agulha no *MF-900 Microforge*.



Fonte: Autor, 2016.

As agulhas de configuração 4 que apresentaram diâmetro próximo à 0,5  $\mu\text{m}$ , por serem muito finas e flexíveis, curvavam-se quando entravam em contato com o óleo mineral presente na lâmina e não conseguiam atingir e injetar os ovos.

Os ovos de *D. melanogaster*, apresentam um tamanho equivalente a 0,5 mm, ou seja, 500  $\mu\text{m}$ . As configurações 1 e 2, formaram agulhas mais grossas e curtas, com diâmetro em torno de 300  $\mu\text{m}$  que, por serem quase do mesmo diâmetro do ovo, poderiam danificá-los e conseqüentemente não permitiriam o desenvolvimento do embrião.

## 4.2 Meios de oviposição

Duas receitas de meio foram testadas. O meio 1 mostrou-se muito eficiente na primeira e na segunda tentativa de obtenção de ovos (Figura 15A), porém, nas outras tentativas não obtivemos sucesso utilizando esta receita, pois estes organismos somente ovipositam quando julgam realmente necessário.

Já o meio 2, é mais rico em nutrientes (Figura 15B). Diferente do primeiro, todas as vezes que o utilizamos, conseguimos obter uma quantidade considerável de ovos.

Figura 15 – Meios de oviposição. a) Meio 1. b) Meio 2. Os pontos brancos são os ovos de *D. melanogaster*.



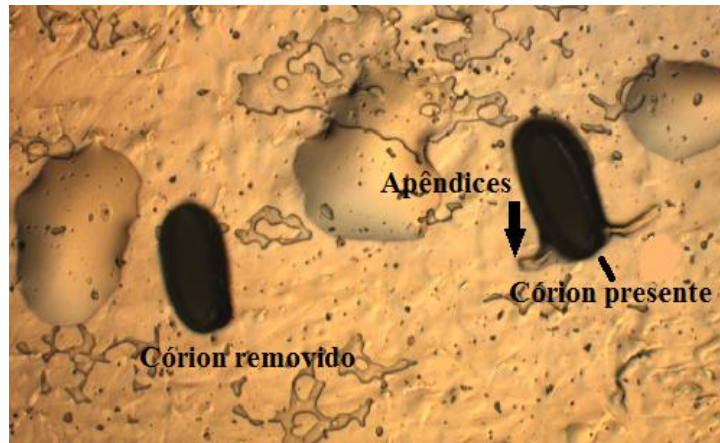
Fonte: Autor, 2016.

Temperatura e luminosidade, além das características do meio, são fatores que influenciam na oviposição<sup>33</sup>. Então, além de possuir um meio rico em nutrientes, devemos ficar atentos a estes fatores que talvez sejam peças chaves para se obter uma boa taxa de oviposição. Considerando que estes fatores podem atuar, os dois meios mostraram-se eficientes. Porém, mais testes são necessários para determinar a melhor forma de conseguir uma alta taxa de oviposição.

### 4.3 Métodos de remoção do córion

Dois métodos foram testados para avaliar a taxa de remoção da membrana de proteção presente nos ovos das moscas, o córion (Figura 16).

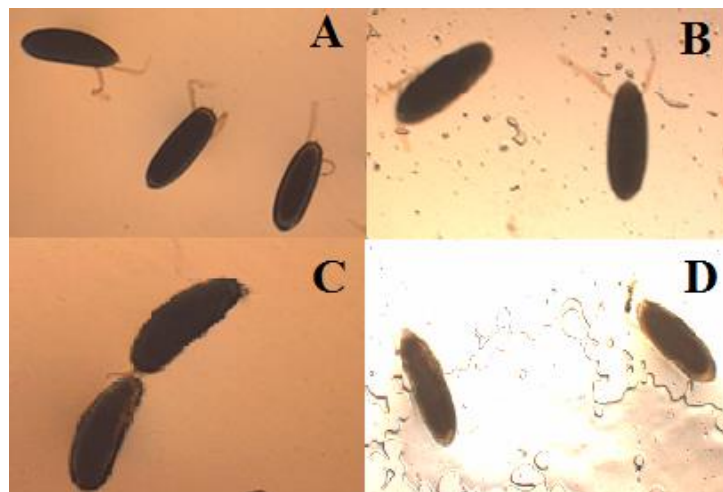
Figura 16 – Dois ovos de *D. melanogaster*. O primeiro, sem a presença do córion; o segundo, apresentando sua membrana de proteção.



Fonte: Autor, 2016.

O primeiro método foi feito utilizando  $\text{CaCl}_2$  e demonstrou bons resultados (Figura 17A e 17B). Porém, o segundo método utilizando água destilada e álcool  $92,8^\circ$  mostrou ser mais eficiente na remoção e na transparência do córion (Figura 17C e 17D) e, além de ser um método mais simples que utilizam soluções que são facilmente encontradas no laboratório, é um método que apresenta baixo custo de produção.

Figura 17 – Ovos de *D. melanogaster* após os procedimentos de decorionação. A e B utilizando o método com  $\text{CaCl}_2$ . C e D utilizando água destilada mais álcool  $92,8^\circ$ .



Fonte: Autor, 2016.

#### 4.4 Microinjeção

Antes da microinjeção, nós testamos diferentes quantidades de óleo mineral para evitar a dessecação dos ovos. Na literatura, a maioria dos processos de microinjeção em insetos utilizam o óleo de halocarbono para o mesmo fim<sup>34,35,36</sup>. Porém, é um produto com um alto custo e não está disponível no laboratório. Como alternativa, testamos o óleo mineral da marca Naturol encontrado em qualquer farmácia e que apresenta um valor 100 vezes menor que o óleo de halocarbono.

Como citado anteriormente, diversas quantidades de óleo foram testadas. Quando colocado em excesso, o óleo prejudicou o procedimento da injeção, pois a agulha se flexionava e não conseguia alcançar o ovo. Os melhores resultados obtidos foram utilizando um pincel de ponta fina (o mesmo utilizado na captura dos ovos) para adicionar óleo mineral nas lâminas de forma individual em cada ovo. Esta quantidade foi suficiente para proteger a dessecação e não interferir na injeção.

Foram injetados um total de 40 ovos com o plasmídeo *pBac[3xp3-EGFPattB]* em quatro etapas, todos os 40 ovos passaram pela decorionação utilizando o segundo método (água mais álcool 92,8°). Após a injeção, os ovos foram transferidos para um meio de cultivo novo para que fosse possível seu desenvolvimento. Inicialmente usando o meio de cultura citado acima, tivemos problemas de contaminação, que foi observada somente naqueles meios que continham ovos que haviam sofrido a injeção. Esta contaminação pode ter ocorrido pela falta de cuidado em alguma etapa de preparação dos ovos, ou pela falta de esterilização de algum material<sup>37</sup>. Então, utilizamos a receita do meio 2 de oviposição como alternativa de meio de cultivo. Neste meio, não houve contaminação e os embriões conseguiram se desenvolver.

Dos 40 ovos injetados, 2 (5%) se desenvolveram e atingiram a fase de vida adulta (Figura 18). Em outros estudos, o número de indivíduos adultos gerados por microinjeção são de 16 (1%) em 1680 ovos injetados<sup>35</sup>, e 8 (1,5%) adultos em 539 ovos injetados<sup>38</sup>. Comparando nossos dados com dados da literatura, podemos constatar que o nosso método apesar de apresentar uma baixa taxa de desenvolvimento, é eficiente e funcionou acima do esperado, contudo, não pode ser descartado que este valor de quase 3-5 vezes superior ao esperado pode ser devido ao baixo número de ovos injetado.

Figura 18 – *D. melanogaster* adultas após a injeção.



Fonte: Autor, 2016.

Não foi possível a visualização da fluorescência do marcador genético presente no plasmídeo, pois o constructo injetado não possui a enzima que codifica a transposase, o que impossibilita sua estabilidade no genoma. Por isso, novas injeções devem ser realizadas utilizando o plasmídeo *pBac[3xp3-EGFPattB]* junto com outro plasmídeo que possua a transposase, como por exemplo, o *pBASac helper*<sup>35</sup> para a confirmação de insetos transformados através deste protocolo.

Desta forma, um protocolo de microinjeção foi estabelecido e os melhores resultados dos métodos utilizados estão ilustrados na tabela 3.

Tabela 3: Consumíveis utilizados neste protocolo que apresentaram melhores resultados.

<b>Agulhas</b>	<b>Meio de Cultivo</b>	<b>Meio de Oviposição</b>	<b>Método de Decorionação</b>	<b>Óleo Mineral Natural</b>
Configuração 3 Diâmetro 45 µm	Meio de oviposição 2 como alternativa contra contaminação	As duas receitas são eficientes	Água destilada + Álcool 92,8°	Eficaz contra a dessecação quando adicionado com o auxílio de um pincel

Fonte: Autor, 2016.

## 5 Considerações finais

No processo de microinjeção, nós obtivemos melhores resultados utilizando agulhas com diâmetro em torno de 45  $\mu\text{m}$ . Para determinar o melhor meio de oviposição, são necessários mais testes levando em consideração os fatores abióticos que podem influenciar na taxa de oviposição. Quanto ao processo de remoção do córion, os melhores resultados foram obtidos no tratamento com água destilada mais o álcool 92,8°. O óleo mineral testado mostrou ser eficiente contra a dessecação, pois dos 40 indivíduos que sofreram injeção, 2 sobreviveram e conseguiram se desenvolver. Sendo assim, utilizando agulhas com diâmetro de 45  $\mu\text{m}$ , o meio de oviposição 1 ou 2, água destilada mais o álcool 92,8° para a decorionação e o óleo mineral adquirido em farmácia contra a dessecação, é possível obter um protocolo de microinjeção em *D.melanogaster* simples e de baixo custo de consumíveis.

Nossos objetivos principais foram alcançados, pois estabelecemos um protocolo de baixo custo de consumíveis. Porém, mais testes são necessários utilizando um conjunto de plasmídeos que permita a observação da integração do DNA exógeno no genoma, e também dever ser testado em outras espécies de insetos para comprovar a eficiência do protocolo estabelecido.

## REFERÊNCIAS

1. GRUPO SILVA ROQUE. ***Drosophila melanogaster***. Disponível em <<http://www.gruposilvaroque.com/wp-content/uploads/2011/03/FT-0702-Mosca-da-Fruta.pdf>> Acesso em: 20 de out. 2016, 20:30:20.
2. IBMC, INEB. **Estaleiro da ciência: Guia prático**. 2008 Disponível em <[http://darwin2009.cienciaviva.pt/img/upload/EC\\_pdf\\_VantagensDrosophila.pdf](http://darwin2009.cienciaviva.pt/img/upload/EC_pdf_VantagensDrosophila.pdf)> Acesso em: 20 de out. 2016, 20:45:00
3. ASHBURNER, M. **The Development of *Drosophila melanogaster***. 1993. p.1493-1506.
4. PIERCE; BENJAMIN A. **Genetics, a conceptual approach**. 6º ed. New York: W.H. Freeman, 2012. p. 573 – 607
5. WATSON J; BARKER T. A; STEPHEN P. **Biologia Molecular do Gene**. 7º ed. Porto Alegre. Artmed, 2015. p.746.
6. GARCIA S. M. L; FERNANDEZ G. C. **Embriologia**. 3º ed. Porto Alegre. Artmed, 2009. p. 178-180.
7. TELES, N. M. **Desenvolvimento de um modelo de doenças inflamatórias sistêmicas em *Drosophila melanogaster***. UFU, Urbelândia. 2014. p. 6-10. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15884/1/DesenvolvimentoModeloDoencas.pdf>> Acesso em 21 de out. 2016 17:30:00.
8. CANDEIAS, N. A. J. **A Engenharia Genética**. Revista Saúde Pública 1º ed. São Paulo, 1991.
9. SPRADLING, A. C; BELLEN J. H; HOSKINSD, R. A. ***Drosophila P elements preferentially transpose to replication origins***. 2011.
10. PRAY, L; ZHAUROVA K. **Barbara McClintock and the Discovery of Jumping Genes (Transposons)**, 2008. Nature Education 1:169.



11. WICKER, T. **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** 2007.
12. SANTANA, D. D. S. **Elementos transponíveis: uma visão geral.** Disponível em <[http://www.uesc.br/genetica/temalivre\\_resumodayse.pdf](http://www.uesc.br/genetica/temalivre_resumodayse.pdf)> Acesso em 21 de out, 2016, 19:15:00.
13. BENEDICT, M. Q. **Transgenic Insects, Techniques and Applications.** Itália. 2014. p. 2-10.
14. RUBIN, M G; SPRADLING C. A. **Genetic Transformation of Drosophila with Transposable Element Vectors.** 1982.
15. YUSA, K. ***piggyBac* transposon.** 2015.
16. O'BROCHTA, D.A; ATKINSON, P.W, **Recent developments in transgenic insect technology.** Parasitology, 13º ed. p. 99-104. 1997.
17. FARIAS, F; FLORENCE M. C. **GFP: Uma Ferramenta Brilhante para a Visualização da Vida.** Revista Virtual Química, 1º ed. 2009.
18. BIO-RAD. **Biolistic Particle Delivery Systems.** Disponível em <<http://www.bio-rad.com/pt-br/category/biolistic-particle-delivery-systems>> Acesso em 22 de out. 2016, 15:30:00
19. POTTER H; HELLER, R. **Transfection by Electroporation.** 2010.
20. DALBY, B; CATES, S; HARRIS, A; OHKI, E. C; TILKINS, M. L; PRICE, P. J; CICARRONE, V. C. **Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications.** 2004.
21. KORZH, V; STRÄHLE, U. **Marshall Barber and the century of microinjection: from cloning of bacteria to cloning of everything.** 2002.
22. KUMAR S. S; PUTTARAJU H. P. **Improvised microinjection technique for mosquito vectors.** 2012.

23. MILLER, W. J; CAPY, P. **Mobile Genetic Elements: Protocols and Genomic Applications**. 2004 . p. 223

24. BRONNER, F; KLEINZELLER, A. **Current Topics in Membranes and Transport**. 12<sup>o</sup> ed. 1990. p. 414

25. YAN, Q; GONG, L; DENG, M; ZHANG, L. **Sumoylation activates the transcriptional activity of Pax-6, an important transcription factor for eye and brain development**. 2010.

26. LEMBIOTECH. **Preparo de células competentes (Eletroporação)**. Disponível em <[http://www.lembaliotech.ufc.br/wiki/index.php/Preparo\\_de\\_c%C3%A9lulas\\_competentes\\_-\\_Eletropora%C3%A7%C3%A3o](http://www.lembaliotech.ufc.br/wiki/index.php/Preparo_de_c%C3%A9lulas_competentes_-_Eletropora%C3%A7%C3%A3o)> Acesso em 30 de out. 2016, 20:35:00.

27. UFMG. **Mini-preparação (MINIPREP) de plasmídeo bacteriano carregador de gene clonado**. Disponível em <<http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/miniprep.html>> Acesso em 30 de out. 2016, 22:06:00.

28. PINTO, H. B; **Desenvolvimento de um protocolo de purificação de DNA plasmidial pela técnica de Salting-out utilizando sulfato de amônio**. 2016.

29. NARISHIGE WEB NEWS. **Setting Values in the PC-10 Puller**. 2007.

30. NARISHIGE. **MF-900 Microforge**. Disponível em <<http://products.narishigegroup.com/group1/MF900/pipette/english.html?group=group1&product=MF900&category=injection&language=english>> Acesso em 31 de out. 2016, 14:10:00.

31. NARISHIGE. **EG-401 Microgrinder**. Disponível em <<http://products.narishigegroup.com/group1/EG-401/pipette/english.html>> Acesso em 31 de out. 2016, 14:15:00.

32. ROTHWELL, W. F; SULLIVAN, W. **Drosophila embryo dechoriation**. 2007.

33. SILVA, A. B. **Mosca-das-frutas e fruticultura**. Disponível em <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/mosca-das-frutas-uma-ameaca-a-fruticultura>> Acesso em 2 de nov. 2016, 21:10:00.

34. GOMPEL, N. ***Drosophila* germline transformation**. 2005.

35. DEPRÁ, M; SEPEL L. M. N; LORETO, E. L. S. **A low-cost apparatus for transforming *Drosophila* and detecting green fluorescent protein (GFP) genetic markers**. 2004.

36. DÉJARDIN, J; CAVALLI, G. **Transgenesis in *Drosophila***. 2004.

37. CARARETO, C. M. A. **Laboratório de preparação de meio de cultura de *Drosophila***. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/53597/laboratorio-de-preparacao-de-meio-de-cultura-de-drosophila/>> Acesso em 2 de nov. 2016, 23:45:00.

38. FINOLIET, M; GONI, B. **Genetic transformation of *Drosophila willistoni* using piggyBac transposon and GFP**. 2007

39. CAMACHO, E. **The mystery of the transposons**, 2014. Disponível em: <<http://keytoflyaway.weebly.com/key-to-fly-away/the-mystery-of-the-transposons>> Acesso em 21 de out. 2016, 20:35:00.

40. CAMBRIDGE BIOSCIENCE LIMITED. **PiggyBac Transposon Vector Construction**, 2016. Disponível em <<http://www.bioscience.co.uk/products/piggybac-transposon-vector-construction>> Acesso em 21 out. 2016, 22:00:00.

41. WALLAU, G. L. **Protocolos LabDros**, 2010. Disponível em <<http://w3.ufsm.br/labdros/arquivos/Protocolos.pdf>> Acesso em 30 de out. 2016, 23:35:00.

42. CORDEIRO, A. R. **Notas de laboratório**, 1953. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/ppgbmmuseu/attachments/article/29/2-notasdelaboratorio.pdf>> Acesso em 30 de out. 2016, 23:45:00.