

Final

**Os Efeitos do Plasma não Térmico
à Pressão Atmosférica no Desenvolvimento
Larval e Anomalias Morfológicas
de *Drosophila Melanogaster***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Margarida Isabel Gouveia da Silva Ferreira
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

fevereiro | 2015

UMa

Efe

T/M Uma
577
FER Efe

José Gabriel

75553
K0HA

**Os Efeitos do Plasma não Térmico
à Pressão Atmosférica no Desenvolvimento
Larval e Anomalias Morfológicas
de *Drosophila Melanogaster***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Margarida Isabel Gouveia da Silva Ferreira

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR
Mahnaz Khadem

CO-ORIENTADOR
José Gabriel Lira Gomes



**Os efeitos do plasma não térmico à pressão atmosférica
no desenvolvimento larval e anomalias morfológicas de
*Drosophila melanogaster***

Tese submetida à UNIVERSIDADE DA MADEIRA
para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada

Margarida Isabel Gouveia da Silva Ferreira

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Mahnaz Khadem
Professor Doutor José Gabriel Lira Gomes

Fevereiro de 2015

Funchal-Portugal

Agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças ao apoio e orientação de diversas pessoas que estiveram envolvidas na minha formação académica.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para este meu percurso académico e pessoal.

Desde logo, esta dissertação de mestrado nunca teria sido possível sem o incentivo e apoio permanente da minha orientadora, Professora Doutora Mahnaz Khadem, Investigadora Professora do Centro de Ciências da Vida (CCV) da Universidade da Madeira (UMa), a quem manifesto o meu profundo agradecimento pela dedicação e pelo tempo que dispensou neste projeto.

Um agradecimento particular também ao Professor Doutor José Gabriel Lira Gomes, coorientador deste projeto, Professor Assistente do Centro de Ciências Exatas e da Engenharia (CEE) da UMa, pelo interesse, pelo apoio e pelo material disponibilizado, sem o qual as experiências não teriam sido possíveis de realizar.

Um especial agradecimento à Doutora Montse Papaceit do laboratório de genética da Universidade de Barcelona por ter gentilmente cedido a linha laboratorial Lboratri Fabra, utilizada neste trabalho.

Agradeço igualmente aos colegas de curso e de laboratório com quem tive a oportunidade de trocar experiências e de adquirir conhecimentos que permitiram enriquecer este trabalho.

Não podia deixar de fazer um especial agradecimento à minha colega Marta Moreira, pela disponibilidade demonstrada em ajudar sempre que lhe foi pedido e à minha querida amiga Carina Cavaco, que com a sua juventude, entusiasmo e amizade foi um grande apoio durante este meu percurso.

A todos o meu sincero e sentido agradecimento e reconhecimento.

Resumo

O plasma não térmico nos cuidados de saúde é um campo emergente que tem as suas raízes na ciência de plasmas. Este tipo de investigação tem crescido rapidamente e é agora objeto de um amplo esforço de pesquisa interdisciplinar envolvendo a medicina, a biologia, a física, a química e a engenharia. Têm sido feitos vários trabalhos de modo a elucidar quais as interações das espécies produzidas pelo plasma com os sistemas vivos. É evidente que o mecanismo da interação do plasma com os sistemas vivos é complexo, em parte devido à complexidade do plasma mas principalmente devido à enorme complexidade da biologia.

O principal objetivo desta dissertação foi observar os efeitos do plasma não térmico à pressão atmosférica (PNTPA) no desenvolvimento larval e anomalias morfológicas de *Drosophila melanogaster*. Para o efeito, foram expostas e analisadas fenotipicamente 2.566 larvas após exposição, dos diferentes estádios (1.º, 2.º e 3.º) de desenvolvimento. Os testes foram realizados com aplicações de plasma com e sem ultra violeta, em duas linhas diferentes de *Drosophila*; uma linha selvagem preparada por nós e uma linha laboratorial.

A análise fenotípica revelou que após exposição as larvas apresentavam alterações no fenótipo e no comportamento que não foram observadas no controlo, nomeadamente anomalias nas mudas, traqueias partidas, formação de massas melanóticas que podiam persistir até à fase adulta, excesso de gotículas lipídicas, atraso no desenvolvimento, comportamento de não alimentação e formação de pupa imatura que levava à formação de pupa precoce e morte pupal.

Na fase pupal, as anomalias mais comuns estavam relacionadas com a forma do pupário (causadas pela pipação prematura), apresentando um desenvolvimento aberrante. Entre os vários fenótipos observados, o mais significativo foi o criptocefálico (alterações na eversão dos discos imaginais) levando à morte pupal.

Nos adultos, as principais anomalias morfológicas foram registadas na formação e segmentação das patas, na forma e padrão das nervuras das asas e na formação do tórax.

A similaridade destes resultados com trabalhos publicados relacionados com a hormona esteróide ecdisona indicam que provavelmente o PNTPA poderá ter influenciado a biossíntese e/ou a regulação da ecdisona, a principal hormona que regula o desenvolvimento e a metamorfose em *Drosophila*.

Palavras-chave: Plasma não térmico, metamorfose, eversão dos discos, glândula protorácica, hormonas, ecdisona.

Abstract

The non-thermal plasma in health care is an emerging field that has its roots in plasma science. This type of research has grown rapidly and is now the subject of a broad interdisciplinary research effort involving medicine, biology, physics, chemistry and engineering. Have been several studies to elucidate the interactions of species produced by plasma and living systems. Clearly plasma interaction mechanism with living systems is complex, in part because of the complexity from the plasma but mainly due to the enormous complexity of biology.

The main objective of this master thesis was to detect the possible effects of NTAPPs on *Drosophila melanogaster* larvae development. A total of 2566 larvae of different stages (1st, 2nd and 3rd) were exposed to plasma and their developments were monitored. The tests were performed with plasma applications with and without ultraviolet in two different lines of *Drosophila*; a wild line prepared for us and a laboratory line.

The results show that the exposed larvae present phenotypic and behavioural anomalies that are not detected in control larvae. The anomalies were observed in larval molting, trachea breakage, formation of melanotic mass, excess of lipid droplet, delay in development, non-feeding behaviour and formation of immature pupae leading to early pupae formation and death.

In pupal stage the most common anomalies were shape of the puparium (caused by premature larval pupation), aberrant pupal development and cryptocephalia (problems of imaginal discs eversion) leading to pupal death.

In adults the main morphological abnormalities were observed in leg segmentations, wing and thorax morphology.

The similarity between the results obtained in the present work and those published on the action of steroid hormone (ecdysone) indicate that NTAPPs possibly intervene in biosynthesis and/or regulation of the ecdysone, the principal hormone that regulates the molting and metamorphosis of *Drosophila*.

Keywords: non-thermal plasma, metamorphosis, eversion of the disks, prothoracic gland, hormones, ecdysone.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice.....	v
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xvii
Tabela de acrónimos.....	xviii

Capítulo I

1	Noções básicas sobre <i>Drosophila</i>	1
1.1	Introdução.....	1
1.2	Ciclo de vida	2
1.3	Embriogénese.....	4
1.4	Desenvolvimento larval.....	4
1.5	Desenvolvimento da pupa	6
1.6	Morfologia externa do adulto	7
2	Tecidos e órgãos	8
2.1	Discos imaginais	8
2.2	Glândulas salivares.....	9
2.3	Corpo gordo (Fat body)	9
2.4	Sistema digestivo.....	10
2.5	Túbulos de malpighianos	11
2.6	Sistema traqueal	11
3	Fisiologia	12
3.1	Sistema hormonal	12
3.2	Sistema imunitário	14
4	Conceitos básicos sobre plasma	16
4.1	Introdução.....	16
4.2	Plasmas térmicos.....	16
4.3	Plasmas não térmicos.....	17
4.4	Aplicações.....	17
4.5	Efeito da aplicação do plasma não térmico nos sistemas vivos.....	17
4.6	Interação do plasma não térmico com os sistemas biológicos.....	18

4.7	Objetivos	20
5	Parte experimental	21
5.1	Linhas de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
5.1.1	Linhas selvagens	21
5.1.2	Linha laboratorial	21
5.2	Equipamento experimental para aplicação do plasma	22
5.3	Preparação das larvas para exposição	22
5.4	Aplicação do plasma	22
5.5	Separação das larvas para caixas de crescimento	22
5.6	Observação após exposição	23
5.7	Testes estatísticos	23
6	Resultados	23
6.1	Otimização do tempo de exposição	24
6.1.1	Controlo	24
6.1.2	Larvas expostas a 30, 40 e 50 segundos de plasma sem separação por estágio de desenvolvimento	24
6.1.3	Larvas expostas a 60 segundos de plasma	25
6.2	Separação das larvas por estágio de desenvolvimento e novos tempos de exposição testados	26
6.2.1	Efeito da exposição de 50 segundos de plasma em larvas de <i>Drosophila</i> de 1.º, 2.º e 3.º estágio de desenvolvimento de diferentes linhas	26
6.2.2	Efeito da exposição de 60 segundos de plasma em larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio	29
6.2.3	Efeito da exposição de 70 segundos de plasma em larvas de 1.º e 2.º estágio	30
6.3	Comparação de larvas mortas e surgimento de massas melanóticas entre de indivíduos de 1.º, 2.º e 3.º estágio	33
6.3.1	50 versus 60 segundos	33
6.3.2	60 versus 70 segundos	33
6.4	Exposição de larvas a 100 segundos de exposição	34
6.4.1	Larvas de 2.º e 3.º estágio expostas a 100 segundos de plasma	34
6.5	Larvas da linha 10 expostas a 50 segundos de plasma	35
6.5.1	Controlo da linha 10, 1.º estágio	36
6.5.2	Controlo da linha 10, 2.º estágio	36
6.5.3	Controlo da linha 10, 3.º estágio	36
6.5.4	Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha 10 expostas a 50 segundos	36
6.6	Larvas da linha 10 expostas a 120 segundos de plasma	38
6.6.1	Larvas de 1.º e 3.º estágio da linha 10 expostas a 120 segundos	38

6.7	Linha laboratorial	39
6.7.1	Controlo Barcelona, 1.º estágio	39
6.7.2	Controlo Barcelona, 2.º estágio	39
6.7.3	Controlo Barcelona, 3.º estágio	39
6.7.4	Larvas da linha Barcelona expostas a 50 segundos de plasma 1.º, 2.º e 3.º estágio.....	40
6.8	Larvas da linha Barcelona expostas a 120 segundos de plasma	41
6.8.1	Larvas de 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 120 segundos.....	41
6.9	Aplicação de plasma sem ultra violeta.....	42
6.9.1	Larvas de 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 50 segundos s/UV	43
6.9.2	Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 120 segundos s/UV	43
6.10	Larvas Barcelona expostas a 180 segundos sem ultra violeta	45
6.10.1	Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 180 segundos s/UV	45
6.11	Exposição da Linha 10 sem UV	47
6.11.1	Larvas de 1.º e 3.º estágio da linha 10 expostas a 120 segundos s/UV.....	47
6.12	Linha 10 com antibiótico	48
6.12.1	Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha 10 cultivadas com antibióticos e expostas a 180 segundos de plasma s/UV	49
6.13	Comparação das larvas da linha 10 e Barcelona com 50, 120 e 180 segundos de exposição de plasma com o controlo.....	50
6.14	Deteção das anomalias morfológicas e comportamentais após exposição	52
6.15	Anomalias detetadas nas larvas.....	53
6.15.1	Anomalias no comportamento	53
6.15.2	Anomalias no tamanho e forma do corpo das larvas	53
6.15.3	Anomalias no sistema respiratório (traqueia e aspiráculos).....	54
6.15.4	Anomalias no corpo gordo (fat body)	56
6.15.5	Melanismo/Massa melanótica desenvolvidas pelas larvas	57
6.15.6	Anomalias nas mudas entre estádios larvares.....	59
6.15.7	Anomalias na tonalidade das larvas.....	59
6.16	Anomalias das pupas.....	60
6.17	Anomalias relacionadas com os discos imaginários.....	61
6.17.1	Fenómeno de criptocefalia	61
6.17.2	Pupas com as patas tortas e inclinadas.....	61
6.17.3	Pupas com melanismos/massas melanóticas	61
6.17.4	Pupas com anomalias na forma corporal.....	62
6.17.5	Pupas com anomalias no aparato bucal	62
6.17.6	Pupas com anomalias nos aspiráculos anteriores e posteriores	62

6.17.7	Pupas com anomalias na posição do corpo no interior do pupário	62
6.17.8	Pupas com diferenças no tamanho.....	63
6.18	Anomalias dos adultos	68
6.18.1	Anomalias na posição da cabeça e do tórax	68
6.18.2	Anomalias das asas.....	68
6.18.3	Anomalias das patas.....	69
6.18.4	Anomalias na pigmentação	69
6.18.5	Melanismos/Massas melanóticas	69
6.18.6	Anomalias no tamanho do corpo	70
6.19	Curiosidades	74
7	Discussão	75
7.1	Otimização dos tempos de exposição.....	75
7.2	Viabilidade e anomalias na linha 10 após exposição	76
7.3	Viabilidade e anomalias na linha Barcelona.....	77
7.4	Anomalias morfológicas e comportamentais observados	78
7.4.1	Anomalias relacionadas com desequilíbrio hormonal	78
7.4.2	Anomalias relacionadas com os discos imaginais	80
7.4.3	Papel da insulina	82
7.4.4	O papel da hipoxia.....	82
7.4.5	A desintegração do corpo gordo	84
7.4.6	Massas melanóticas e regulação do sistema imunitário.....	85
7.4.7	O papel de outros fatores no desenvolvimento nas anomalias.....	86
7.5	Dissecação dos adultos	88
7.6	Análise global	89
8	Conclusão	91
9	Trabalhos futuros	93
	Referências bibliográficas	94
	Anexo 1	100
	Anexo 2	102

Lista de figuras

- Figura 1: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Após a clivagem e a gastrulação, o embrião, que já se encontra segmentado, eclode em larva. A larva eclode um dia depois de o ovo ser fertilizado. O primeiro, segundo e terceiro instar são estágios larvais. Cada um destes estágios termina com uma muda. Durante a fase de pupa, esta vai sofrer metamorfose onde a maioria dos tecidos da larva são destruídos e substituídos por tecidos adultos derivados dos discos imaginais formando a mosca adulta. Os tempos estão indicados para o ciclo de vida, a 25° C..... 2
- Figura 2: Morfologia externa de um embrião de *Drosophila* e os 3 estádios larvais:** a) imagem de fase anterior e posterior de um embrião (ovo) de *Drosophila*; b) diferentes estádios larvares, 1.º estádio (0h), 2.º estádio (24h), 3.º estádio (48h). 3
- Figura 3: Divisões do núcleo após fecundação para forma a blastoderme celular.** Este diagrama mostra como um único núcleo passa por uma série de divisões nucleares livres. Os núcleos migram para a periferia e organizam-se em camadas formando a blastoderme, a partir do qual toda a larva se desenvolve..... 4
- Figura 4: Segmentação da larva conservada no adulto.** As diferentes regiões do corpo do adulto já estão definidas antes da eclosão em adulto. O esquema mostra a segmentação das diferentes regiões do corpo da larva, que estão relacionadas com o corpo do indivíduo adulto. A identidade dos segmentos embrionários à esquerda é mantida no adulto à direita..... 5
- Figura 5: Diagrama do padrão cuticular de larva completamente formado.** O corpo da larva é caracterizado por um padrão característico de segmentos. De T1-T3 são os segmentos torácicos; de A1-A8 são os segmentos abdominais..... 6
- Figura 6: Morfologia externa de *Drosophila melanogaster*:** a) organização externa do corpo: 1-cabeça, 1.1 olhos, 1.2 antena, 1.3 omatídios sensoriais; 2-tórax, 2.1 asa, 2.2 patas, 2.3 ater; 3-abdómen; b) esquema de uma pata de *Drosophila* com os seis diferentes segmentos. 8
- Figura 7: Metamorfose.** Os discos imaginais (agrupamentos de células embrionárias), presentes na fase larval diferenciam-se na fase de pupa, originando as estruturas adultas. As linhas ligam os discos imaginais na larva com as estruturas correspondentes no adulto.9
- Figura 8: Organização esquemática do aparelho digestivo *Drosophila*;** (a) aparelho digestivo dentro da cavidade do corpo do adulto; b) o aparelho digestivo está dividido em três partes distintas, intestino anterior (foregut), intestino médio (midgut) e intestino grosso (hindgut). 11
- Figura 9: Esquema do sistema traqueal da larva de 3.º estádio** 12
- Figura 10: Variação das concentrações de ecdisteróides durante o desenvolvimento de *Drosophila*.** Os estágios de desenvolvimento de *Drosophila* estão representados com setas que assinalam as grandes transições no desenvolvimento. 14

- Figura 11: A interação do plasma não térmico com os sistemas vivos.** Resumo das principais conclusões sobre a interação do plasma não térmico com os organismos biológicos. Efeito das espécies radicalares na peroxidação das membranas, a alteração dos processos bioquímicos intracelulares, a seletividade e o efeito dose..... 18
- Figura 12: Espectro de emissão do PNTPA (250-450 nm)..... 19**
- Figura 13: Esquema do dispositivo de descarga dielétrica:** G-gerador de alta tensão, e_1 e e_2 -elétrodos de cobre, d_1 e d_2 -placas de mica..... 22
- Figura 14: Larvas compactadas:** a) larva de 3.^o estágio controlo, as setas indicam os aspiráculos anteriores e posteriores não melanizados; b) larva viva com 16 dias após exposição. A seta preta indica os aspiráculos posteriores não melanizados; c) larva morta com 16 dias após exposição, 1-larva com massa melanótica interna mas com tamanho normal, 2 e 3- larvas mortas compactadas; d-e) larvas mortas compactadas e com a posição da boca invertida assinalado com as setas pretas, 1- aspiráculos anteriores melanizados, 2- aspiráculos posteriores melanizados. 54
- Figura 15: Imagens das larvas com anomalia no tamanho, na forma, na gordura corporal e na forma do corpo após exposição.** Imagens estereoscópicas. As duas imagens finais são microscópicas 10x e 40x: a) comparação do tamanho das larvas com os mesmos tempos de desenvolvimento: 1-larva tamanho normal, 2-larva com 10 dias após exposição, 3-larva com 18 dias após exposição; b) larva com traqueias torcidas assinalado com as setas pretas; c) desenvolvimento de melanismos ou tecidos necróticos 10 dias após a exposição; d) larva com curvatura para um dos lados, compactada, traqueias tortas, posição do aparato bucal anormal assinalado com a seta; e) imagem onde se pode ver, assinalado com setas pretas, as zonas de desintegração dos tecidos internos; f) imagem de uma larva com traqueias partidas; g) ampliação da zona de traqueia partida; h) imagem microscópica 10x de uma larva com a traqueia dorsal partida assinalada com as setas pretas; i) imagem 40x de traqueias laterais partidas, assinaladas com as setas pretas. 55
- Figura 16: Imagens de diferentes graus de melanização observados nas larvas após exposição:** a) larva de 3.^o estágio com algumas zonas dos aspiráculos anteriores melanizados, assinalados com as setas pretas; b) larva de 3.^o estágio com os aspiráculos anteriores completamente melanizados; c) larva de 2.^o estágio com os aspiráculos anteriores completamente melanizados, assinalados com as setas pretas; d) imagem de uma larva de 3.^o estágio com outro padrão de melanização; e) imagem onde se pode observar uma faixa melanizada nos aspiráculos anteriores, a seta maior indica uma ampliação 40x desse padrão; f) imagem onde se observa a melanização dos aspiráculos anteriores com uma posição anormal assinalado com as setas pretas; g) larva com melanização dos aspiráculos posteriores. 56
- Figura 17: Diferentes tonalidades da gordura corporal da larva.** Foram observadas diferentes tonalidades nas vesículas de gordura no interior do corpo da larva, assinalado com as setas pretas 40x..... 57

Figura 18: Imagens estereoscópicas de larvas vivas com o desenvolvimento de massas melanóticas: a) zonas de grandes massas melanóticas internas na zona genitália e alguns melanismos mais pequenos assinalados com as setas pretas; b) larva com uma grande massa melanótica interna na metade inferior do corpo; c) larva com massas melanóticas internas situadas na metade superior do corpo; d) larva com melanismos cuticulares e subcuticulares na zona genitália; e) larva com vários melanismos subcuticulares na zona genitália assinalados com as setas pretas. 58

Figura 19: Larvas mortas apresentando diferentes tipos de melanismos: a) larvas com zonas de melanismos na boca assinalado com as setas pretas; b) larva com melanismo na boca e genitália; c) larva com melanismo na zona da cabeça assinalado com as setas pretas; d) larva morta com melanismo na metade superior do corpo; e) larva com massas melanóticas internas, espalhadas por todo o corpo; f-g) larvas mortas com melanização generalizada e com o corpo espalhado em redor (“puf”); h) larva com massas melanóticas afetando alguns órgãos; i) larva com massas melanóticas afetando a integridade das traqueias assinalado com as setas pretas; j) larva com o corpo todo condensado na metade superior e com vários melanismos; l) larva com massa melanótica na zona genitália e alterações da gordura corporal..... 58

Figura 20: Imagens microscópicas das anomalias observadas nas mudas das larvas: a) imagem 10x da larva com anomalias na muda com traqueias partidas assinaladas com as setas pretas; b) imagem ampliada 20x da parte superior da cabeça da larva; 1 e 2 assinala os aspiráculos superiores característicos de 3.º estágio; 3 e 4 assinala os aspiráculos anteriores característico de 2.º estágio; 5 assinala a retenção da cutícula velha; 6 assinala a duplicação das mandíbulas; c) uma imagem ampliada 40x da cabeça de uma larva que apresentou anomalias durante o processo de muda; 7 e 8 assinalam a mandíbula de 3.º estágio; 9 e 10 assinala a mandíbula de 2.º estágio; 11 assinala o aspiráculo anterior de 2.º estágio; 12 e 13 assinalam os aspiráculos anteriores de 3.º estágio. 59

Figura 21: Imagens microscópicas de larvas que apresentaram pigmentos cor-de-rosa: a) larva com pigmentos cor-de-rosa na zona dos tubos malpighianos, no aparelho digestivo e na hemolinfa, assinalado com a seta preta; b) larva com a pigmentação colorida no interior dos tubos malpighianos; c) nesta imagem pode ser observado uma larva com pigmentos em diferentes zonas do corpo, nas traqueias e nos músculos da faringe. Na imagem mais à esquerda a larva de corpo completo com zonas de pigmentos assinalados com as setas pretas. Na imagem mais à direita, as setas indicam as traqueias e os músculos da faringe com pigmentação colorida 40x. 60

Figura 22: Imagens estereoscópicas dos vários fenótipos observados nas pupas: a) fenótipo de uma pupa do controlo; b) comparação da forma e do tamanho entre duas pupas de exposição: 1-tamanho normal, 2-tamanho compactado, vista dorsal à esquerda e vista ventral mais à direita; c) pupa com melanismo em forma de renda em todo o corpo; d) pupa com outro padrão de melanização; e-f) pseudo pupário em que a forma faz lembrar a forma de larva. Esta pupa apresenta melanismo interno assinalado com as setas pretas; g) pupa alteração na forma do corpo, vista dorsal e vista ventral; h) pupa

com forma de larva, corpo colapsado na parede do pupário e com melanismo na cabeça, sem apresentar aspiráculos anteriores, vista dorsal e vista lateral; i-j) pupa com curvatura para um dos lados; l-m) pupas com anomalias na morfologia da cabeça e da posição do corpo..... 63

Figura 23: Nesta figura estão representados alguns dos fenótipos criptocefálicos encontrados nas pupas que morreram antes de eclodir em adulto: a-a1) pupa morta antes de ser dissecada. Vista dorsal e ventral. A posição baixa da cabeça (criptocefálica) está assinalada pela seta preta; a2) a pupa anterior depois de dissecada. As setas mostram a presença do desenvolvimento das patas curtas, corpo condensado para cima e a ausência dos olhos, revelando que esta pupa deve ter morrido entre a fase P5 e P6; b) pupa com melanismo na altura das patas e cabeça baixa, posição ventral; b1) a mesma pupa na posição dorsal, onde se podem observar alguns melanismos; b2) a mesma pupa após dissecação, onde se pode observar a formação das patas, mas com zonas melanizadas. Também se pode ver que a posição do corpo é menos condensado que o anterior; c) pupa criptocefálica, mas com pigmentação vermelha nos olhos; c1-c2) a mesma pupa dissecada após morte numa das fases do desenvolvimento mais avançada. Esta pupa desenvolveu-se até à fase P13, pois apresenta pêlos e asas pretas; d) pupa criptocefálica com pigmentação dos olhos. Esta pupa não fez expulsão da armadura bucal, podemos ver que a armadura bucal ainda está agarrada ao corpo, assinalado com a seta preta; e) pupa que não fez expulsão da armadura bucal e morreu numa das fases inicial do desenvolvimento. O corpo apresentava-se como um amassa gordurosa e saíram algumas massas melanóticas durante a dissecação. Estes eventos estão assinalados com as setas pretas. 64

Figura 24: Imagens de fenómenos criptocefálicos que desenvolveram olhos pigmentados no tórax e no abdómen. Pupa antes e depois da dissecação: a) pupa controlo; a1) pupa controlo dissecada posição dorsal; a2) pupa controlo dissecada posição ventral; b) pupa de exposição com fenótipo criptocefálico. A seta preta assinala a posição do olho; b1) vista lateral da mesma pupa, onde se pode observar a posição do olho, assinalado com a seta preta; b2) outra vista lateral onde se pode observar a posição dos dois olhos; b3) imagem da pupa após dissecação, onde se pode observar que um dos olhos desenvolveu-se entre o tórax e o abdómen; c) pupa criptocefálica, onde só se observa um dos olhos, vista dorsal; c1) vista ventral; c2-c4) vista dorsal, ventral e lateral da pupa após dissecação. Podemos verificar que um dos olhos não está na posição; c5) pupa após dissecação do abdómen. Verificou-se que o olho tinha desenvolvido no abdómen; d), d1) imagem de outro tipo criptocefálico encontrado na pupa antes de dissecação, vista dorsal e vista ventral; d2) vista ventral da mesma pupa após dissecação, onde se vê a sombra dos olhos no abdómen; d3), d4) diferentes posições ventrais da pupa. A posição dos olhos está assinalada pelas setas pretas; d5) o corpo do indivíduo foi dissecado, verificando-se que os olhos tinham-se desenvolvido no abdómen. 65

Figura 25: Fenótipos das patas curtas e tortas observadas nas pupas de larvas sobreviventes à exposição: a) pupa do controlo, posição das patas assinalada com a seta preta; b) pupa com o corpo todo condensado na parte superior. Patas muito curtas e

inclinadas para a direita; pupa com patas curtas e inclinadas para a esquerda; e) pupa com patas curtas e melanismo interno; f) pupa com as patas curtas e curvadas; g) pupa com patas mais curtas e inclinadas para a direita; h) pupa com patas curtas e tortas inclinadas para a esquerda; i) pupa com patas muito curtas, tortas e inclinadas para a esquerda; j) pupa com as patas curtas e enroladas para a esquerda; i) pupa com patas curtas mas direitas; m) pupa com o corpo em forma de vírgula e com patas curtas; n) pupa com patas curtas e muito tortas; o) pupa dissecada com as patas muito curtas; p) pupa dissecada com as patas tortas e enroladas; q) pupa com patas curtas e melanismo na zona das patas, onde se pode observar que falta um par de patas, assinalado com a seta preta; r) pupa onde faltam patas e as outras estão enroladas; s) pupa dissecada muito jovem, onde se pode observar as patas curtas..... 66

Figura 26: Imagens das diferentes anomalias morfológicas observados nas pupas: a) pupa do controlo; b) vista dorsal de uma das pupas que apresentaram anomalias nos aspiráculos anteriores e na posição da cabeça. Podemos observar que o corpo está descolado da cutícula e tem ar na cavidade corporal; c) vista ventral das pupas anteriores. Nesta imagem pode ser observado que a pupa não expeliu o aparato bucal, assinalado com a seta preta, e que a cabeça tem uma forma anormal; d) pupa com a morfologia do corporal toda alterada; e) vista ventral de uma pupa com anomalias morfológicas da forma do corpo e aspiráculos anteriores; f) vista dorsal da pupa anterior; g) pupa com a posição dos aspiráculos anteriores em forma de “V”; h-i) pupa mole com anomalias na forma do corpo, onde podemos observar que faltam os aspiráculos anteriores assinalado com a seta preta. Também podemos observar massas melanóticas internas. 67

Figura 27: Os diferentes tamanhos observados nas pupas que resultaram das larvas de exposição: 1) pupa com um tamanho gigante; 2) pupa com um tamanho normal; 3) pupa com um tamanho ligeiramente mais pequeno que o normal; 4) pupa com um tamanho minúsculo..... 67

Figura 28: a) Adulto que não conseguiu eclodir corretamente, as patas com anomalias ficaram agarradas à cutícula; b) adulto que após dissecação saíram muitas cutículas de gordura que estavam soltas na cavidade corporal..... 70

Figura 29: Imagens de algumas das anomalias apresentadas pelos adultos do grupo experimental na posição da cabeça, dos olhos, da asas e das patas: a) adulto de controlo; b) adulto com anomalias na posição da cabeça, assinalado com a seta preta; b) adulto com anomalias na posição da cabeça e com uma das patas muito curta, assinalado com a seta preta; c) indivíduo com alteração nos pêlos do tórax; exemplo de anomalias da forma dos olhos; e) adulto com o corpo em forma de vírgula; f) um adulto com assimetria das asas, uma com a forma e o tamanho normal e a outra mais pequena e quadrada; g) um adulto com a formação e segmentação dos 3 pares de patas completamente alteradas. 70

Figura 30: Fenótipos observados nos adultos de *Drosophila melanogaster* resultantes das larvas de exposição: a) adulto de controlo; b-f) adultos com diferentes anomalias do tórax, onde se pode observar que falta uma das asas, assinalado com a seta preta; g)

adulto com massas melanóticas internas no abdómen; h) adulto com massas melanóticas internas no tórax e abdómen, assinalado com as setas pretas; i) adulto com pigmentos vermelhos nas patas, na cabeça, no tórax e abdómen, assinalado com as setas pretas. ... 71

Figura 31: Adultos com diferentes anomalias das asas: a) controlo; b-f) diferentes tipos de alterações verificadas nas asas; g) adulto que apresentou uma pequena asa no 1.º par de patas. A asa está assinalada com a seta preta; h) adulto com as asas não desenvolvidas e o corpo com curvatura para um dos lados. 71

Figura 32: Nesta imagem podem ser observadas as várias alterações observadas nas asas: a) asa de controlo; b-c) as setas pretas assinalam a alteração no padrão dos pêlos à volta da asa. Também pode ser observado que o formato das asas está alterado; d-i) diferentes alterações registadas a nível das nervuras das asas; j-l) asas com a forma alterada. 72

Figura 33: Imagem onde se podem observar diferentes anomalias registadas nas patas: a) patas de controlo; b) 3.º e 2.º par de patas com anomalias na segmentação; b) patas onde se pode ver melanismos da 3.ª pata e a falta de uma das patas do lado direito; c) patas com melanismo e mal formação de uma das patas, assinalado com a seta. Não foi possível determinar se pertencia à 2 ou à 3 pata; d-p) diferentes anomalias na forma e segmentação; q-r) manchas melanóticas nas articulações, assinaladas com as setas pretas. 72

Figura 34: Anomalias da pigmentação nos adultos. Na figura podemos ver diferentes zonas do corpo da mosca onde se observou alterações da pigmentação: a) abdómen de um macho com o padrão normal de pigmentação; b) macho completamente despigmentado; c) um macho, pente sexual assinalado com a seta preta, com padrão de pigmentação alterado no final do abdómen, assinalado com a chave; d) abdómen com o padrão das listas pretas anormal, assinalado com a seta preta; e) manchas melanóticas na boca de um indivíduo adulto; f) imagem dos testículos de um macho do controlo; g) imagem dos testículos com alteração da pigmentação de um indivíduo do grupo experimental; h) pata com alteração da pigmentação nos segmentos finais. 73

Figura 35: Imagens das diferentes formas de massas melanóticas que saíram durante a dissecação dos adultos: a) dissecação de um adulto com a respetiva massa melanótica; b-g) massas melanóticas com diferentes tonalidades e formas associadas a vesículas de gordura; h) estrutura melanótica solta sem vesículas de gordura 40x. 73

Figura 36: Comparação de tamanhos. Nesta imagem é possível ver as diferenças de tamanhos encontrados nos indivíduos adultos. Na imagem mais à esquerda podemos ver um adulto minúsculo com problemas nas asas. Na imagem à direita podemos ver um adulto minúsculo mas asas têm morfologia normal. 74

Figura 37: Curiosidades: a) adulto com asas e pata colada no pupário; b) adulto rodeado de muitas cutículas de gordura que saíram durante a dissecação; c) fêmea que apresentou uma estrutura anormal junto aos ovários; d) fêmea com duplicação do tórax;

e) fêmea com um pente sexual na pata esquerda; f) ampliação da pata da fêmea com o pente sexual..... 74

Figura 38: Ilustração de um esquema endocrinológico do inseto. Os círculos representam os vários reguladores ambientais internos que afetam a função da PG. Esses sinais convergem para a PG, que por sua vez decide o tempo de transição do desenvolvimento. Abreviaturas: E, ecdisona; PTTH, hormona protorácica; PG, glândula protorácica; IPC, célula produtora de insulina; X, fatores protorácicos desconhecidos. 90

Figura 39: Esquema da comunicação inter-órgãos na resposta à ecdisona: (a) órgãos larvais envolvidos na comunicação; (b) sinalização ETH/ETHR que desencadeia o comportamento da muda. (c) comunicação entre o corpo gordo e os discos imaginais para promover o desenvolvimento das estruturas do adulto durante a metamorfose. Abreviaturas: 20E, 20-hidroxiecdisona; PG, glândula protorácica; CNS, sistema nervoso central; ETH, hormona que desencadeia a muda; ETHR, recetor de ETH; IIS, sinalização insulina/IGF; Crol, pernas tortas. 91

Lista de tabelas

Tabela 1: Resumo da otimização do tempo de exposição	26
Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos com os diferentes tempos de exposição, na separação por estágio de desenvolvimento.....	31
Tabela 3: Tabela resumo dos resultados do teste estatístico χ^2 , obtidos na comparação do desenvolvimento de massas melanóticas e na mortalidade influenciada pelas massas melanóticas nas larvas dos diferentes estádios larvais, nos diferentes tempos de exposição com o controlo.....	32
Tabela 4: Resumo dos resultados da comparação da linha 10 e Barcelona com exposição de 50, 120 e 180 segundo com o controlo. Estão representados os valores para a mortalidade das larvas, para a mortalidade das pupas e para a relação mortalidade e desenvolvimento de massas melanóticas. Abreviaturas: di, dados insuficientes; ns, não significativo.	51
Tabela 5: Resumo dos resultados da comparação da linha 10 e Barcelona com exposição de 50, 120 e 180 segundo com o controlo. Estão representados os valores para a formação de massas melanóticas nas larvas vivas e as anomalias morfológicas nos adultos. Abreviaturas: di, dados insuficientes; ns, não significativo.....	52

Tabela de abreviaturas

Símbolos	°C	Graus Celcius
	%	Porcentagem
	µl	Microlitro
	µm	Micrómetro
	mm	Milímetro
	h	Hora
	GL	Graus liberdade
	p	p-value
A	A ₁	1º Segmento abdominal
	A ₈	8º Segmento abdominal
	A ₁ -A ₈	Segmentos abdominais entre 1 e 8
	ADGF-A	Adenosine deaminase-related growth factor A Factor de crescimento A relacionados com adenosina/adenosidade
C	ADN	Ácido desoxirribonucleico
	Crol	Crooked legs gene Gene patas tortas
D	DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine 3,4-di-hidroxifenilalanina
E	E	Ecdysone Ecdisona
	E74	Ecdysone E74 gene Gene da ecdisona E74
	EcR	Ecdysone receptor gene Gene receptor de ecdisona
F	F1	Primeira geração
H	Hb	Hemoglobin Hemoglobina
	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
	I	Imd
IGF		Insulin/insulin-like growth factor / Factor de crescimento insulina/insulina like
J	Jak	Janus Kinase protein / Proteína quinase Janus
M	MDA	Malondialdehyde / Malondialdeído
	Mmp1	Matrix metalloproteinase-1 / Metaloproteinase 1 da matriz
	Mmp2	Matrix metalloproteinase-2 / Metaloproteinase 2 da matriz

Os efeitos do plasma não térmico à pressão atmosférica no desenvolvimento larval e anomalias morfológicas de Drosophila melanogaster

N	nec	Necrotic gene / Gene necrótico
	NO	Nitric oxide / Óxido nítrico
	NTPP	Non-thermal atmospheric pressure plasma / Plasma não térmico à pressão atmosférica
O	O ₋₂	Singleto de oxigénio
	O ₃	Ozono
	OH.-	Radical hidroxilo
P	P1-P15	Estádios de desenvolvimento pupal de 1 a 15
	PG	prothoracic gland / Glândula protorácica
	PO	Phenoloxidase enzyme / Enzima fenoloxidase
	PPO	Prophenoloxidase enzyme / Enzima profenoloxidase
	PTTH	Prothoracicotropic hormone / Hormona protorácica
	R	RC
ROS		Reactive oxygen species / Especies reativas de oxigénio
S	ss	Gene spineless
	Sgs	<i>Drosophila</i> glue gene Gene da cola de <i>Drosophila</i>
T	T1-T3	Segmento torácico 1 a 3
	TGFβ/activin	Transforming growth factor beta/activin / Factor de crescimento transformante beta relacionado com activina
	TOLL	Transmembrane receptor / Recetor transmembranar
	TOR	Target of rapamycin / Alvo da rapamicina
U	UV	Ultraviolet / Ultra violeta
	c/UV	Com ultra violeta
	s/UV	Sem ultra violeta

Capítulo I

1 Noções básicas sobre *Drosophila*

1.1 Introdução

A *Drosophila melanogaster* tem sido o sistema modelo escolhido por muitos investigadores ao longo dos últimos cem anos. Devido à sua genética e à facilidade com que pode ser tratada experimentalmente, esta mosca é um dos mais importantes organismos para estudar a genética, a fisiologia e o comportamento dos animais. É pequenina (3/4mm), não representa qualquer ameaça para a saúde humana, é fácil de obter e de transportar, permitindo assim efetuar experiências rápidas mas que demonstram conceitos biológicos básicos [1].

Muitas das técnicas utilizadas neste organismo foram estabelecidas ao longo do tempo e outras continuam a ser desenvolvidas e aperfeiçoadas de modo a responder a uma variedade emergente de questões científicas. Existem bancos de dados e *stocks* de moscas que permitem o fácil acesso a coleções extensivas de informação e a milhares de mutantes e transgênicos, como por exemplo o FlyBase, um excelente banco de dados de pesquisa sobre *Drosophila*.

A *D. melanogaster* apresenta duas características que a tornam particularmente valiosa como um organismo modelo para a ciência moderna. Em primeiro lugar, as ferramentas disponíveis para trabalhar com estes organismos são muitas e de fácil acesso. Em segundo lugar, é um excelente modelo para o estudo de doenças humanas porque quaisquer descobertas podem ser transpostas para a medicina [2]. Por outro lado, o seu uso tem sido estimulado pela surpreendente descoberta de que cerca de 70% das doenças genéticas nos humanos encontram ortólogos (genes/proteínas com a mesma função em organismos diferentes) no genoma da mosca [2, 3]. Atualmente é muito usada para pesquisas sobre um amplo espectro de patologias, como doenças infecciosas, cancro, distúrbios convulsivos, abuso de drogas e doenças neurodegenerativas, entre muitas outras.

Vejamos, por exemplo, o trabalho de Leslie C. Griffith [4], publicado em agosto de 2014, onde foi feito um estudo sobre qual é o sub-circuito neural usado pelas fêmeas de *Drosophila* na escolha do macho para copular. Este é um trabalho interessante, uma vez que as moscas são confrontadas com desafios semelhantes aos enfrentados pelos seres humanos no que diz respeito a decisões tais como: o que comer, quando dormir e com quem acasalar, ou seja, decisões que estão relacionados com o nosso livre arbítrio, um processo que está enraizado na arquitetura molecular e neural dos nossos cérebros [4]. Os conhecimentos genéticos e as ferramentas eletrofisiológicas disponíveis para este organismo tornam a mosca *Drosophila* um ótimo modelo para obter os primeiros vislumbres de como um cérebro pode tomar decisões complexas [4].

A *D. melanogaster* é um inseto holometabólico, o que significa que a larva passa por uma transformação completa durante a metamorfose até formar o adulto. Deste modo, até surgir o indivíduo adulto vai passar por vários estágios de desenvolvimento, progredindo através de 4 etapas: embrião, larva, pupa e adulto, num processo conhecido como o ciclo de vida (figura 1) [5]. As fases larvais e adultas são separadas por uma fase distinta de pupa onde ocorre a metamorfose. A metamorfose envolve a destruição de determinados tecidos larvais, a transformação de outros e a diferenciação dos tecidos adultos, principalmente a partir dos discos imaginais (a importância dos discos imaginais é explicada no ponto 2.1) [6].

1.2 Ciclo de vida

A *D. melanogaster* inicia o seu desenvolvimento embrionário no interior de um ovo do qual eclode em larva. A fase embrionária estende-se até 24 horas após a fecundação, seguindo-se a fase larval que evolui para uma fase de pupa, onde vai sofrer metamorfose até atingir a forma adulta [5].

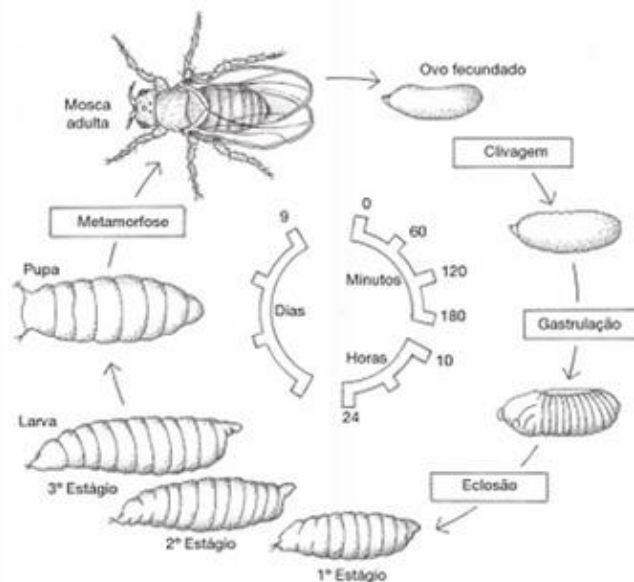


Figura 1: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Após a clivagem e a gastrulação, o embrião, que já se encontra segmentado, eclode em larva. A larva eclode um dia depois de o ovo ser fertilizado. O primeiro, segundo e terceiro instar são estágios larvais. Cada um destes estágios termina com uma muda. Durante a fase de pupa, esta vai sofrer metamorfose onde a maioria dos tecidos da larva são destruídos e substituídos por tecidos adultos derivados dos discos imaginais formando a mosca adulta. Os tempos estão indicados para o ciclo de vida, a 25°C [7].

O ovo de *Drosophila* tem cerca de 0,5 mm de comprimento e uma forma oval, com filamentos salientes na extremidade anterior. É coberto com um córion branco e opaco, sob o qual fica a membrana vitelina que contorna o ovo (figura 2a). Na extremidade anterior existe um pequeno furo chamado micrópilo, que é o ponto de entrada para o espermatozoide. O embrião desenvolve-se dentro do córion, e a larva recém-formada rompe-o após cerca de 22 horas [5, 7]. O ovo é colocado sobre a superfície do alimento e a larva entra para o seu interior logo após a eclosão. A vida da larva é dividida em três estágios larvais, durante os quais ocorrem mudas e a cutícula larval é descartada (figura 2b). Quando eclode, a larva mede cerca de 0,5 mm, crescendo cerca de 4,5 mm de comprimento até ao final da terceira fase larval [5].

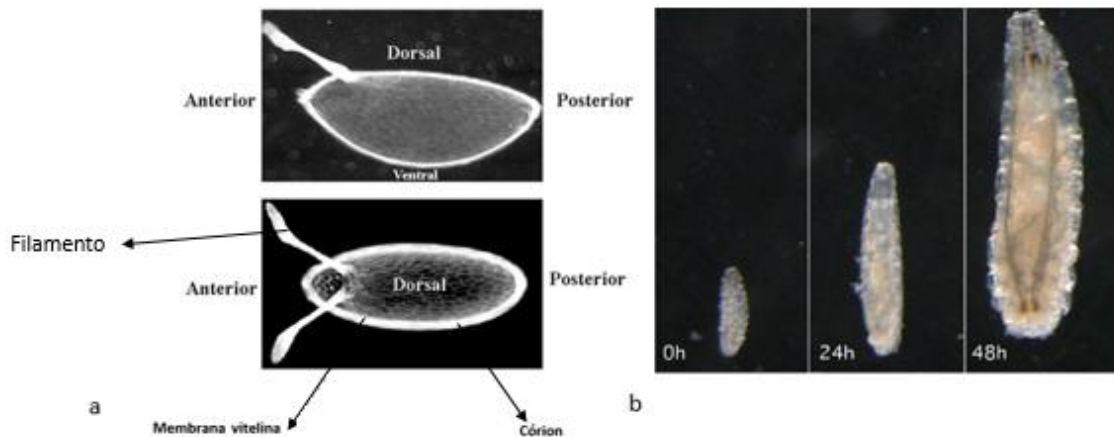


Figura 2: Morfologia externa de um embrião de *Drosophila* e os 3 estádios larvais: a) imagem de fase anterior e posterior de um embrião (ovo) de *Drosophila*; b) diferentes estádios larvais, 1.º estágio (0h), 2.º estágio (24h), 3.º estágio (48h) [7].

No final do terceiro instar a larva arrasta-se para fora da comida e muda de forma. Os aspiráculos anteriores evertem, o corpo diminui e deixa de se mover [5]. A cutícula larval forma a casca exterior da pupa ou pupário. Uma vez dentro da proteção do pupário, as ex-larvas vão submeter-se a metamorfose [5, 7]. Esta reorganização leva cerca de quatro dias e consiste na desintegração da maior parte dos tecidos larvais e a sua substituição por meio da proliferação e diferenciação de células que resultam em estruturas adultas [5].

A maioria das estruturas adultas, como as asas, as pernas, os olhos e os órgãos genitais, desenvolvem-se a partir de discos imaginais, que são sacos epiteliais achatados que se desenvolvem a partir de pequenos grupos de células embrionárias [7]. Os discos imaginais passam, durante as fases de larva e de pupa, por um extenso processo de crescimento e de desenvolvimento [5].

A fase de pupa passa por 15 estádios de desenvolvimento, após os quais emerge o indivíduo adulto. No final da metamorfose, quando o adulto emerge, as suas asas vão expandir, o exosqueleto endurece e torna-se pigmentado [7]. Oito horas após a eclosão,

os adultos tornam-se sexualmente ativos e começam a acasalar, iniciando uma vez mais o ciclo de vida [5].

O ciclo de vida completo demora cerca de 10 dias a 25° C, mas pode ser afetado pela temperatura. Por exemplo, a 18° C o ciclo de vida é de cerca de 19 dias e a 29° C o ciclo de vida é de apenas 7 dias [7].

1.3 Embriogénese

O embrião é um ovo fertilizado, e imediatamente após a fecundação sofre divisão mitótica rápida sem crescimento. O núcleo zigótico sofre nove ciclos de divisão nuclear, mas sem ocorrer citocinese (divisão do citoplasma e formação de duas células distintas), formando-se uma célula multinucleada chamada blastoderme sincicial [5].

Após a décima divisão nuclear, os núcleos migram para a periferia do blastoderme sincicial. Na periferia, estes núcleos vão dividir-se mais quatro vezes em sincronia [5, 7]. Assim que os núcleos chegam à superfície do ovo, as membranas invaginam-se entre si, formando a blastoderme celular [5, 7] (figura 3). A blastoderme celular contém uma mono-camada de células que serão transformadas numa estrutura complexa com multicamadas celulares, num processo conhecido como gastrulação. Deste modo, a mono-camada celular do blastoderme será convertida em ectoderme, endoderme e mesoderme. A endoderme dá origem ao intestino, a mesoderme dá origem aos músculos cardíacos e a ectoderme dá origem à epiderme e ao sistema nervoso central. Após 24 horas os embriões eclodem como larva [5, 7].

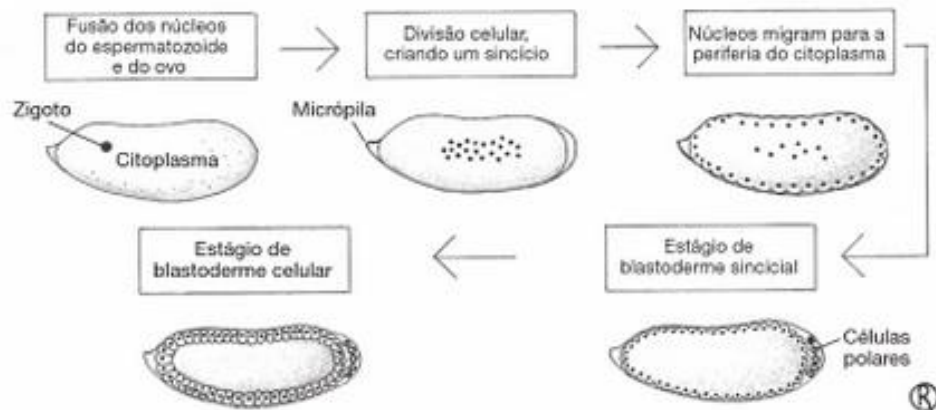


Figura 3: Divisões do núcleo após fecundação para forma a blastoderme celular. Este diagrama mostra como um único núcleo passa por uma série de divisões nucleares livres. Os núcleos migram para a periferia e organizam-se em camadas formando a blastoderme, a partir do qual toda a larva se desenvolve [7].

1.4 Desenvolvimento larval

Vinte e duas horas após a fecundação, as larvas de *Drosophila* eclodem do ovo e começam logo a alimentar-se. A larva vai crescer e passará por três estádios larvais, por

duas mudas e formará uma pupa que após metamorfose originará um indivíduo adulto [5].

As larvas, que são brancas com o corpo segmentado, rastejam e alimentam-se constantemente no interior da comida molhada, o que proporciona um rápido crescimento. Estas larvas vão progredir através de três estádios larvais: o primeiro estágio desenvolve-se entre 24 a 38 horas após a fecundação, o segundo estágio de 48 a 72 horas e o terceiro estágio de 72 a 120 horas [7].

Para poder crescer, a larva produz uma cutícula nova e maior, descartando a cutícula velha. Por essa razão, ocorre uma muda entre cada estágio (ecdysis). As diferentes regiões do corpo da larva já estão bem definidas antes mesmo da sua eclosão (figura 4). Na fase larval, o organismo apresenta três segmentos torácicos e oito abdominais. Há onze cintos de dentículos que se encontram ventralmente. Os segmentos são numerados de 1-13 de anterior para posterior (figura 5). O segmento 1 é o pseudo céfalo, os segmentos 2-4 são torácicos e os segmentos 5-13 são abdominais [5]. Existem pequenas protuberâncias denominadas dentículos.

Quando estiverem prontas para a fase seguinte, as larvas de terceiro estágio deixam de se alimentar e fixam-se a uma superfície firme, como por exemplo o lado de um frasco, para formar a pupa [5].

A fase de larva de terceiro instar é uma fase crítica no desenvolvimento de *Drosophila*, uma vez que contém o maior crescimento e proliferação de todos os tecidos necessários para formar a mosca adulta. O correto desenvolvimento das estruturas dos adultos requer a coordenação da proliferação com o início da diferenciação celular nos discos imaginais [8].

Até o final do terceiro instar larval, variações bruscas na concentração da hormona esteróide 20-hidroxiecdisona (a importância desta hormona é explicada no ponto 3.1) induz a entrada das larvas na fase de pré-pupa e os discos começam a sua morfogénese [9].

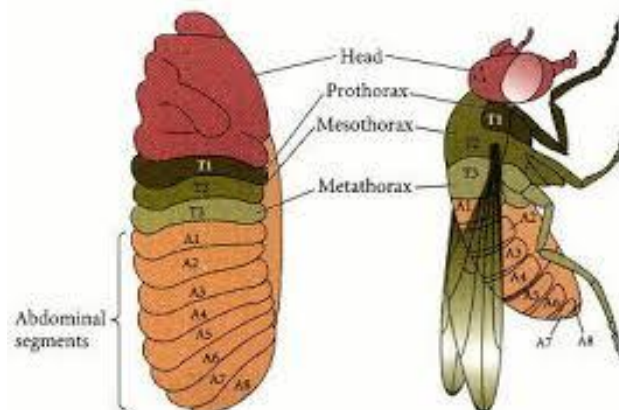


Figura 4: Segmentação da larva conservada no adulto. As diferentes regiões do corpo do adulto já estão definidas antes da eclosão em adulto. O esquema mostra a segmentação das diferentes regiões do corpo da larva, que estão relacionadas com o corpo do indivíduo adulto. A identidade dos segmentos embrionários à esquerda é mantida no adulto à direita [7].

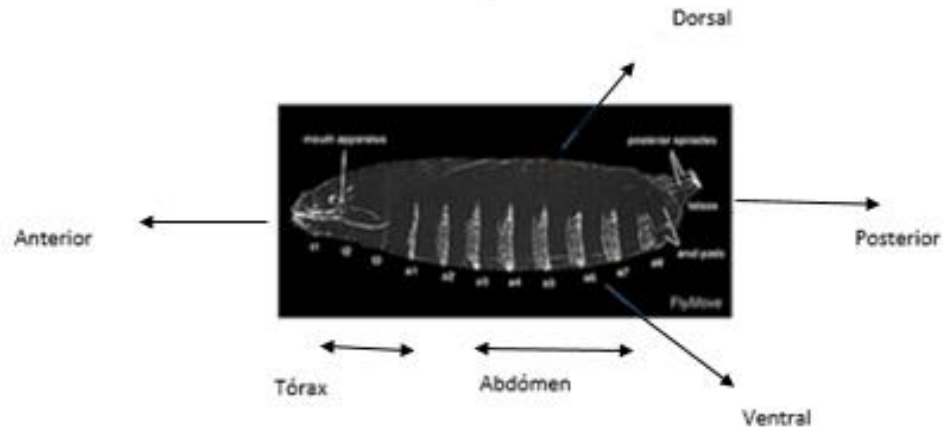


Figura 5: Diagrama do padrão cuticular de larva completamente formado. O corpo da larva é caracterizado por um padrão característico de segmentos. De T1-T3 são os segmentos torácicos; de A1-A8 são os segmentos abdominais [10].

1.5 Desenvolvimento da pupa

No final do terceiro instar, a larva estende os espiráculos anteriores que constitui um sinal de que a metamorfose está prestes a começar. A transformação de larva a adulto vai ocorrer dentro de um pupário duro. O seu desenvolvimento processa-se ao longo de quinze estádios de desenvolvimento (P1-P15). Este processo é dividido em duas fases: pré-pupa e pupa [5].

A formação do pupário é desencadeada por um pulso de ecdisona e consiste num processo de fixação a uma superfície sólida. Este acontecimento marca o início da metamorfose [5, 11]. Nesta fase a larva encurta, torna-se mais ampla e os espiráculos anteriores invertem e deixam de se movimentar [5]. As pupas são imóveis e inicialmente são brancas e macias. Os estágios (P2-P4) são pré-pupais. Ao entrar no primeiro estágio de pré-pupa (P1), o corpo da larva encurta e torna-se imóvel [12]. Após a fase de pupa branca, a cutícula larval vai formar o pupário. Depois deste período as pupas vão endurecer, ficando com uma tonalidade acastanhada, formando uma pupa madura. Dentro do pupário, a maioria dos órgãos de larvas vão começar a se autodestruir. Simultaneamente, os discos imaginais evertem. Dez horas após a formação do pupário os níveis de ecdisona voltam a subir, induzindo a eversão da cabeça. Uma hora mais tarde os discos imaginais começam a invaginar [11]. A fase seguinte é marcada pelo aparecimento de uma bolha de gás dentro do pupário por baixo do coração (P3). Logo depois a cabeça vai everter (P4) [12]. Contrações musculares e movimento da bolha de gás precedem a eversão da cabeça. A cápsula da cabeça desprende dos espiráculos larvais e as mandíbulas são ejetadas. A eversão da cabeça marca a transição de pré-pupa para pupa (P4-P5).

A fase de pupa vai de P5-P15. Ao longo de um período de quatro dias, o tecido da larva vai degenerar para formar os tecidos do adulto. O estado P5 é identificado pelo surgimento de uma mancha translúcida marcando o desenvolvimento dos olhos, das pernas e das asas, que se estendem ventralmente. Na fase de desenvolvimento P6 os

tubos malpighianos passam de branco a verde. O estado P7-P8 é marcado pelo desenvolvimento da pigmentação dos olhos, que passam de amarelo claro a âmbar, passando depois de âmbar escuro a vermelho brilhante (P9-P10). Mais tarde, as pontas das asas tornam-se cinza clara (P11). Ventralmente são visíveis os pentes sexuais no 1.º par de patas do macho (P12). As asas escurecem para preto (P12-P13), os pêlos da cabeça, do tórax e do abdômen são pretos. As garras nas pontas dos pés tornam-se visíveis (P13-P14). No final da metamorfose (P15), a mosca adulta está totalmente formada e pronta para sair [12].

A eclosão do adulto a partir do pupário começa com contrações musculares. Em seguida, o opérculo abre-se e a mosca vai fazer movimentos e contrações com as pernas para conseguir sair do pupário. Todas as fases do desenvolvimento pupal estão representadas na tabela 1 do anexo 1.

No final desta fase, a maioria dos tecidos de larvas sofreram processos de histólise e as estruturas adultas foram formadas [13]. A fase de pupa dura entre 6 a 7 dias após a fecundação. A eclosão marca o fim da fase de pupa e as moscas emergem como adultos. A metamorfose de *Drosophila* requer a coordenação da proliferação (crescimento celular e divisão), da diferenciação e morte celular, de modo a que a mosca adulta adquira o tamanho adequado e apresente as estruturas corretamente diferenciadas [14, 15].

1.6 Morfologia externa do adulto

O adulto de *Drosophila* é formado por uma cabeça, um tórax e um abdômen. Na cabeça encontram-se dois olhos, duas antenas, um aparato bucal e três omatídios sensíveis à luz dispostos de forma triangular [5] (figura 6-a). O tórax é constituído por três segmentos: protórax, mesotórax e metatórax. Cada segmento possui um par de patas. Cada pata é dividida em seis segmentos: coxa, trocânter, fémur, tíbia, metatarsos e tarso (de proximal para distal) (figura 6-b). As asas estão anexadas ao mesotórax e o haltere, um par de pequenos órgãos usados para manter o equilíbrio na mosca adulta, estão ligados ao metatórax. O protórax é muito reduzido e serve de suporte para as pernas protorácicas. Todos os três segmentos torácicos estão fundidos para formar uma caixa quase sólida. Os halteres no metatórax são o equivalente das asas metatorácicas. O abdômen contém sete pares de furos (espiráculos), um par para cada um dos segmentos [16]. A *D. melanogaster* tipo selvagem, ou mosca da fruta, tem uma cabeça com olhos vermelhos multifacetados, um tórax bronzeado com pêlos pretos arqueados, asas, patas, e um abdômen listado.

O grupo *melanogaster* apresenta dimorfismo sexual, o que significa que as fêmeas são fenotipicamente distintas dos machos. Em particular, os machos são mais pequenos que as fêmeas e têm um abdômen arredondado e escuro. Podem ser observados tufo de pêlos na articulação do tarso do primeiro par de patas junto à cabeça, chamados pentes sexuais [5]. As fêmeas têm um abdômen caracteristicamente aguçado com um padrão uniforme de bandas mais pigmentadas. São extremamente férteis, pois podem

produzir milhares de descendentes durante a sua vida. As fêmeas colocam centenas de ovos por dia e podem continuar a fertilizar ovos após o acasalamento ocorrer [17].

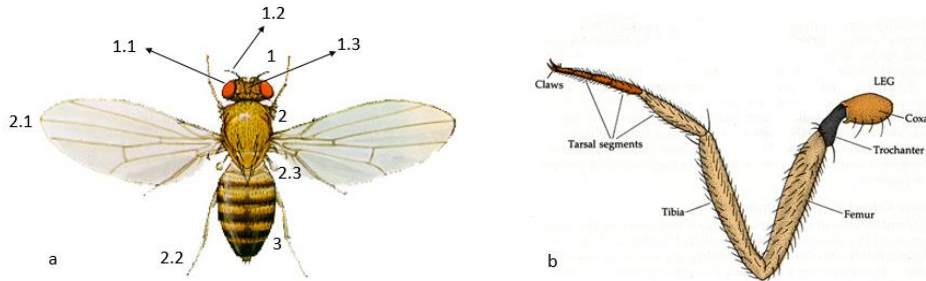


Figura 6: Morfologia externa de *Drosophila melanogaster*: a) organização externa do corpo: 1-cabeça, 1.1 olhos, 1.2 antena, 1.3 omatídios sensoriais; 2-tórax, 2.1 asa, 2.2 patas, 2.3 alter; 3- abdômen; b) esquema de uma pata de *Drosophila* com os seis diferentes segmentos [18].

2 Tecidos e órgãos

2.1 Discos imaginais

A transição de larva à forma do corpo adulto é mediada por sacos de células epiteliais especializadas, denominados discos imaginais, que se desenvolvem a partir de precursores especificados, durante o desenvolvimento embrionário [9].

Os discos imaginais são populações de células que crescem de forma autónoma, suspensas na cavidade corporal das larvas unidas à hipoderme por uma haste [19]. Formam um epitélio de uma camada única de células, que surge como um dobramento da ectoderme embrionária [20]. Cada disco imaginal desenvolve-se a partir de invaginações do epitélio embrionário e é constituído por um grupo de 10-50 células estaminais indiferenciadas. Durante o desenvolvimento larval, vão-se submeter a um enorme crescimento e proliferação, chegando a apresentar 100.000 células no final da terceira fase larval [8]. Por exemplo, os discos imaginais das asas, no início do terceiro estágio larval, contêm cerca de 30 células, atingindo na metamorfose, 4 dias mais tarde, cerca de 50.000 células [5, 21]. Após um aumento exponencial no número de células durante os três estágios larvais, os discos cessam a sua divisão celular e invaginam [20]. Assim, os discos imaginais começam a se diferenciar no final do terceiro estágio larval e completam o processo no final da pupação [8]. A camada de células que os constituem transformar-se-ão em estruturas adultas reconhecíveis (cabeça, tórax, asas e pernas,) por uma série de mudanças morfogénicas, que incluem alongamento/forma e eversão dos discos individuais (chamado de evaginação), seguido de espalhamento e fusão de discos vizinhos [9]. Existem pares de discos imaginais para cada conjunto de apêndices, como as patas, as asas, os halters, as antenas e o sistema genital (figura 7).

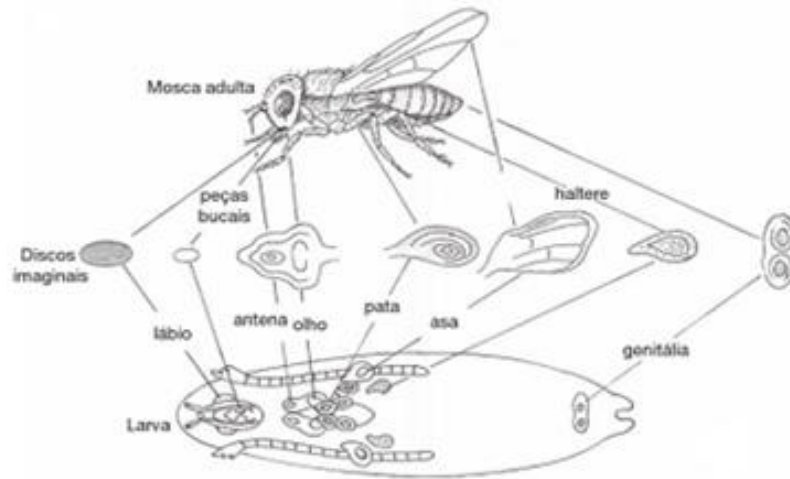


Figura 7: Metamorfose: os discos imaginais (agrupamentos de células embrionárias), presentes na fase larval diferenciam-se na fase de pupa, originando as estruturas adultas. As linhas ligam os discos imaginais na larva com as estruturas correspondentes no adulto [7].

2.2 Glândulas salivares

O principal papel das glândulas salivares durante o 3.^o estágio larval é sintetizar polipéptidos, conhecidos como proteínas de cola, que a larva utiliza para se fixar a uma superfície para dar início à fase de pupação e metamorfose. Quando o animal entra na pupação, as glândulas salivares vão entrar em morte celular programada (apoptose), que destrói as glândulas de modo a permitir que os órgãos do adulto se desenvolvam. Estes eventos são cuidadosamente coordenados por genes que são expressos de forma hierárquica, em resposta às mudanças temporais na concentração da hormona ecdisona [22, 23]. Estas glândulas são os maiores órgãos secretores no embrião e na larva de *Drosophila* [24].

É nas glândulas salivares que os cromossomas politénicos são formados, durante a fase embrionária [25]. Quando estes cromossomas são observados no microscópio de luz, são visíveis bandas escuras distintas alternadas com interbandas mais claras [25]. O padrão de bandas e interbandas em cada cromossoma politénico é específico para a espécie, e em geral é característico de um cromossoma em particular, em diferentes tecidos ou em diferentes fases do desenvolvimento [26]. Estas bandas fornecem marcos visíveis que podem ser usados para identificar a localização de um gene específico no cromossoma ou os locais de rearranjos cromossômicos. De acordo com diferentes estimativas, existem 3.500-5.000 bandas e interbandas nos cromossomas politénicos de *D. melanogaster* [27].

2.3 Corpo gordo (Fat body)

O corpo gordo é um órgão relativamente grande distribuído por todo o corpo do inseto. Geralmente, o órgão está disposto em lobos finos que são banhadas pela

hemolinfa. O corpo gordo nos insetos é um análogo do fígado e tecido adiposo nos vertebrados, e funciona como um dos principais órgãos de armazenamento de nutrientes e do metabolismo energético. Para além disso, é um órgão de grande atividade metabólica e biossintética. Uma dessas funções é a de armazenar e libertar energia, em resposta às exigências energéticas. Os insetos armazenam reservas de energia sob a forma de glicogénio e triglicéridos nos adipócitos, a principal célula do corpo gordo. O metabolismo lipídico é essencial para o crescimento e reprodução, fornecendo a energia necessária durante os períodos prolongados de não alimentação (durante a metamorfose e nas primeiras horas de adulto). As células do corpo gordo, não só controlam a síntese e utilização de reservas de energia, como também sintetizam a maior parte das proteínas e metabolitos em circulação da hemolinfa [28]. Para além do seu papel relacionado com o armazenamento e utilização de nutrientes, o corpo gordo é um órgão endócrino, produz vários péptidos antimicrobianos e participa na desintoxicação do metabolismo do azoto [28]. Semelhante ao que acontece com outros órgãos larvais, o corpo gordo sofre um processo de “remodelação” durante o período da metamorfose dos insetos [29]. O corpo gordo larval de *D. melanogaster* é uma monocamada de células grandes rodeadas por uma fina membrana basal. As suas células não sofrem divisão celular, mas crescem em tamanho durante os estágios larvais. Durante este tempo, mantém-se como uma folha contínua que se estende desde o primeiro segmento torácico até ao segundo segmento posterior. Este tecido pode ser reconhecido pelo arranjo morfológico característico dos grupos de células e pela sua posição com os outros órgãos. Na fase de pupa, as células desta estrutura organizada separam-se e dispersam como células individuais na hemolinfa, sobrevivendo durante a metamorfose mas desaparecendo no jovem adulto [30].

2.4 Sistema digestivo

O intestino de *Drosophila* consiste num epitélio simples, cercado por músculos viscerais, nervos e traqueias. É subdividido em intestino anterior, intestino médio e intestino grosso (figura 8). O aparelho digestivo desempenha um papel central na digestão e absorção de nutrientes. Do mesmo modo, fornece a primeira linha de defesa contra patogénicos e mantém a homeostasia energética através da troca de sinais neuronais e endócrinos com os outros órgãos. Como nos outros insetos holometabólicos, o intestino adulto de *Drosophila* é gerado de novo durante a metamorfose. Na verdade, três tecidos gastrointestinais distintos substituem-se uns aos outros durante o desenvolvimento: o intestino das larvas (decorrente do intestino embrionário), o intestino de pupa transiente e o intestino do adulto. Após a metamorfose, tanto o intestino médio da larva e da pupa são degenerados para formar o mecónio, que será expelido após a eclosão. Está provado que o intestino de *Drosophila* é um bom modelo para estudar as interações entre o *stress*, a reparação e as respostas imunológicas [31].

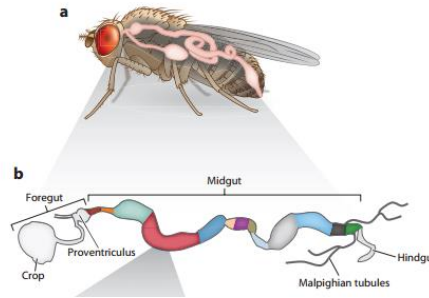


Figura 8: Organização esquemática do aparelho digestivo *Drosophila*; (a) aparelho digestivo dentro da cavidade do corpo do adulto; b) o aparelho digestivo está dividido em três partes distintas, intestino anterior (foregut), intestino médio (midgut) e intestino grosso (hindgut) [31].

2.5 Túbulos de malpighianos

A *Drosophila* possui dois pares de túbulos de Malpighi; dois do lado direito, com o seu ponto de inserção dentro do intestino grosso na extremidade anterior do abdómen, e dois do lado esquerdo. Os túbulos estendem-se para trás de modo que as suas pontas juntam-se na parte posterior do intestino grosso. Cada par de túbulos une-se para formar um ureter comum, que entra no intestino entre o intestino médio e o intestino grosso [32]. Os túbulos de Malpighi nos insetos executam as funções básicas do rim, como a excreção, a osmorregulação e o transporte de nefrócitos, um tipo de células excretoras presentes na cavidade do corpo, que são cruciais para o indivíduo lidar com o stress metabólico e com a desintoxicação [33]. A secreção pelos túbulos está sob controlo hormonal [34]. Os túbulos de Malpighi em *D. melanogaster* também são conhecidos por serem fontes de dois precursores do pigmento castanho envolvidos no sistema responsável pela cor dos olhos [35].

2.6 Sistema traqueal

O sistema traqueal (respiratório) de *D. melanogaster* é uma rede ramificada de tubos epiteliais, ramificados por todo o corpo, que transporta o oxigénio para todos os tecidos. O oxigénio entra nesta rede de tubos epiteliais através dos aspiráculos e difunde-se ao longo dos principais ramos até atingir os ramos terminais mais finos (traquéolas) [36]. As traqueias terminam com ampliações chamadas sacos de ar, através dos quais ocorrem as trocas gasosas. O aspeto mais característico do sistema traqueal larval são as duas grandes traqueias longitudinais, que se estendem dos aspiráculos anteriores aos posteriores (figura 9). Em cada muda, os aspiráculos são remodelados. Estas estruturas não estão presentes nas larvas de 1.º estágio, e ainda estão fechadas no 2.º estágio larval. A maior parte do oxigénio nestas fases entra via aspiráculos posteriores. No 3.º estágio larval, os aspiráculos anteriores estão completamente abertos e a rede de traqueias é cada vez mais complexa. O sistema traqueal da larva é gradualmente destruído durante a pupação e o sistema respiratório do adulto vai-se formando gradualmente [5].

Na pupação, a traqueia anterior desconexa dos aspiráculos larvais e são formados uns novos aspiráculos. Os aspiráculos formam a única entrada gasosa da pupa.

Os adultos têm aspiráculos laterais (dois por cada segmento).

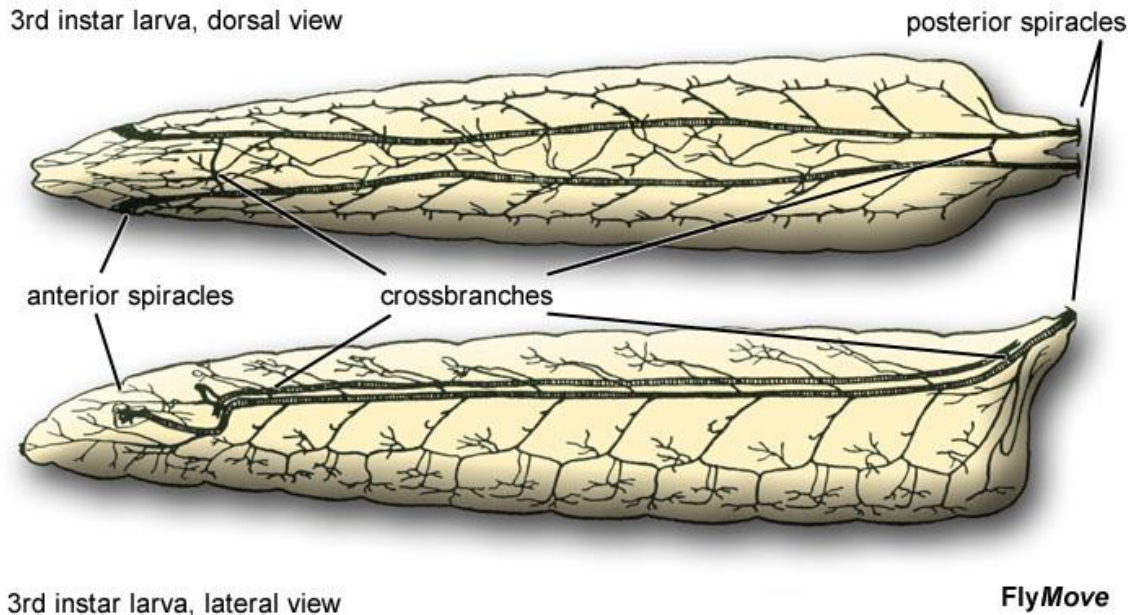


Figura 9: Esquema do sistema traqueal da larva de 3.º estágio.

3 Fisiologia

3.1 Sistema hormonal

Em *Drosophila*, a principal hormona do desenvolvimento é a hormona esteróide 20-hidroxiecdisona, vulgarmente conhecida como ecdisona.

Ecdisona é uma hormona esteróide, semelhante aos estrogénios e androgénios dos mamíferos, que em *Drosophila* é segregada a partir da glândula protorácica (PG) e que desempenha um papel importante na regulação do desenvolvimento dos discos imaginais [14, 37]. A concentração de ecdiesteróides aumenta antes de cada muda larval e é necessária para desencadear as transições inerentes ao desenvolvimento [38]. A libertação de ecdisona é controlada por uma combinação complexa de fatores, incluindo hormonas peptídicas e sinais de neuro-peptídeos. Por exemplo, a hormona protorácica (PTTH) é um neuro peptídico necessário para regular a síntese e libertação de ecdisona da PG [8, 14]. Pulsos de ecdisona são necessários para todos os aspetos da morfogénese, começando com a formação do plano do corpo durante a embriogénese. Mais tarde é necessária para o desenvolvimento das larvas de primeiro estágio e para a ecdysis dos primeiro e segundo estádios larvais [8, 14]. Um grande pulso de ecdisona é libertado no final do terceiro instar para a preparação da fase de pupa, que marca o início da metamorfose dos tecidos adultos [8, 14, 37]. Também é essencial para a regulação dos genes envolvidos no controlo da apoptose e da diferenciação, processos essenciais para a remoção das estruturas das larvas que se tornaram desnecessárias e

para a remodelação do tecido [8, 14, 37]. Além disso, a ecdisona regula o crescimento e divisão celular em muitos tecidos larvais na transição para a fase de pupa.

Durante a metamorfose, uma cascata de transcrição de genes é desencadeada por ecdisona [14]. Alguns estudos demonstraram que os ativadores de apoptose são regulados positivamente nos tecidos do terceiro estágio larval, incluindo as glândulas salivares e o intestino médio, em resposta à ecdisona [14]. Cerca de 12 horas após a formação do pupário, outro grande pulso de ecdisona inicia a transição de pré-pupa para pupa e forma o plano corporal básico da mosca adulta. A ecdisona desencadeia a eversão e o alongamento dos discos imaginais, que é realizado por meio de alterações na forma das células, em vez de divisão celular adicional [8, 15]. Este impulso faz a eversão da cabeça na extremidade anterior do pupário e o final do crescimento das pernas e das asas [8, 15]. À medida que os novos apêndices emergem dos discos imaginais, os tecidos das larvas sofrem morte celular programada e, eventualmente, são substituídos pelas estruturas adultas [8, 15]. Durante esta fase, a ecdisona regula a progressão e o crescimento do ciclo celular necessário para o crescimento dos tecidos de modo a que o inseto atinja o tamanho correto de corpo adulto.

Como a divisão celular e a padronização em *Drosophila* estão intimamente ligados aos tecidos imaginais, o processo de metamorfose controlado por ecdisona envolve a coordenação dos sinais de desenvolvimento que regulam a proliferação e diferenciação [14, 37]. A concentração de ecdisteróides diminui no final do desenvolvimento das pupas e é relativamente baixa quando a mosca adulta emerge do pupário [39] (figura 10).

Estas alterações induzidas por ecdisona na expressão gênica podem ser visualizadas na glândula salivar da larva de terceiro instar como uma cascata de três conjuntos de alterações denominadas de “puffs”, temporalmente distintos nos cromossomas politênicos [37].

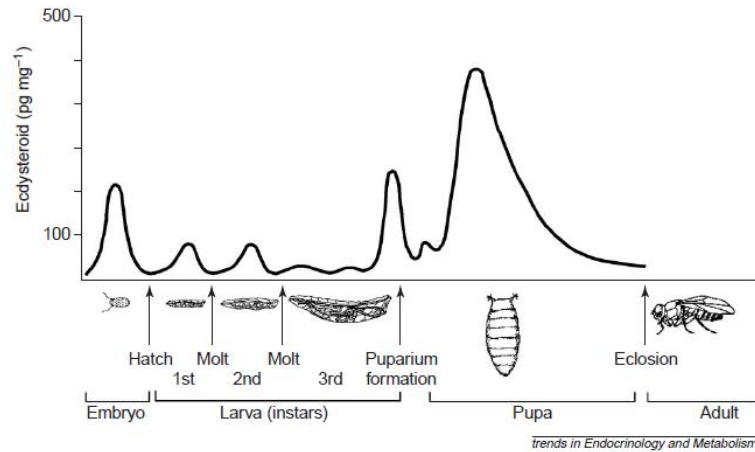


Figura 10: Variação das concentrações de ecdisteróides durante o desenvolvimento de *Drosophila*. Os estágios de desenvolvimento de *Drosophila* estão representados com setas que assinalam as grandes transições no desenvolvimento.

3.2 Sistema imunitário

Todos os organismos multicelulares são continuamente expostos a microrganismos e, portanto, evoluíram com um mecanismo de defesa eficaz, o sistema imunitário. A resposta imune dos mamíferos é constituída por duas grandes componentes: o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adaptativo. Os insetos também têm uma resposta imune muito eficaz que, até recentemente, pensava-se ser uma resposta inata. Evidências recentes apontam no sentido de que os insetos também podem ter uma forma primitiva de imunidade adaptativa [40].

Os insetos são extremamente resistentes à infecção, graças a uma defesa imunitária eficiente que compartilha uma série de características com a imunidade inata dos mamíferos. Existem duas principais respostas do sistema imunológico inato: a resposta humoral e a resposta celular. Por exemplo a *D. melanogaster* usa barreiras mecânicas (como a cutícula e células epiteliais muito juntas) para diminuir a entrada de patogênicos ambientais. Para além disso, é rapidamente acionado um sistema de defesa através da secreção de uma bateria de moléculas peptídicas com ação anti microbial, como o dipterocin e espécies reativas de oxigénio, assim como a ativação da enzima fenol oxidase, que promove a produção de componentes reativos e de melanina. Estas substâncias são lançadas na hemolinfa, promovendo a fagocitose e a encapsulação de objetos estranhos pelas células do sangue (hemócitos), de modo a neutralizar intrusos e a manter o equilíbrio interno (homeostasia) [41]. As duas grandes vias de sinalização que controlam este processo são chamadas de vias TOLL (um recetor transmembranar e membro de um grupo de 12 genes dorsais, responsáveis pela polaridade dorsoventral da mosca e envolvido na defesa imunitária) e do gene da *imunodeficiência (Imd)* [42].

Em *Drosophila*, a imunidade inata de defesa é baseada em três aspetos:

1.º) A indução rápida de cascatas proteolíticas, que resultam em coagulação que se faz sentir na produção de moléculas de sinalização e cascatas de fenol oxidase que

induzem a melanização ou massas melanóticas (tumores e pseudo tumores melanóticos) [40]. A reação de melanização é uma resposta imune importante e envolve a síntese rápida de um pigmento preto, a melanina, no local da infecção e/ou da lesão. A melanização requer a ativação da enzima fenoloxidase (PO), uma enzima que catalisa a oxidação dos fenóis a quinonas, que posteriormente são polimerizados em melanina. A PO é normalmente sintetizada como uma forma inativa chamada de profenoloxidase (PPO), a qual é clivada para gerar PO ativa, como resultado da ativação da cascata proteolítica [43].

2.º) Uma resposta humoral desencadeada pelo corpo gordo, um tecido abundante no inseto, equivalente ao fígado nos mamíferos, que produz uma mistura de peptídeos antimicrobianos que são lançados para a circulação (hemolinfa) [44, 45]. A *Drosophila* responde à infecção através da produção de uma ampla variedade de agentes antimicrobianos no corpo gordo e também através de respostas mais restritas em tecidos como o intestino, a traqueia e os túbulos de Malpighi [44, 45].

3.º) Uma resposta celular incluindo a fagocitose, a formação de nódulos e a encapsulação de agentes patogénicos [40]. O sangue de *Drosophila* também pode ser chamado de hemolinfa, que circula por um sistema aberto. A resposta celular consiste na circulação de células de vigilância imunológica (hemócitos) na hemolinfa. Estes hemócitos desempenham um papel-chave na vigilância imunológica e são ativos contra patogénicos e parasitas [40]. Durante o desenvolvimento larval, a hematopoiese (processo de renovação celular do sangue por processos mitóticos) ocorre nas glândulas linfáticas, que servem como reservatório de hemócitos [46]. Quando um organismo invasor é detetado, os hemócitos circulantes devem removê-lo, seja por fagocitose e/ou encapsulação/melanização [45]. Quanto à morfologia dos hemócitos, podem ser identificados três tipos básicos de células: plasmócitos, lamelócitos e células cristal. As células mais abundantes são os plasmatócitos, que se assemelham a monócito/macrófago nos mamíferos, que são pequenas células arredondadas envolvidas na fagocitose, no encapsulamento e na produção de peptídeos antimicrobianos. Os lamelócitos são grandes células planas menos abundantes e raras em larvas saudáveis. Estas células estão envolvidas no encapsulamento de patogénicos invasores demasiado grandes para sofrer fagocitose. Também são referenciadas como intervenientes na formação dos tumores melanóticos [45]. As células cristal, que são apenas 5 a 10% da população das células sanguíneas, são caracterizadas por inclusões cristalinas no citoplasma, e contêm substratos e enzimas necessárias para a ativação da cascata da fenol-oxidase, estando envolvidas na melanização de organismos invasores e na cicatrização de feridas [45, 47].

Capítulo II

4 Conceitos básicos sobre plasma

4.1 Introdução

Em Física o termo plasma refere-se a um meio parcialmente ionizado, geralmente gás. O plasma não só produz elétrons e vários íons, mas também átomos neutros (sem carga), moléculas, tais como os radicais livres e átomos eletronicamente excitados, com alta reatividade química e capacidade para emitir raios UV [48]. A sua interação com a célula leva ao surgimento de espécies reativas, sendo as mais importantes o ozono (O_3), o hidroxilo ($OH\bullet$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o singlete de oxigénio (1O_2), o óxido nítrico (NO), o superóxido ($O\bullet_{-2}$) e outros íons positivos, que quando em interação com as células iniciam processos de peroxidação semelhantes aos que ocorrem com a radiação ionizante [48].

São estas espécies químicas geradas pelo plasma que merecem especial atenção para os tratamentos médicos. O plasma nos cuidados de saúde é um campo emergente que tem as suas raízes na ciência de plasmas. Este tipo de investigação tem-se desenvolvido rapidamente e é agora objeto de um amplo esforço de pesquisa interdisciplinar, envolvendo a medicina, a biologia, a física, a química e a engenharia [49].

Os plasmas são usados há vários anos na esterilização de material médico, de embalagens para a indústria alimentar, de implantes, na coagulação sanguínea, entre outras aplicações. Nos últimos anos foram desenvolvidos plasmas não térmicos à pressão atmosférica que proporcionará novas abordagens de tratamentos em tecidos vivos, abrindo assim novos horizontes à ciência [49].

A temperatura e os componentes do gás, assim como a força e duração do impulso do campo elétrico, determinam a exata composição do plasma. Em sistemas artificiais, o plasma é geralmente gerado por descargas elétricas e é classificado de acordo com a temperatura do gás em plasmas térmicos e plasmas não térmicos [48].

4.2 Plasmas térmicos

Nos plasmas térmicos, a temperatura do gás pode chegar a vários milhares de graus Kelvin. Dispositivos como o plasma de argônio de coagulação, que é usado clinicamente para cauterizar tecidos vivos, normalmente geram plasmas a temperaturas muito superiores à temperatura ambiente. Os efeitos destes plasmas térmicos sobre os tecidos são não seletivos e difíceis de controlar devido a transferência de calor intenso [48]. É claro que os plasmas podem ter não só efeitos físicos – como queimar o tecido –, mas também efeitos terapêuticos clinicamente relevantes que podem desencadear uma sequência complexa de respostas biológicas em tecidos e células, como o que se observa com a aplicação de plasmas não térmicos [48, 49].

4.3 Plasmas não térmicos

Em contrapartida, nos plasmas não térmicos o gás pode ser mantido perto da temperatura ambiente. O plasma não térmico é seletivo no tratamento desde que não se exceda um certo nível de dose, permitindo novas aplicações, incluindo a esterilização de tecidos vivos sem danos, a cicatrização de feridas, a indução de apoptose seletiva nos tecidos malignos e a modulação da adesão celular, entre outros [50, 51].

Dispositivos de plasma não térmico, nomeadamente de descarga de barreira dielétrica, são usados extensivamente na medicina. Este tipo de plasma é produzido no ar à pressão atmosférica, quando pulsos curtos de alta tensão são aplicados entre dois eletrodos, com os eletrodos isolados por material dielétrico. As características deste plasma variam em função da tensão aplicada, do material dielétrico e da distância entre os eletrodos [52].

4.4 Aplicações

A aplicação do plasma expõe a superfície das células ou dos tecidos a moléculas e átomos ativos como o ozono (O_3), óxido nítrico (NO), radicais OH e singletos de oxigénio, assim como a um fluxo significativo de partículas carregadas, incluindo eletrões e iões positivos e negativos, como os radicais superóxido ($O\bullet_{-2}$) [48].

Recentemente, foi demonstrado que o plasma não-térmico à pressão atmosférica pode ser aplicado diretamente nas células e tecidos vivos [53], matando as bactérias e induzindo a coagulação do sangue sem aquecimento significativo [53, 54]. Tem sido observado que o tratamento com plasma não-térmico promove a proliferação celular [53], aumenta a transfeção das células [55] e, possivelmente, aumenta a cicatrização de feridas [56]. Esta nova tecnologia tem aplicações médicas, tais como a coagulação do sangue [57, 58], a cura de feridas [56], a esterilização de tecidos [53], a esterilização de alguns equipamentos médicos, o tratamento da cavidade dental [59, 60], a apoptose de células malignas [61, 62], sendo ainda utilizada na engenharia de tecidos [63]. Para além destas aplicações, Birte Ahlfeld et al, no seu artigo publicado em janeiro de 2015, sugere que o plasma não térmico à pressão atmosférica pode ser usado para inativar o vírus NoV (norovirus Humano), responsável pela gastroenterite aguda não bacteriológica em tudo o mundo [64].

4.5 Efeito da aplicação do plasma não térmico nos sistemas vivos

Os efeitos da aplicação deste tipo de plasma a nível celular dependem da dose aplicada [65] (figura 10). É evidente que o mecanismo da interação do plasma com os sistemas vivos é complexo, em parte devido à complexidade do plasma mas principalmente devido à enorme complexidade da biologia.

Podemos considerar três paradigmas distintos para interação do plasma: com as bactérias, com as células de mamíferos e com tecidos. Em todos os três casos, os

mecanismos podem revelar-se significativamente diferentes. Não podemos esquecer que a complexidade é acrescida pela presença de líquido ou com a adsorção de água [65]. A interação do plasma não térmico com os sistemas vivos pode ser observada no esquema da figura 11.

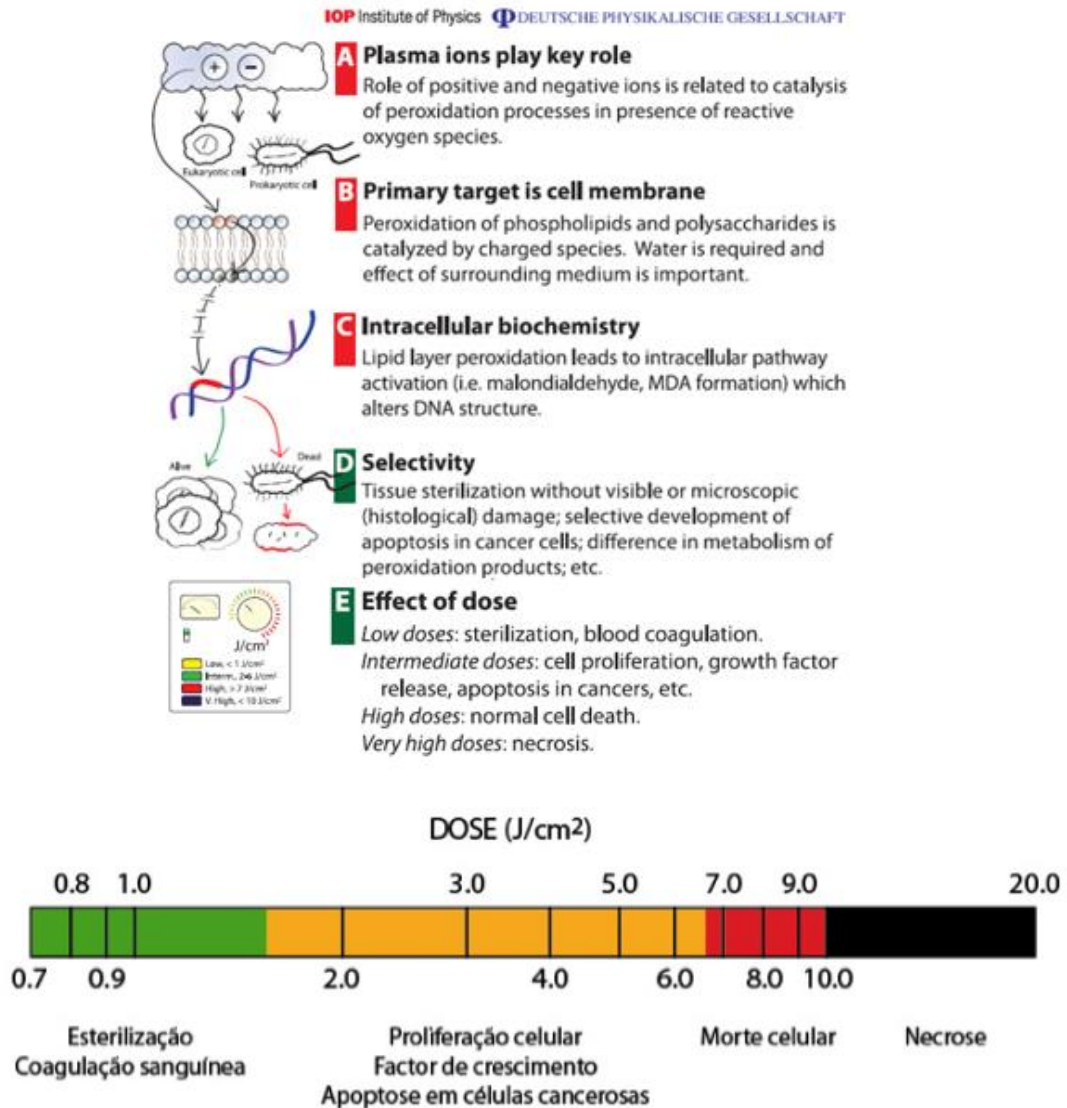


Figura 11: A interação do plasma não térmico com os sistemas vivos. Resumo das principais conclusões sobre a interação do plasma não térmico com os organismos biológicos. Efeito das espécies radiculares na peroxidação das membranas, a alteração dos processos bioquímicos intracelulares, a seletividade e o efeito dose [65].

4.6 Interação do plasma não térmico com os sistemas biológicos

Quando as espécies químicas produzidas pelo plasma entram em contato direto com o alvo do tratamento, desempenham um papel fundamental nos mecanismos biológicos através da iniciação de catálise e de processos de peroxidação. Quando é feita uma aplicação direta de plasma não térmico, o principal alvo é a membrana da célula. É nos fosfolipídios (eucariontes) ou polissacarídeos (procariontes) que se têm

observado os efeitos iniciais. Após o “ataque” da membrana celular, tem sido observado a ativação de vias bioquímicas complexas, como por exemplo a formação de malondialdeído (MDA), que participa na formação de ductos de ADN [65].

O plasma não térmico à pressão atmosférica (PNTPA) utilizado neste trabalho é gerado a partir de uma descarga de barreira dielétrica que ocorre ao ar livre. As condições da descarga são as seguintes: dois elétrodos paralelos são cobertos por um material dielétrico (e.g. vidro, mica, silicato de alumínio). É aplicada uma diferença de potencial entre os elétrodos de cerca de 15 kV durante um intervalo de tempo de 180 μ s. Este impulso é repetido cada 1 ms. O campo elétrico resultante da aplicação da diferença de potencial faz com que os eletrões e iões presentes no ar se desloquem em sentido contrário (os eletrões são acelerados para o ânodo e os iões para o cátodo). Como a massa dos eletrões é muito menor que a dos iões, os eletrões deslocam-se muito mais rapidamente que os iões. Ou seja, a temperatura dos eletrões é muito maior que a dos iões. O movimento organizado destas partículas carregadas é o responsável pela geração de espécies reativas no ar. Segundo Leduc et al [66], no espectro de emissão, o NO aparece entre os 200 e 288,5 nm, o OH aos 300 nm e as bandas entre os 300 e 400 nm correspondem ao N₂ e ao O₂. O espectro de emissão correspondente ao PNTPA usado na exposição está representado na figura 12.

Num PNTPA, a probabilidade dos eletrões colidirem com as moléculas do ar nestas condições é muito pequena. Isso implica que a energia transferida dos eletrões para as moléculas do gás é muito pequena e que as espécies reativas geradas não têm energia suficiente para alterar de forma significativa a temperatura do alvo. O plasma é por isso seguro e permite que tecidos vivos sejam expostos diretamente sem sofrer danos relacionados com o aquecimento.

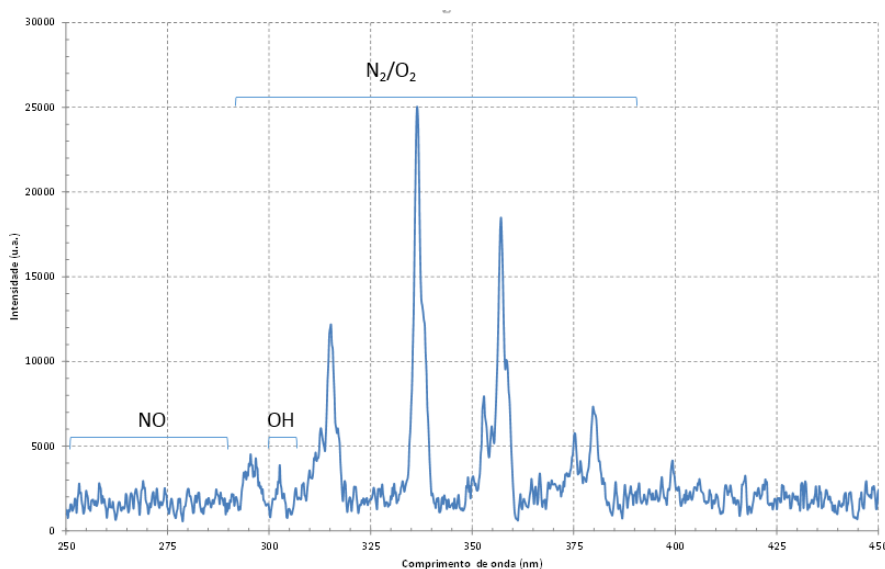


Figura 12: Espectro de emissão do PNTPA (250-450 nm).

4.7 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo determinar os efeitos da aplicação de plasma não térmico no desenvolvimento e morfologia de *D. melanogaster*.

Todas as observações são feitas a nível do fenótipo nos diferentes estádios de desenvolvimento: larva, pupa e adultos.

O trabalho foi dividido em diferentes etapas, nomeadamente:

- Preparação das linhas de *D. melanogaster*.
- Exposição das larvas de diferentes linhas a diferentes tempos de plasma (otimização do tempo de exposição).
 - Observação e registo das alterações morfológicas visíveis nas larvas.
 - Observação e registo das alterações morfológicas observáveis na pupa (fenótipos).
 - Observação e registo das alterações morfológicas detetáveis no adulto (fenótipos).
- Observação dos ovários e dos testículos de modo para estimar a fertilidade dos machos e das fêmeas.

Capítulo III

5 Parte experimental

Este trabalho dividiu-se em três fases. A primeira fase consistiu na obtenção de diferentes linhas de *D. melanogaster*. Na segunda fase do trabalho testou-se diferentes tempos de exposição das moscas a plasma não térmico, de modo a averiguar qual o tempo de exposição mínima e máximo mais adequado de modo a alcançar os objetivos propostos. Na terceira fase as larvas foram expostas aos tempos mínimos e máximos estabelecidos anteriormente, tendo procedido ao registo de todas as alterações comportamentais e morfológicas observáveis nas lavas após a exposição. Foram seguidas todas as pupas e adultos resultantes das larvas sobreviventes à exposição.

5.1 Linhas de *Drosophila melanogaster*

5.1.1 Linhas selvagens

Começou-se por recolher as moscas no Campus Universitário da Penteada em três momentos diferentes. Posteriormente, estas moscas foram separadas de modo a formar diferentes linhas de *D. melanogaster* (linha “isofemale”). As fêmeas foram mantidas individualmente em frascos contendo meio de alimentação preparado com agar 1,2g/100ml (Agar agar, V. Reis, Limitada), açúcar 12,5g/100ml, fermento 0,85g/100ml, milho 9g/100ml e nipagin M 0,4g/100ml (éster metílico do ácido p-hidroxibenzóico, NIPA, José M. Vaz Pereira, Lda) dissolvidas em água.

Os filhos produzidos (geração F₁) foram separados 8-10 horas após a eclosão colocados em frascos aos pares (cruzados entre si) de modo a formar diferentes linhas de *Drosophila*. As diferentes linhas foram identificadas como linha 1, linha 2, etc. Este procedimento foi repetido durante 5 gerações, de modo a obter uma linha pura (para que todos os indivíduos sejam em princípio geneticamente idênticos). As linhas foram transferidas para frascos contendo um meio novo a cada 2-3 semanas, de modo a ter sempre larvas frescas para a exposição do plasma. Todos os frascos foram guardados na estufa a 22° C. A linha 10 foi escolhida entre as linhas estabelecidas para prosseguir com a experiência.

5.1.2 Linha laboratorial

Para confirmar os resultados observados, o trabalho de exposição de larvas ao plasma foi repetido, usando uma linha laboratorial. A linha usada foi de *D. melanogaster* (laboratori Fabra), cedida pela Universidade de Barcelona/Departamento de Genética. As moscas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Esta linha foi designada de linha Barcelona.

5.2 Equipamento experimental para aplicação do plasma

O plasma não térmico à pressão atmosférica foi produzido por um equipamento desenhado e montado para esse efeito, apresentado na figura 13. Para uma aplicação de 10 segundos, o plasma gerado tinha uma amplitude máxima de 4 w e a dose foi de 8 J/cm². Este equipamento é constituído por duas partes:

- Um gerador de alta tensão.
- Um dispositivo de descarga de barreira dielétrica.

A injeção de corrente elétrica no enrolamento primário de um transformador produz sinais de alta tensão. O dispositivo de descarga dielétrica é constituído por 2 elétrodos de cobre e duas placas de mica. Um gerador de alta tensão alimenta a descarga que ocorre no espaço entre os dielétricos. A informação anteriormente descrita foi gentilmente cedida pelo professor Doutor Gabriel Lira.

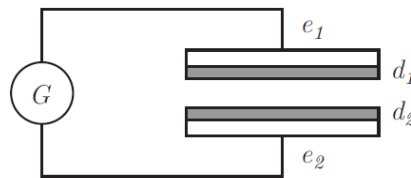


Figura 13: Esquema do dispositivo de descarga dielétrica: G-gerador de alta tensão, e₁ e e₂-elétrodos de cobre, d₁ e d₂-placas de mica.

5.3 Preparação das larvas para exposição

Foram retiradas dos frascos pequenas porções de meio que continham as larvas, que foram colocadas em caixas de *Petri*. As larvas foram inicialmente separadas com uma agulha com ponta de metal. Posteriormente, utilizou-se um pincel para evitar magoá-las e desta forma estar a influenciar os resultados. Foram colocadas em caixas de *Petri*, contendo papel de filtro humedecido com água. Imediatamente após a separação foram transportadas em caixas para o laboratório de exposição.

5.4 Aplicação do plasma

No laboratório de exposição as larvas foram separadas em grupos de 10 indivíduos e colocadas num caixa própria, construída para a exposição do plasma. Após cada exposição, as larvas foram retiradas com um pincel e colocadas novamente em caixas de *Petri* forradas com papel de filtro humedecido com água e transportadas para o laboratório de trabalho.

5.5 Separação das larvas para caixas de crescimento

Imediatamente após à exposição, as larvas foram separadas por estágio de desenvolvimento.

Os critérios para a separação dos diferentes estádios de desenvolvimento foram: as diferenças do tamanho do aparato bucal (que é mais pequeno nas larvas de 1.º estádio), os espiráculos anteriores (uma vez que nas larvas de 3.º estádio estes estão abertos tipo dedos de uma mão, enquanto nas larvas de 2.º estádio estão fechados), assim como os espiráculos posteriores, que nas larvas de 3.º estádio apresentam um anel cor de laranja.

Uma vez separadas, as larvas foram colocadas em grupos de 10 larvas em caixas de *Petri* de 50 mm contendo meio de alimentação. As caixas foram colocadas na incubadora a 23° C e observadas a cada 24 horas.

5.6 Observação após exposição

As larvas foram observadas diariamente desde a fase larval até à fase adulta. As larvas com anomalias encontradas em cada observação foram separadas individualmente para novas caixas. Todas as caixas foram seguidas diariamente e todas as alterações foram registadas. Para o efeito foi utilizado uma lupa Wild M3B. As larvas mortas foram separadas e feitas preparações definitivas com as que apresentaram anomalias para observação posterior. As fêmeas com ovários desenvolvidos e com ovos e os machos com testículos normais e presença de espermatozóides serão considerados férteis.

As lâminas foram observadas e analisadas recorrendo a um microscópio óptico SWIFF M4000-D. Foram tiradas fotografias diárias dos resultados obtidos. As fotos foram tiradas com uma câmara digital Sony SteadyShot DSC-W320, 14,1 Mega Pixels.

5.7 Testes estatísticos

Os dados foram tratados com o teste estatístico qui quadrado. Este teste foi usado para avaliar se as diferenças entre os grupos expostos e o controlo foram ou não significativas. Posteriormente foi feita a correção de Bonferroni. Esta correção permite verificar quais os resultados que são verdadeiramente significativos.

6 Resultados

Este tipo de trabalho é inovador, pelo que não estão ainda disponíveis protocolos de aplicação de plasma em *Drosophila*, assim como informações bibliográficas que permitissem delinear uma estratégia de trabalho. Por este motivo foram feitos vários ensaios experimentais com o objetivo de encontrar o melhor protocolo possível, que permitisse atingir os objetivos propostos inicialmente.

Para tentar elucidar os efeitos da exposição do PNTPA no desenvolvimento e morfologia de *D. melanogaster*, usamos uma abordagem física, expondo as larvas da mosca a diferentes tempos de exposição. Após analisar os resultados obtidos com os primeiros tempos, verificou-se que estes não foram suficientes para influenciar o desenvolvimento, visto não terem sido observadas alterações significativas. Por este

motivo, decidiu-se aumentar os tempos de exposição para 60, 70, 100 e 120 segundos separadas em grupos de 10 larvas, mas por estádios de desenvolvimento. Posteriormente as larvas foram observadas durante 30 dias só com a lupa.

Primeiro são apresentados os resultados das contagens das larvas mortas e sobreviventes, referindo o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas nas mortas e nas vivas. O mesmo critério é aplicado para as pupas. Também são apresentados os resultados das contagens dos adultos com e sem anomalias morfológicas.

Seguidamente são apresentados os resultados das observações diárias com a lupa das larvas, pupas e adultos e os resultados microscópicos das observações das preparações definitivas das larvas.

6.1 Otimização do tempo de exposição

Testou-se 197 larvas das diferentes linhas de *D. melanogaster* obtidas na 1.^a fase do trabalho. Começou-se com tempos relativamente baixos (30 segundos) que foram aumentando progressivamente, de acordo com os resultados que iam sendo observados.

6.1.1 Controlo

Seguiram-se 95 larvas de controlo e verificou-se que destas, 4 (4%) morreram durante o seu desenvolvimento. Nenhuma das larvas mortas apresentavam alterações visíveis. Toadas as larvas desenvolveram-se normalmente e formaram adultos sem anomalias morfológicas visíveis.

6.1.2 Larvas expostas a 30, 40 e 50 segundos de plasma sem separação por estádio de desenvolvimento

No ensaio de 30 segundos, foram expostas 61 larvas. Destas, 4 ($\pm 7\%$) morreram. As 57 larvas ($\pm 93\%$) que sobreviveram fizeram pupa, que eclodiram em adultos.

Contaram-se 57 adultos, dos quais 4 indivíduos ($\pm 7\%$) apresentaram massas melanóticas/melanismo no abdómen e anomalias na pigmentação das patas. Como não foram detetadas anomalias no desenvolvimento das larvas, o tempo de exposição foi aumentado para 40 segundos.

Na exposição de 40 segundos foram testadas 33 larvas, das quais 7 ($\pm 21\%$) acabaram por morrer. As 26 larvas ($\pm 79\%$) que sobreviveram tornaram-se adultos sem qualquer anomalia.

Este tempo de exposição também não revelou ter uma grande influência na viabilidade e no desenvolvimento larval e como tal o tempo voltou a ser aumentado para os 50 segundos.

Com o tempo de 50 segundos, verificou-se que das 53 larvas expostas, 8 ($\pm 15\%$) acabaram por morrer. Das 45 larvas ($\pm 85\%$) que sobreviveram, 5 desenvolveram melanismos/massas melanóticas. Todas as larvas formaram pupas.

Das 45 pupas formadas, 3 ($\pm 7\%$) apresentaram anormalidades morfológicas, sendo que 2 destas pupas apresentaram um desenvolvimento assimétrico do corpo e uma pupa desenvolveu até à fase P14 (nesta fase já são visíveis patas, asas, pêlos e garras pretas), mas o adulto não conseguiu eclodir. Este indivíduo era uma fêmea que apresentava melanismos/massas melanóticas interno e anomalias na segmentação da pata (apresentava uma cor preta em vez do castanho normal).

Nos 42 adultos formados, 3 machos ($\pm 7\%$) tinham alterações na segmentação das patas e uma fêmea ($\pm 2\%$) tinha anomalia nas asas. Os restantes adultos não apresentaram modificações morfológicas.

Este tempo de exposição já revelou ter alguma influência no desenvolvimento, visto terem sido observadas irregularidades na fase larval, na fase de pupa e na morfologia dos adultos. Porém, o tempo de exposição continuou a ser aumentado de modo a determinar qual a sua influência na viabilidade das larvas. Assim, o tempo foi aumentado para 60 segundos.

6.1.3 Larvas expostas a 60 segundos de plasma

Para os 60 segundos foram testadas 50 larvas, das quais 15 (30%) acabaram por morrer. Sobreviveram 35 larvas (70%), mas observou-se atrasos no desenvolvimento (11 dias após a exposição 5 larvas não tinham crescido). Nestas 5 larvas com desenvolvimento atrasado, verificou-se que 4 desenvolveram melanismos/massas melanóticas, mas todas as larvas formaram pupa. No entanto, as 5 pupas resultantes das larvas com desenvolvimento atrasado apresentavam características de pupas prematuras. Durante o desenvolvimento pupal, estas pupas morreram. As restantes 30 ($\pm 86\%$) formaram adultos.

Nos adultos verificou-se que 6 indivíduos (20%) apresentavam modificações na segmentação e formação das patas assim como nas asas.

Estes resultados pareciam dar a indicação que a viabilidade das larvas pode ir diminuindo em função do tempo de exposição. No entanto, não sabíamos se a viabilidade larval estava dependente do estágio de desenvolvimento que a larva apresentava no momento da exposição, uma vez que as larvas não foram separadas tendo em atenção esse fator. Para perceber se a viabilidade das larvas dependia da fase de desenvolvimento, as larvas passaram a ser separadas tendo em atenção o referido fator.

Na tabela seguinte pode ser observado um resumo dos resultados obtidos.

Tabela 1: Resumo da otimização do tempo de exposição.

	Larvas expostas	Larvas mortas	Sobreviventes	C/massa melanótica	Pupas formadas	Pupas c/ anomalias morfológicas	Adultos	Adultos c/ anomalias
30 segundos	61	4 (±7%)	57(±93%)	0	57	0	57 (100%)	4 (±7%)
40 segundos	33	7 (±21%)	26 (±79%)	0	26	0	26 (100%)	0
50 segundos	53	8 (±15%)	45 (±85%)	5 (±11%)	45	3 (±7%)	42 (±93%)	3 (±7%)
60 segundos	50	15 (30%)	35 (70%)	4 (±11%)	35	5 (±14%)	30 (±86%)	6 (20%)
Controlo	95	4 (±4%)	91 (±96%)	0	91	0	91 (100%)	0

6.2 Separação das larvas por estágio de desenvolvimento e novos tempos de exposição testados

Após a análise dos resultados alcançados, determinou-se que 50 segundos seria o menor tempo de exposição aplicado no trabalho. Esta decisão teve em conta que os tempos de 30 e 40 segundos testados anteriormente não tinham revelado ter grande influência no desenvolvimento larval e que, por outro lado, as larvas de 50 segundos desenvolveram melanismos/massas melanóticas. Partindo deste mínimo, o tempo seria aumentado progressivamente até alcançar um tempo máximo que permitisse observar alterações morfológicas nas larvas, mas sem causar morte na totalidade das mesmas. O tempo foi subindo progressivamente até aos 70 segundos.

A viabilidade das larvas após exposição, das pupas e o surgimento de melanismos/massas melanóticas, serão sempre comparadas com os resultados obtidos no controlo. Para estes novos testes foram expostas e analisadas 483 larvas de diferentes linhas de *Drosophila*.

6.2.1 Efeito da exposição de 50 segundos de plasma em larvas de *Drosophila* de 1.º, 2.º e 3.º estágio de desenvolvimento de diferentes linhas

Nas 123 larvas de 1º estágio expostas a 50 segundos de plasma não térmico, observou-se que 66 larvas (±54%) morreram, sendo que 33 das larvas mortas (50%) morreram nas primeiras 24 horas após exposição.

Das 57 larvas (±46%) sobreviventes, 26 larvas (±46%) desenvolveram melanismos/massas melanóticas internas e zonas de melanismo externo da cutícula, observando-se que essas massas localizavam-se principalmente na metade inferior do corpo, com predominância na zona genitália.

Das 26 larvas que desenvolveram melanismos/massas melanóticas após a exposição, 8 larvas (±31%) morreram e 18 larvas (±69%) desenvolveram-se até formar pupa.

Nas 18 pupas formadas, 10 (±56%) apresentaram anomalias durante o desenvolvimento pupal, quer a nível externo quer a nível interno, que se revelaram letais. Quatro destas pupas (±22%) não desenvolveram qualquer órgão, apresentando-

se como uma massa gordurosa onde se podiam observar melanismos/massas melanóticas, e 3 pupas ($\pm 17\%$) desenvolveram-se até à fase P14, mas morreram antes da eclosão. Estes indivíduos apresentavam irregularidades na eversão da cabeça, no alongamento das patas (patas mais curtas), na posição dos olhos (apresentaram olhos localizados no abdómen) e na posição do corpo no interior da pupa (corpo deslocado para cima). Apenas 8 das 18 pupas ($\pm 44\%$) desenvolveram-se até eclodir em moscas adultas.

No que diz respeito aos 8 adultos resultantes das larvas que desenvolveram melanismos/massas melanóticas, observou-se que 2 fêmeas tinham morfologia normal e ovários normais, numa fêmea (12,5%) faltavam 4 pêlos no tórax e os ovários estavam atrofiados. A outra fêmea tinha ovários com alguns ovos.

Quatro machos apresentaram massas melanismos/melanóticas internas que quando foram dissecados saíram associadas a gordura, e tinham testículos normais. Um dos machos apresentava alterações na segmentação das patas e asas e tinha os testículos normais.

No que diz respeito às 31 ($\pm 54\%$) larvas (de 57 larvas) que não desenvolveram melanismos/massas melanóticas, desenvolveram-se na sua totalidade até formar pupa sem deformidades morfológicas e eclodiram como adultos.

Contaram-se 31 adultos, 15 machos e 16 fêmeas. Nestes, verificou-se que 13 indivíduos apresentavam anomalias morfológicas (8 machos e 5 fêmeas). Nos machos, 5 tinham irregularidades na morfologia das patas e 3 nas asas. Nas fêmeas, 1 tinha modificações na posição da cabeça e 4 tinham ovários atrofiados.

No controlo foram analisadas 106 larvas, das quais 52 ($\pm 49\%$) morreram, contando-se 17 ($\pm 33\%$) mortas nas primeiras 24 horas. Comparando estes resultados com o grupo de exposição, verificou-se não existirem diferenças significativas na viabilidade das larvas do grupo de controlo em relação às larvas do grupo exposto ($X^2=0,483$, $GL=1$, $p=0,483$). Estes resultados parecem indicar que neste estágio de desenvolvimento, a morte das larvas não está relacionado com a exposição, mas talvez com a fragilidade destas larvas ou com a manipulação feita durante a experiência. Das 54 larvas ($\pm 51\%$) sobreviventes, apenas 2 ($\pm 3,7\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas que se situavam principalmente na zona genitália.

O tratamento dos dados com o teste estatístico qui quadrado revelou existir uma diferença significativa no surgimento de melanismos/massas melanóticas entre o grupo de controlo e o de exposição ($X^2=25,822$, $GL=1$, $p=0,0000$). Estes dados sugerem que a exposição foi responsável pelo surgimento dos melanismos/massas melanóticas. Talvez seja uma resposta imunológica por parte dos indivíduos às alterações provocadas pela exposição ao plasma.

Analisando os resultados observados dentro do grupo exposto, verificou-se existir uma diferença significativa na viabilidade das larvas que desenvolvem melanismos/massas melanóticas em relação às larvas que não apresentaram qualquer

alteração ($X^2=11,096$, $GL=1$, $p=0,00087$). Os dados revelam que uma vez desenvolvidas as massas melanóticas/melanismos, estas influenciam a viabilidade das larvas.

Do mesmo modo, a análise dos dados pelo teste estatístico qui quadrado revelou que a viabilidade das pupas para formar adulto no grupo de exposição tinha sido influenciada pela formação de melanismos/massas melanóticas nas larvas ($X^2=21,638$, $GL=1$, $p=0,00000$). Uma vez mais, verifica-se que após o surgimento de melanismos/massas melanóticas, estas podem influenciar o desenvolvimento da pupa.

No grupo de controlo, das 54 pupas formadas, 3 ($\pm 6\%$) morreram durante o desenvolvimento pupal. As restantes desenvolveram-se até formar adultos.

Comparou-se a viabilidade das pupas formadas a partir de larvas que não tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas, mas que tinham sido expostas ao plasma, com as pupas do controlo e verificou-se existir uma diferença significativa entre estas ($X^2=1,856$, $GL=1$, $p=0,173$), revelando que a exposição ao plasma influenciou a viabilidade das pupas.

No controlo obteve-se 51 adultos, 24 fêmeas ($\pm 47\%$) e 27 machos ($\pm 53\%$), não havendo diferença significativa na percentagem de machos e fêmeas entre o grupo de controlo e o de exposição ($X^2=0,024$, $GL=1$, $p=0,875$). Não foram observados adultos deste controlo com anomalias morfológicas.

Analisando os resultados, podemos dizer que 50 segundos de exposição não influencia a viabilidade das larvas de 1.º estágio, mas influencia o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas.

Para o 2.º estágio foram separadas 108 larvas de diferentes linhas expostas, sendo que destas 26 ($\pm 24\%$) morreram, das quais 15 ($\pm 58\%$) nas primeiras 24 horas.

Das 82 ($\pm 76\%$) larvas sobreviventes, 22 ($\pm 27\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Para avaliar o efeito de 50 segundos de exposição, comparou-se os resultados obtidos com o controlo e verificou-se não existir uma diferença significativa ($X^2=0,024$, $GL=1$, $p=0,8762$) na mortalidade, mas, por outro lado, no que diz respeito ao desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas, constatou-se que a diferença já era significativa ($X^2 =17,660$, $GL=1$, $p=0,00003$), revelando uma vez mais que o desenvolvimento de massas melanóticas estava relacionado com a exposição do plasma. No entanto, a viabilidade das larvas continua a não ser afetada.

Para o 3.º estágio foram expostas 56 larvas, sendo que 12 ($\pm 21\%$) morreram, e destas 6 (50%) foram nas primeiras 24 horas. Das 44 larvas ($\pm 79\%$) finais, 8 ($\pm 18\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Avaliando os resultados em comparação com o controlo, verificou-se não existir diferença significativa no número de larvas mortas ($X^2=0,00492$, $GL=1$, $p=0,9440$), mas

em relação aos melanismos/massas melanóticas a diferença já se fez notar ($X^2=5,897$, $GL=1$, $p=0,0151$).

Tendo em conta os resultados obtidos podemos sugerir que a exposição das larvas a 50 segundos de plasma não influenciou a viabilidade, mas influenciou o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas. No geral, podemos sugerir que 50 segundos não influencia a viabilidade das larvas, mas influencia o desenvolvimento de massas melanóticas.

6.2.2 Efeito da exposição de 60 segundos de plasma em larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio

Separaram-se 44 larvas de 1.º estágio que foram expostas a 60 segundos de plasma. Destas, 18 ($\pm 41\%$) morreram, sendo que 2 ($\pm 11\%$) nas primeiras 24 horas. Das 26 restantes, 2 ($\pm 5\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

A mortalidade não apresentou diferença significativa quando comparada com o controlo ($X^2=0,829$, $GL=1$, $p=0,3624$). O desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas também não apresentou diferença significativa ($X^2=0,588$, $GL=1$, $P=0,4433$). Pensamos que estes resultados podem estar influenciados pelo tamanho da amostra, visto esta ser reduzida, ou com alguns danos ocorridos durante o ensaio.

Para o 2.º estágio foram expostas 60 larvas, 40 ($\pm 67\%$) morreram e destas 15 (37,5%) nas primeiras 24 horas. Nas 20 larvas sobreviventes, 6 (30%) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Comparou-se com o controlo e verificou-se existir uma diferença significativa na viabilidade das larvas ($X^2=26,991$, $GL=1$, $p=0,00000$) assim com no desenvolvimento de massas melanóticas ($x^2=24,601$). Estes valores dão a indicação que o desenvolvimento das larvas de 2.º estágio foi influenciado pelos 60 segundos de exposição, sugerindo que o aumento do tempo de exposição poderá influenciar a viabilidade e o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas nas larvas.

Para o ensaio de 3.º estágio testou-se 34 larvas das quais 8 ($\pm 24\%$) morreram, mas desta vez todas as mortes foram observadas passadas mais de 72 horas. Das 26 larvas sobreviventes, 4 ($\pm 15\%$) desenvolveram melanismo/massas melanóticas.

Em relação à mortalidade, não se observou diferença significativa em relação ao controlo ($x^2=0,0832$), mas em relação ao desenvolvimento de massas melanóticas essa diferença já foi significativa ($x^2=20,415$). Como nas larvas de 2.º estágio a viabilidade foi influenciada por 60 segundos de exposição e nas larvas de 3.º estágio isso não aconteceu, podemos presumir que este resultado está relacionado com uma maior resistência das larvas num estágio de desenvolvimento mais avançado.

6.2.3 Efeito da exposição de 70 segundos de plasma em larvas de 1.º e 2.º estágio

Para o 1.º estágio testaram-se 26 larvas, registrando-se 8 ($\pm 31\%$) mortas, todas após 72 horas. Das 18 larvas sobreviventes, 2 ($\pm 11\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas com as mesmas características observadas nos ensaios anteriores.

Comparando mais uma vez estes resultados com os resultados do controlo verificou-se, não existirem diferenças significativas, quer no número de mortas ($X^2=2,816$, $GL=1$, $p=0,0933$), quer no desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas ($X^2=1,412$, $GL=1$, $p=0,2347$).

Estes resultados levam-nos a supor que o tamanho da amostra poderá estar a influenciar, ou mais uma vez podem ter acontecido danos durante a preparação das larvas para a exposição.

Para o 2.º estágio testaram-se 32 larvas, verificando-se que 26 ($\pm 81\%$) morreram, sendo que 15 ($\pm 58\%$) destas mortes ocorreram nas primeiras 24 horas. Das 6 larvas sobreviventes, 2 ($\pm 33\%$) apresentaram melanismos/massas melanóticas. Estes dados revelaram existir uma diferença significativa no número de larvas mortas e com melanismo em relação ao controlo, respetivamente $X^2=32,333$, $GL=1$, $p=0,0000$ e $X^2=17,660$, $GL=1$, $p=0,00003$.

Não foram testadas larvas de 3.º estágio com tempo de exposição 70 segundos.

Após comparar os resultados obtidos no controlo com os observados nos diferentes tempos de exposição, tentou-se perceber qual o comportamento dos indivíduos que apresentavam o mesmo estágio de desenvolvimento sujeitos a diferentes tempos de exposição.

Um resumo dos resultados obtidos com os diferentes tempos de exposição e dos dados estatísticos estão representados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos com os diferentes tempos de exposição, na separação por estágio de desenvolvimento.

	Larvas expostas	Larvas mortas	Mortas 1. ^{as} 24h	Larvas sobreviventes	C/ massas melanóticas
50 segundos					
1º estágio	123	66 (±54%)	33 (50%)	57 (±46)	26 (±46%)
2º estágio	108	26 (±24%)	15 (±58%)	82 (±76%)	22 (±27%)
3º estágio	56	12 (±21%)	6 (50%)	44 (±79%)	8 (±18%)
60 segundos					
1º estágio	44	18 (±41%)	2 (±11%)	26 (±59%)	2 (±8%)
2º estágio	60	40 (±67%)	15 (37,5%)	20 (±33%)	6 (30%)
3º estágio	34	8 (±24%)	0	26 (±76%)	4 (±15%)
70 segundos					
1º estágio	26	8 (±31%)	0	18 (±69%)	2 (± 11%)
2º estágio	32	26 (±81%)	15 (±58%)	6 (±18%)	2 (±33%)
3º estágio	0	0	0	0	0

Tabela 3: Tabela resumo dos resultados do teste estatístico χ^2 , obtidos na comparação do desenvolvimento de massas melanóticas e na mortalidade influenciada pelas massas melanóticas nas larvas dos diferentes estádios larvais, nos diferentes tempos de exposição com o controle.

	Desenvolvimento de massas melanóticas	Mortalidade/massas melanóticas
50 segundos		
1º estágio vs controle	$\chi^2=25,822^{***}$	$\chi^2=11,096^{***}$
2º estágio vs controle	$\chi^2=17,660^{***}$	$\chi^2=0,024$
3º estágio vs controle	$\chi^2=5,817^{**}$	$\chi^2=0,0049$
60 segundos		
1º estágio vs controle	$\chi^2=0,588$	$\chi^2=0,829$
2º estágio vs controle	$\chi^2=24,601^{***}$	$\chi^2=26,991^{***}$
3º estágio vs controle	$\chi^2=20,415^{***}$	$\chi^2=0,0832$
70 segundos		
1º estágio	$\chi^2=1,412$	$\chi^2=2,816$
2º estágio	$\chi^2=17,660^{***}$	$\chi^2=32,333^{***}$
3º estágio	"	"

6.3 Comparação de larvas mortas e surgimento de massas melanóticas entre de indivíduos de 1.º, 2.º e 3.º estágio

6.3.1 50 versus 60 segundos

Ao comparamos o número de larvas mortas de 1.º estágio o teste qui quadrado revelou não existir diferença significativa entre estes dois grupos ($X^2= 2,107$, $GL=1$, $p=0,1466$).

Pelo contrário, no que diz respeito ao desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas, verificou-se existir uma diferença muito significativa entre 50 e 60 segundos de exposição ($X^2=11,486$, $GL=1$, $p=0,0007$).

Estes resultados levam a sugerir que 50 e 60 segundos de exposição do plasma podem influenciar o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas, mas não a viabilidade das larvas. Como os resultados são semelhantes para estes dois tempos, parecem não existir grandes diferenças entre uma exposição de 50 e 60 segundos.

No que diz respeito à viabilidade/número de larvas mortas de 2.º estágio para estas intensidades, verificou-se existir uma diferença significativa entre a exposição de 50 e de 60 segundos ($X^2=26,531$, $GL=1$, $p=0,00000$). Já no que diz respeito ao surgimento de melanismos/massas melanóticas não houve diferença significativa ($X^2=0,081$, $GL=1$, $p=0,7757$), também ao contrário do esperado.

Embora seja notório que o tempo de exposição influencia a viabilidade das larvas, pensamos que esta variação do tempo de exposição não foi suficiente para poderem ser observadas diferenças no desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas.

Para as larvas de 3.º estágio não foram encontradas diferenças significativas quer no número de larvas mortas ($X^2=0,054$, $GL=1$, $p=0,8162$), quer no desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas ($X^2=0,090$, $GL=1$, $p=0,7641$).

Julgamos que as larvas de 3.º estágio apresentam uma maior resistência e que a diferença entre 50 e 60 segundos de exposição não será significativa.

6.3.2 60 versus 70 segundos

Para as larvas do 1.º estágio, o teste revelou não existir diferença entre o número de larvas mortas ($X^2=4,498$, $GL=1$, $p=0,03393$). Este resultado pode estar relacionado com a manipulação, ou então pelo fato de termos testado um número mais reduzido de larvas. De igual modo, verificou-se que também não existiram diferenças quanto ao surgimento de melanismos/massas melanóticas ($X^2= 0,150$, $GL=1$, $p=0,6981$).

No grupo de 2.º estágio, também não foram encontradas diferenças significativas quer seja em relação ao número de mortes ($X^2=2,2189$, $GL=1$, $p=0,1389$), quer seja no desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas. Uma vez mais estes resultados podem estar relacionados com o tamanho das amostras, com a manipulação das larvas

ou então, e tal como já referido, pelo fato de não existirem grandes diferenças entre uma exposição de 60 e 70 segundos no desenvolvimento das larvas.

Não foram realizados ensaios com larvas de 3.º estágio e com 70 segundos.

Como não foram encontradas diferenças significativas quer na viabilidade das larvas quer no desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas, podemos deduzir que um aumento de 60 para 70 segundos de exposição não tem um efeito significativo no desenvolvimento larval.

Após verificar que 50, 60 e 70 segundos de exposição talvez tenham influenciado o número de larvas mortas e o surgimento de melanismos/massas melanóticas, mas que não existiram grandes diferenças entre estes tempos, resolveu-se fazer um aumento mais significativo do tempo de exposição. Deste modo, fez-se um ensaio com o tempo de 100 segundos.

6.4 Exposição de larvas a 100 segundos de exposição

Para este tempo, foram expostas larvas de 2.º e 3.º estágio. Não foram testadas larvas de 1.º estágio devido ao fato destas serem muito pequeninas e apresentarem uma mortalidade elevada.

6.4.1 Larvas de 2.º e 3.º estágio expostas a 100 segundos de plasma

Neste ensaio foram testadas 10 larvas de 2.º estágio, das quais 3 ($\pm 30\%$) morreram nas primeiras 24 horas, sendo que todas elas tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas em diferentes zonas do corpo. Das 7 ($\pm 70\%$) sobreviventes, todas fizeram pupa, sendo que 2 destas pupas apresentavam zonas melanizadas. Uma destas morreu sem desenvolver qualquer órgão. Na outra pupa que apresentou melanismos/massas melanóticas, foi observado que desenvolveu um fenótipo criptocefálico (fenótipo é caracterizado por mal formações da eversão da cabeça), onde os olhos estavam a desenvolver-se entre o tórax e/ou abdómen. Na zona onde deveria desenvolver os olhos, apresentava uma mancha melanótica. A pupa desenvolveu-se até à fase P14 e foi dissecada, tendo-se verificado que a cabeça se tinha desenvolvido dentro do abdómen (fenótipo criptocefálico). As patas apresentavam-se curtas e tortas. As 2 pupas que desenvolveram melanismos/massas melanóticas não chegaram a eclodir como adulto.

Estes resultados deram a informação que o tempo de 100 segundo já tinha influenciado significativamente o desenvolvimento.

Para o 3.º estágio foram expostas 20 larvas verificando-se que apenas 1 delas morreu. Esta larva apresentava melanismos/massas melanóticas generalizado, de tal forma que o seu corpo rebentou (a este tipo de mortes vamos passar a referenciar como “puf”), espalhando fragmentos castanhos, tipo tecido melanizado pelo meio de cultivo. Este efeito está a ser observado pela primeira vez, talvez indicando um efeito associado a um período mais prolongado de exposição.

Das 19 larvas sobreviventes, 7 ($\pm 37\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas. Todas as larvas desenvolveram-se até formar pupa.

Das 19 pupas formadas, 7 ($\pm 37\%$), correspondentes às larvas com melanismos/massas melanóticas, apresentaram vários melanismos em diferentes zonas do corpo. Uma destas 7 pupas morreu na fase P14. Após a dissecação verificou-se que era um macho que apresentava várias manchas no abdómen, deformidades na formação da cabeça (fenótipo criptocefálico) e do tórax. As restantes 18 ($\pm 95\%$) desenvolveram-se até eclodir em adulto.

Nos 18 adultos contaram-se 8 fêmeas e 10 machos. Destes, 5 tinham anormalidades morfológicas (3 machos e 2 fêmeas). Dois dos machos apresentaram mal formação na segmentação das patas e 1 outro apresentou uma massa melanótica no estomago. Uma fêmea apresentou mal formação de uma das asas e uma outra tinha massas melanóticas no abdómen.

Estes dados não foram tratados estatisticamente visto o tamanho da amostra ser reduzido, mas o fenótipo criptocefálico foi interpretado como resultado do aumento da exposição do plasma no desenvolvimento da larva e da pupa. Não obstante, a viabilidade das larvas continuou a ser bastante elevada (1 larva em 20).

Após testados os tempos entre 30 e 100 segundos, resolveu-se estabelecer o tempo mínimo de 50 segundos para as exposições seguintes e aumentar o tempo máximo para os 120 segundos.

Como todos os ensaios tinham sido realizados usando diferentes linhas da mosca, e todos mostraram o mesmo padrão de acontecimentos, foi decidido que o trabalho iria prosseguir analisando-se apenas uma das linhas testadas anteriormente. Para o efeito decidiu-se usar a linha 10, testando todos os diferentes estádios de desenvolvimento separadamente, começando com o tempo mínimo e avançando posteriormente para o tempo máximo de exposição estabelecido.

Numa primeira fase, a observação é feita com a lupa de modo a determinar a viabilidade e o surgimento de melanismos/massas melanóticas nas larvas e nas pupas. Posteriormente as larvas mortas são observadas ao microscópio.

6.5 Larvas da linha 10 expostas a 50 segundos de plasma

Foram analisadas à lupa 438 larvas após exposição a 50 segundos de plasma não térmico, 171 larvas de 1.º estágio, 163 larvas de 2.º estágio e 104 larvas de 3.º estágio.

As larvas foram seguidas diariamente até à eclosão dos adultos. Também foi feita uma observação dos adultos no que diz respeito ao surgimento de anomalias morfológicas. Todos os resultados observados foram comparados com o controlo.

6.5.1 Controlo da linha 10, 1.º estágio

No controlo de 1.º estágio foram analisadas 106 larvas. Destas, 52 ($\pm 49\%$) morreram, sendo que 17 ($\pm 33\%$) morreram nas primeiras 24 horas. Das 54 ($\pm 51\%$) sobreviventes, apenas 2 ($\pm 4\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Formaram-se 54 pupas mas 3 ($\pm 6\%$) destas morreram sem desenvolver qualquer órgão. Eclodiram 51 adultos, onde 24 eram fêmeas e 27 eram machos. Estes adultos não apresentaram anomalias morfológicas.

6.5.2 Controlo da linha 10, 2.º estágio

No controlo de 2.º estágio foram analisadas 100 larvas, sendo que morreram 14 (14%). Sobreviveram 86 larvas e destas 3 ($\pm 3\%$) larvas desenvolveram melanismos/massas melanóticas. Todas as 86 larvas fizeram pupa.

Contaram-se 86 pupas, sendo que 3 ($\pm 3\%$) apresentaram melanismos/massas melanóticas. Estas pupas resultaram das larvas que tinham apresentado melanismos durante a sua fase larval. Todas as pupas eclodiram como adulto.

Nos 86 adultos, 50 eram machos ($\pm 58\%$) e 36 eram fêmeas ($\pm 42\%$). Nestas verificou-se que 3 ($\pm 8\%$) apresentavam modificações morfológicas (1 macho e 2 fêmeas). Nos machos, 1 (2%) não tinha um pêlo no tórax. Numa das fêmeas ($\pm 3\%$) as asas não abriram e noutra faltava um pêlo no tórax.

6.5.3 Controlo da linha 10, 3.º estágio

No controlo de 3.º estágio foram analisadas 121 larvas. Destas apenas 2 ($\pm 2\%$) morreram. Sobreviveram 119 larvas ($\pm 98\%$). Destas apenas 3 ($\pm 3\%$) desenvolveram pequenos melanismos/massas melanóticas.

Formaram-se 119 pupas normais. Morreram 4 ($\pm 3\%$) durante o desenvolvimento pupal. Estas estavam moles e apresentavam uma cor mais escura.

Formaram-se 115 adultos, 59 machos e 56 fêmeas. Nos adultos verificou-se que 5 tinham irregularidades morfológicas. Eram todas fêmeas, onde 3 tinham um formato de asas mais quadrado e 2 eram mais branquinhas (despigmentadas).

6.5.4 Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha 10 expostas a 50 segundos

Das 171 larvas de 1.º estágio expostas, 95 ($\pm 56\%$) morreram, sendo que 38 (40%) nas primeiras 24 horas. Das larvas mortas, 60 ($\pm 63\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Esses melanismos estavam distribuídos por diferentes partes do corpo. De notar que sempre que as larvas desenvolveram melanismos/massas melanóticas na zona da cabeça acabaram por morrer.

Das 76 larvas sobreviventes, 31 ($\pm 41\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas, que na sua maioria situavam-se na metade inferior do corpo, com predominância na área genitália A8/A7. Todas as larvas fizeram pupa.

Nas 76 pupas formadas, verificou-se que 22 ($\pm 29\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas e 54 ($\pm 71\%$) tinham uma morfologia normal e sem qualquer melanismo. Contaram-se 15 pupas mortas, sendo que 10 ($\pm 67\%$) tinham desenvolvido melanismo/massas melanóticas e 5 ($\pm 33\%$) tinham uma morfologia normal.

Contaram-se 61 adultos, 31 machos ($\pm 51\%$) e 30 fêmeas ($\pm 49\%$). Destes, 9 ($\pm 15\%$) apresentaram alterações morfológicas (7 machos e 2 fêmeas). Nos machos verificou-se que 2 tinham problemas de segmentação das patas, 2 tinham problemas na formação das asas, 1 tinha mal formação do tórax, onde faltava uma das asas, e 2 apresentaram massas melanóticas na zona do abdómen. Nas fêmeas, 1 tinha problemas na segmentação da 3.^a pata esquerda e 1 apresentou melanismo/massas melanóticas no abdómen.

Nas 163 larvas de 2.^o estágio expostas, contaram-se 45 ($\pm 27\%$) mortas, sendo que 10 ($\pm 22\%$) ocorreram nas primeiras 24 horas. Nestas larvas verificou-se que 35 ($\pm 78\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas.

Sobreviveram 118 larvas nas quais observou-se que 35 ($\pm 30\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas. Todas estas larvas formaram pupa.

Nestas pupas verificou-se que 21 ($\pm 18\%$) desenvolveram zonas com melanismo/massas melanóticas e 4 ($\pm 3\%$) atinham grandes deformidades morfológicas. Estas pupas acabaram por morrer durante o desenvolvimento pupal, assim como mais 9 pupas com melanismo/massas melanóticas e 4 com morfologia normal. No total morreram 19 pupas ($\pm 16\%$).

Contaram-se 99 adultos, 61 machos ($\pm 62\%$) e 38 fêmeas ($\pm 38\%$). Verificou-se que 23 indivíduos apresentavam modificações morfológicas (14 machos e 9 fêmeas). Nos machos, 8 ($\pm 13\%$) tinham irregularidades nas asas, 3 ($\pm 5\%$) eram minúsculos e despigmentados, 2 ($\pm 3\%$) tinham pigmentos cor-de-rosa no corpo e 1 ($\pm 2\%$) tinha anomalias na formação do tórax, faltando uma das asas. Nas fêmeas, 6 ($\pm 16\%$) apresentaram deformações na segmentação da 3.^a pata esquerda e melanismos nas articulações, 1 ($\pm 3\%$) na segmentação do abdómen e 2 ($\pm 5\%$) nas asas.

Para o 3.^o estágio, analisaram-se 104 larvas, das quais 28 ($\pm 27\%$) morreram, 12 (43%) delas nas primeiras 24 horas. Nas larvas mortas verificou-se que 21 ($\pm 75\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas.

Sobreviveram 76 larvas, 19 ($\pm 25\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas. Todas formaram pupa.

Nas 76 pupas formadas, 23 ($\pm 30\%$) apresentaram melanismos/massas melanóticas. Morreram 3 pupas, 2 ($\pm 3\%$) com melanismo e 1 ($\pm 1\%$) normal.

Contaram-se 73 adultos, 41 ($\pm 56\%$) machos e 32 ($\pm 44\%$) fêmeas. Verificou-se que 25 ($\pm 30\%$) apresentavam modificações morfológicas (16 machos e 9 fêmeas). Nos machos, 3 ($\pm 10\%$) tinham pigmentos cor-de-rosa no corpo, 5 ($\pm 12\%$) apresentavam massas melanóticas no tórax e abdômen que saíram quando dissecados, 2 ($\pm 5\%$) tinham problemas de segmentação das patas, 2 ($\pm 5\%$) tinham problemas nas asas, 2 ($\pm 5\%$) tinham falta de pêlos no tórax e 1 ($\pm 2\%$) era despigmentado e 1 tinha uma forma côncava do corpo. Nas fêmeas, 3 ($\pm 7\%$) tinham falta de pêlos no tórax, 2 ($\pm 5\%$) apresentavam anomalias na formação das asas e 3 ($\pm 9\%$) tinham irregularidades na segmentação da patas e do abdômen e 1 na segmentação das patas. Quando as fêmeas foram dissecadas, verificou-se que saíram manchas associadas a vesículas de gordura em 7 ($\pm 22\%$) delas.

6.6 Larvas da linha 10 expostas a 120 segundos de plasma

Após analisar os efeitos da exposição das larvas ao tempo mínimo de 50 segundos, passou-se a analisar os efeitos da exposição do tempo máximo estabelecido de 120 segundos de plasma.

Foram testadas 54 larvas, 23 de 1.^o estágio e 31 de 3.^o estágio. As observações e registros foram realizados como descrito anteriormente. Não foram testadas larvas de 2.^o estágio.

6.6.1 Larvas de 1.^o e 3.^o estágio da linha 10 expostas a 120 segundos

Das 23 larvas expostas a 120 segundos de plasma 7 ($\pm 30\%$) morreram, sendo que todas tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Nas 16 ($\pm 70\%$) sobreviventes observou-se que 5 ($\pm 31\%$) apresentaram melanismos/massas melanóticas.

Formaram-se 16 pupas nas quais 4 (25%) apresentaram melanismos mas a morfologia era normal; 1 ($\pm 6\%$) desenvolveu irregularidades morfológicas. Morreram 4 (25%) pupas, 3 com melanismos e 1 com anomalias morfológicas.

Contaram-se 12 adultos, 8 eram machos ($\pm 67\%$) e 4 eram fêmeas normais ($\pm 33\%$). Destes 2 apresentaram deformidades. Os machos eram todos normais. Nas fêmeas, 2 (50%) apresentaram alterações na segmentação da 3.^a pata esquerda.

Para o 3.^o estágio foram seguidas 31 larvas de 3.^o estágio após exposição e verificou-se que 3 morreram ($\pm 10\%$), todas tendo desenvolvido melanismos/massas melanóticas, sendo 1 nas primeiras 24 horas. Das 28 larvas sobreviventes, 9 ($\pm 32\%$) apresentaram melanismos/massas melanóticas. Todas formaram pupa.

Das 28 pupas formadas, 8 ($\pm 29\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas e 1 ($\pm 4\%$) apresentou anomalia na morfologia dos espiráculos anteriores, mas todas desenvolveram-se até eclodir em adultos.

Contaram-se 28 adultos, 14 machos (50%) e 14 fêmeas (50%). Verificou-se que 6 indivíduos apresentavam deformidades morfológicas (3 machos e 3 fêmeas). Nos machos, 2 ($\pm 14\%$) apresentaram modificações na segmentação das patas e 1 ($\pm 7\%$) apresentou problemas nas asas. Nas fêmeas, 1 ($\pm 7\%$) tinha irregularidade na segmentação do abdómen e 2 ($\pm 14\%$) na segmentação das patas.

Um resumo dos dados atrás descritos pode ser visto na tabela 1 e 3 do anexo 2.

Como os resultados da linha selvagem apresentaram sempre o mesmo padrão passou-se a analisar uma linha laboratorial.

6.7 Linha laboratorial

Levantou-se a hipótese de que os resultados observados nas larvas após a exposição do plasma podiam de alguma forma estar relacionados com alguma característica presente na linha selvagem. Com efeito, na natureza os cruzamentos entre os diferentes indivíduos resulta numa maior variabilidade genética. Para confirmação dos resultados, em todo o trabalho foi usado somente uma linha laboratorial (linha Barcelona). As larvas da linha de Barcelona foram sujeitas aos mesmos tempos testados nas larvas na linha selvagem (linha 10).

6.7.1 Controlo Barcelona, 1.º estágio

Para o controlo de 1.º estágio foram analisadas 95 larvas. Destas 30 ($\pm 32\%$) morreram durante o seu desenvolvimento, sendo que 12 (40%) foram nas primeiras 24 horas. Sobreviveram 65 ($\pm 68\%$) que fizeram pupa.

Das 65 pupas 2 morreram sem se desenvolver.

Contaram-se 63 adultos, 28 machos ($\pm 44\%$) e 35 fêmeas ($\pm 56\%$) que não apresentaram modificações morfológicas.

6.7.2 Controlo Barcelona, 2.º estágio

No controlo de 2.º estágio foram analisadas 88 larvas, das quais 10 ($\pm 11\%$) morreram, sendo que 5 ($\pm 6\%$) nas primeiras 24 horas. Sobreviveram 78 larvas ($\pm 89\%$) e nenhuma desenvolveu melanismos/massas melanóticas.

Formaram-se 78 pupas. Todas eclodiram como adulto.

Contaram-se 78 adultos, 40 machos ($\pm 51\%$) e 38 fêmeas (49%). Nenhum destes indivíduos apresentou anomalias morfológicas.

6.7.3 Controlo Barcelona, 3.º estágio

No controlo de Barcelona foram analisadas 96 larvas. Destas, 7 ($\pm 7\%$) morreram, sendo que 4 ($\pm 57\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas e 3 (43%)

não apresentavam alterações visíveis. As 89 larvas ($\pm 93\%$) sobreviventes não apresentaram irregularidades morfológicas nem melanismos.

Formaram-se 89 pupas das quais morreram 4 ($\pm 4\%$) sem alterações visíveis. As 85 ($\pm 96\%$) restantes eclodiram em adultos.

Contaram-se 85 adultos, 38 machos ($\pm 45\%$) e 47 fêmeas ($\pm 55\%$). Nenhum dos adultos apresentou irregularidades morfológicas.

6.7.4 Larvas da linha Barcelona expostas a 50 segundos de plasma 1.º, 2.º e 3.º estágio

Para o 1.º estágio foram expostas 50 larvas. Destas contaram-se 30 (60%) mortas, sendo que 12 (40%) foram nas primeiras 24 horas. Nas larvas mortas observou-se que 19 ($\pm 63\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Das 20 ($\pm 40\%$) sobreviventes nenhuma desenvolveu melanismos.

Formaram-se 20 pupas, e 2 (10%) apresentaram melanismo/massas melanóticas.

Contaram-se 20 adultos, 11 machos (55%) e 9 fêmeas (45%). Verificou-se que 3 indivíduos (15%) apresentavam alterações morfológicas. Os machos eram todos normais. No entanto, 2 fêmeas ($\pm 22\%$) tinham ovários pouco desenvolvidos e 1 fêmea ($\pm 11\%$) tinha uma massa melanótica no abdômen que saiu quando foi dissecada.

Para o 2.º estágio foram analisadas 52 larvas, sendo que 24 ($\pm 46\%$) morreram. Destas 13 ($\pm 54\%$) foram nas primeiras 24 horas, onde se verificou que 18 (75%) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Das 28 ($\pm 54\%$) sobreviventes, 3 ($\pm 11\%$) desenvolveram massas melanóticas.

Formaram-se 28 pupas, e 2 ($\pm 7\%$) apresentaram melanismos/massas melanóticas. Durante o desenvolvimento pupal, 5 ($\pm 18\%$) morreram, nas quais se verificou que existiam anomalias morfológicas. Uma das pupas tinha anormalidades nos espiráculos anteriores e uma das pupas melanóticas desenvolveu até à fase P14, mas não eclodiu. Era um macho com as patas assimétricas que tinha problemas de segmentação. As outras pupas tinham uma consistência mole e anomalias na forma do corpo. As restantes 23 pupas desenvolveram-se até eclodir em adulto.

Contaram-se 23 adultos, 11 machos ($\pm 48\%$) e 12 fêmeas ($\pm 52\%$). Verificou-se que 2 dos adultos ($\pm 9\%$) apresentavam modificações morfológicas (1 macho e 1 fêmea). Um macho tinha massas melanóticas no abdômen que saiu quando foi dissecado e 1 fêmea tinha ovários reduzidos e faltavam pêlos no abdômen.

Para o 3.º estágio, foram expostas 61 larvas, das quais 4 ($\pm 7\%$) morreram, sendo que 3 (75%) nas primeiras 24 horas. Verificou-se que todas as larvas mortas apresentavam melanismos/massas melanóticas. Das 57 ($\pm 93\%$) sobreviventes, 12 ($\pm 21\%$) desenvolveram massas melanóticas.

Formaram-se 57 pupas, verificando-se que 22 ($\pm 39\%$) morreram. Observou-se que nas pupas mortas, 10 ($\pm 45\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas, e

destas 4 tinham anomalias na posição do corpo. Toda a massa corporal estava voltada para o lado direito, existia ar na cavidade corporal e o corpo estava solto da cutícula. As restantes 12 ($\pm 55\%$) pupas mortas não apresentaram alterações visíveis. Das 35 ($\pm 61\%$), sobreviventes, 11 ($\pm 31\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Contaram-se 35 adultos, 15 machos ($\pm 43\%$) e 20 fêmeas ($\pm 57\%$). Verificou-se que 11 ($\pm 31\%$) adultos apresentavam deformidades (6 machos e 5 fêmeas). Nos machos verificou-se que 2 tinham problemas na segmentação das patas, 1 macho tinha o tórax torto e torcido onde faltava uma das asas. Noutro macho faltavam pêlos no tórax, 1 outro era minúsculo e ainda 1 outro era despigmentado, apresentando uma tonalidade muito mais clara do que o normal. Numa das fêmeas faltavam pêlos no tórax, 1 fêmea tinha uma massa melanótica no abdómen que saiu quando foi dissecada, 1 fêmea tinha anomalias nas patas e nas asas e faltavam pêlos no tórax e 2 fêmeas tinham anomalias nas asas e patas.

6.8 Larvas da linha Barcelona expostas a 120 segundos de plasma

Na exposição de 120 segundos foram testadas 53 larvas em que 5 eram de 2.º estágio e 48 de 3.º estágio. Não foram analisadas larvas de 1.º estágio pelo fato destas apresentarem uma mortalidade elevada.

6.8.1 Larvas de 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 120 segundos

Para este grupo foram analisadas somente 5 larvas, onde 4 (80%) morreram, todas com melanismos/massas melanóticas. Três dessas mortes (75%) foram nas primeiras 24 horas.

Formou-se 1 pupa normal e eclodiu numa fêmea normal, mas de tamanho reduzido.

Para o 3.º estágio foram expostas 48 larvas, das quais 30 ($\pm 62\%$) acabaram por morrer. Essas mortes foram todas depois das primeiras 24 horas. Nas larvas mortas verificou-se que 20 ($\pm 67\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Das 18 ($\pm 38\%$) sobreviventes, 10 ($\pm 56\%$) desenvolveram massas melanóticas. Todas as larvas formaram pupa.

Nas 18 pupas formadas, 4 ($\pm 22\%$) acabaram por morrer durante o seu desenvolvimento. Nessas pupas mortas verificou-se que 1 tinha deformidades na forma; era alongada como se tivesse mantido a forma da larva. Duas pupas tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas e 1 pupa tinha morfologia normal. Nas 14 pupas sobreviventes ($\pm 78\%$) observou-se que 1 tinha desenvolvido melanismos/massas melanóticas.

Contaram-se 14 adultos, 6 ($\pm 43\%$) machos e 8 fêmeas ($\pm 57\%$). Quatro ($\pm 29\%$) desses indivíduos apresentaram alterações (1 macho e 3 fêmeas). Nos machos verificou-se que 1 deles tinha melanismo na zona bucal, a segmentação da 1.ª pata esquerda era anómala e que tinha deformidades na orientação dos pêlos do corpo, nomeadamente

nos pentes sexuais. Nas fêmeas, 1 tinha modificação na segmentação das patas e faltavam alguns pêlos no tórax e outras 2 tinham os ovários reduzidos.

Como os resultados seguiram o mesmo padrão dos observados das outras linhas anteriormente testados, levantou-se a hipótese que estas anomalias poderiam estar relacionadas com a presença da radiação ultra violeta (UV) na composição do plasma usado na exposição. Assim, resolveu-se não fazer mais exposição de 120 segundos com este tipo de plasma.

6.9 Aplicação de plasma sem ultra violeta

De modo a averiguar se os resultados observados estavam a ser influenciados pela presença de radiação ultra violeta na composição do plasma, as experiências foram repetidas, mas desta vez expondo as larvas a plasma sem ultra violeta (s/UV). Para este tipo de plasma, as espécies reativas eram transportadas por um fluxo de ar que atravessava o espaço de descarga com uma vazão volúmica de cerca de 25 l/min. As larvas ficavam assim fora do campo de visão direto da zona de descarga, logo não estavam expostas a radiação ultra violeta.

Para esta exposição as larvas foram colocadas em caixas de *Petri* com 70 mm de diâmetro em grupos de 10 a uma distância de 16.5 mm da saída do dispositivo de descarga. A aplicação do plasma foi feita expondo as larvas ao fluxo de ar proveniente do dispositivo de descarga. Começou-se por testar os 50 segundos que foram estabelecidos como mínimo. Contudo, os tempos de exposição nos ensaios com plasma sem ultra violeta tiveram que ser aumentados para obterem-se efeitos equivalentes. O fluxo de ar com espécies reativas implicou uma maior perda de espécies por difusão, de forma que a concentração de espécies reativas a atingir as larvas foi menor do que numa exposição direta de igual duração. Deste modo, os tempos foram fixados em 120 e 180 segundos como tempo mínimo e máximo, respetivamente.

Para estes ensaios foram testadas 47 larvas com 50 segundos, onde 16 foram de 2.º estágio e 31 de 3.º estágio. Com tempos de exposição superiores foram testadas 446 larvas da linha de Barcelona com o tempo de 120 segundos (208 foram de 1.º estágio, 129 de 2.º estágio e 109 de 3.º estágio) e 599 larvas com 180 segundos (137 larvas de 1.º estágio, 205 de 2.º estágio e 257 de 3.º estágio).

Do mesmo modo, foram feitos ensaios com a linha 10 com o plasma sem ultra violeta. Foram testadas 54 larvas com o tempo de 120 segundos, sendo 23 de 2.º estágio e 31 de 3.º estágio. Não foram testadas larvas de 1.º estágio devido à elevada mortalidade que foram apresentando ao longo do trabalho.

Todas as observações e registos seguiram o mesmo critério estabelecido para a aplicação do plasma com ultra violeta (c/UV).

6.9.1 Larvas de 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 50 segundos s/UV

Foram expostas 16 larvas de 2.º estágio, onde se verificou que 6 ($\pm 38\%$) morreram. Todas tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas e morreram após as primeiras 24 horas. Nas 10 ($\pm 62\%$) sobreviventes, 2 (20%) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Formaram-se 10 pupas. Destas, 1 apresentou anomalias morfológicas. Esta pupa tinha características compatíveis com a formação precoce, sugerindo que a larva deve ter entrado na fase de pupa antes de completar o 3.º estágio de desenvolvimento. Esta pupa apresentava uma forma alongada de larva, a tonalidade era muito mais clara do que o normal e tinha grandes alterações morfológicas a nível dos espiráculos anteriores. Acabou por morrer nas primeiras horas do seu desenvolvimento. As restantes 9 pupas desenvolveram-se até eclodir em adultos.

Contaram-se 9 adultos, 5 machos ($\pm 56\%$) e 4 fêmeas ($\pm 44\%$). Verificou-se que 3 indivíduos ($\pm 33\%$) tinham anomalias morfológicas (1 macho e 2 fêmeas). Um dos machos tinha massas melanóticas no abdómen que saíram quando foi dissecado e 2 das fêmeas tinham os ovários reduzidos.

Para o 3.º estágio foram expostas 31 larvas verificando-se que 4 ($\pm 13\%$) acabaram por morrer. Estas larvas morreram após as primeiras 24 horas, sendo que 2 (50%) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas e 1 delas tinha o aspeto de “puf”, já que todo o corpo estava melanizado e espalhado em redor. Das 27 larvas sobreviventes ($\pm 87\%$), 5 ($\pm 19\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Formaram-se 27 pupas. Dessas, 19 ($\pm 70\%$) tinham uma morfologia normal, 3 ($\pm 11\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas e outras 5 ($\pm 19\%$) tinham anomalias morfológicas. Destas 5, verificou-se que 4 ($\pm 15\%$) acabaram por morrer durante o seu desenvolvimento. Verificou-se que 1 dessas pupas tinha problemas na eversão dos aspiráculos anteriores, 2 tinham o corpo mal formado e 1 tinha características de pupa com formação precoce. As restantes 23 ($\pm 85\%$) desenvolveram-se até eclodir em adulto.

Contaram-se 23 adultos, 13 machos ($\pm 57\%$) e 10 fêmeas ($\pm 43\%$). Nos indivíduos adultos, verificou-se que 11 ($\pm 48\%$) deles apresentavam anomalias (3 machos e 8 fêmeas). Nos machos detetou-se que 1 tinha uma mancha melanótica no abdómen que saiu quando foi dissecado, 1 outro tinha irregularidades na segmentação do corpo e ainda 1 outro apresentava falta de pêlos no tórax. Nas fêmeas registou-se que 7 ($\pm 30\%$) tinham ovários atrofiados e 1 outra tinha uma mancha na articulação tíbia tarso do 2.º par de patas do lado direito.

6.9.2 Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 120 segundos s/UV

No grupo de 1.º estágio foram analisadas 208 larvas. Após a exposição verificou-se que 138 ($\pm 66\%$) acabaram por morrer. Dessas, 29 ($\pm 21\%$) morreram nas primeiras 24 horas. No total de larvas mortas verificou-se que 97 ($\pm 70\%$) tinham desenvolvido

melanismos/massas melanóticas. Nas 70 ($\pm 34\%$) sobreviventes, observou-se que 14 (20%) desenvolveram melanismos/massas melanóticas.

Formaram-se 70 pupas, nas quais verificou-se que 15 ($\pm 21\%$) apresentaram deformidades morfológicas que incluíam mal formação do corpo, desenvolvimento de ar na cavidade corporal e falta dos espiráculos anteriores. Outras 6 ($\pm 9\%$) tinham desenvolvido vários melanismos/massas melanóticas. Morreram 8 ($\pm 15\%$), 1 das quais tinha deformidades morfológicas nos espiráculos anteriores, 3 apresentavam anormalidades morfológicas características de desenvolvimento precoce, 2 apresentavam melanismo/massas melanóticas, sendo que uma delas não chegou a desenvolver a pigmentação dos olhos, dando a indicação que deve ter morrido na fase de desenvolvimento P6 e a outra morreu na fase P14. Esta pupa era um macho que apresentava irregularidades na segmentação das patas. As outras 2 pupas mortas tinham uma morfologia normal, sendo que uma não se desenvolveu e a outra ficou na fase de desenvolvimento P14. Esta última também era um macho, onde se verificou que faltava o 2.º par de patas. No final, 62 pupas ($\pm 89\%$) desenvolveram-se até eclodir em adultos.

Desses 62 adultos, 34 ($\pm 55\%$) eram machos e 28 eram fêmeas ($\pm 45\%$). Após a observação dos indivíduos verificou-se que 15 ($\pm 24\%$) apresentavam alterações (2 machos e 13 fêmeas). Um dos machos tinha variações nas nervuras das asas e 1 tinha problema na posição de formação das patas e a 2.ª pata estava no mesmo local da 3.ª pata. No que diz respeito às fêmeas, 3 tinham modificações na forma e nervuras das asas, 1 tinha manchas pretas na 2.ª pata do lado direito, a duas faltavam pêlos no tórax, 1 fêmea apresentava uma massa melanótica no abdómen que saiu quando foi dissecada, 1 outra tinha melanismo cuticular, 1 tinha duplicação do tórax e 4 ($\pm 6\%$) tinham ovários reduzidos.

Para o 2.º estágio foram expostas 129 larvas, sendo que 45 ($\pm 35\%$) acabaram por morrer. Registrou-se que 22 ($\pm 49\%$) morreram nas primeiras 24 horas. No total de larvas mortas, observou-se que 29 ($\pm 64\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Nas 84 ($\pm 65\%$) sobreviventes, 13 ($\pm 15\%$) desenvolveram massas melanóticas.

Formaram-se 84 pupas nas quais foram detetadas 16 ($\pm 19\%$) com alterações morfológicas. Morreram 27 pupas ($\pm 32\%$), sendo que 6 ($\pm 22\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Uma delas era um macho com irregularidades nas asas, que se desenvolveu até a fase P14. Uma outra tinha uma curvatura para um dos lados (côncavo), 9 ($\pm 33\%$) tinham características compatíveis com formação precoce e 11 ($\pm 41\%$) tinham uma morfologia normal. As restantes 57 pupas ($\pm 68\%$) desenvolveram-se até eclodir em adulto.

Dos 57 adultos, 32 ($\pm 56\%$) eram machos e 25 eram fêmeas ($\pm 44\%$). Nestes indivíduos verificou-se que 4 ($\pm 7\%$) apresentavam anormalidades morfológicas (1 macho e 3 fêmeas). Nos machos, 1 tinha alterações na segmentação do segundo par de patas.

Nas fêmeas, 2 tinham irregularidades na formação e nervuras das asas e 1 na segmentação das patas.

Para o de 3.º estágio foram expostas 109 larvas, das quais 13 ($\pm 12\%$) acabaram por morrer, sendo que 2 ($\pm 15\%$) morreram nas primeiras 24 horas. No total de larvas mortas verificou-se que 8 ($\pm 62\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Nas 96 ($\pm 88\%$) sobreviventes, registaram-se 12 ($\pm 13\%$) com massas melanóticas.

Das 96 pupas que se formaram, 20 ($\pm 21\%$) apresentavam melanismos/massas melanóticas, 9 ($\pm 9\%$) tinham transtornos morfológicas compatíveis com formação de pupa precoce e 4 ($\pm 4\%$) tinham irregularidades na formação dos espiráculos anteriores. Morreram 28 pupas ($\pm 29\%$) durante o desenvolvimento. A observação das pupas mortas revelou que 3 eram melanóticas e 15 correspondiam a pupas problemáticas descritas anteriormente. As restantes 10 pupas mortas ($\pm 36\%$) tinham morfologia normal. As outras 68 ($\pm 71\%$) desenvolveram-se até formar adulto.

Desses 68 indivíduos adultos, 25 ($\pm 37\%$) eram machos e 43 eram fêmeas ($\pm 63\%$). No total de adultos verificou-se que 40 ($\pm 59\%$) tinham morfologia normal e 28 ($\pm 41\%$) apresentavam deformidades (12 machos e 16 fêmeas). Nos machos, 5 ($\pm 7\%$) tinham irregularidades na segmentação e posição das patas. Após dissecação saíram algumas massas melanóticas. Outro macho tinha melanismo na zona genitália, 1 era despigmentado, 1 tinha falta de pêlos no tórax e 4 tinham uma tonalidade cor-de-rosa. Nas fêmeas registou-se que 4 apresentavam anomalias na posição e segmentação das patas, 2 tinham mudanças na forma das asas, 2 eram despigmentadas, 1 tinha massas melanóticas no abdómen que saíram quando foi dissecada, 3 tinham falta de pêlos no tórax e 4 fêmeas tinham ovários reduzidos.

6.10 Larvas Barcelona expostas a 180 segundos sem ultra violeta

As experiências foram todas repetidas desta vez para 180 segundos de tempo de exposição, de modo a averiguar quais os efeitos de um aumento drástico no tempo de exposição. Para os testes de 180 segundos foram expostas 597 larvas (135 de 1.º estágio, 205 de 2.º estágio e 257 de 3.º estágio).

6.10.1 Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha Barcelona expostas a 180 segundos s/UV

Começou-se por fazer a exposição em 135 larvas de 1.º estágio, verificando-se que 90 ($\pm 67\%$) acabaram por morrer, sendo que 22 ($\pm 24\%$) nas primeiras 24 horas. No total de larvas mortas observou-se que 77 ($\pm 86\%$) tinham desenvolvido melanismo/massas melanóticas. Nas 45 ($\pm 33\%$) sobreviventes, 13 ($\pm 29\%$) desenvolveram massas melanóticas. Todas as 45 larvas fizeram pupa.

Nas 45 pupas formadas, 6 tinham deformidades morfológicas. Verificou-se que 1 tinha anomalias nos aspiráculos anteriores, 1 tinha mal formações morfológicas compatíveis com formação de pupa precoce e 4 ($\pm 9\%$) apresentavam melanismos/massas melanóticas. Verificou-se que durante o seu desenvolvimento

morreram 11 pupas, ($\pm 24\%$) sendo que 9 ($\pm 82\%$) tinham morfologia normal, 1 ($\pm 9\%$) apresentava melanismo e 1 era a pupa precoce. As restantes 34 pupas ($\pm 76\%$) formaram adultos.

Desses 34 adultos, verificou-se que 20 ($\pm 59\%$) eram machos e 14 eram fêmeas ($\pm 41\%$). No total de indivíduos, 24 ($\pm 71\%$) tinham morfologia normal e 10 ($\pm 29\%$) apresentaram alterações (5 machos e 5 fêmeas). Nos machos, 3 ($\pm 9\%$) tinham mal formação na segmentação das patas e quando dissecados saíram algumas massas melanóticas. Em 2 machos ($\pm 6\%$) observou-se que estes estavam despigmentados. Nas fêmeas, 1 ($\pm 3\%$) tinha ovários reduzidos, 2 estavam despigmentadas, 1 tinha irregularidades na formação das asas e 1 apresentou pente sexual, uma característica sexual dos machos.

Nas 205 larvas de 2.º estágio expostas, verificou-se que 94 ($\pm 46\%$) acabaram por morrer, das quais 35 ($\pm 37\%$) nas primeiras 24 horas. Entre elas estava uma “puf”. No total de larvas mortas, verificou-se que 71 ($\pm 76\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas. Nas 111 ($\pm 54\%$) sobreviventes, 25 ($\pm 23\%$) desenvolveram melanismos. Todas estas larvas formaram pupa.

Das 111 pupas formadas, observaram-se 19 ($\pm 17\%$) com melanismos/massas melanóticas. Morreram 9 ($\pm 8\%$) durante o desenvolvimento. Destas pupas mortas, 6 ($\pm 67\%$) tinham morfologia normal e 2 destas desenvolveram-se até à fase P14, 1 macho e 1 fêmea com patas curtas e tortas. As outras 3 tinham desenvolvido melanismos, onde uma delas chegou à fase P14, era 1 macho com patas e asas anómalas. No final, 102 pupas ($\pm 92\%$) desenvolveram-se até eclodir em adultos.

Desses 102 adultos, 51 (50%) eram machos e 51 fêmeas. Trinta indivíduos ($\pm 34\%$) apresentaram alterações (12 machos e 18 fêmeas) e 72 ($\pm 66\%$) eram normais. Verificou-se que 3 machos ($\pm 3\%$) apresentavam anomalias na formação e segmentação das patas, 1 ($\pm 1\%$) tinha manchas pretas nas articulações das patas, 1 tinha o tórax torto e faltava uma das asas, 2 machos ($\pm 2\%$) eram despigmentados, 2 tinham pêlos curtos no tórax, 1 tinha deformidades na forma das asas, 1 tinha uma massa melanótica no abdómen que saiu quando foi dissecado e 1 tinha os testículos reduzidos e mais escuros. Nas fêmeas, detetou-se que 2 tinham deformidades na segmentação das patas, 1 tinha um tamanho muito reduzido, 3 eram despigmentadas, 3 tinham massas melanóticas no abdómen que saíram quando foram dissecadas, 4 ($\pm 4\%$) tinham irregularidades na forma e tamanho das asas, 2 tinham falta de pêlos no tórax, 2 tinham ovários reduzidos e de uma fêmea, quando dissecada, saíram muitas vesículas de gordura do abdómen e algumas massas melanóticas. Também 1 fêmea apresentou uma mancha vermelha associada à cutícula abdominal.

Para o 3.º estágio analisou-se 257 larvas após exposição. Destas, verificou-se que 27 ($\pm 11\%$) acabaram por morrer, sendo que 9 ($\pm 33\%$) morreram nas primeiras 24 horas. No total de larvas mortas, contaram-se 21 ($\pm 78\%$) com melanismos/massas melanóticas. Nas 230 ($\pm 89\%$) sobreviventes, 31 ($\pm 13\%$) desenvolveram massas melanóticas.

Das 230 pupas que se formaram, foi observado que 31 ($\pm 13\%$) apresentavam melanismos/massas melanóticas e 23 (10%) tinham transtornos na morfologia. Durante o desenvolvimento morreram 40 pupas ($\pm 17\%$). Nas pupas mortas verificou-se que 18 (45%) eram melanóticas e 7 ($\pm 18\%$) tinham anomalias morfológicas nos aspiráculos, corpo em forma de vírgula e tinham desenvolvido ar na cavidade corporal. As restantes 15 pupas mortas ($\pm 37\%$) apresentavam morfologia normal. As 190 pupas sobreviventes ($\pm 83\%$) desenvolveram-se até eclodir em adultos.

Dos 190 adultos, 88 eram machos ($\pm 46\%$) e 102 eram fêmeas ($\pm 54\%$). Verificou-se que nestes indivíduos, 163 ($\pm 81\%$) tinham morfologia normal e 30 ($\pm 19\%$) apresentavam alterações morfológicas (15 machos e 15 fêmeas). Nos machos, 2 tinham anomalias nas asas, 5 na segmentação das patas e 4 tinham massas melanóticas no abdómen que saíram quando foram dissecadas. Um macho era despigmentado, 1 tinha manchas pretas nas articulações das patas, 1 tinha anomalias no padrão de segmentação do abdómen e 1 outro tinha transtornos na pigmentação dos olhos. Nas fêmeas, verificou-se que 4 tinham massas melanóticas no abdómen que saíram quando foram dissecadas, 4 tinham anomalias na formação e padrão dos pêlos à volta das asas, 5 tinham anomalias na segmentação das patas e 2 eram despigmentadas e tinham ovários reduzidos.

Todos os dados apresentados anteriormente estão sumarizados na tabela 2 e 3 do anexo 2.

6.11 Exposição da Linha 10 sem UV

A experiência foi repetida para as larvas da linha 10 para confirmar se os resultados da exposição do plasma s/UV seguiam o mesmo padrão observado com a exposição c/UV.

Para a exposição de 120 segundos s/UV testaram-se 54 larvas, 23 de 1.º estágio e 31 de 3.º estágio. Não foram testadas larvas de 2.º estágio, porque estas não foram encontradas nos frascos de cultivo quando foram separadas para a exposição.

6.11.1 Larvas de 1.º e 3.º estágio da linha 10 expostas a 120 segundos s/UV

Das 23 larvas de 1.º estágio expostas verificou-se que 7 ($\pm 30\%$) acabaram por morrer após as primeiras 24 horas, e todas apresentavam melanismos/massas melanóticas. Nas 16 sobreviventes ($\pm 70\%$), verificou-se que 5 ($\pm 31\%$) desenvolveram massas melanóticas. Todas estas larvas formaram pupa.

Nas 16 pupas formadas registou-se que 4 (25%) apresentavam melanismos/massas melanóticas e 1 ($\pm 6\%$) tinha irregularidades morfológicas compatíveis com formação de pupa precoce. As restantes 11 ($\pm 69\%$) tinham morfologia normal. Durante o seu desenvolvimento morreram 4 pupas (25%), onde se verificou que 3 ($\pm 19\%$) apresentavam morfologia normal e 1 correspondia com a pupa precoce.

Dos 12 adultos, 8 eram machos ($\pm 67\%$) e 4 eram fêmeas ($\pm 33\%$). Nestes indivíduos, 3 (25%) tinham deformidades na morfologia. Eram todas fêmeas, onde 2 tinham mal formações da 3.^a pata esquerda e algumas manchas pretas nas articulações. Uma fêmea tinha ovários reduzidos.

Para o 3.^o estágio foram expostas 31 larvas, onde 3 ($\pm 10\%$) acabaram por morrer, 1 nas primeiras 24 horas ($\pm 33\%$) e as restantes nas horas seguintes. Todas as larvas mortas apresentavam melanismos/massas melanóticas. Das 28 ($\pm 90\%$) larvas sobreviventes, 9 ($\pm 32\%$) desenvolveram massas melanóticas e 19 ($\pm 68\%$) não apresentaram anomalias visíveis. Todas as larvas formaram pupa.

Nas 28 pupas formadas verificou-se que 8 ($\pm 29\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas, 1 ($\pm 3\%$) tinha uma irregularidade ligeira nos espiráculos anteriores e 19 ($\pm 68\%$) tinham uma morfologia normal. Todas as pupas eclodiram em adultos.

Desses 28 adultos, 14 (50%) eram machos e 14 eram fêmeas. Verificou-se que 12 ($\pm 43\%$) tinham anomalias morfológicas (6 machos e 6 fêmeas) e 16 ($\pm 57\%$) eram normais. Nos adultos com anomalias registou-se que 5 ($\pm 18\%$) machos tinham problemas na segmentação das patas e 1 ($\pm 3\%$) tinha alteração na forma das asas. Nas fêmeas, 2 ($\pm 7\%$) tinham anormalidades na formação e posição das patas, 1 tinha modificações na segmentação do abdómen e 3 ($\pm 11\%$) tinham ovários reduzidos.

Não continuámos a fazer exposição com esta linha visto que os resultados estavam a seguir o mesmo padrão, evidenciando que os resultados não estavam relacionados com o UV mas sim com a exposição ao plasma.

6.12 Linha 10 com antibiótico

Como uma das alterações mais evidentes nas larvas após exposição foi o desenvolvimento de massas melanóticas, levantou-se a hipótese de que a linha 10 poderia estar infetada com alguma estirpe bacteriana ou microrganismo que pudesse estar na origem dos resultados obtidos. Embora os resultados já tivessem sido confirmados com a linha laboratorial, verificou-se que o desenvolvimento das massas melanóticas era sempre mais exuberante na linha selvagem. Alguns artigos publicados referem que quando as larvas de *Drosophila* estão infetadas com parasitas, desenvolvem massas melanóticas. Para eliminar esta hipótese, cultivou-se a linha num meio que continha antibiótico. Usou-se amoxicilina e ampicilina, de forma a tentar eliminar quer microrganismo Gram negativo, quer Gram positivo. Após o cultivo em meio com antibiótico, as larvas foram separadas e expostas ao plasma, seguindo o protocolo anteriormente usado.

Nesta experiência foram testadas 398 larvas: 147 de 1.^o estágio, 147 de 2.^o estágio e 104 de 3.^o estágio. Neste grupo as exposições foram todas de 180 segundos.

6.12.1 Larvas de 1.º, 2.º e 3.º estágio da linha 10 cultivadas com antibióticos e expostas a 180 segundos de plasma s/UV

Foram separadas 147 larvas de 1.º estágio do meio com antibiótico e foram expostas ao plasma durante 180 segundos. Verificou-se que 88 destas larvas ($\pm 60\%$) acabaram por morrer, sendo que 27 ($\pm 31\%$) morreram nas primeiras 24 horas. Verificou-se que nas larvas mortas, 63 ($\pm 72\%$) apresentavam melanismos/massas melanóticas. Também observou-se tonalidades cor-de-rosa em algumas destas larvas. Nas 59 larvas sobreviventes ($\pm 40\%$), registou-se que 15 ($\pm 25\%$) desenvolveram massas. Todas desenvolveram-se até formar pupa.

Nas 59 pupas formadas verificou-se que 18 ($\pm 31\%$) apresentavam melanismos/massas melanóticas, 1 ($\pm 2\%$) tinha morfologia compatível com formação precoce de pupa, 3 ($\pm 5\%$) tinham anomalias ligeiras na morfologia dos aspiráculos anteriores e 37 ($\pm 63\%$) eram normais. Durante o seu desenvolvimento, 3 pupas acabaram por morrer. Nessas pupas verificou-se que 1 correspondia a pupa precoce, 1 era melanótica e 1 tinha morfologia normal.

Dos 56 adultos contados, 29 eram machos ($\pm 52\%$) e 27 eram fêmeas ($\pm 48\%$). Nestes adultos, verificou-se que 29 ($\pm 52\%$) apresentavam irregularidades (16 machos e 11 fêmeas). Nos machos, 5 ($\pm 9\%$) eram despigmentados, 4 ($\pm 7\%$) tinham massas melanóticas no abdómen que saíram quando foram dissecados, 2 ($\pm 4\%$) tinham deformação na segmentação das patas, 1 ($\pm 2\%$) tinha alteração na forma das asas e 4 apresentavam um tamanho muito reduzido. Nas fêmeas, 5 eram despigmentadas, 2 tinham anormalidades nos pêlos que rodeiam as asas, 3 tinham massas melanóticas no abdómen que saíram ao serem dissecadas e 1 tinha ovários reduzidos.

Para o 2.º estágio foram expostas 147 larvas, das quais 122 ($\pm 83\%$) acabaram por morrer. Destas, 34 ($\pm 28\%$) morreram nas primeiras 24 horas. No total de larvas mortas, verificou-se que 91 ($\pm 75\%$) tinham desenvolvido melanismos/massas melanóticas e algumas tinham tonalidades cor-de-rosa. Nas 25 larvas sobreviventes, observou-se que 8 (32%) desenvolveram massas melanóticas. Algumas larvas vivas tinham uma tonalidade cor-de-rosa muito claro. Todas formaram pupa.

Nas 25 pupas formadas, detetou-se que 8 (32%) apresentavam melanismos/massas melanóticas, 1 (4%) tinha deformidades na morfologia dos aspiráculos anteriores e 15 (60%) tinham morfologia normal. Morreram 5 pupas (20%) durante o desenvolvimento, sendo que 3 (12%) apresentavam melanismos/massas melanóticas, 1 tinha anomalias na morfologia dos espiráculos anteriores e 1 tinha morfologia normal.

Contaram-se 20 adultos, 10 machos (50%) e 10 fêmeas, onde 10 (50%) eram normais e 10 apresentavam modificações (6 macho e 4 fêmeas). Nos machos, verificou-se que 3 (15%) apresentavam massas melanóticas no abdómen que saíram após dissecação, 2 (10%) eram despigmentados e 1 (5%) tinha um tamanho reduzido. Nas fêmeas, 1 apresentava massas melanóticas no abdómen que saíram na dissecação, 2 tinham anomalias na segmentação das patas e 1 na forma das asas.

No grupo de 3.º estágio foram expostas 104 larvas, das quais 56 ($\pm 54\%$) acabaram por morrer, 7 delas ($\pm 13\%$) nas primeiras 24 horas. Nas larvas mortas contaram-se 44 ($\pm 79\%$) com melanismos/massas melanóticas. Em algumas destas larvas observou-se tonalidade cor-de-rosa.

Nas 48 larvas sobreviventes ($\pm 46\%$), detetou-se que 7 ($\pm 15\%$) desenvolveram massas melanóticas.

Formaram-se 48 pupas, onde 9 ($\pm 19\%$) apresentaram alterações morfológicas na forma do corpo, 6 ($\pm 12\%$) desenvolveram melanismos/massas melanóticas e 33 ($\pm 69\%$) tinham morfologia normal. Morreram 16 pupas ($\pm 33\%$) durante o desenvolvimento. Nestas, verificou-se que 5 ($\pm 31\%$) tinham morfologia normal, 8 (50%) apresentavam deformidades morfológicas e 3 ($\pm 19\%$) tinham desenvolvido melanismos.

Contaram-se assim 32 adultos, 10 machos ($\pm 31\%$) e 22 fêmeas ($\pm 69\%$). Todos os adultos apresentaram irregularidades morfológicas.

Os resultados revelaram-se semelhantes aos observados na linha sem antibiótico, o que nos leva a supor que a resposta mais forte por parte da linha 10 está relacionada com um sistema imunitário mais fortalecido na linha selvagem. Alguns autores têm sugerido que os insetos podem desenvolver um tipo de sistema imunitário adquirido.

Nas tabelas 1 e 3 do anexo 2, estão resumidos todos os dados anteriormente apresentados.

6.13 Comparação das larvas da linha 10 e Barcelona com 50, 120 e 180 segundos de exposição de plasma com o controlo

Para percebermos a influência dos diferentes tempos de exposição do plasma no desenvolvimento das larvas, foram comparados os resultados obtidos com os do controlo. Nas larvas avaliou-se a mortalidade, a formação de massas melanóticas e a mortalidade associada à formação dessas massas. Nas pupas foi avaliado a mortalidade. Nos adultos contabilizou-se o número de indivíduos que apresentaram anomalias morfológicas. Os dados foram tratados com o teste estatístico qui quadrado e foi feita a correção de Bonferroni. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. Os valores significativos encontrados após a correção estão assinalados na tabela a negro.

Tabela 4: Resumo dos resultados da comparação da linha 10 e Barcelona com o controlo. Estão representados os valores para a mortalidade das larvas, para a mortalidade das pupas e para a relação mortalidade e desenvolvimento de massas melanóticas.

Descrição	Mortalidade larvas			Mortalidade pupas			Mortalidade e massas melanóticas		
	50 segundos	120 segundos	180 segundos	50 segundos	120 segundos	180 segundos	50 segundos	120 segundos	180 segundos
Linha 10 c/UV									
1º estágio vs controlo <i>Linha 10 s/UV</i>	X ² = 0,864 ns	X ² = 1,628 ns	di	X²= 5,322**	X ² = 5,185 ns	di	X ² = 8,025 ns	X²= 9,224*	di
1º estágio vs controlo <i>Linha 10 c/antibiótico</i>	di	x ² = 4,180 ns	di	di	x ² = 5,185 ns	di	di	x²= 59,000***	di
1º estágio vs controlo <i>Linha Barcelona c/UV</i>	di	di	x ² = 2,911 ns	di	di	x ² =0,012 ns	di	di	x ² = 67,686***
1º estágio vs controlo <i>Linha Barcelona s/UV</i>	x²=10,909**		di	x ² = 0,630 ns	di	di	x²= 9,804*	di	di
1º estágio vs controlo	di	x²= 31,910***	x²= 29,939***	di	di	x²=11,650*	di	x²= 49,896***	x²= 68,072***
Linha 10 c/UV									
2º estágio vs controlo <i>Linha 10 s/UV</i>	X ² = 6,595 ns	di	di	X²= 15,270**	di	di	X ² = 30,782***	di	di
2º estágio vs controlo <i>Linha 10 c/antibiótico</i>	di	di	di	di	di	di	di	di	di
2º estágio <i>Linha Barcelona c/UV</i>	di	di	x²= 114,489***	di	di	x²= 18,011***	di	di	x²= 14,502***
2º estágio <i>Linha Barcelona s/UV</i>	x²= 21,515***	di	di	x ² = 5,679 ns	di	di	x²= 15,938***	di	di
2º estágio	x ² = 7,104 ns	x²= 15,294**	x²= 31,989***	x ² = 7,809 ns	x²= 45,096***	x ² = 6,641 ns	x²= 16,000**	x²= 13,632**	x²= 23,804***
Linha 10 c/UV									
3º estágio vs controlo <i>Linha 10 s/UV</i>	X²= 30,907***	X ² = 4,995 ns	di	X ² = 0,051 ns	X ² = 0,968 ns	di	X²= 21,613***	X ² = 5,259 ns	di
3º estágio vs controlo <i>Linha 10 c/antibiótico</i>	di	x ² = 4,995 ns	di	di	X ² = 0,325 ns	di	di	di	di
3º estágio vs controlo <i>Linha Barcelona c/UV</i>	di	di	x²= 79,632***	di	di	x²= 29,147***	di	di	X ² = 8,840 ns
3º estágio vs controlo <i>Linha Barcelona s/UV</i>	x ² = 0,031 ns	x ² = 24,973***	di	x²= 29,682***	x ² = 6,802 ns	di	x ² = 2,357 ns	x ² = 0,226 ns	di
3º estágio vs controlo	x ² = 1,047 ns	x ² = 1,245 ns	x ² = 0,830 ns	x ² = 3,436 ns	x ² = 6,692 ns	x²= 8,976*	x ² = 0,052 ns	x ² = 0,037 ns	x ² = 1,216 ns

Legenda: di, dados insuficientes; ns, não significativo; c/UV, com ultra violeta; s/UV, sem ultra violeta;
* 0,01<p<0,05; ** 0,001<p<0,01; *** p<0,001.

Tabela 5: Resumo dos resultados relativamente à formação de massas melanóticas das larvas vivas e anomalias nos adultos, comparando a linha 10 e Barcelona com o controlo.

Descrição	Formação massas melanóticas (larvas vivas)			Anomalias adultos		
	50 segundos	120 segundos	180 segundos	50 segundos	120 segundos	180 segundos
Linha 10 c/UV 1º estágio vs controlo	$\chi^2 = 22,923^{***}$	$\chi^2 = 10,406$ ns	di	$\chi^2 = 8,182$ ns	$\chi^2 = 8,779^*$	di
Linha 10 s/UV 1º estágio vs controlo	di	$\chi^2 = 59,000^{***}$	di	di	$\chi^2 = 13,388^{**}$	di
Linha 10 antibiotico 1º estágio vs controlo	di	di	$\chi^2 = 10,0407^*$	di	di	$\chi^2 = 34,043^{***}$
Linha Barcelona c/UV 1º estágio vs controlo	di	di	di	$\chi^2 = 9,804$ ns	di	di
Linha Barcelona s/UV 1º estágio vs controlo	di	$\chi^2 = 14,504^{**}$	$\chi^2 = 25,088^{***}$	di	$\chi^2 = 17,320^{***}$	$\chi^2 = 15,889^{***}$
Linha 10 c/UV 2º estágio vs controlo	$\chi^2 = 22,481^{***}$	di	di	$\chi^2 = 14,853^{**}$	di	di
Linha 10 s/UV 2º estágio vs controlo	di	di	di	di	di	di
Linha 10 antibiotico 2º estágio vs controlo	di	di	$\chi^2 = 167,115^{***}$	di	di	$\chi^2 = 28,886^{***}$
Linha Barcelona c/UV 2º estágio vs controlo	$\chi^2 = 8,601$ ns	di	di	$\chi^2 = 6,364$ ns	di	di
Linha Barcelona s/UV 2º estágio vs controlo	$\chi^2 = 15,963^{***}$	$\chi^2 = 13,451^{**}$	$\chi^2 = 20,246^{***}$	$\chi^2 = 26,929^{***}$	$\chi^2 = 5,641$ ns	$\chi^2 = 33,225^{***}$
Linha 10 c/UV 3º estágio vs controlo	$\chi^2 = 23,414^{***}$	di	di	$\chi^2 = 25,240^{***}$	$\chi^2 = 4,995$ ns	di
Linha 10 s/UV 3º estágio vs controlo	di	$\chi^2 = 25,083^{***}$	di	di	di	di
Linha 10 antibiotico 3º estágio vs controlo	di	di	$\chi^2 = 8,840^*$	di	di	$\chi^2 = 1,440$ ns
Linha Barcelona c/UV 3.º estágio vs controlo	$\chi^2 = 20,415^{***}$	$\chi^2 = 54,542^{***}$	di	$\chi^2 = 29,410^{***}$	$\chi^2 = 45,262^{***}$	di
Linha Barcelona s/UV 3.º estágio vs controlo	$\chi^2 = 17,224^{***}$	$\chi^2 = 11,361^*$	$\chi^2 = 13,287^{**}$	$\chi^2 = 45,262^{***}$	$\chi^2 = 25,308^{***}$	$\chi^2 = 19,126^{***}$

Legenda: di, dados insuficientes; ns, não significativo; c/UV, com ultra violeta; s/UV, sem ultra violeta;

* $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.14 Deteção das anomalias morfológicas e comportamentais após exposição

Verificou-se que as anomalias das larvas (comportamentais, no tamanho e forma, no sistema respiratório, no corpo gordo, no desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas, nas mudas e na tonalidade das larvas) detetadas em ambas as linhas testadas eram comuns, indicando um padrão nos efeitos da exposição ao PNTAP, independentemente do estágio de desenvolvimento ou do tempo de exposição. O mesmo se verificou com as anomalias das pupas (o fenómeno de criptocefalia, as patas troças e inclinadas, o desenvolvimento de melanismos, a forma do corpo, o aparato

bucal, nos aspiráculos, na posição do corpo, no interior do pupário e nas diferenças de tamanho) e dos adultos (posição da cabeça em relação ao tórax, nas asas, nas patas, na pigmentação e no tamanho do corpo). Por esta razão, as alterações observadas vão ser descritas sem referir estágio ou linha a que pertencem.

A descrição começa com a fase larval e vai progredindo para a fase de pupa até chegar ao adulto.

6.15 Anomalias detetadas nas larvas

6.15.1 Anomalias no comportamento

Após exposição, algumas das larvas, independentemente do estágio de desenvolvimento, quando eram transferidas para o meio fresco não entravam na comida para se alimentarem, como era de esperar. Ficavam a vaguear pela superfície, com um movimento de deslocamento e rotação da cabeça diferente do normal, chegando a sair da caixa de *Petri*. Verificou-se que passadas 24 horas, algumas podiam recuperar e tinham um comportamento normal, outras acabavam por morrer ou então continuavam com esse comportamento de não alimentação e de vaguear pela caixa por 18/20 dias, ou mais. Geralmente iam adquirindo gradualmente uma aparência compactada. Essas larvas acabavam por morrer, ou então faziam um tipo de pupa com grandes anomalias morfológicas (ver ponto 6.17.8). Verificou-se que nessas larvas, o desenvolvimento durante o 3.º estágio larval era significativamente atrasado, tendo-se chegado a acompanhar e a registar o comportamento de larvas que sobreviveram até 30 dias após exposição.

6.15.2 Anomalias no tamanho e forma do corpo das larvas

Verificou-se que algumas das larvas descritas anteriormente não cresciam; não chegavam a completar o 3.º estágio de desenvolvimento. O seu corpo ficava compactado e eram mais pequenas quando comparadas com o controlo da mesma idade. Geralmente, nessas larvas o sistema traqueal apresentava-se torcido, podendo apresentar zona de rutura. Após a morte, estas larvas estavam todas compactadas e quase sempre com uma posição da boca invertida. Algumas das alterações observadas na forma e tamanho das larvas podem ser vista na figura 14.



Figura 14: Larvas compactadas: a) larva de 3.^o estágio controle, as setas indicam os aspiráculos anteriores e posteriores não melanizados; b) larva viva com 16 dias após exposição. A seta preta indica os aspiráculos posteriores não melanizados; c) larvas mortas com 16 dias após exposição, 1- larva com massa melanótica interna mas com tamanho normal, 2-3- larvas mortas compactadas; d-e) larvas mortas compactadas e com a posição da boca invertida assinalado com as setas pretas, 1- aspiráculos anteriores melanizados, 2- aspiráculos posteriores melanizados.

6.15.3 Anomalias no sistema respiratório (traqueia e aspiráculos)

Em algumas das larvas descritas anteriormente foi observado que tanto as traqueias principais como as laterais estavam partidas em várias zonas. Este efeito chegou a ser observado 30 minutos após a exposição, mas por vezes surgia só algumas horas ou mesmo dias após a exposição ser feita. Os aspiráculos anteriores e posteriores estavam, por vezes, total ou parcialmente melanizados (figura 15).

Algumas larvas apresentavam movimentos lentos, ficando por vezes com uma posição imóvel por 2-3 dias. Após este período, podia ser observado ao longo da larva manchas melanóticas, bem como que os tecidos internos começavam a perder a sua integridade. Outras apresentavam anomalias no aparato bucal, paravam de comer, o tamanho ficava compactado, e por vezes tinham uma curvatura para um dos lados até que finalmente morriam.

As larvas onde os aspiráculos anteriores e posteriores apresentavam-se total ou parcialmente melanizados (figura 16), podiam morrer durante o seu desenvolvimento, mas por vezes desenvolviam-se até formar pupa. Algumas dessas pupas podiam chegar a eclodir como adulto, enquanto outras morreram durante a fase pupal. Estes acontecimentos podem sugerir que a melanização dos aspiráculos larvais pode não ser letal.

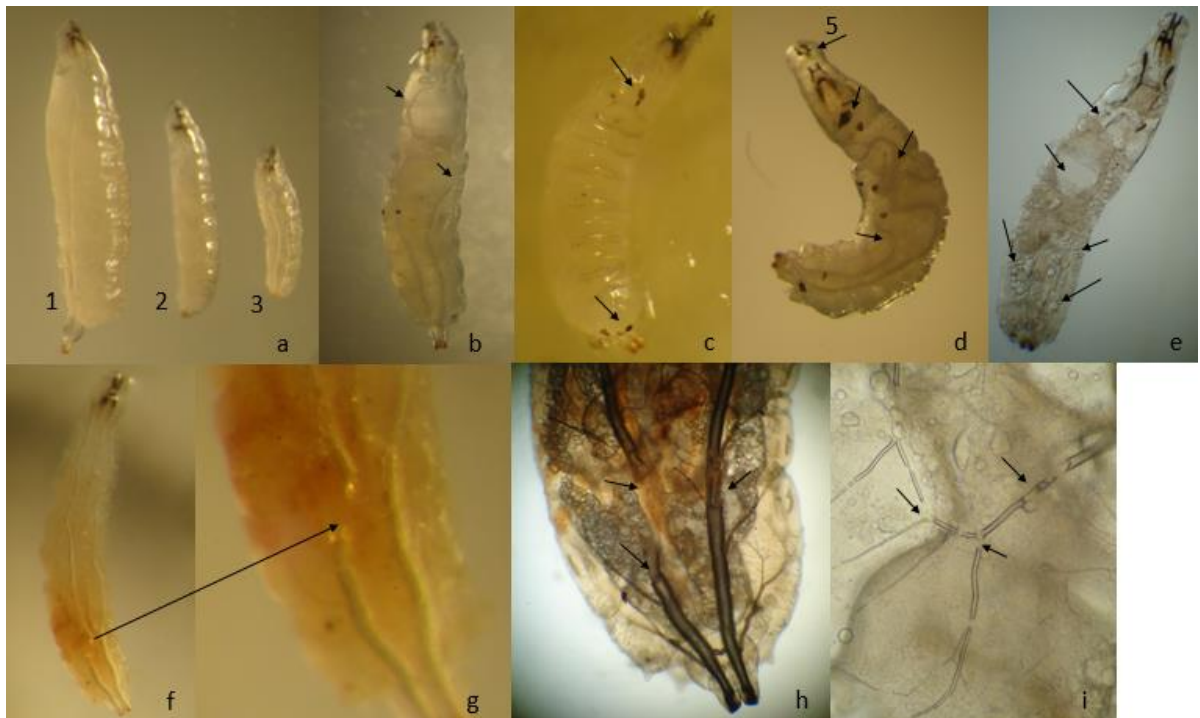


Figura 15: Imagens das larvas com anomalia no tamanho, na forma, na gordura corporal e na forma do corpo após exposição. Imagens estereoscópio e as duas imagens finais são microscópicas: a) comparação do tamanho das larvas com os mesmos tempos de desenvolvimento: 1-larva tamanho normal, 2-larva com 10 dias após exposição, 3-larva com 18 dias após exposição; b) larva com traqueias torcidas assinalado com as setas pretas; c) desenvolvimento de melanismos ou tecidos necróticos 10 dias após a exposição; d) larva com curvatura para um dos lados, compactada, traqueias tortas, posição do aparato bucal anormal assinalado com a seta; e) imagem onde se pode ver, assinalado com setas pretas, as zonas de desintegração dos tecidos internos; f) imagem de uma larva com traqueias partidas; g) ampliação da zona de traqueia partida; h) imagem microscópica 10x de uma larva com a traqueia dorsal partida assinalada com as setas pretas; i) imagem 40x de traqueias laterais partidas, assinaladas com as setas pretas.



Figura 16: Imagens de diferentes graus de melanização observados nas larvas após exposição: a) larva de 3.º estágio com algumas zonas dos aspiráculos anteriores melanizados, assinalados com as setas pretas; b) larva de 3.º estágio com os aspiráculos anteriores completamente melanizados; c) larva de 2.º estágio com os aspiráculos anteriores completamente melanizados, assinalados com as setas pretas; d) imagem de uma larva de 3.º estágio com outro padrão de melanização; e) imagem onde se pode observar uma faixa melanizada nos aspiráculos anteriores, a seta maior indica uma ampliação 40x desse padrão; f) imagem onde se observa a melanização dos aspiráculos anteriores com uma posição anormal, assinalado com as setas pretas; g) larva com melanização dos aspiráculos posteriores.

6.15.4 Anomalias no corpo gordo (fat body)

As anomalias a nível do corpo gordo foram observadas na grande maioria das larvas mortas, mas também em algumas das larvas vivas. Apresentavam desintegração do corpo gordo, tendo sido observadas muitas gotículas de gordura soltas em todo o corpo das larvas. Foram detetadas diferentes tonalidades nas gotículas de gordura, que iam do amarelo a uma cor acastanhada, sugerindo que as diferentes tonalidades observadas poderiam estar relacionadas com diferentes estados de oxidação da gordura (figura 17).

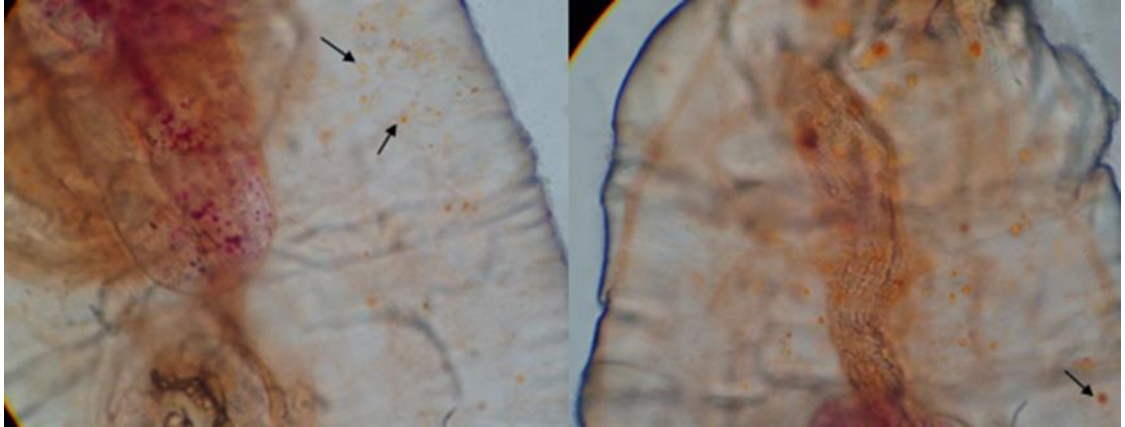


Figura 17: Imagens microscópicas de diferentes tonalidades da gordura corporal da larva. Foram observadas diferentes tonalidades nas vesículas de gordura no interior do corpo da larva, assinalado com as setas pretas 40x.

6.15.5 Melanismo/Massa melanótica desenvolvidas pelas larvas

Nas horas seguintes à exposição algumas larvas começaram a desenvolver massas melanóticas internas e alguns melanismos subcuticulares e cuticulares. Esta reação chegou a ser observada 30 minutos após a exposição. Estes melanismos/massas melanóticas continuavam a desenvolver-se, quer em tamanho quer em número.

Verificou-se que sempre que as massas melanóticas estavam situadas ao nível da cabeça ou aparato bucal, a larva acabava por morrer. Na sua grande maioria, essas massas situavam-se na metade inferior do corpo com predominância para a zona genitália, mas também foram detetadas massas melanóticas na metade superior do corpo, as quais estavam umas vezes soltas na hemolinfa, com movimentos ascendentes e descendentes, e outras vezes estavam fixas em determinada zona ou órgão. Algumas destas larvas acabavam por morrer. Nas larvas mortas eram visíveis as zonas com as massas melanóticas; ou então o corpo estava completamente melanizado.

Esses melanismos/massas melanóticas por vezes desenvolviam-se de tal modo que levava a uma explosão “puf” do corpo da larva. A zona de explosão das larvas verificava-se quase sempre do lado direito, ligeiramente abaixo da metade do corpo (figuras 18 e 19). Por outro lado, algumas larvas, mesmo formando massas melanóticas, desenvolviam-se até formar uma pupa.



Figura 18: Imagens estereoscópicas de larvas vivas com o desenvolvimento de massas melanóticas: a) zonas de grandes massas melanóticas internas na zona genitália e alguns melanismos mais pequenos assinalados com as setas pretas; b) larva com uma grande massa melanótica interna na metade inferior do corpo; c) larva com massas melanóticas internas situadas na metade superior do corpo; d) larva com melanismos cuticulares e subcuticulares na zona genitália; e) larva com vários melanismos subcuticulares na zona genitália assinalados com as setas pretas.

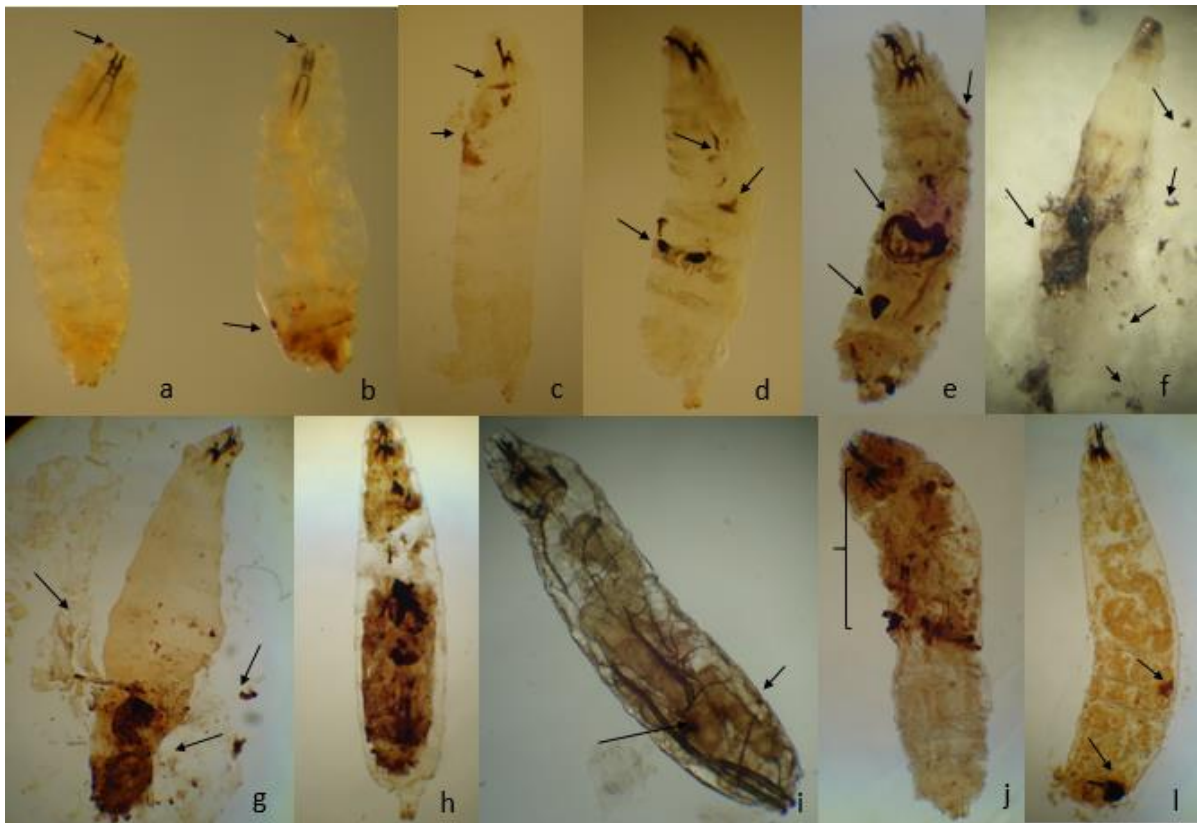


Figura 19: larvas mortas apresentando diferentes tipos de melanismos: a) larvas com zonas de melanismos na boca assinalado com as setas pretas; b) larva com melanismo na boca e genitália; c) larva com melanismo na zona da cabeça assinalado com as setas pretas; d) larva morta com melanismo na metade superior do corpo; e) larva com massas melanóticas internas, espalhadas por todo o corpo; f-g) larvas mortas com melanização generalizada e com o corpo espalhado em redor “puf”; h) larva com massas melanóticas afetando alguns órgãos; i) larva com massas melanóticas afetando a integridade das traqueias assinalado com as setas pretas; j) larva com o corpo todo condensado na metade superior e com vários melanismos; l) larva com massa melanótica na zona genitália e alterações da gordura corporal.

6.15.6 Anomalias nas mudas entre estádios larvares

A observação microscópica revelou existirem anomalias a nível das mudas entre os estádios larvais.

Com efeito, quando as larvas mortas foram observadas ao microscópio foram encontradas larvas que tinham morrido entre dois estádios larvais ficando entre o 2.º e o 3.º estágio, mostrando defeitos no processo de muda larval. Foram observados dois tipos de espiráculos anteriores, os de 2.º estágio e os de 3.º estágio, e dois tipos de mandíbulas de 2.º e 3.º estágio. Também parecem reter a cutícula do estágio anterior, para além da cutícula recém-formada, pois foram observadas algumas larvas que continham a cutícula “velha” agarrada no aparato bucal. Estas observações levam a sugerir que nessas larvas o processo de muda falhou e talvez acabaram por ficar presas durante o processo de muda (figura 20).

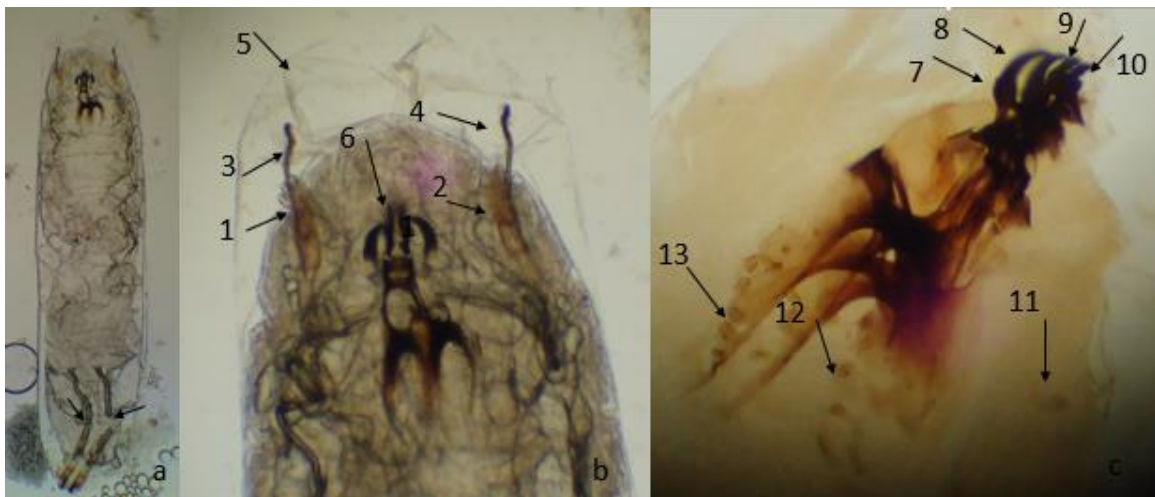


Figura 20: Imagens microscópicas das anomalias observadas nas mudas das larvas: a) imagem 10x da larva com anomalias na muda com traqueias partidas assinaladas com as setas pretas; b) imagem ampliada 20x da parte superior da cabeça da larva; 1 e 2 assinala os aspiráculos superiores característicos de 3.º estágio; 3 e 4 assinala os aspiráculos anteriores característico de 2.º estágio; 5 assinala a retenção da cutícula velha; 6 assinala a duplicação das mandíbulas; c) uma imagem ampliada 40x da cabeça de uma larva que apresentou anomalias durante o processo de muda; 7 e 8 assinalam a mandíbula de 3.º estágio; 9 e 10 assinala a mandíbula de 2.º estágio; 11 assinala o aspiráculo anterior de 2.º estágio; 12 e 13 assinalam os aspiráculos anteriores de 3.º estágio.

6.15.7 Anomalias na tonalidade das larvas

Para além das anomalias descritas anteriormente, verificou-se que algumas larvas após a exposição desenvolviam uma tonalidade cor-de-rosa. Depois de fixadas e observadas ao microscópio, verificou-se que essa cor devia-se à presença de pigmentos vermelhos. Esses pigmentos foram observados na hemolinfa, no tecido gordo, no sistema traqueal, no sistema digestivo, na musculatura do aparato bucal e nos tubos malpighianos (figura 21). Essas tonalidades chegaram a ser detetadas em larvas vivas, mas que na sua grande maioria acabavam por morrer. Quando alguma dessas larvas

chegava a pupa, esta apresentava uma tonalidade cor-de-rosa muito claro. Quando eclodia em adulto, estes apresentavam pigmentos cor-de-rosa subcuticulares (figura 30 i). Em 358 larvas observadas, 23 ($\pm 7\%$) apresentavam esta tonalidade.

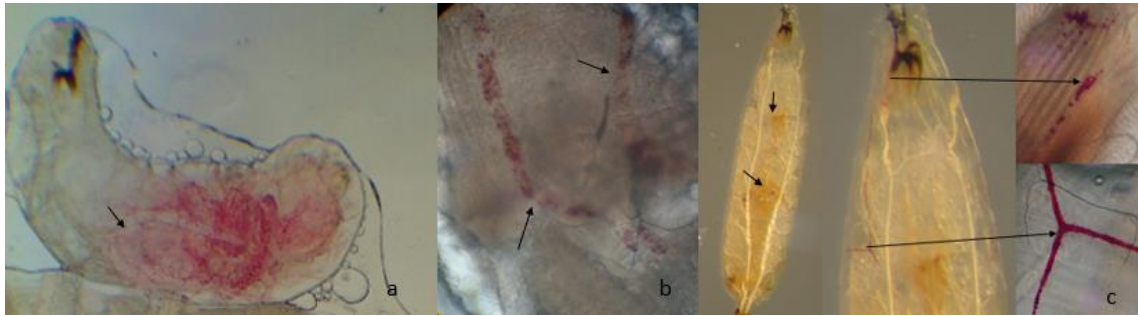


Figura 21: Imagens microscópicas de larvas que apresentaram pigmentos cor-de-rosa: a) larva com pigmentos cor-de-rosa na zona dos tubos malpighianos, aparelho digestivo e hemolinfa, assinalado com a seta preta; b) larva com a pigmentação colorida no interior dos tubos malpighianos; c) nesta imagem pode ser observado uma larva com pigmentos em diferentes zonas do corpo, nas traqueias e nos músculos da faringe. Na imagem mais à esquerda a larva de corpo completo com zona de pigmentos cor-de-rosa assinalados com as setas pretas. Na imagem mais à direita as setas indicam as traqueias e os músculos da traqueia com pigmentação colorida 40x.

6.16 Anomalias das pupas

As larvas que apresentaram atraso no 3.º estágio de desenvolvimento e que sobreviveram, acabavam por formar um tipo de pré-pupa com grandes anomalias morfológicas. Estas larvas formaram um pseudo pupário sem o característico encurtamento e eversão dos espiráculos anteriores, acabando por morrer nas 24 horas seguintes. Outras formavam pré-pupas com grandes anomalias morfológicas na forma e no tamanho. Esses defeitos incluíam falha na eversão dos espiráculos anteriores e retenção da forma da larva alongado e por vezes com uma curvatura para um dos lados. Também foram observadas anomalias na forma e no tamanho da pupa. As larvas com melanismos sobreviventes fizeram diferentes tipos de pupas a nível da forma e/ou do tamanho (figura 22).

Algumas destas pupas morreram em fases iniciais do desenvolvimento pupal e não era visível o desenvolvimento de qualquer órgão. Outras acabavam por morrer numa fase mais tardia. Por vezes não tinham segmentação do abdómen e eram visíveis grandes células amarelas de gordura, que pareciam ser células do tecido que flutuavam na cavidade corporal da pupa. Outras vezes não desenvolviam os órgãos e o corpo estava completamente ocupado com a gordura.

Após dissecação foram observados indivíduos que tinham começado a desenvolver patas, mas não tinham olhos, revelando que a pupa desenvolveu até à fase P5, que acontece 12 a 25 horas após a formação do pupário. Outras ficaram na fase P4 e não chegaram a expulsar a armadura bucal. Nestas pupas verificou-se que saíram algumas massas melanóticas que flutuavam livremente na cavidade corporal, sendo que também estas pupas não apresentavam nenhum dos órgãos desenvolvidos e o corpo apresentava-se como uma massa gordurosa que ocupava todo o corpo. No entanto,

outras pupas não foram capazes de expulsar a armadura bucal, mas continuaram a se desenvolver. Foram observadas pupas que apresentavam a armadura presa na cutícula e pigmentação vermelha dos olhos. Esta situação dá-nos a indicação que a pupa sofreu anomalias na fase P4 e não fez a expulsão, mas continuou o seu desenvolvimento até pelo menos à fase P10. É nesta fase que os olhos ficam vermelho brilhante (figura 23).

6.17 Anomalias relacionadas com os discos imaginários

6.17.1 Fenómeno de criptocefalia

Algumas destas pupas apresentaram um fenómeno criptocefálico. Estas pupas por vezes apresentavam desenvolvimento da pigmentação dos olhos. Após dissecação, verificou-se que algumas tinham desenvolvido olhos com pigmentação vermelha no tórax e/ou abdómen (figura 23 e 24). Estes fenótipos poderão estar relacionados com anomalias durante a eversão dos discos imaginais da cabeça e dos olhos. Durante a metamorfose os discos têm que fazer a eversão, o alongamento e a fusão de modo a que as estruturas do adulto sejam formadas corretamente. Verificou-se que essas anomalias podiam ser assimétricas (figura 24 b-c5) ou simétricas (figura 24 d-d5).

6.17.2 Pupas com as patas tortas e inclinadas

Similarmente foram observadas pupas com deformidades na eversão dos discos imaginais das patas e das asas. Estas irregularidades poderão estar relacionadas com a eversão e alongamentos dos discos imaginais durante a metamorfose e os apêndices não ficaram corretamente formados. Muitas vezes as patas tinham uma inclinação para os lados e apresentavam modificações na formação e na segmentação. Foram observadas patas todas enroladas, patas inclinadas e patas assimétricas. Podiam ser muito curtas acompanhando o corpo compactado para cima, ou podiam ter um tamanho intermédio entre o muito curto e o normal. A inclinação podia ser para a direita ou para a esquerda, não apresentando sempre o mesmo padrão de inclinação. Em algumas pupas foi observado que faltava um par de patas ou pelo menos uma das patas (figura 25). As modificações na formação das asas são difíceis de detetar durante o estado pupal devido à compactação da asa no pupário, no entanto podiam ser vistas asas com um tamanho mais curto. Outro tipo de alterações podem ser detetadas posteriormente na fase adulta.

6.17.3 Pupas com melanismos/massas melanóticas

Em algumas pupas era visível o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas que podia ser interno, com formação de massas melanóticas, ou cuticular, que por vezes tinham o aspeto de uma “renda”. Esses melanismos podiam estar situados só numa pequena área, mas por vezes podiam ocupar a quase totalidade do corpo da pupa. Quando a massa melanótica não crescia a pupa desenvolvia-se até eclodir em adulto. Por outro lado, se o melanismo fosse muito grande interferia com o desenvolvimento pupal e o indivíduo não se desenvolvia, acabando por morrer. Após a

dissecação de algumas pupas mortas, foi possível observar alguns órgãos, como por exemplo as patas afetadas com manchas melanóticas (figura 26).

6.17.4 Pupas com anomalias na forma corporal

Também foram identificadas pupas que apresentavam uma forma alongada da larva e tinham uma tonalidade mais clara. Verificou-se que algumas pupas tinham o escurecimento tardio e por vezes o abdómen estava contraído para um dos lados, encontrando-se solto da cutícula do pupário, contendo uma consistência mole. Também foram observadas pupas com uma inclinação para um dos lados, outras tinham a cabeça em forma alongada, onde à sua volta viam-se saliências que faziam lembrar várias “orelhas”. Algumas das pupas moles morriam, mas algumas recuperavam a sua rigidez e desenvolviam-se até eclodir o adulto (figura 26).

6.17.5 Pupas com anomalias no aparato bucal

Foram igualmente detetadas anomalias na posição do aparato bucal da pupa, que podiam estar numa posição completamente torta ou ligeiramente inclinada. Após 4 a 5 dias da formação do pupário, estas pupas não completavam a pupação; não expeliram o aparato bucal e não fizeram a eversão dos componentes cefálicos, não apresentando sinais de invaginação dos discos. Foi observado que se a inclinação do aparato bucal fosse muito acentuada a pupa acabava por morrer, ou então a posição dos olhos ficava comprometida. Se a inclinação fosse ligeira não havia influência no desenvolvimento da pupa (figura 26).

6.17.6 Pupas com anomalias nos espiráculos anteriores e posteriores

Muitas das pupas apresentaram anomalias a nível dos espiráculos anteriores. Por vezes estavam ausentes, evidenciando uma falha na sua eversão. Algumas tinham só um dos espiráculos. Por vezes a posição de ambos estava alterada, apresentando-se em forma de “V”. Outras apresentavam problemas no alongamento destes espiráculos, onde se observava somente a ponta do órgão. Algumas vezes foram observadas irregularidades na posição dos espiráculos posteriores, que apresentavam-se com uma inclinação para um dos lados. As alterações na morfologia dos espiráculos posteriores parecem não ter influência na viabilidade da pupa, pois nunca se revelaram letais. Já no que diz respeito aos espiráculos anteriores, quando a anormalidade era muito severa – como a ausência de um dos espiráculos ou a sua posição – a mesma quase sempre foi letal.

6.17.7 Pupas com anomalias na posição do corpo no interior do pupário

Foi possível observar pupas onde as patas eram mais curtas e o corpo estava todo compactado na zona superior do pupário. Após a dissecação destas pupas, observou-se que na sua maioria os indivíduos apresentavam anomalias nas patas ou nas asas. O contrário também chegou a ser observado, onde as pupas tinham o corpo esticado ao

longo do pupário e não se observava a eversão da cabeça. Foram ainda observadas pupas que apresentavam uma inclinação do corpo para um dos lados e estava separado da cutícula pupal, havendo a formação de ar no interior da cavidade corporal (figura 26). Todas estas pupas acabavam por morrer sem desenvolver qualquer órgão, revelando a letalidade deste fenótipo. De igual modo as pupas que apresentavam o corpo colapsado na parede do pupário acabavam por morrer.

6.17.8 Pupas com diferenças no tamanho

Verificou-se que algumas pupas tinham um tamanho muito mais pequeno que o normal. Da mesma forma, o contrário também chegou a ser observado, onde foram registadas algumas pupas quase "gigantes" (figura 27). Tanto umas como outras desenvolviam-se normalmente. O tamanho da pupa parece não influenciar o seu desenvolvimento.

Também foram observadas pupas com anomalias morfológicas sem apresentarem melanismos.



Figura 22: Imagens estereoscópicas dos vários fenótipos observados nas pupas: a) fenótipo de uma pupa do controlo; b) comparação da forma e do tamanho entre duas pupas de exposição: 1-tamanho normal, 2-tamanho compactado, vista dorsal à esquerda e vista ventral mais à direita; c) pupa com melanismo em forma de renda em todo o corpo; d) pupa com outro padrão de melanização; e-f) pseudo pupário em que a forma faz lembrar a forma de larva. Esta pupa apresenta melanismo interno assinalado com as setas pretas; g) pupa alteração na forma do corpo, vista dorsal e vista ventral; h) pupa com forma de larva, corpo colapsado na parede do pupário e com melanismo na cabeça, sem apresentar aspiráculos anteriores, vista dorsal e vista lateral; i-j) pupa com uma curvatura para um dos lados; l-m) pupas com anomalias na morfologia da cabeça e da posição do corpo.



Figura 23: Nesta figura estão representados alguns dos fenômenos criptocefálicos encontrados nas pupas que morreram antes de eclodir em adulto: a-a1) pupa morta antes de ser dissecada. Vista dorsal e ventral. A posição baixa da cabeça (criptocefálica) está assinalada pela seta preta; a2) a pupa anterior depois de dissecada. As setas mostram a presença do desenvolvimento das patas curtas, corpo condensado para cima e a ausência dos olhos, revelando que esta pupa deve ter morrido entre a fase P5 e P6; b) pupa com melanismo na altura das patas e cabeça baixa, posição ventral; b1) a mesma pupa na posição dorsal, onde se podem observar alguns melanismos; b2) a mesma pupa após dissecação, onde se pode observar a formação das patas, mas com zonas melanizadas. Também se pode ver que a posição do corpo é menos condensado que o anterior; c) pupa criptocefálica, mas com pigmentação vermelha nos olhos; c1-c2) a mesma pupa dissecada após morte numa das fases do desenvolvimento mais avançada. Esta pupa desenvolveu-se até à fase P13, pois apresenta pêlos e asas pretas; d) pupa criptocefálica com pigmentação dos olhos. Esta pupa não fez expulsão da armadura bucal, podemos ver que a armadura bucal ainda está agarrada ao corpo, assinalado com a seta preta; e) pupa que não fez expulsão da armadura bucal e morreu numa das fases iniciais do desenvolvimento. O corpo apresentava-se como um amassa gordurosa e saíram algumas massas melanóticas durante a dissecação. Estes eventos estão assinalados com as setas pretas.



Figura 24: Imagens de fenômenos criptocefálicos que desenvolveram olhos pigmentados no tórax e no abdômen. Pupa antes e depois da dissecação: a) pupa controle; a1) pupa controle dissecada posição dorsal; a2) pupa controle dissecada posição ventral; b) pupa de exposição com fenótipo criptocefálico. A seta preta assinala a posição do olho; b1) vista lateral da mesma pupa, onde se pode observar a posição do olho, assinalado com a seta preta; b2) outra vista lateral onde se pode observar a posição dos dois olhos; b3) imagem da pupa após dissecação, onde se pode observar que um dos olhos desenvolveu-se entre o tórax e o abdômen; c) pupa criptocefálica, onde só se observa um dos olhos, vista dorsal; c1) vista ventral; c2-c4) vista dorsal, ventral e lateral da pupa após dissecação. Podemos verificar que um dos olhos não está na posição; c5) pupa após dissecação do abdômen. Verificou-se que o olho tinha desenvolvido no abdômen; d), d1) imagem de outro tipo criptocefálico encontrado na pupa antes de dissecação, vista dorsal e vista ventral; d2) vista ventral da mesma pupa após dissecação, onde se vê a sombra dos olhos no abdômen; d3), d4) diferentes posições ventrais da pupa. A posição dos olhos está assinalada pelas setas pretas; d5) o corpo do indivíduo foi dissecado, verificando-se que os olhos tinham-se desenvolvido no abdômen.

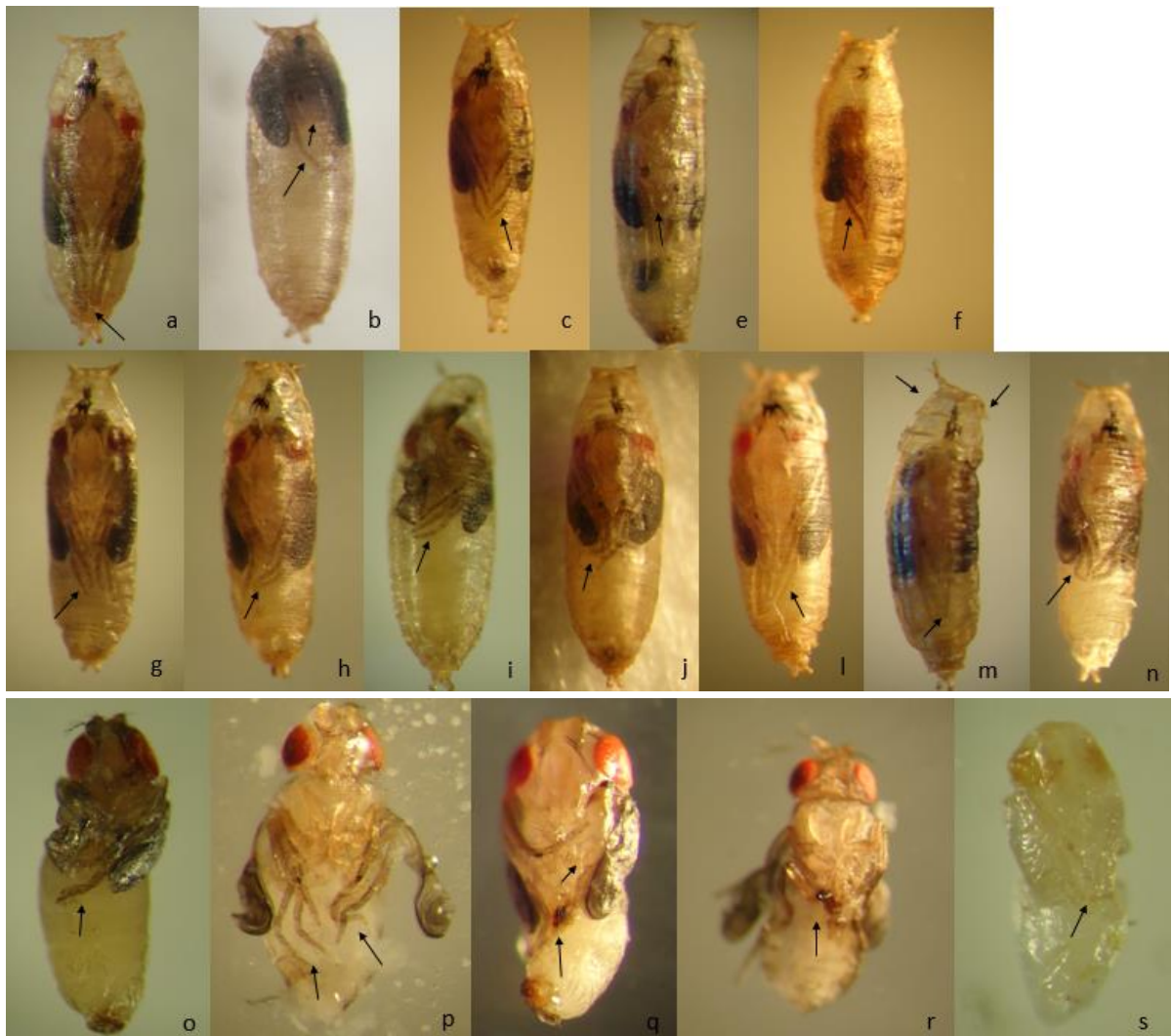


Figura 25: Fenótipos das patas curtas e tortas observadas nas pupas de larvas sobreviventes à exposição: a) pupa do controlo, posição das patas assinalada com a seta preta; b) pupa com o corpo todo condensado na parte superior. Patas muito curtas e inclinadas para a direita; c) pupa com patas curtas e inclinadas para a esquerda; d) pupa com patas curtas e melanismo interno; e) pupa com as patas curtas e curvadas; f) pupa com patas mais curtas e inclinadas para a direita; g) pupa com patas curtas e tortas inclinadas para a esquerda; h) pupa com patas muito curtas, tortas e inclinadas para a esquerda; i) pupa com as patas curtas e enroladas para a esquerda; j) pupa com o corpo em forma de vírgula e com patas curtas; k) pupa com patas curtas e muito tortas; l) pupa dissecada com as patas muito curtas; m) pupa dissecada com as patas tortas e enroladas; n) pupa com patas curtas e melanismo na zona das patas, onde se pode observar que falta um par de patas, assinalado com a seta preta; o) pupa onde faltam patas e as outras estão enroladas; p) pupa dissecada muito jovem, onde se pode observar as patas curtas.



Figura 26: Imagens estereoscópicas das diferentes anomalias morfológicas observados nas pupas: a) pupa do controlo; b) vista dorsal de uma das pupas que apresentaram anomalias nos aspiráculos anteriores e na posição da cabeça. Podemos observar que o corpo está descolado da cutícula e tem ar na cavidade corporal; c) vista ventral das pupas anteriores. Nesta imagem pode ser observado que a pupa não expeliu o aparato bucal, assinalado com a seta preta, e que a cabeça tem uma forma anormal; d) pupa com a morfologia do corporal toda alterada; e) vista ventral de uma pupa com anomalias morfológicas da forma do corpo e aspiráculos anteriores; f) vista dorsal da pupa anterior; g) pupa com a posição dos aspiráculos anteriores em forma de “V”; h-i) pupa mole com anomalias na forma do corpo, onde podemos observar que faltam os aspiráculos anteriores assinalado com a seta preta. Também podemos observar massas melanóticas internas.



Figura 27: os diferentes tamanhos observados nas pupas que resultaram das larvas de exposição: 1) pupa com um tamanho gigante; 2) pupa com um tamanho normal; 3) pupa com um tamanho ligeiramente mais pequeno que o normal; 4) pupa com um tamanho minúsculo.

6.18 Anomalias dos adultos

A observação fenotípica dos 1.032 indivíduos adultos resultantes da exposição das larvas dos diferentes estádios de desenvolvimento e dos vários tempos testados revelou que 304 moscas ($\pm 29\%$) apresentavam anomalias morfológicas. Essas deformidades situavam-se a nível, da cabeça, da forma dos olhos, do tórax, das asas, das patas, da segmentação do abdómen e também da pigmentação do corpo, do tamanho e da forma.

Notou-se que mesmo com alterações morfológicas a nível das patas, das asas, da formação do tórax e dos olhos, alguns indivíduos conseguiram desenvolver-se e eclodir como adultos. No entanto, tinham sempre um período de vida mais curto que os restantes, acabando por morrer 4 a 5 dias após a eclosão.

Foram igualmente registadas algumas anomalias do aparato bucal, que impedia uma alimentação correta. Os indivíduos que apresentaram esse tipo de alteração acabavam por morrer prematuramente.

Foi verificado que alguns adultos morriam durante a eclosão agarrados à cutícula (figura 28-a). Apresentavam quase sempre mal formações a nível das patas ou das asas, ou então em ambas, o que nos faz sugerir que quando a modificação era mais grave, estes indivíduos ficavam privados dos movimentos necessários à eclosão e esta falhava.

Há algumas curiosidades a registar. Por exemplo, foi observado uma fêmea com um pente sexual na pata esquerda, uma fêmea com duplicação do tórax e uma fêmea com uma estrutura anormal junto aos ovários.

6.18.1 Anomalias na posição da cabeça e do tórax

Foram observadas anomalias na posição da cabeça em relação ao tórax. Os olhos tinham irregularidades no tamanho e na forma. Os pêlos do tórax, que podiam ser mais curtos, tortos ou então simplesmente não existir. Foram detetados adultos com o tórax completamente torto, inclinado para um lado. Por vezes parecia ter só metade do tórax, faltando uma das asas. Uma fêmea apresentou duplicação do tórax (figuras 29 e 30).

6.18.2 Anomalias das asas

Em relação às asas, foram observadas modificações na forma, nas nervuras de ligação e no padrão dos pêlos que as rodeiam. Alguns indivíduos não desenvolviam as asas na sua totalidade, estas não abriam completamente ou então eram mais curtas do que o normal. Embora estes fenótipos possam surgir espontaneamente, verificou-se que a sua prevalência foi maior no grupo de exposição, o que sugere que a exposição influenciou a formação das asas (figuras 31 e 32).

6.18.3 Anomalias das patas

Dos vários fenótipos identificados, aqueles que apresentavam alterações da segmentação das patas foi predominante ($\pm 26\%$). Essas anomalias apresentavam diferentes graus de gravidade, indo de ligeiros desvios à normalidade a deformações severas das patas. Foram observados desvios à normalidade quer na segmentação quer nos ângulos de posição, que iam de ligeiros a muito graves. As patas por vezes estavam tortas, curvadas e algumas estavam mesmo enroladas. A irregularidade era quase sempre do lado esquerdo e afetava a 2.^a ou a 3.^a pata. Alguns indivíduos tinham mesmo falta do 2.^o par de patas ou de pelo menos uma das patas.

6.18.4 Anomalias na pigmentação

Foram observados adultos que apresentavam massas pretas em algumas articulações das patas, enquanto outros tinham alterações a nível da pigmentação, apresentando uma tonalidade mais escura do que o esperado (figura 29-g e 33). Similarmente, foram observados adultos com pigmentos cor-de-rosa brilhantes subcuticulares. Essa pigmentação foi mais notória no tórax, na cabeça, em volta dos olhos, nas patas e também no abdómen. O pigmento parece encontrar-se sob a forma de grânulos vermelhos no citoplasma.

No que diz respeito à pigmentação do corpo, verificou-se que por vezes as moscas eram branquinhas, quase sem a cor característica da espécie, ou então apresentavam uma cor mais clara. Estas alterações estavam quase sempre associadas a indivíduos com um tamanho mais pequeno que o normal. Nas fêmeas, estava quase sempre associado a ovários não desenvolvidos. Nos machos verificou-se que alguns não apresentavam a parte final do abdómen escuro, como é característico nesta espécie. Também foram observadas alterações a nível da pigmentação dos testículos, que podiam ter uma tonalidade mais escura ou então mais clara (figura 34). Estas alterações parecem não influenciar a fertilidade do macho, pois quando se observou estes órgãos ao microscópio, foram detetados muitos espermatozóides e com muita mobilidade, dando a indicação de que a fertilidade estava assegurada.

Também foram registadas anomalias no padrão de segmentação do abdómen, que por vezes estava incompleta ou então apresentava algumas bandas fundidas (figura 34).

6.18.5 Melanismos/Massas melanóticas

Alguns adultos apresentaram melanismos/massas melanóticas cuticulares, subcuticulares e internas, no tórax, no abdómen, na cabeça e também nas articulações das patas. Quando foram dissecados, verificou-se que essas massas podiam estar soltas e saíam livremente, ou então estavam associadas a vesículas de gordura. Observou-se massas com diferentes formas e tamanhos. A cor variou entre um castanho claro e o preto. Estas massas melanóticas provavelmente desenvolveram-se durante a fase larval, e como não influenciaram a viabilidade mantiveram-se na cavidade corporal até à fase

adulta (figuras 30-e,g e 35). Foram observados alguns indivíduos que tinham melanismo na boca. Alguns apresentavam muitas vesículas de gordura solta que saíam do corpo.

6.18.6 Anomalias no tamanho do corpo

Na comparação de tamanhos dos adultos, verificou-se que o tamanho de alguns indivíduos variava entre o normal e subnormal (maior ou menor) (figura 36).



Figura 28: a) Adulto que não conseguiu eclodir corretamente, as patas com anomalias ficaram agarradas à cutícula; b) adulto que após dissecação saíram muitas cutículas de gordura que estavam soltas na cavidade corporal.

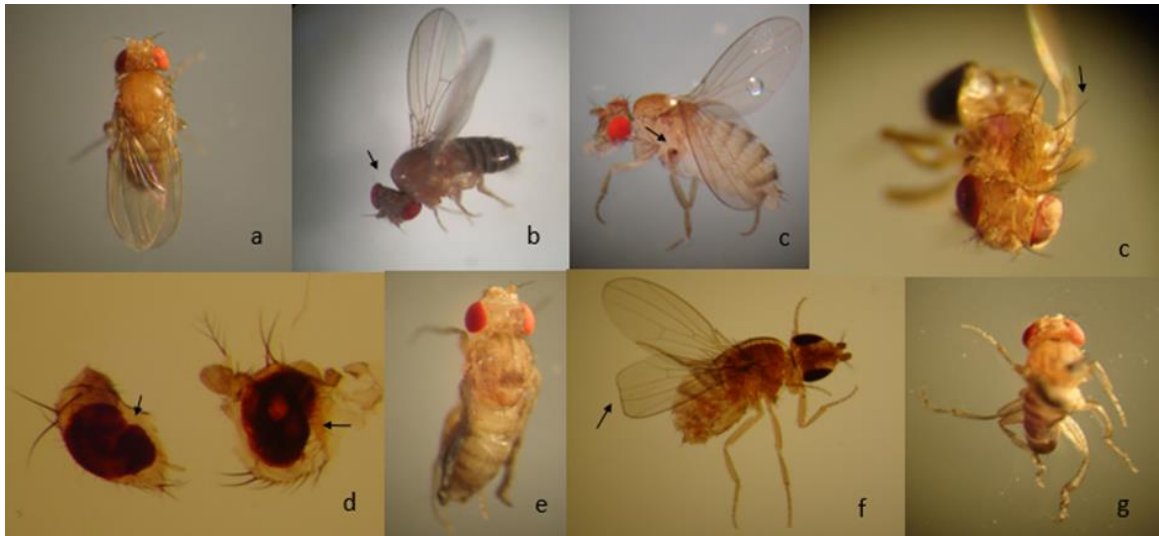


Figura 29: Imagens de algumas das anomalias apresentadas pelos adultos do grupo experimental na posição da cabeça, dos olhos, da asas e das patas: a) adulto de controlo; b) adulto com anomalias na posição da cabeça, assinalado com a seta preta; b) adulto com anomalias na posição da cabeça e com uma das patas muito curta, assinalado com a seta preta; c) indivíduo com alteração nos pêlos do tórax; exemplo de anomalias da forma dos olhos; e) adulto com o corpo em forma de vírgula; f) um adulto com assimetria das asas, uma com a forma e o tamanho normal e a outra mais pequena e quadrada; g) um adulto com a formação e segmentação dos 3 pares de patas completamente alteradas.



Figura 30: Fenótipos observados nos adultos de *Drosophila melanogaster* resultantes das larvas de exposição: a) adulto de controlo; b-f) adultos com diferentes anomalias do tórax, onde se pode observar que falta uma das asas, assinalado com a seta preta; g) adulto com massas melanóticas internas no abdómen; h) adulto com massas melanóticas internas no tórax e abdómen, assinalado com as setas pretas; i) adulto com pigmentos vermelhos nas patas, na cabeça, no tórax e abdómen, assinalado com as setas pretas.

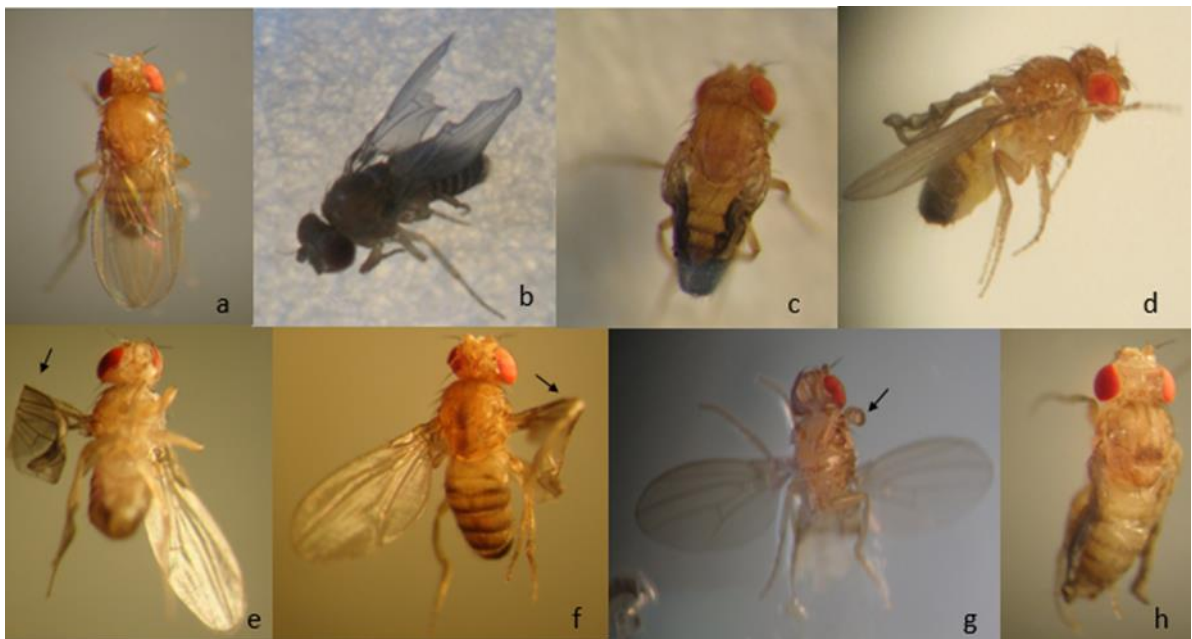


Figura 31: Adultos com diferentes anomalias das asas: a) controlo; b-f) diferentes tipos de alterações verificadas nas asas; g) adulto que apresentou uma pequena asa no 1.º par de patas. A asa está assinalada com a seta preta; h) adulto com as asas não desenvolvidas e com o corpo com uma curvatura para um dos lados.

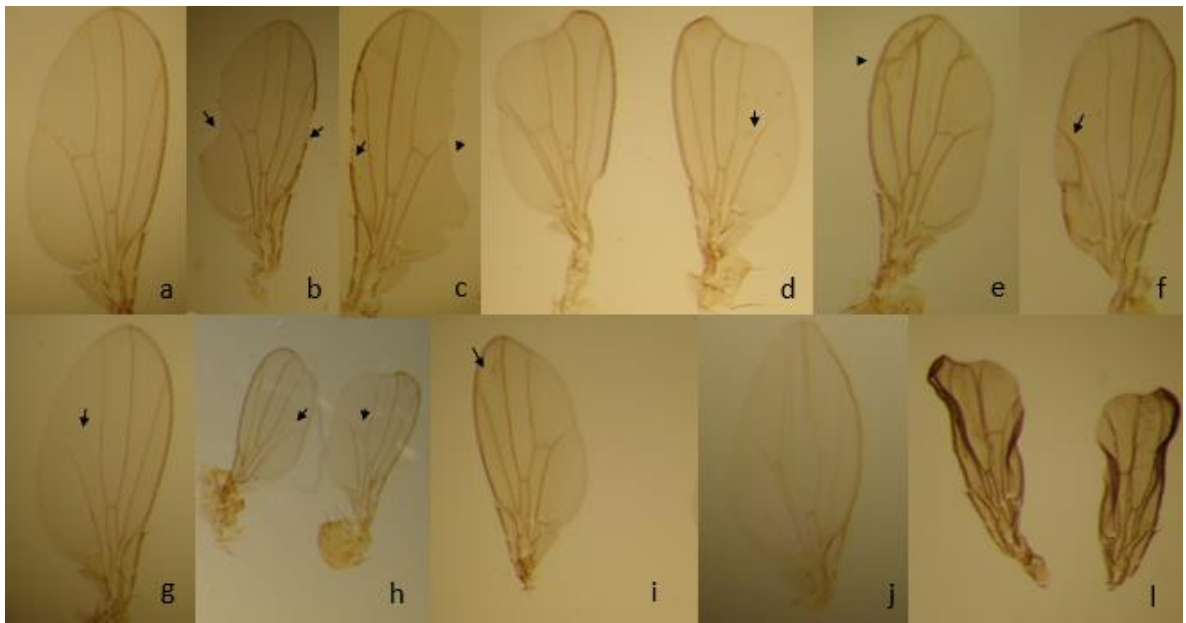


Figura 32: Nesta imagem podem ser observadas as várias alterações observadas nas asas: a) asa de controlo; b-c) as setas pretas assinalam a alteração no padrão dos pêlos à volta da asa. Também pode ser observado que o formato das asas está alterado; d-i) diferentes alterações registadas a nível das nervuras das asas; j-l) asas com a forma alterada.



Figura 33: Imagem onde se podem observar diferentes anomalias registadas nas patas: a) patas de controlo; b) 3.ª e 2.ª par de patas com anomalias na segmentação; b) patas onde se pode ver melanismos da 3.ª pata e a falta de uma das patas do lado direito; c) patas com melanismo e mal formação de uma das patas, assinalado com a seta. Não foi possível determinar se pertencia à 2 ou à 3 pata; d- p) diferentes anomalias na forma e segmentação; q-r) manchas melanóticas nas articulações, assinaladas com as setas pretas.

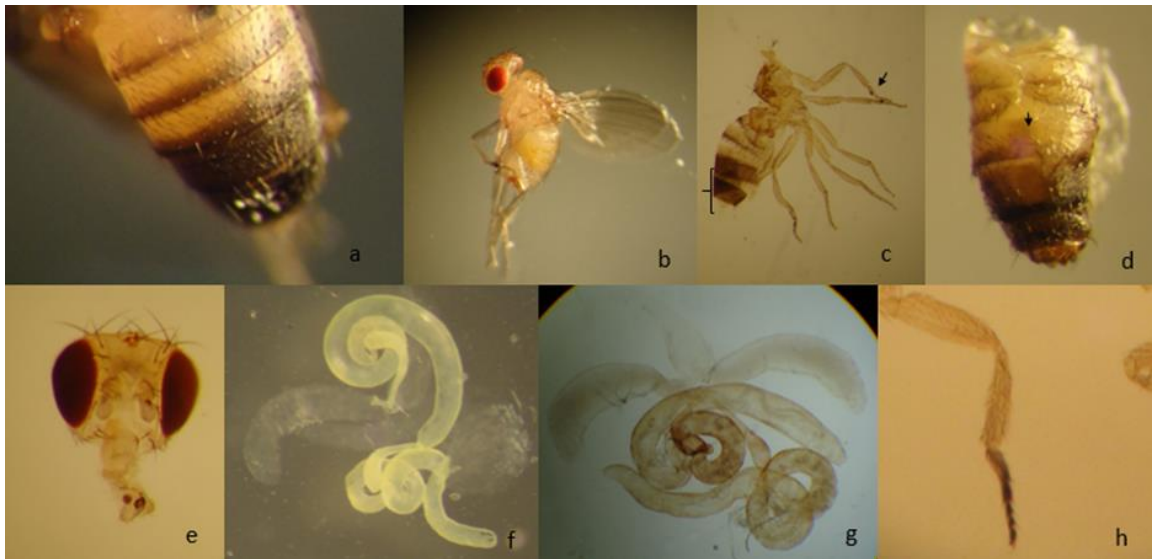


Figura 34: Anomalias da pigmentação nos adultos. Na figura podemos ver diferentes zonas do corpo da mosca onde se observou alterações da pigmentação: a) abdómen de um macho com o padrão normal de pigmentação; b) macho completamente despigmentado; c) um macho, pente sexual assinalado com a seta preta, com padrão de pigmentação alterado no final do abdómen, assinalado com a chave; d) abdómen com o padrão das listas pretas anormal, assinalado com a seta preta; e) manchas melanóticas na boca de um indivíduo adulto; f) imagem dos testículos de um macho do controlo; g) imagem dos testículos com alteração da pigmentação de um indivíduo do grupo experimental; h) pata com alteração da pigmentação nos segmentos finais.

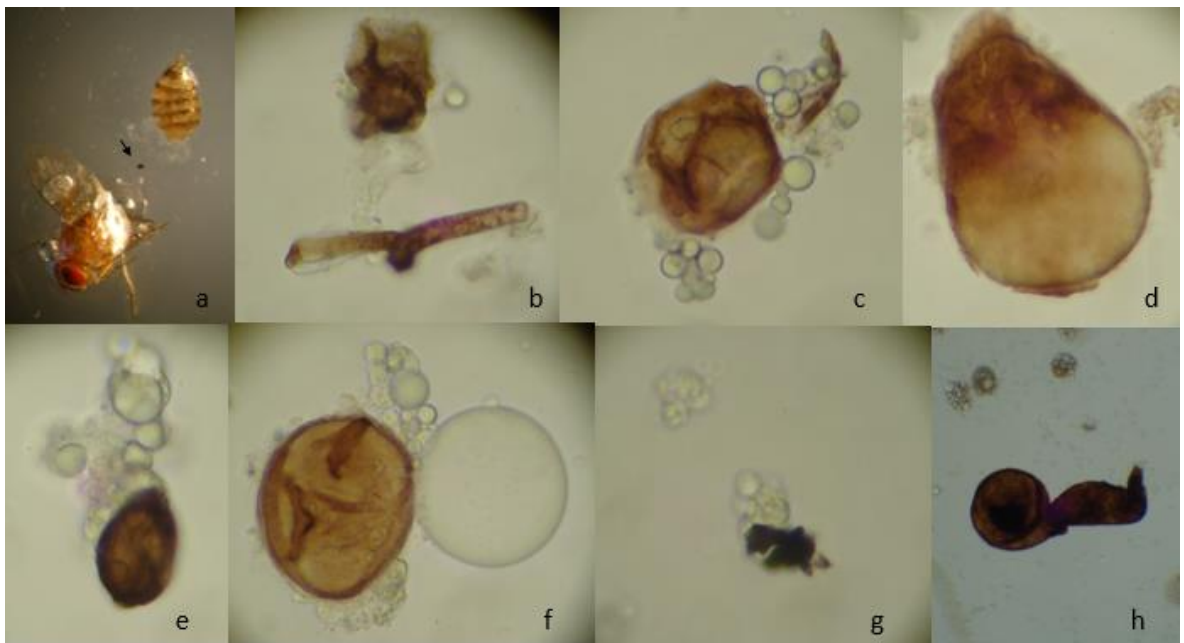


Figura 35: Imagens das diferentes formas de massas melanóticas que saíram durante a dissecação dos adultos: a) dissecação de um adulto com a respetiva massa melanótica; b-g) massas melanóticas com diferentes tonalidades e formas associadas a vesículas de gordura 40x; h) estrutura melanótica solta sem vesículas de gordura 40x.



Figura 36: Comparação de tamanhos. Nesta imagem é possível ver as diferenças de tamanhos encontrados nos indivíduos adultos. Na imagem da direita vemos uma fêmea grande e três machos com diferentes tamanhos. Na imagem mais à esquerda podemos ver dois machos, um minúsculo e um normal.

6.19 Curiosidades

Há algumas curiosidades a registrar. Foi observado uma fêmea com um pente sexual na pata esquerda, uma fêmea com duplicação do tórax e uma fêmea com uma estrutura anormal junto aos ovários. Algumas anomalias foram observadas uma só vez, mas não deixaram de ser bastante interessantes (figura 37).



Figura 37: Curiosidades: a) fêmea que apresentou uma estrutura anormal junto aos ovários, assinalado com a seta preta; b) fêmea com duplicação do tórax; c) fêmea com um pente sexual na pata esquerda, 1-ovos, 2-pente sexual, a seta preta indica a ampliação da pata.

7 Discussão

7.1 Otimização dos tempos de exposição

Nos ensaios iniciais para a otimização dos tempos de exposição, verificou-se que as larvas que foram expostas a 30 e 40 segundos de PNTPA não apresentaram anomalias visíveis no seu desenvolvimento. Estes resultados sugerem que estes tempos de exposição não influenciam o desenvolvimento larval. Por este motivo passou-se a testar o tempo de 50 segundos, que já influenciou o desenvolvimento pois as larvas apresentaram melanismos/massas melanóticas e os adultos algumas anomalias morfológicas. Por este motivo, este tempo foi escolhido para ser o tempo mínimo usado durante este trabalho. A partir daí o tempo foi aumentado para 60, 70 e 100 segundos para verificar o seu efeito na viabilidade e intensidade das anomalias.

Quando o tempo de exposição aumentou para os 60 segundos, verificou-se atrasos no desenvolvimento larval.

Nesta fase do trabalho, os resultados obtidos sugeriam que a viabilidade das larvas poderia estar dependente do tempo de exposição. De qualquer modo, como as larvas não tinham sido separadas por estágio de desenvolvimento, não podíamos afirmar que seria só a exposição a influenciar a viabilidade.

Após a separação das larvas por estágio de desenvolvimento, os dados estatísticos revelaram que 50 segundos de exposição não seria o suficiente para influenciar a viabilidade das larvas, mas que, por outro lado, já era suficiente para influenciar o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas. Este resultado poderia indicar que este tempo de exposição faz acionar o sistema de defesa anti *stress* do animal, após o qual a larva responde desenvolvendo as massas melanóticas, mas que estas poderão não ser sempre letais.

Os resultados inesperados para os 60 e 70 segundos – onde se verificou que, contrariamente ao esperado, o tempo de exposição não tinha influenciado a viabilidade das larvas – poderão estar relacionados com o tamanho da amostra ou com alguns erros que aconteceram durante a exposição, como por exemplo a incorreta posição da caixa, a tampa mal colocada ou mesmo a incorreta ligação dos elétrodos.

No entanto, os tempos testados revelaram que a exposição das larvas ao plasma evidenciava um padrão nos resultados observados. As larvas respondiam ao *stress* acionando um sistema de defesa que poderia estar envolvido na formação dos melanismos/massas melanóticas observados. As posteriores deformidades detetadas durante o desenvolvimento larval e pupal, assim como as anormalidades morfológicas detetadas nos adultos, poderão estar relacionadas com as alterações provocadas pelo plasma durante a exposição.

Para verificar os efeitos diferenciados do plasma nas linhas geneticamente diferentes, foram usadas duas linhas: linha 10 e linha Barcelona.

7.2 Viabilidade e anomalias na linha 10 após exposição

Relativamente ao 1.º estágio larval verificou-se que o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas parece ser independente do tempo de exposição. Mas por outro lado, as massas melanóticas poderiam influenciar a viabilidade/mortalidade das larvas. Pensamos que quando as larvas se desenvolvem, massas melanóticas ou têm um tamanho e forma benigna que não influenciam a sobrevivência da larva, ou então crescem de tal forma que acabam por influenciar o normal desenvolvimento, tornando-se malignas e levando à morte da larva. Observou-se o mesmo padrão nas pupas resultantes destas larvas. Todavia, o tempo de exposição influenciou as irregularidades morfológicas dos adultos.

Podemos sugerir que as pupas sobreviventes podem desenvolver malformações que não foram letais para o seu desenvolvimento, mas que influenciaram a morfologia dos adultos.

No 2.º estágio larval, parece que a mortalidade é influenciada pelo aumento do tempo de exposição. O mesmo se verificou para o desenvolvimento de massas melanóticas, para a mortalidade influenciada pelo desenvolvimento dessas massas melanóticas, para a mortalidade das pupas e para o surgimento de anomalias morfológicas nos adultos.

No 3.º estágio larval, podemos dizer que no geral o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas pode estar dependente do aumento do tempo de exposição, influenciando a mortalidade.

Os dados não foram suficientes para fazer uma avaliação mais precisa quanto à mortalidade das pupas. No entanto, parece existir uma relação entre o tempo de exposição e a morte das pupas, pois o aumento do tempo para 180 segundos revelou existir uma diferença bastante significativa quando comparado com o controlo.

Para as anomalias morfológicas dos adultos não foi possível fazer uma associação direta com o aumento do tempo de exposição.

Fazendo uma análise geral parece que o 1.º estágio de desenvolvimento foi o menos afetado com o aumento do tempo de exposição. No entanto, foi neste estágio que se contaram mais mortes, as quais foram influenciadas pelo aumento do tempo de exposição. Como as larvas sobreviventes foram em menor número, tal poderá estar a influenciar os restantes resultados. Por outro lado, como foram expostas e analisadas um número pequeno de larvas com o tempo de 120 segundos, não foi possível determinar se os resultados tinham sido influenciados pelo aumento do tempo de exposição.

7.3 Viabilidade e anomalias na linha Barcelona

Nas larvas de 1.º estágio desta linha, a mortalidade, o aparecimento de massas melanóticas e a associação entre elas foram dependentes do aumento do tempo de exposição. O mesmo se verificou nas pupas e nas anomalias morfológicas dos adultos.

Para o 2.º estágio, a mortalidade foi claramente influenciada pelo tempo de exposição, assim como o desenvolvimento de massas melanóticas e o surgimento de anomalias morfológicas nos adultos. No que diz respeito à mortalidade das pupas parece que este é independente do tempo de exposição.

Nas larvas de 3.º estágio a viabilidade/mortalidade não foi dependente do tempo de exposição. No entanto, o desenvolvimento de melanismos/massas melanóticas já foi influenciado. Mesmo assim, a mortalidade associada às massas melanóticas também não foi influenciada pelo aumento do tempo. O mesmo foi verificado em relação à mortalidade das pupas. Já no que diz respeito às anomalias morfológicas dos adultos, foi evidente que estas foram influenciadas pelo aumento do tempo de exposição. O correto desenvolvimento das estruturas adultas requer a coordenação da proliferação com o início da diferenciação celular dos discos imaginais durante o 3.º estágio larval, fazendo com que este estágio seja uma fase crítica do desenvolvimento [8]. Provavelmente estas larvas ficaram com anomalias após a exposição, que alteraram a necessária coordenação desses acontecimentos, influenciando a correta formação dos adultos.

Fazendo uma análise mais generalizada de todos os resultados observados nas duas linhas testadas, sou levada a sugerir que a mortalidade e as anomalias observadas nas larvas, pupas e adultos após exposição poderão não estar relacionadas com o estágio de desenvolvimento em que a larva se encontra, mas sim com o momento em que cada larva se encontra dentro desse estágio. Existem momentos mais críticos durante o desenvolvimento dentro de cada estágio, que poderão influenciar os resultados do trabalho.

Por exemplo, se a exposição coincidir com o momento em que ocorrem alterações importantes no desenvolvimento larval, este poderá ficar comprometido. Sabe-se que durante o 1.º e 2.º estágio larval são necessárias variações na concentração da hormona ecdisona para regular as mudas inerentes ao crescimento [8, 37]. Por outro lado, também se sabe que os reguladores da apoptose são controlados durante o 3.º estágio larval por ecdisona. Do mesmo modo, no final deste estágio é necessário um grande pulso da hormona para dar início à passagem para a fase seguinte [8, 37]. Se a exposição das larvas ao plasma coincidir com estes ou outros momentos importantes, pode alterar a regulação hormonal, comprometendo a viabilidade e o normal desenvolvimento larval, influenciando todas as fases seguintes das larvas sobreviventes.

Para uma melhor avaliação, futuramente deverão ser realizados trabalhos de exposição em larvas com o desenvolvimento sincronizado de modo a avaliar se a resposta da larva à exposição é condicionada pelo estágio ou pelo momento exato de desenvolvimento em que se encontra.

Também é de salientar que os resultados iniciais poderão estar dependentes da manipulação das larvas. Inicialmente a manipulação foi sendo ajustada por tentativa e erro. Deste modo, a linha de Barcelona nos ensaios sem ultra violeta foi a menos influenciada pela manipulação. De qualquer modo, a tendência geral dos resultados seguiu sempre o mesmo padrão.

Numa última análise, em relação às larvas mortas, verificou-se que nas 2.250 larvas expostas, 963 larvas ($\pm 43\%$) acabaram por morrer e que destas 314 ($\pm 33\%$) morreram nas primeiras 24 horas. Parece que as primeiras 24 horas após a exposição são muito importantes para a viabilidade das larvas. Se esta conseguir recuperar nas primeiras horas, a probabilidade de sobrevivência aumenta; ou a larva recupera e continua a desenvolver-se ou, se não recuperar dos danos provocados pela exposição, acaba por morrer nas primeiras horas após ter sido exposta ao plasma. Talvez por esta razão foram observadas larvas completamente melanizadas 24 horas após a exposição.

7.4 Anomalias morfológicas e comportamentais observados

Por falta de publicações sobre o efeito do plasma em *Drosophila*, os dados são discutidos e comparados com fenótipos semelhantes relatados em outros estudos.

7.4.1 Anomalias relacionadas com desequilíbrio hormonal

As alterações encontradas nos diferentes estádios de desenvolvimento larval, como os movimentos lentos, as anomalias no comportamento de alimentação, as fugas da caixa de *Petri*, o vaguear sobre a comida antes do final 3.º estádio, os tempos de vida prolongados, o desenvolvimento atrasado, as falhas nas mudas, as traqueias partidas, as alterações a nível dos tubos malpighianos, a desintegração do corpo gordo, a formação precoce de pupas e/ou grandes anomalias morfológicas, têm sido referenciadas em mutantes de genes relacionados com a hormona ecdisona.

Em *Drosophila*, como em todos os insetos holometabólicos, a metamorfose é controlada por alterações na concentração da hormona esteróide ecdisona que controla a transição jovem/adulto através de um sistema neuro-endócrino [67-70]. Esta hormona é convertida na sua forma ativa 20-hidroxiecdisona após ser libertada na hemolinfa. Tradicionalmente, as duas formas da hormona é genericamente chamada de ecdisona. A progressão do ciclo de vida de *Drosophila* depende de impulsos desta hormona que comanda as principais transições de desenvolvimento, incluindo as mudas¹. É libertada em pulsos periódicos, que assim coordenam múltiplas alterações fisiológicas em todo o corpo. Os pulsos devem ser regulados para que tenham um pico definido de começo e de fim [72]. Esta coordenação é necessária para mudanças importantes na fisiologia e no comportamento, incluindo o peso crítico “checkpoint” (é um ponto de controlo

¹ A muda nos insetos é uma série de eventos que se inicia com a separação da cutícula da epiderme e termina com a ecdise, a eliminação da velha cutícula [71]. Gates J, Lam G, Ortiz JA, Losson R, Thummel CS. rigor mortis encodes a novel nuclear receptor interacting protein required for ecdysone signaling during *Drosophila* larval development. *Development* 2004;131:25-36.

fisiológico que determina se a larva adquiriu recursos suficientes para a fase de pupa), a indução dos genes “*interruptor*” que faz a larva parar de se alimentar e apresentar um comportamento errante para dar início à fase de pré-pupa e do gene *Sgs* (“*cola*”) que servem para fixar a pupa a um substrato sólido [72-74].

A retenção da cutícula velha, a duplicação das estruturas da boca e dos espiráculos anteriores, podem estar relacionados com transtornos hormonais. Alguns trabalhos publicados têm referido que a muda é orquestrada pela hormona ecdisona e que mutantes para a sua expressão exibem defeitos com retenção da cutícula velha, [75]. A letalidade larval, o desenvolvimento atrasado, o tamanho mais pequeno, as irregularidades da traqueia, os movimentos lentos e algumas alterações nos tubos malpighianos, têm sido associadas a anomalias da ecdisona [68, 71, 75].

Sabe-se que uma redução na biossíntese de ecdisona atrasa o desenvolvimento. Este acontecimento pode explicar porque razão as larvas que não atingiram o tamanho esperado precisaram de mais tempo até pupar. Será que foi necessário mais tempo para atingirem o peso crítico, necessário para iniciar a cascata endócrina de passagem à fase seguinte? Do mesmo modo, aquelas que fizeram pupa precoce foram descritas em trabalhos realizados com mutantes para a regulação/sinalização da biossíntese da ecdisona [73].

Um pulso elevado de ecdisona no final do desenvolvimento larval desencadeia a formação do pupário, iniciando a fase de desenvolvimento pré-pupa, seguido por um outro pulso de ecdisona 10 horas após a formação do pupário, que assinala a transição de pré-pupa/pupa [76]. Uma grande onda de ecdisona durante o desenvolvimento da pupa de 24 a 72 horas após formação do pupário controla a diferenciação em adulto. A maioria dos tecidos larvais são destruídos por morte celular programada durante a pré-pupa e início de pupa.

Todas as deformidades detetadas no desenvolvimento das pupas, como a falha da eversão dos espiráculos anteriores, as pupas com uma curvatura para um dos lados, a pupação precoce, e em geral todas as grandes anomalias na morfologia do corpo da pupa, foram descritas em mutantes de genes que estão envolvidos no controlo da metamorfose [77-79]. Como todas estas mal formações morfológicas estão associadas ao controlo da concentração da ecdisona, faz-me propor que a exposição das larvas ao plasma alterou de alguma maneira o papel da regulação hormonal, sendo responsável pelas anomalias observadas nas pupas.

Os fenótipos relacionados com formação de pupa precoce também foram descritos em mutantes do gene *indutor de ecdisona E74* (um membro da família do proto oncogene *ets*, que codifica fatores de transcrição para o desenvolvimento mesodermal da célula durante o período embrionário) que está referenciado como necessário para a metamorfose em resposta à hormona ecdisona. Análises fenotípicas demonstraram que este gene é necessário para a metamorfose dos tecidos larvais e imaginários [78].

Os fenótipos descritos para as pupas resultantes de larvas que apresentaram anomalias durante o seu desenvolvimento, também foram observados em pupas de larvas que não apresentaram anomalias visíveis. Esta situação leva-me a inferir que embora não fossem detetadas anormalidades visíveis durante o desenvolvimento das larvas, a alteração hormonal e/ou genética aconteceu, vindo a revelar-se mais tarde na fase de pré-pupa e pupa. Os efeitos da variação hormonal e genética podem manifestar-se cedo, no desenvolvimento larval e pré-pupa, mas também podem revelar-se durante uma fase mais avançada do desenvolvimento pupal. Uma vez que o desenvolvimento é controlado por várias oscilações na concentração da hormona, influenciando a expressão de diferentes genes em tempos alternados, a manifestação das anomalias podem ocorrer em qualquer fase.

Alguns indivíduos adultos apresentaram anomalias a nível da posição e orientação dos pêlos no tórax. Estas irregularidades, assim como a falta de pigmentação no abdómen, foram relatadas em mutantes de genes envolvidos na regulação da indução da ecdisona na transformação pupa/adulto [79].

7.4.2 Anomalias relacionadas com os discos imaginais

As deformidades observadas na cabeça das pupas durante o presente trabalho, poderão estar relacionadas com defeitos na eversão dos discos imaginais. A fase de pré-pupa dura aproximadamente 12 horas e um pulso de ecdisona desencadeia a transição de pré-pupa/pupa. Nessa fase, as glândulas salivares são submetidas a histólise e os discos da cabeça vão deslocar-se a partir do interior do tórax impulsionados pela contração dos músculos abdominais, ocupando o espaço anterior. Defeitos na eversão da cabeça são chamados de criptocefalia. Mutantes para o gene *criptocefálico (crc)*, não conseguem fazer a eversão da cabeça nem o alongamento dos discos imaginais durante a fase de pupa, exibindo defeitos na diferenciação posterior do abdómen [80], resultados muito semelhantes aos por mim observados.

Estes fenótipos foram igualmente descritos em mutantes do gene síntese *de purina fosforibosilaminotransferase (Prat)*, e do recetor nuclear β FTZ-F1 (fator de transcrição que regula os genes envolvidos na biossíntese da ecdisona), necessários para a metamorfose, sugerindo que o fenómeno de criptocefalia observado nas pupas poderá estar relacionado com problemas ocorridos durante a eversão dos discos imaginais [80-82]. Como todos os genes referenciados são importantes para as diferentes fases do desenvolvimento em resposta à hormona ecdisona, as anomalias observadas podem estar de algum modo relacionadas com qualquer um deles ou com todos, como consequência de alterações na biossíntese da hormona.

Alguns indivíduos adultos apresentaram o tórax torcido para um dos lados e possuíam uma só asa. Esta anomalia não deixou de ser um resultado interessante, pois os indivíduos conseguiram sobreviver mais de uma semana. Fenótipos semelhantes foram descritos em mutantes de *Drosophila* para o gene *ciclope (cype)* que codifica o citocromo c oxidase (*cox*). Este citocromo é uma enzima da fase terminal da cadeia

respiratória, sintetizado no interior da mitocôndria, um regulador intrínseco da apoptose. Quando a permeabilidade da membrana mitocondrial fica comprometida, o citocromo c é libertado induzindo uma cascata de caspases responsáveis pela morte celular programada. Alterações na cadeia respiratória são acompanhadas de alterações na expressão gênica nuclear, incluindo defeitos no desenvolvimento dos discos imaginais, resultando em patas e asas defeituosas, alterações no tórax e deformações nos olhos [83]. Como se sabe, as espécies radicalares agridem as membranas celulares. Durante a exposição, as membranas mitocondriais poderão ter ficado danificadas, resultando nas anomalias observadas. Outros trabalhos identificaram vários genes que são importantes para a correta morfogênese dos discos, o que sugere que as irregularidades observadas no tórax dos indivíduos poderão estar relacionadas com modificações ocorridas durante a eversão e o alongamento destas estruturas.

O desenvolvimento da asa de *D. melanogaster* depende da regulação correta, da sobrevivência, do crescimento, da proliferação, da diferenciação e da formação de um padrão celular específico. Estes acontecimentos envolvem a atividade de várias vias de sinalização que atuam em colaboração com fatores de transcrição de sequência específicos para definir os destinos celulares [84]. As anomalias observadas nas asas e nas patas de alguns adultos devem estar relacionadas com falhas na evaginação dos discos imaginais. No entanto, a correta morfogênese dos discos está sob controle da hormona ecdisona. Mutantes para o gene *EcR* (receptor de ecdisona) e *crooked legs (crol)*, genes induzíveis por ecdisona, apresentam defeitos na morfogênese das asas [76] semelhantes aos observados. As anomalias observadas poderão ter sido causadas por alterações na regulação destes genes pela hormona após a exposição.

Uma das principais anomalias observadas nos indivíduos situa-se a nível da formação das patas, que se exibiam curtas, enroladas e/ou mal formadas, e que poderão estar relacionadas com falhas ocorridas durante a eversão dos discos imaginais. A morfogênese de discos imaginais das pernas é iniciado em resposta a elevados títulos de ecdisona no final da fase larval. Nesta fase, a hormona provoca rearranjos e alterações na forma das células dos discos das pernas, causando-lhes a eversão e alongamento. Falhas nestes rearranjos resultam em fenótipos de pernas malformadas, que se apresentam enroladas com segmentos curtos e grossos [85]. É a ecdisona que promove a proliferação e a diferenciação dos discos imaginais via um fator de transcrição chamado *Crookes legs (crol)* [86]. Este fator tem sido associado a anomalias encontradas na formação das patas de *Drosophila* e na eversão da cabeça [87]. Mutantes para esta proteína apresentaram mal formação das pernas, provavelmente devido a defeitos durante o alongamento do disco [87]. Como as patas são formadas a partir da morfogênese dos discos imaginais correspondentes, podem ter ocorrido alterações a nível dos discos imaginais que culminaram na má formação das patas observadas. Essas irregularidades podem estar relacionadas com o fator de transcrição e/ou com falhas na regulação hormonal.

7.4.3 Papel da insulina

A pupação precoce pode também dever-se a anomalias na sinalização via insulina. Sabe-se que na glândula torácica (GT), esta via aumenta a síntese de ecdisona e causa pupação prematura, e que, pelo contrário, uma supressão da sinalização da insulina reduz a secreção de ecdisona e atrasa a muda. Sempre que se altera o rácio da secreção da hormona altera-se a duração do período de crescimento da larva. É possível que a sinalização via insulina tenha ficado afetada, alterando a sinalização hormonal. Segundo Viviane et al [88], em condições normais o cérebro controla a muda quando o peso crítico é atingido. Mas sob condições de *stress*, onde o “checkpoint” não é atingido, o cérebro não fica no controlo, mas uma atividade autónoma da GT, ou uma ativação da glândula por fatores extra cerebrais, possivelmente a insulina, induz a muda via uma acumulação gradual de ecdisona. Esta glândula produz ecdisona em concentrações basais. Com base no anteriormente referido, e sabendo que as larvas de exposição estão em condições de *stress* oxidativo, algumas destas larvas podem não ter atingido o peso crítico (foram observadas anomalias no comportamento de alimentação) e a informação via cerebral ficou comprometida, e assim o sistema neuro-endócrino não foi ativado [88]. A passagem à fase seguinte foi controlada por fatores extra cerebral, como por exemplo a insulina, justificando o período de vida prolongado, para atingir a concentração hormonal necessária e a pupação precoce observada.

A sinalização via insulina está igualmente envolvida no tamanho final da mosca adulta. As diferenças de tamanho encontradas nos adultos podem estar relacionadas com irregularidades nesta via. O mecanismo “*Insulin/Insulin-like growth factor*” (IGF), sinalizado como (IIS)² está associado ao crescimento celular. Alguns estudos têm demonstrado a importância da IIS na PG, propondo que o crescimento da PG atua como um sensor do estado metabólico de todo o organismo [86]. A danificação da PG e/ou a modificação na sinalização via insulina durante a exposição do plasma poderá ter influenciado o tamanho final da mosca e ser responsável pelo tamanho minúsculo e gigante observado. Porém, também se sabe que a PG não é unicamente controlada pela IIS, mas que esta poderá providenciar a competência para a glândula responder a outros sinalizadores do desenvolvimento [86], o que me leva a propor que o dano poderá não ter acontecido na PG, mas sim a nível da sinalização via insulina, comprometendo a competência da PG para responder aos outros sinalizadores envolvidos no processo.

7.4.4 O papel da hipoxia

O comportamento errante, levando as larvas a não se alimentarem e chegando a sair das caixas de *Petri*, parece estar relacionado com anomalias no fluxo de oxigénio. Situações semelhantes foram descritas em larvas de trabalhos onde se investigou o efeito da hipoxia em *Drosophila* [88]. Segundo alguns autores, o comportamento exploratório e errante (andar por cima da comida e sair da caixa) poderá estar

² Referenciado em *Drosophila* como um regulador do crescimento tecidual, sendo uma via de sinalização composto por múltiplos ligandos e um recetor, que está envolvido em muitos processos fisiológicos.

relacionado com alterações dos níveis de oxigênio. Com base nos trabalhos referidos, proponho que após a exposição ao plasma algumas larvas foram sujeitas a períodos de hipoxia. Como foram observadas várias larvas com as traqueias partidas em diferentes zonas entre os espiráculos anteriores e os posteriores, provavelmente o fluxo normal de oxigênio ficou comprometido.

A hipoxia também parece estar relacionada com a tonalidade cor-de-rosa observada em algumas larvas. Fenótipos semelhantes são descritos para larvas de *Chironomidae*. No início do século XIX, os cientistas observaram que a cor vermelha brilhante das larvas aquáticas de mosquitos quironomídeos era resultado da presença de hemoglobina (Hb) [89]. As larvas de muitas espécies de *Chironomidae* vivem no sedimento de águas eutrofizadas e poluídas, às vezes chegando a profundidades consideráveis. Neste ambiente, as águas são frequentemente pouco oxigenadas e as larvas aumentam a síntese de hemoglobina, o que lhes confere uma cor vermelha [89].

De igual modo, foram recentemente descobertas Hbs em *Drosophilidae*. A expressão em *D. melanogaster* está principalmente associada com o sistema traqueal. No entanto, outros locais de síntese têm sido identificados, como o corpo gordo, os músculos da faringe, os músculos viscerais e os tubos malpighianos [89]. Se compararmos os locais de síntese de hemoglobina referenciados anteriormente, com as zonas das larvas onde a tonalidade vermelha foi observada durante este trabalho, podemos verificar que vão de encontro aos atrás descritos, o que me leva a sugerir que a cor observada poderá estar relacionada com a presença de Hbs. Deste modo, as larvas, para responder à hipoxia provocada pela exposição ao plasma, sintetizaram uma quantidade maior de Hb, de modo a armazenar ou fazer circular o oxigênio necessário para a sua sobrevivência, o que lhes conferiu a cor vermelha observada.

As anomalias observadas nas mudas e no tamanho final dos indivíduos adultos podem também estar relacionadas com as alterações dos níveis de oxigênio. Uma baixa tensão do gás induz a muda em larvas com tamanho pequeno, mesmo antes de atingir o peso crítico, e por consequência adultos mais pequenos [90]. Deste modo, a hipoxia poderá ser responsável pelo tamanho das moscas. Muitos trabalhos indicam que os níveis de oxigênio influenciam o tamanho do corpo dos insetos [79, 91]. A alteração dos níveis de oxigênio durante o desenvolvimento larval pode também ter influenciado o tamanho final do corpo de alguns adultos.

Por outro lado, a PTTH também controla o tamanho final do corpo, mas a função da hormona pode ficar alterada quando os discos imaginais ficam genética ou fisicamente danificados [86]. Se a exposição do plasma induziu danos nos discos imaginais, alterou também a função da PTTH que acabou por influenciar o tamanho final dos indivíduos. Alguns autores têm proposto modelos de comunicação inter-órgãos para o desenvolvimento em *Drosophila* [86, 90, 92].

O tamanho final da PG também está sob o efeito regulador de outros fatores como fator de crescimento transformante beta (*TGFβ/Activin*), do óxido nítrico (NO, um segundo mensageiro, considerado um regulador importante nas transições do

desenvolvimento), do recetor membranar *TOR* (*target of rapamycin*) e de fatores estáticos protorácicos, como por exemplo a JH e a adenosina extracelular [86]. Podemos dizer que existem muitos circuitos de “*feedback*” positivos e negativos envolvidos na sinalização da biossíntese da hormona, bem como na resposta altamente sistemática coordenada pela ecdisona que impulsiona o processo de forma organizada em todos os tecidos [86]. Qualquer um destes fatores poderá ter ficado afetado pela exposição do plasma, levando a uma resposta descontrolada da hormona ecdisona, o que acabou por determinar o tamanho minúsculo observado em alguns indivíduos, assim como muitos dos resultados observados durante a investigação.

7.4.5 A desintegração do corpo gordo

A desintegração do corpo gordo das larvas muito antes de terem atingido o tamanho ideal, e o fato de terem um comportamento de vaguear sobre a comida, como se já estivessem no final do 3.º estágio de desenvolvimento, revela uma mudança metamórfica precoce. Essa desintegração ocorre normalmente depois das larvas terem atingido o peso crítico. Nesse estágio, as larvas param de comer e começam a vaguear para encontrar um local adequado para a pupação. É nesta altura que o corpo gordo sofre uma enorme indução para a autofagia, conhecido como autofagia de desenvolvimento [93]. Em *Drosophila* e outros insetos submetidos a completa metamorfose, o corpo gordo larval funciona como uma reserva de proteínas e outros materiais, que são libertados através de autofagia programada (degradação do próprio tecido pelos lisossomas) para fornecer energia e nutrientes durante a metamorfose e início da idade adulta [93, 94]. Essa autofagia é rigorosamente cronometrada onde a hormona ecdisona tem um papel regulador [94]. Os resultados observados sugerem que o controlo da passagem à metamorfose foi desregulado, que a sinalização que coordena a passagem à fase seguinte ficou modificada e que o “relógio” interno da larva ficou descontrolado. A desintegração precoce do corpo gordo é um indicador de mudança precoce, uma vez que a sua desintegração ocorre mais tarde durante a vida pupal [95].

Trabalhos recentes com a proteína adenosina desaminase relacionada com o fator de crescimento A (ADGF-A) revelaram que as larvas mutantes para a atividade enzimática da ADGF-A apresentaram um aumento da concentração de adenosina e desoxi-adenosina na hemolinfa das larvas. Esta mudança causou morte larval, associada com a desintegração do corpo gordo, com a formação de tumores melanóticos, atrasos e defeitos no desenvolvimento. Verificou-se que se a função da enzima não ficar completamente comprometida mas simplesmente deficiente, as larvas desenvolvem tumores melanóticos, apresentam a desintegração do corpo gordo mas continuam a desenvolver-se até à idade adulta [95]. Talvez por isso, algumas larvas conseguiram passar à fase de pupa e eclodir como adulto, mesmo tendo apresentado desintegração precoce. O desenvolvimento de massas melanóticas pode também estar relacionado com a desintegração do corpo gordo. Este fenótipo foi observado em larvas mutantes para o gene tumor^w, onde as massas melanóticas foram descritas como sendo células do corpo gordo que foram encapsuladas pelos hemócitos. A desintegração do corpo

gordo induz uma hiper-ativação dos hemócitos, o que por sua vez leva à formação de massas melanóticas. É referido que os hemócitos assumem uma forma achatada e depositam-se em camadas à volta das células de gordura, formando uma massa compacta que se torna melanizada [96].

7.4.6 Massas melanóticas e regulação do sistema imunitário

Os melanismos/massas melanóticas também podem estar relacionadas com a resposta do sistema imunitário. Estas massas podiam ser internas móveis em circulação na hemolinfa, fixas numa determinada zona ou órgão, ou cuticulares. É de salientar que o melanismo cuticular poderá resultar da manipulação das larvas. De qualquer modo, os melanismos/massas melanóticas foi significativamente menor nas larvas de controlo, o que me leva a propor que na sua grande maioria estavam relacionados com a exposição do plasma. Fenótipos semelhantes foram relatados em diversos trabalhos sobre a resposta imunitária em *Drosophila*. O fenótipo do tumor/massa melanótica é caracterizado pela presença de corpos negros flutuando livremente na cavidade corporal ou então ligado a um órgão interno. São raros em mosca tipo selvagens, mas podem ser frequentes em algumas alterações genéticas.

As massas melanóticas/tumores estão divididos em duas classes: a classe 1, que inclui mutantes nos quais os tumores melanóticos resultam de uma “resposta autoimune” – a interrupção da membrana basal de tecidos e a infeção com parasitas pode levar à formação de tumores, induzindo a adesão de hemócitos e à formação de cápsulas –; e a classe 2, que inclui mutantes que exibem uma super-ativação de hemócitos, resultando na formação de cápsulas. Muitas das mutações que ativam o sistema imunitário da mosca, como as mutações nos genes *Tool* e *JAK* (genes referenciados como pertencer ao sistema imunitário), pertencem a esta classe [97].

Em *Drosophila*, as infeções com bactérias induzem no intestino uma síntese rápida de ROS, e o ciclo dinâmico da geração e eliminação de ROS parece ser vital. As larvas usadas neste trabalho não estavam infetadas com parasitas, nem eram mutantes. Deste modo, a ativação do sistema imunitário das larvas poderá ter sido induzido pela presença anormal dos ROS, induzidos pela exposição. O aumento das espécies radiculares pode ter sido interpretada pelo sistema vivo como uma resposta à presença de invasores, o que terá conduzido a uma ativação de sinalizadores moleculares, acionando o sistema de resposta imunitário. Assim sendo, proponho que o organismo, de modo a restabelecer a homeostasia interna, ativa uma resposta imunitária rápida tendo as massas melanóticas observadas resultado dessa ativação.

O alvo da aplicação direta de plasma em sistemas vivos é a membrana celular. Uma vez que a peroxidação da camada dos fosfolipídios nos eucariontes é catalisada por espécies radiculares, a exposição poderá ter provocado danos nos tecidos, induzindo uma resposta imunitária. A peroxidação da camada lipídica induz diversas vias bioquímicas intracelulares, como por exemplo a formação de malondialdeído (MDA), que participa na formação de dutos do ADN (ácido desoxirribonucleico) [98]. O ADN

pode ter ficado danificado pela exposição ao plasma e a expressão génica foi modificada, levando a diferentes respostas imunes. A formação das massas melanóticas pode também dever-se a mutações de genes envolvidos na resposta imunitária [97, 99].

As diferentes tonalidades (amarelo, castanho e vermelho) observadas em algumas larvas podem estar relacionadas com uma resposta do sistema imunitário na ativação da cascata de oxidação do fenol. A enzima fenol oxidase (PO) catalisa a oxidação do fenol a quinona, que subseqüentemente é polimerizada a melanina [43]. Alguns dos produtos intermediários da reação resultam da oxidação das quinonas a orto-benzo-quinonas que são muito reativas e que podem ir de amarelo, a castanho, a vermelho, a verde e a azul [100].

A melanização é a maior reação do sistema imunitário em artrópodes e envolve uma rápida síntese da melanina [43]. A exposição das larvas ao plasma poderá ter causado uma alteração muito grande na homeostasia interna do organismo. Esta variação deve ter desencadeado uma forte reação imunitária, ativando a via da fenol-oxidase e a formação de melanina. As cores observadas, principalmente a tonalidade vermelha, podem estar relacionadas com os intermediários da formação da melanina, pois inicialmente, na biossíntese de melanina, a fenilalanina é hidroxilada a tirosina, que posteriormente será convertida em 3,4-di-hidroxi-fenilalanina (DOPA) [101]. Na presença de fenol Oxidases, a DOPA é oxidada e um pigmento vermelho é formado, que por sua vez será convertido em melanina [102]. Assim sendo, as tonalidades vermelhas observadas podem estar relacionadas com a conversão da fenilalanina em melanina.

Também foram observados alguns adultos que apresentaram pequenos pontos pretos no corpo e nas patas, principalmente junto às articulações. Utilizando como termo de comparação outros trabalhos, sugiro que é possível terem-se verificado algumas mutações. Fenótipos semelhantes foram descritos em mutantes do gene *necrótico (nec)* em *D. melanogaster*, que desenvolveram manchas pretas melanizadas no corpo e articulações das patas, no abdómen e na hemolinfa. A presença das massas negras podem ser resultado da deposição de melanina via ativação da cascata da fenol-oxidase que está sob o controlo do *nec*, mas também poderá ser uma reação autoimune desencadeada por uma anomalia celular [103]. Se atendermos ao fato de que a exposição de plasma aumenta a concentração de ROS e que estes são capazes de provocar dano celular, as massas melanóticas observadas nas articulações das patas nos adultos podem dever-se a uma resposta autoimune em reação ao dano provocado pelos ROS, ou então uma resposta a uma expressão génica afetada.

7.4.7 O papel de outros fatores no desenvolvimento nas anomalias

No que diz respeito às traqueias partidas, poderá estar relacionada com alterações a nível proteico. Fenótipos semelhantes foram descritos em larvas mutantes para as metaloproteínas Mmp1 e Mmp2, onde se verificou que estas proteínas desempenharam um papel importante no crescimento das traqueias e na morfogénese, como por exemplo a histólise e a apoptose durante a metamorfose em *Drosophila*. Estes mutantes

exibiram tamanhos mais pequenos e um comportamento errante sobre a comida antes do final do 3.º estágio larval, tal como o por mim observado. Estas ocorrências foram relacionadas com deficiências no aporte de oxigénio, tendo sido observado mesmo em larvas de 1.º estágio [104].

Assim sendo, proponho que as metaloproteínas atrás referenciadas possam ter sido afetadas pela exposição ao plasma, resultando em traqueias partidas e conseqüentemente em irregularidades no aporte de oxigénio.

Sabe-se que a *Drosophila* utiliza a via do NO para responder à hipoxia [105]. Se pensarmos que algumas larvas conseguiram recuperar e outras não, é legítimo propor que possam ter acontecido anomalias nessa via, resultando numa resposta ineficaz à hipoxia por parte das larvas que estavam afetadas.

A cor (amarelo, castanho e vermelho) observada nas larvas pode estar relacionada com diferentes estados de oxidação das gotículas de gordura. Foram observadas zonas de tecido adiposo com vesículas de diferentes tonalidades que iam do amarelo pálido até ao castanho caramelo. A oxidação lipídica altera a cor da gordura e durante essas reações de oxidação são produzidos oxi-polímeros de cor castanha [106].

A cor vermelha também poderá estar relacionada com a síntese de precursores do pigmento vermelho que dá cor aos olhos. A síntese destes precursores acontece nos tubos malpighianos durante a fase de pupa [35], e posteriormente são lançados na hemolinfa para serem transportados por transportadores membranares das células de pigmentos [107]. O transporte de pigmentos poderá ter sido comprometido. Alguns trabalhos com o plasma não térmico têm revelado que os Ros induzem peroxidação dos lípidos membranares, provocando danos na integridade da célula. Esta situação poderá ter acontecido, danificando os transportadores membranares, e alterando deste modo todo o sistema de transporte, e que de alguma maneira a expressão da cor vermelha tenha acontecido prematuramente durante a fase larval, quer na hemolinfa quer mesmo a nível dos tubos malpighianos.

Esta investigação precisa de ser aprofundada de modo a tentar identificar que tipo de células são as que apresentam a cor vermelha, de modo a perceber se são realmente pigmentos de cor, se são um tipo de células adiposas oxidadas, ou intermediários da formação da melanina, ou ainda se são Hbs que conferiram a cor vermelha às larvas.

No que diz respeito à tonalidade cor-de-rosa observada em algumas pupas, poderá estar relacionada com a formação dos pigmentos que dão cor aos olhos. Os pigmentos vermelhos aparecem em primeiro lugar nas células de gordura na fase de pupa, ao mesmo tempo que as formas dos olhos, e posteriormente vão dar cor aos olhos numa das fases (P9-P10) mais tardia do desenvolvimento da pupa [91]. Como a tonalidade começou a ser notada precocemente, conferindo uma tonalidade rosada a toda a pupa, sugiro que aconteceram algumas anomalias no transporte dos precursores de pigmentos expressando-se prematuramente.

Similarmente, foram observados adultos que apresentaram pigmentos subcuticulares cor-de-rosa brilhantes em determinadas zonas do corpo. Esses pigmentos situavam-se principalmente na zona da cabeça, do abdómen e das patas. As células pigmentadas de vermelho assemelham-se a células de gordura.

Fenótipos semelhantes foram descritos para mutantes do gene *spineless (ss)* que foram designados de *Red cells mutant (rc)* [91]. Essas células foram identificadas como um tipo de células gordas, sugerindo que o pigmento observado estava relacionado com o pigmento castanho dos olhos que se desenvolve autonomamente nas células de gordura [91].

Como estes fenótipos são muito semelhantes aos observados, sugiro que a expressão genética ficou alterada devido à exposição, levando a mutações no gene em questão.

De qualquer forma, esta é uma questão que precisa de ser melhor avaliada, complementando com outros trabalhos a nível molecular, de modo a permitir uma correta identificação das células pigmentadas. Ainda assim, mutações no gene *ss* têm sido referenciadas em mutantes que apresentam anomalias no tamanho dos pêlos, nos segmentos das patas e das antenas [108]. Todas essas anormalidades foram descritas durante esta dissertação, reforçando a hipótese de que mutações no gene em questão possam ter acontecido como consequência da exposição.

7.5 Dissecção dos adultos

Duas semanas após a eclosão, os adultos foram dissecados de modo a averiguar se existiam anomalias visíveis no aparelho reprodutor.

Não foi possível determinar se a exposição do plasma alterou a fertilidade das moscas, uma vez que os resultados não foram significativamente diferentes dos encontrados no grupo de controlo. Porém, verificou-se que aconteceram anomalias na pigmentação. Com efeito, foram encontrados testículos com uma tonalidade diferente do normal. Contudo, essa diferença parece não interferir com a fertilidade porque quando foram observados ao microscópio apresentavam muitos espermatozóides com muita mobilidade, dando a indicação de que a fertilidade estaria assegurada.

Durante a dissecção foram igualmente observadas algumas massas melanóticas que estavam soltas na hemolinfa e que saíam livremente da cavidade corporal. Essas massas tinham diferentes formas e tonalidades. Foram observadas massas amarelas e pretas, com diferentes tons de castanho. Por vezes podiam estar associadas a vesículas de gordura. Penso que essas massas formaram-se durante a fase de larva, mas como não foram letais não afetaram o desenvolvimento do indivíduo, persistindo até à fase adulta. Genericamente, as massas melanóticas surgem pela agregação de células do sangue durante a vida larval e persistem durante a fase adulta, flutuando livremente na hemolinfa ou então associadas com a gordura corporal [109].

Alguns adultos apresentavam grandes quantidades de vesículas de gordura soltas na cavidade corporal. Essa gordura era bastante abundante e saía livremente após dissecação. Penso que este fato possa estar relacionado com anomalias na utilização da gordura (energia) acumulada durante a fase larval e pupal. A vida dos insetos holometabólicos está intimamente ligada a períodos de alimentação e a períodos de não alimentação [110]. A fase larval é caracterizada por uma fase de alimentação extensa que apoia o rápido crescimento dos indivíduos e permite a acumulação de depósitos de energia de reserva, principalmente no corpo gordo [110]. Posteriormente essa reserva vai ser usada como fonte de energia durante os períodos de não alimentação (metamorfose) e nas primeiras horas da vida adulta. Em *Drosophila* essa gordura é preservada como células individuais que flutuam pela cavidade corporal do indivíduo pupa e jovem adulto durante 3 a 4 dias [110]. Como os indivíduos foram dissecados duas semanas após a eclosão seria de esperar que já não fossem visíveis tantas vesículas de gordura soltas na cavidade corporal. Como foram observadas gotículas duas semanas após eclosão, penso que sucederam irregularidades a nível do metabolismo dos lípidos e que estes não puderam ser corretamente utilizados.

7.6 Análise global

Analisando todos os resultados podemos constatar que, de uma maneira ou de outra, quase todos os fenótipos observados estão interligados com a normal expressão e coordenação da hormona ecdisona.

Fazendo então uma análise global, podemos dizer que durante os estádios lavares, a ecdisona é produzida na PG, um tecido endócrino que expressa genes para a codificação da hormona [86]. Uma vez libertada na hemolinfa, a hormona é convertida na sua forma ativa 20-hidroxiecdisona, que vai coordenar alterações fisiológicas e comportamentais associadas à muda e à metamorfose [86]. A regulação génica é o processo molecular central subjacente ao controlo da hormona durante estes eventos. Podemos dizer que a PTH é um importante regulador do desenvolvimento, mas não é o único que está envolvido na biossíntese da ecdisona. Sinais adicionais, especialmente sinais nutricionais que refletem o *status* metabólico geral das larvas, agem diretamente sobre a PG, influenciando o período de transição [86]. Para além disso, existem múltiplos reguladores que provavelmente podem suprimir a biossíntese da hormona até estarem reunidas as condições fisiológicas apropriadas (figura 38) [86].

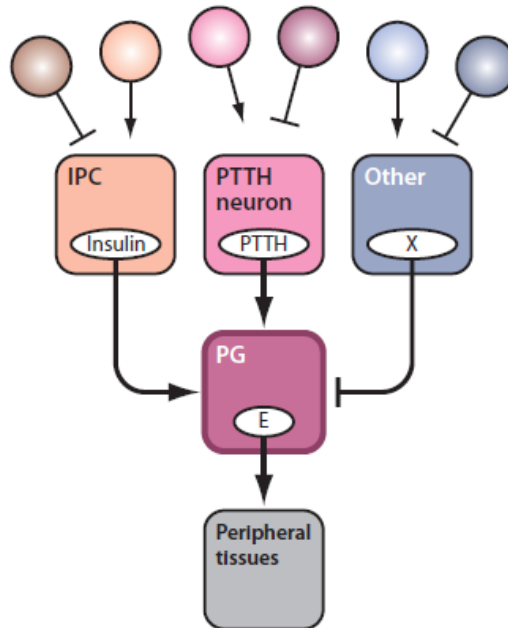


Figura 38: Ilustração de um esquema endocrinológico do inseto. Os círculos representam os vários reguladores ambientais internos que afetam a função da PG. Esses sinais convergem para a PG, que por sua vez decide o tempo de transição do desenvolvimento. Abreviaturas: E, ecdisona; PTTH, hormona protorácica; PG, glândula protorácica; IPC, célula produtora de insulina; X, fatores protorácicos desconhecidos [86].

Provavelmente, o aspecto mais relevante na resposta à ecdisona será a interação entre os diferentes tecidos e órgãos. Os tecidos do inseto respondem a ecdisona coordenadamente, de modo que os eventos fisiológicos e comportamentais são desencadeados em harmonia. A ecdisona inicia a cascata de sinalização, que começa com a libertação da hormona de início da ecdise (ETH) a partir de células endócrinas chamadas células Inka. Esta hormona é recebida por um recetor ETH ou ETHR. Uma vez ativado este recetor, são desencadeadas sequencialmente respostas nos diferentes tecidos que são responsáveis pelas mudanças comportamentais observadas durante a fase de muda [86]. Esta coordenação faz com que a resposta à ecdisona seja altamente integrada e complexa.

Na figura seguinte podemos ver um esquema de comunicação inter-órgãos (figura 39). Um dos genes envolvidos nessa comunicação é o gene *Crol*, que tem sido apontado como responsável por defeitos na formação das patas (patas tortas), um dos principais resultados observados durante este trabalho, o que poderá sugerir que a comunicação inter-órgãos ficou afetada.

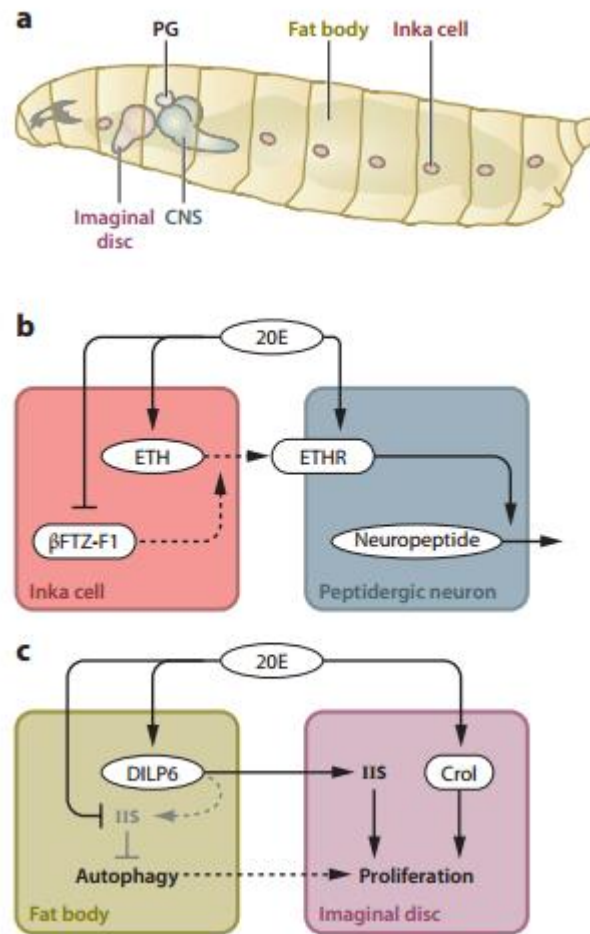


Figura 39: Esquema da comunicação inter-órgãos na resposta à ecdisona: (a) órgãos larvais envolvidos na comunicação; (b) sinalização ETH/ETHR que desencadeia o comportamento da muda. (c) comunicação entre o corpo gordo e os discos imaginários para promover o desenvolvimento das estruturas do adulto durante a metamorfose. Abreviaturas: 20E, 20-hidroxiecdisona; PG, glândula protorácica; CNS, sistema nervoso central; ETH, hormona que desencadeia a muda; ETHR, recetor de ETH; IIS, sinalização insulina/IGF; Crol, pernas tortas [86].

Se pensarmos que as espécies radicalares produzidas pelo plasma podem provocar dano celular, podemos aferir que, por consequência, alguns tecidos podem ter ficado danificados, alterando toda essa comunicação. Tem sido demonstrado que danos teciduais podem ser responsáveis por atrasos no desenvolvimento e que estão associados com a expressão alterada de genes envolvidos na sinalização e síntese de ecdisteróides [111].

8 Conclusão

A observação fenotípica revelou que após exposição as larvas apresentavam alterações na morfologia e no comportamento que não foram observadas no controlo, nomeadamente atraso no desenvolvimento, anomalias nas mudas e desenvolvimento de massas melanóticas que podiam persistir até à fase adulta e formação de pupa precoce.

Nas pupas, verificou-se que por vezes apresentavam um tamanho mais pequeno que o normal, tinham anomalias da forma e um desenvolvimento aberrante. Entre os vários fenótipos observados, o mais significativo foi o criptocefálico.

Nos adultos, as principais anomalias morfológicas foram registadas na formação e segmentação das patas, na forma e padrão das nervuras das asas e na formação do tórax.

A hormona ecdisona é a principal responsável, direta ou indiretamente, por todos os eventos que acontecem durante o desenvolvimento da mosca *Drosophila*. Vimos também que a biossíntese desta hormona dá-se na PG, e que está sob a influência de múltiplos fatores que afetam o seu normal funcionamento. Os resultados sugerem que diferentes fatores podem estar envolvidos na desregulação hormonal, implícita nas irregularidades observadas.

Assim sendo, e em conclusão, proponho três hipóteses finais:

1.ª) A exposição do plasma durante a fase larval induz um *stress* oxidativo nas larvas e o organismo responde ativando várias respostas do sistema imunitário.

2.ª) A exposição do plasma levou a um aumento dos ROS em circulação e esse aumento foi interpretado como uma infeção e as respostas imunitárias foram acionadas.

3.ª) Após a exposição ao plasma, as membranas celulares sofreram peroxidação lipídica e o ADN foi comprometido, levando a mutações dos genes, alterando a principal hormona do desenvolvimento, a ecdisona. Aqui duas situações podem ter ocorrido: ou a biossíntese da hormona ficou alterada, ou, após a sua síntese, a hormona não passou à sua forma ativa 20-hidroxiecdisona. De uma maneira ou de outra parece que todos ou quase todos os eventos dependentes da hormona sofreram modificações.

De qualquer forma, penso que foi muito evidente que a expressão genética ficou modificada. Como a regulação da expressão génica é claramente o processo molecular central subjacente à hormona ecdisona e à metamorfose, este trabalho precisa de ser continuado de modo a se perceber quais os mecanismos que estão envolvidos nos fenótipos observados.

Também é de salientar que, na sua grande maioria, as irregularidades detetadas estavam relacionadas com a morfogénese dos discos imaginais. Durante a metamorfose, os discos imaginais sofrem processos de proliferação e diferenciação de modo a serem formadas as estruturas adultas, sugerindo que o plasma poderá ter uma maior interação em tecidos onde a atividade celular é bastante significativa.

9 Trabalhos futuros

A *Drosophila* tem-se revelado um excelente modelo para estudar os vários mecanismos associados a diversas patologias humanas, e o plasma não térmico tem sido apontado como uma alternativa para algumas das terapias convencionais no tratamento de algumas doenças como o cancro. Perceber quais os mecanismos biológicos e bioquímicos envolvidos na resposta à exposição das larvas ao plasma irá fornecer informações valiosas para a terapia de algumas doenças humanas.

Por exemplo, os defeitos de desenvolvimento que perturbam a coordenação da proliferação e diferenciação controlado por ecdisona serviram durante muito tempo como excelentes modelos para o desenvolvimento do cancro [86]. Para além disso, estudos recentes têm mostrado que a *Drosophila* é um excelente modelo para estudar os mecanismos regulação do organismo. Têm sido feitos estudos sobre a coordenação entre o metabolismo energético e outros processos, na neuro-degeneração, nos ritmos circadianos, na imunidade e na biologia do tumor [33].

Julgo que seria importante começar por um trabalho que nos dê a indicação da extensão do *stress* oxidativo produzido nas larvas após exposição. Assim sendo, proponho um trabalho de determinação da atividade da enzima catálase, que sabemos ser uma das principais enzimas a ser ativada em resposta a um *stress* oxidativo. Depois de determinada a atividade enzimática *anti stress*, que nos dará a indicação se a exposição provocou ou não um *stress* oxidativo, o trabalho seguinte deverá ser feito a nível da oxidação lipídica e do malondialdeído. Este trabalho dará a indicação se houve ou não dano na membrana celular, com o conseqüente dano a nível do ADN.

Também será importante fazer trabalhos de imuno-histoquímica, de modo a se perceber que células estão envolvidas na formação das massas melanóticas; se são células de gordura que foram posteriormente melanizadas, ou se são hemócitos que se agregam como resposta autoimune ou por mutações genéticas.

Trabalhos sincronizados com embriões de *Drosophila* também seriam muito importantes. Na fase embrionária existe uma grande atividade genética e muitos mecanismos de “*switch on switch of*” estão acionados, pelo que será muito importante perceber de que maneira são influenciados pela aplicação do plasma, interagindo no desenvolvimento do embrião e do indivíduo.

Também seriam interessantes trabalhos de exposição sincronizados na fase larval.

Referências bibliográficas

1. Pulver SR, Cognigni P, Denholm B, Fabre C, Gu WX, Linneweber G, et al. Why flies? Inexpensive public engagement exercises to explain the value of basic biomedical research on *Drosophila melanogaster*. *Adv Physiol Educ* 2011;35:384-392.
2. Kühnlein RP. *Drosophila* as a lipotoxicity model organism — more than a promise? *BBA - Mol Cell Biol L* 2010;1801:215-221.
3. Sonnhammer EL, Koonin EV. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes. *Trends Genet* 2002;18:619-620.
4. Griffith LC. Neuroscience: What females really want. *Nature* 2014;512:138-139.
5. Ransom R. A handbook of *Drosophila* development. Milton Keynes: Elsevier Biomedical Press; 1982.
6. Pecasse F, Beck Y, Ruiz C, Richards G. Krüppel-homolog, a Stage-Specific Modulator of the Prepupal Ecdysone Response, Is Essential for *Drosophila* Metamorphosis. *Dev Biol* 2000;221:53-67.
7. Garcia SML, Fernández CG. *Embriologia - 3.Ed.* Porto Alegre: Artmed Editora; 2003.
8. Cranna N, Quinn L. Impact of steroid hormone signals on *Drosophila* cell cycle during development. *Cell Division* 2009;4:3-3.
9. Agnes F, Suzanne M, Noselli S. The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* 1999;126:5453-5462.
10. <http://flymove.uni-muenster.de/> .09/08/2014
11. Ritter AR, Beckstead RB. Sox14 is required for transcriptional and developmental responses to 20-hydroxyecdysone at the onset of *drosophila* metamorphosis. *Dev Dyn* 2010;239:2685-2694.
12. <http://www.developmentalbiology.net/pdf/flybooklet.pdf> .acedido a 10/08/2014
13. Pokholkova GV, Zhimulev IF. [Cytogenetic analysis of two ecdysone-regulated puffs 62C and 62E in *Drosophila melanogaster*]. *Genetika* 2002;38:1626-1634.
14. Quinn I LJ, Cranna N, Lee JEA,, R. MNaH. *Steroid Hormones in Drosophila: How Ecdysone Coordinates Developmental Signalling with Cell Growth and Division.* Australia: INTECH Open Access Publisher; 2012.
15. Murata T, Kageyama Y, Hirose S, Ueda H. Regulation of the EDG84A gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1996;16:6509-6515.
16. <http://cricket.bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/aimorph/thorxab.htm>.acedido a 06/08/2014
17. <http://flybase.org/> .acedido a 08/08/2014
18. <http://www.discoverlife.org/nh/tx/Insecta/Diptera/Drosophilidae/Drosophila/images/melanogaster3.jpeg> .acedido a 03/02/2015
19. Usui K, Simpson P. Cellular basis of the dynamic behavior of the imaginal thoracic discs during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* 2000;225:13-25.
20. Boedigheimer M, Laughon A. Expanded: a gene involved in the control of cell proliferation in imaginal discs. *Development* 1993;118:1291-1301.
21. Aegerter-Wilmsen T, Aegerter CM, Hafen E, Basler K. Model for the regulation of size in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech Develop* 2007;124:318-326.
22. Berry DL, Baehrecke EH. Growth Arrest and Autophagy Are Required for Salivary Gland Cell Degradation in *Drosophila*. *Cell* 2007;131:1137-1148.
23. Baehrecke EH. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 0000;10:940-945.
24. Andrew DJ, Henderson KD, Seshaiyah P. Salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. *Mech Develop* 2000;92:5-17.

25. Su TT, O'Farrell PH. Chromosome Association of Minichromosome Maintenance Proteins in *Drosophila* Endoreplication Cycles. *J Cell Biol* 1998;140:451-460.
26. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0001183.pub2/pdf> .acedido a 04/08/2014
27. Demakov SA, Vatolina TY, Babenko VN, Semeshin VF, Belyaeva ES, Zhimulev IF. Protein composition of interband regions in polytene and cell line chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 2011;12:566.
28. Arrese EL, Soulages JL. INSECT FAT BODY: ENERGY, METABOLISM, AND REGULATION. *Annu rev entomol* 2010;55:207-225.
29. Liu Y, Liu H, Liu S, Wang S, Jiang R-J, Li S. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Archiv Insect Biochem* 2009;71:16-30.
30. Lindmo K, Simonsen A, Brech A, Finley K, Rusten TE, Stenmark H. A dual function for Deep orange in programmed autophagy in the *Drosophila melanogaster* fat body. *Exp Cell Res* 2006;312:2018-2027.
31. Lemaitre B, Miguel-Aliaga I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet* 2013;47:377-404.
32. Sozen MA, Armstrong JD, Yang M, Kaiser K, Dow JA. Functional domains are specified to single-cell resolution in a *Drosophila* epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5207-5212.
33. Rajan A, Perrimon N. Of flies and men: insights on organismal metabolism from fruit flies. *BMC Biol* 2013;11:38.
34. Davies SA, Huesmann GR, Maddrell SH, O'Donnell MJ, Skaer NJ, Dow JA, et al. CAP2b, a cardioacceleratory peptide, is present in *Drosophila* and stimulates tubule fluid secretion via cGMP. *Am J Physiol* 1995;269:R1321-1326.
35. Yagi S, Ogawa H. Effect of Tryptophan Metabolites on Fluorescent Granules in the Malpighian Tubules of Eye Color Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Zool Sci* 1996;13:97-104.
36. Samakovlis C, Hacohen N, Manning G, Sutherland DC, Guillemin K, Krasnow MA. Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* 1996;122:1395-1407.
37. Guay PS, Guild GM. The ecdysone-induced puffing cascade in *Drosophila* salivary glands: a Broad-Complex early gene regulates intermolt and late gene transcription. *Genetics* 1991;129:169-175.
38. Kozlova T, Thummel CS. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:276-280.
39. Buszczak M, Segraves WA. *Drosophila* metamorphosis: the only way is USP? *Curr Biol* 1998;8:R879-882.
40. Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 2001;230:243-257.
41. Olcott MH, Henkels MD, Rosen KL, Walker FL, Sneh B, Loper JE, et al. Lethality and developmental delay in *Drosophila melanogaster* larvae after ingestion of selected *Pseudomonas fluorescens* strains. *PLoS One* 2010;5:e12504.
42. Meister M, Lagueux M. *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 2003;5:573-580.
43. Binggeli O, Neyen C, Poidevin M, Lemaitre B. Prophenoloxidase Activation Is Required for Survival to Microbial Infections in *Drosophila*. *PLoS Pathogens* 2014;10:e1004067.
44. Senger K, Harris K, Levine M. GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15957-15962.
45. Williams MJ. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol* 2007;178:4711-4716.
46. Harari-Steinberg O, Cantera R, Denti S, Bianchi E, Oron E, Segal D, et al. COP9 signalosome subunit 5 (CSN5/Jab1) regulates the development of the *Drosophila* immune system: effects on Cactus, Dorsal and hematopoiesis. *Genes Cells* 2007;12:183-195.

47. Braun A, Hoffmann JA, Meister M. Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14337-14342.
48. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One* 2011;6:e16270.
49. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Dijk Jv, et al. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys* 2009;11:115012.
50. Kalghatgi SU, Fridman G, Cooper M, Nagaraj G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, et al. Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2007;35:1559-1566.
51. Steinbeck MJ, Chernets N, Zhang J, Kurpad DS, Fridman G, Fridman A, et al. Skeletal Cell Differentiation Is Enhanced by Atmospheric Dielectric Barrier Discharge Plasma Treatment. *PLoS ONE* 2013;8:e82143.
52. Arjunan KP, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. *J R Soc Interface* 2012;9:147-157.
53. Fridman G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Ayan H, Fridman A, Gutsol A, et al. Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chem and Plasma Process* 2006;26:425-442.
54. Kalghatgi S, Fridman G, Balasubramanian M, Brooks A, Vasilets V, Fridman A, et al., editors. Mechanism of Blood Coagulation by Non-Thermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2007; 35:5.
55. Leduc M, Guay D, Leask RL, Coulombe S. Cell permeabilization using a non-thermal plasma. *New J Phys* 2009;11:115021.
56. Shekhter AB, Serezhenkov VA, Rudenko TG, Pekshev AV, Vanin AF. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. *Nitric Oxide* 2005;12:210-219.
57. Raiser J, Zenker M. Argon plasma coagulation for open surgical and endoscopic applications: state of the art. *J Phys D: Appl Phys* 2006;39:3520.
58. Kuo SP, Tarasenko O, Chang J, Popovic S, Chen CY, Fan HW, et al. Contribution of a portable air plasma torch to rapid blood coagulation as a method of preventing bleeding. *New J Phys* 2009;11:115016.
59. Sladek REJ, Stoffels E, Walraven R, Tielbeek PJA, Koolhoven RA. Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2004;32:1540-1543.
60. Pan J, Sun K, Liang Y, Sun P, Yang X, Wang J, et al. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with enterococcus faecalis biofilms in vitro. *J Endod* 2013;39:105-110.
61. Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, Fridman G, Shereshevsky A, Torabi B, et al. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species. *Ann Biomed Eng* 2011;39:674-687.
62. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied Plasma Medicine. *Plasma Process Polym* 2008;5:503-533.
63. Yildirim ED, Ayan H, Vasilets VN, Fridman A, Guceri S, Sun W. Effect of Dielectric Barrier Discharge Plasma on the Attachment and Proliferation of Osteoblasts Cultured over Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds. *Plasma Process Polym* 2008;5:58-66.
64. Ahlfeld B, Li Y, Boulaaba A, Binder A, Schotte U, Zimmermann JL, et al. Inactivation of a foodborne norovirus outbreak strain with nonthermal atmospheric pressure plasma. *MBio* 2015;6:e02300-14
65. Danil D, Gregory F, Gary F, Alexander F. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 2009;11:115020.
66. Leduc M, Guay D, Coulombe S, Leask RL. Effects of Non-thermal Plasmas on DNA and Mammalian Cells. *Plasma Process Polym* 2010;7:899-909.
67. Ward RE, Reid P, Bashirullah A, D'Avino PP, Thummel CS. GFP in living animals reveals dynamic developmental responses to ecdysone during *drosophila* metamorphosis☆. *Dev Biol* 2003;256:389-402.

68. Schubiger M, Wade AA, Carney GE, Truman JW, Bender M. Drosophila EcR-B ecdysone receptor isoforms are required for larval molting and for neuron remodeling during metamorphosis. *Development* 1998;125:2053-2062.
69. Regan JC, Brandao AS, Leitao AB, Mantas Dias AR, Sucena E, Jacinto A, et al. Steroid hormone signaling is essential to regulate innate immune cells and fight bacterial infection in Drosophila. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003720.
70. Rewitz KF, O'Connor MB. Timing is Everything: PTH Mediated DHR4 Nucleocytoplasmic Trafficking Sets the Tempo of Drosophila Steroid Production. *Front Endocrin* 2011;2:108.
71. Gates J, Lam G, Ortiz JA, Losson R, Thummel CS. rigor mortis encodes a novel nuclear receptor interacting protein required for ecdysone signaling during Drosophila larval development. *Development* 2004;131:25-36.
72. Ou Q, Magico A, King-Jones K. Nuclear Receptor DHR4 Controls the Timing of Steroid Hormone Pulses During *Drosophila* Development. *PLoS Biol* 2011;9:e1001160.
73. Mirth C, Truman JW, Riddiford LM. The Role of the Prothoracic Gland in Determining Critical Weight for Metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 2005;15:1796-1807.
74. Andres AJ, Fletcher JC, Karim FD, Thummel CS. Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of Drosophila ecdysteroid-regulated transcription. *Dev Biol* 1993;160:388-404.
75. Gautam NK, Tapadia MG. Ecdysone signaling is required for proper organization and fluid secretion of stellate cells in the Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Int J Dev Biol* 2010;54:635-642.
76. D'Avino PP, Thummel CS. The ecdysone regulatory pathway controls wing morphogenesis and integrin expression during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* 2000;220:211-224.
77. Cho KH, Daubnerova I, Park Y, Zitnan D, Adams ME. Secretory competence in a gateway endocrine cell conferred by the nuclear receptor betaFTZ-F1 enables stage-specific ecdysone responses throughout development in *Drosophila*. *Dev Biol* 2014;385:253-262.
78. Fletcher JC, Burtis KC, Hogness DS, Thummel CS. The *Drosophila* E74 gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development* 1995;121:1455-1465.
79. Zhou X, Riddiford LM. Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* 2002;129:2259-2269.
80. Hewes RS, Schaefer AM, Taghert PH. The cryptocephal gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Genetics* 2000;155:1711-1723.
81. Broadus J, McCabe JR, Endrizzi B, Thummel CS, Woodard CT. The *Drosophila* β FTZ-F1 Orphan Nuclear Receptor Provides Competence for Stage-Specific Responses to the Steroid Hormone Ecdysone. *Molecular Cell* 1999;3:143-149.
82. Ji Y, Clark DV. The Purine Synthesis Gene *Prat2* Is Required for *Drosophila* Metamorphosis, as Revealed by Inverted-Repeat-Mediated RNA Interference. *Genetics* 2006;172:1621-1631.
83. Szuplewski S, Terracol R. The cyclope gene of *Drosophila* encodes a cytochrome c oxidase subunit VIc homolog. *Genetics* 2001;158:1629-1643.
84. Rodriguez A, Zhou Z, Tang ML, Meller S, Chen J, Bellen H, et al. Identification of Immune System and Response Genes, and Novel Mutations Causing Melanotic Tumor Formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1996;143:929-940.
85. Mirth C. Ecdysteroid control of metamorphosis in the differentiating adult leg structures of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 2005;278:163-174.
86. Yamanaka N, Rewitz KF, O'Connor MB. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu Rev Entomol* 2013;58:497-516.

87. D'Avino PP, Thummel CS. crooked legs encodes a family of zinc finger proteins required for leg morphogenesis and ecdysone-regulated gene expression during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 1998;125:1733-1745.
88. Callier V, Nijhout HF. Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14664-14669.
89. Burmester T, Hankeln T. The respiratory proteins of insects. *J Insect Physiol* 2007;53:285-294.
90. Callier V, Nijhout HF. Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108:14664-14669.
91. Lewis JCJAEB. The Nature of Certain Red Cells in *Drosophila Melanogaster*. *Biol Bull* 1957;122:220-224.
92. Halme A, Cheng M, Hariharan IK. Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Curr Biol* 2010;20:458-463.
93. Juhasz G, Puskas LG, Komonyi O, Erdi B, Maroy P, Neufeld TP, et al. Gene expression profiling identifies FKBP39 as an inhibitor of autophagy in larval *Drosophila* fat body. *Cell Death Differ* 2007;14:1181-1190.
94. Rusten TE, Lindmo K, Juhasz G, Sass M, Seglen PO, Brech A, et al. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* 2004;7:179-192.
95. Dolezal T, Dolezelova E, Zurovec M, Bryant PJ. A Role for Adenosine Deaminase in *Drosophila* Larval Development. *PLoS Biol* 2005;3:e201.
96. Rizki TM, Rizki RM. Topology of the caudal fat body of the tumor-w mutant of *Drosophila melanogaster*. *J Invertebr Pathol* 1974;24:37-40.
97. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007;25:697-743.
98. Danil D, Gregory F, Gary F, Alexander F. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 2009;11:115020.
99. Rus F, Flatt T, Tong M, Aggarwal K, Okuda K, Kleino A, et al. Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls *Drosophila* innate immunity. *Embo j* 2013;32:1626-1638.
100. Zamora FJHaR. The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas Aceites* 2000;51:35-49.
101. Tang H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 2009;3:105-111.
102. Mason HS. The chemistry of melanin; mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J Biol Chem* 1948;172:83-99.
103. Green C, Levashina E, McKimmie C, Dafforn T, Reichhart JM, Gubb D. The necrotic gene in *Drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43A1.2. *Genetics* 2000;156:1117-1127.
104. Page-McCaw A, Serano J, Sante JM, Rubin GM. *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev Cell* 2003;4:95-106.
105. Caceres L, Necakov AS, Schwartz C, Kimber S, Roberts IJ, Krause HM. Nitric oxide coordinates metabolism, growth, and development via the nuclear receptor E75. *Genes Dev* 2011;25:1476-1485.
106. Buttkus HA. Fluorescent lipid autoxidation products. *J Agr Food Chem* 1975;23:823-825.
107. Mackenzie SM, Brooker MR, Gill TR, Cox GB, Howells AJ, Ewart GD. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochim Biophys Acta* 1999;1419:173-185.
108. Kuzin B, Doszhanov K, Mazo A. Interaction between spineless-aristopedia gene and genes from Antennapedia and bithorax complexes of *Drosophila melanogaster*. *Int J Dev Biol* 1997;41:867-875.

109. Bryant PJ, Sang JH. Physiological Genetics of Melanotic Tumors in *Drosophila Melanogaster*. VI. the Tumorigenic Effects of Juvenile Hormone-like Substances. *Genetics* 1969;62:321-336.
110. Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 2007;210:956-963.
111. Hackney JF, Zolali-Meybodi O, Cherbas P. Tissue damage disrupts developmental progression and ecdysteroid biosynthesis in *Drosophila*. *PLoS One* 2012;7:e49105.

Anexo 1

Etapas da metamorfose em *Drosophila melanogaster* a 25° C

Stages of metamorphosis in <i>Drosophila melanogaster</i> (at 25°C)		
Stage	Time (hours)^a	Developmental event
P1	0–1	White puparium: wriggling stops completely
P2	1–3	Brown puparium: oral armature stops moving permanently, heart stops pumping, gas bubble becomes visible within abdomen
P3	3–6.5	Bubble prepupa: puparium becomes separated from underlying epidermis; bubble in abdominal region is large, causing prepupa to become positively buoyant at end of this stage (it floats)
P4	6.5–12.5	Buoyant and moving bubble: prepupa is buoyant, and bubble moves, first appearing in the posterior of the puparium, displacing pupa anteriorly, and then appearing in the anterior, displacing the pupa posteriorly. Imaginal head sac is everted and oral armature of larva is expelled
P5	12.5–25	Malpighian tubules migrating and white: legs and wings extend; Malpighian tubules move from thorax to abdomen and become visible as white structures in dorsal anterior abdomen
P6	25–43	Green Malpighian tubules: Malpighian tubules turn green, and dark green “yellow body” appears between the anterior ends of the two Malpighian tubules
P7	43–47	“Yellow body”: “yellow body” (actually dark green) moves back between the Malpighian tubules; transparent pupal cuticle separates from underlying epidermis; eye cup becomes yellow at its perimeter
P8	47–57	Yellow-eyed: eyes become bright yellow
P9	57–69	Amber: eyes darken to deep amber
P10	69–73	Red-eye Bald: eyes become bright red; orbital and ocellar bristles and vibrissae darken
P11	73–78	Head and thoracic bristles: head bristles, followed by thoracic bristles, darken
P12	73–78	Wings grey: wings become gray; sex comb darkens
P13	78–87	Wings black: wings become black; tarsal bristles darken and claws become black
14	87–90	Mature bristles: green patch (the meconium–waste products of pupal metabolism) appears dorsally at posterior tip of abdomen

P15	90–103	Meconium and eclosion: tergites become tan, obscuring Malpighian tubules and “yellow body”; legs twitch; flies able to walk prematurely if puparium removed; eclosion completed
<p>^aTimes start on approximately day four of larval life when the larva is still white but is no longer able to crawl. Timing is variable among individuals, and the times given are a simplification from the Bainbridge and Bownes paper.</p> <p><i>Source:</i> After Bainbridge, S. P. and M. Bownes. 1981. Staging the metamorphosis of <i>Drosophila melanogaster</i>. <i>J. Embryol. Exp. Morph.</i> 66: 57–80.</p>		

Fonte: <http://developmentalbiology.net/node/46>.

Anexo 2

Tabela 1: Exposição da linha 10

Discrição	50 segundos c/UV			120 segundos c/UV			120 s/UV			c/antibiótico 180 segundos		
	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio
Linha 10												
Nº larvas expostas	171	163	104	23	0	31	23	0	31	147	147	104
Larvas mortas	95 (±56%)	45 (±27%)	28 (±27%)	7 (±30%)	0	3 (±10%)	7 (±30%)	0	3 (±10%)	88 (±60%)	122 (±83%)	56 (±54%)
c/melanismo	60 (±63%)	35 (±78%)	21 (±75%)	7 (100%)	0	3 (100%)	7 (100%)	0	3 (100%)	63 (±72%)	91 (±75%)	44 (±79%)
s/melanismo	35 (±37%)	10 (±22%)	7 (25%)	0	0	0	0	0	0	25 (±28%)	31 (±25%)	12 (±21%)
sobreviventes	76 (±44%)	118 (±72%)	76 (±73%)	16 (±70%)	0	28 (±90%)	16 (±70%)	0	28 (±90%)	59 (±40%)	25 (±17%)	48 (±46%)
c/massas melanóticas	31 (±41%)	35 (±30%)	19 (±25%)	5 (±31%)	0	9 (±32%)	5 (±31%)	0	9 (±32%)	15 (±25%)	8 (32%)	7 (±15%)
s/massas melanóticas	45 (±59%)	83 (±70%)	53 (±70%)	11 (±69%)	0	19 (±68%)	11 (±69%)	0	19 (±68%)	44 (±75%)	17 (±68%)	41 (±85%)
Pupas formadas	45	118	76	16	0	28	16	0	28	59	25	48
c/melanismos	22 (±29%)	21 (±18%)	23 (±30%)	4 (25%)	0	8 (±29%)	4 (25%)	0	8 (±29%)	18 (±31%)	8 (±32%)	6 (±12%)
s/melanismos	54 (±71%)	97 (±82%)	53 (±70%)	12 (75)	0	19 (±68%)	12 (75%)	0	19 (±68%)	41 (±69%)	17 (±68%)	42 (±88%)
c/anomalias morfológicas	0	4 (±3%)	0	1 (±6%)	0	1 (±4%)	1 (±6%)	0	1 (±3%)	3 (±5%)	1 (±4%)	9 (±19%)
morfologia normal	45	93 (±79%)	53 (±70%)	11 (±69%)	0	18 (±64%)	15 (±94%)	0	18 (±64%)	56 (±95%)	15 (±60%)	33 (±69%)
pupa mortas	15 (±20%)	19 (±16%)	3 (±4%)	4 (25%)	0	0	4 (25%)	0	0	3 (±5%)	5 (±20%)	16 (33%)
c/melanismo	10 (±67%)	4 (±3%)	2 (±3%)	3 (±18%)	0	0	0	0	0	1 (±33%)	3 (±12%)	3 (19%)
c/anomalias morfológicas	0	4 (±3%)	0	1 (±7%)	0	0	1 (±6%)	0	0	1 (±33%)	1 (±4%)	8 (50%)
morfologia normal	5 (±33%)	4 (±3%)	1 (±1%)	0	0	0	3 (±19%)	0	0	1 (±33%)	1 (±4%)	5 (±31%)
pupas sobreviventes	61	99	73	12	0	28	12	0	28	56	20	32
c/melanismo	12	17 (±17%)	21 (±29%)	1 (±8%)	0	8 (±29%)	4 (±33%)	0	8 (±29%)	17 (±30%)	5 (±20%)	3 (±9%)
c/anomalias morfológicas	0	0	0	0	0	1 (±4%)	0	0	1 (±4%)	0	0	1 (±3%)
c/morfologia normal	49	91 (±92%)	52 (±71%)	12 (100%)	0	19 (±68%)	11 (±92%)	0	19 (±68%)	55 (±98%)	14 (±70%)	28 (±88%)
adultos formados	61	99	73	12	0	28	12	0	28	56	20	32
c/anomalias	9 (±15%)	23 (±23%)	25 (±30%)	2 (±17%)	0	6 (±21%)	3 (25%)	0	12 (±43%)	29 (±52%)	11 (±55%)	32 (100%)
c/ morfologia normal	52 (±85%)	76 (±77%)	51 (±70%)	10 (±83%)	0	22 (±79%)	9 (±75%)	0	16 (±57%)	27 (±48%)	9 (±45%)	0
machos	31 (±51%)	61 (±62%)	41 (±56%)	8 (±67%)	0	14 (50%)	8 (±67%)	0	14 (50%)	29 (±52%)	10 (50%)	10 (±31%)
fêmeas	30 (±49%)	38 (±38%)	32 (±44%)	4 (±33%)	0	14 (50%)	4 (±33%)	0	14 (50%)	27 (±48%)	10 (50%)	22 (±69)

Tabela 2: Exposição da linha Barcelona; número de larvas mortas com melanismo/massas melanóticas e sem melanismo/massas melanóticas, número de larvas sobreviventes com melanismo/massas melanóticas e sem melanismo/massas melanóticas; número de pupas formadas com melanismo/massas melanóticas, sem melanismo/massas melanóticas e com morfologia normal, numero de pupas mortas com melanismo/massas melanóticas e com morfologia normal numero de pupas sobreviventes com melanismo/massas melanóticas, com morfologia normal e com anomalias morfológicas; número de adultos formados com anomalias, sem anomalias; número de machos e de fêmeas.

Discrição	50 segundos c/UV			120 segundos c/UV			50 segundos s/UV			120 segundos s/UV			180 segundos s/UV		
	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio	1º estágio	2º estágio	3º estágio
Nº larvas expostas	50	52	61	0	5	48	0	16	31	208	129	109	135	205	257
Larvas mortas	30 (60%)	24 (±46%)	4 (±7%)	0	4 (80%)	30 (±62%)	0	6 (±38%)	4 (±13%)	138 (±66%)	45 (±35%)	13 (±13%)	90 (±67%)	94 (±46%)	27 (±11%)
c/melanismo	19 (±63%)	18 (75%)	4 (100%)	0	4 (100%)	20 (±67%)	0	6 (100%)	2 (50%)	97 (±70%)	29 (±64%)	8 (±62%)	77 (±86%)	71 (±76%)	21 (±78%)
s/melanismo	21 (±70%)	6 (25%)	0	0	0	10 (±33%)	0	0	2 (50%)	41 (±30%)	16 (±37%)	5 (±38%)	15 (±17%)	23 (±24%)	6 (±22%)
sobreviventes	20 (±40%)	28 (±54%)	57 (±93%)	0	1 (20%)	18 (±38%)	0	10 (±63%)	27 (±87%)	70 (±34%)	84 (±65%)	96 (±87%)	45 (±33%)	111 (±54%)	230 (±89%)
c/massas melanóticas	0	3 (±11%)	12 (±21%)	0	0	10 (±56%)	0	2 (20%)	5 (±19%)	14 (20%)	13 (±15%)	13 (±14%)	13 (±29%)	25 (±23%)	31 (±13%)
s/massas melanóticas	20 (100%)	25 (±89%)	45 (±79%)	0	1 (100%)	8 (±44%)	0	8 (±80%)	22 (±81%)	56 (80%)	71 (±85%)	83 (±86%)	32 (±71%)	86 (±77%)	191 (±83%)
Pupas formadas	20	28	57	0	1	18	0	10	27	70	84	96	45	111	230
c/melanismos	2 (10%)	2 (±7%)	22 (±39%)	0	0	3 (±17%)	0	0	3 (±11%)	6 (±9%)	7 (±8%)	20 (±21%)	4 (±9%)	19 (±17%)	31 (±13%)
s/melanismos	18 (±90%)	26 (±93%)	35 (±61%)	0	1 (100%)	15 (±83%)	0	10 (100%)	24 (±89%)	55 (±79%)	68 (±81%)	70 (±73%)	41 (±91%)	92 (±83%)	199 (±87%)
c/anomalias morfológicas	0	0	0	0	0	1 (±6%)	0	0	5 (±19%)	15 (±21%)	9 (±11%)	13 (±14%)	2 (±4%)	0	22 (±10%)
morfologia normal	18 (±90%)	28 (100%)	57 (100%)	0	1 (100%)	14 (±78%)	0	0	19 (±70%)	55 (±79%)	68 (±81%)	83 (±86%)	43 (±96%)	111 (100%)	230 (100%)
pupa mortas	0	5 (±18%)	22 (±39%)	0	0	4 (±22%)	0	1	4 (±15%)	8 (±15%)	27 (±32%)	28 (±29)	11 (±24%)	9 (±8%)	40 (±17%)
c/melanismo	0	0	10 (±45%)	0	0	2 (50%)	0	1 (100%)	0	2 (25%)	6 (±22%)	3 (±11%)	1 (±9%)	3 (±33%)	18 (±45%)
c/anomalias morfológicas	0	5	0	0	0	1 (25%)	0	0	4 (100%)	1 (±13%)	9 (±33%)	13 (±46%)	1 (±9%)	0	22 (±55%)
morfologia normal	0	0	12 (±55%)	0	0	1 (25%)	0	0	0	3 (±38%)	11 (±41%)	10 (±36%)	9 (±82%)	6 (±67%)	15 (±38%)
pupas sobreviventes	20	23	35	0	1	14	0	9	23	62	57	68	45	102	190
c/melanismo	2 (10%)	2 (±9%)	11 (±31%)	0	0	1 (±7%)	0	0	3 (±13%)	8 (±13%)	1 (22%)	17 (25%)	3 (±7%)	16 (±16%)	13 (±7%)
c/anomalias morfológicas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14 (±23%)	0	0	1 (±2%)	0	0
c/morfologia normal	18 (90%)	21 (±91%)	24 (±69%)	0	1 (100%)	13 (±93%)	0	9 (100%)	20 (±87%)	52 (±84%)	56 (±98%)	51 (75%)	41 (±91%)	102 (100%)	190 (100%)
adultos formados	20	23	35	0	1	14	0	9	23	62	57	68	45	102	190
c/anomalias	3 (15%)	2 (±9%)	11 (±31%)	0	1 (100%)	4 (±29%)	0	3 (±33%)	11 (±48%)	15 (±24%)	4 (27%)	28 (±41%)	10 (±22%)	35 (±34%)	37 (±19%)
c/ morfologia normal	17 (±85%)	20 (±89%)	24 (±69%)	0	0	10 (±71%)	0	6 (±67%)	12 (52%)	47 (±76%)	53 (±93%)	40 (±59%)	35 (±78%)	67 (±66%)	153 (±81%)
machos	11 (55%)	11 (±48%)	15 (±43%)	0	0	6 (±43%)	0	5 (±56%)	13 (±57%)	34 (±55%)	32 (±56%)	25 (±37%)	20 (±59%)	51 (50%)	88 (±46%)
fêmeas	9 (45%)	12 (±52%)	20 (±57%)	0	1 (100%)	8 (±57%)	0	4 (±44%)	10 (±43%)	28 (±45%)	25 (±44%)	43 (±63%)	14 (±41%)	51 (50%)	102 (±54%)

Tabela 3: Controlo

Descrição	Controlo Barcelona			Controlo linha 10		
	1.º estágio	2.º estágio	3.º estágio	1.º estágio	2.º estágio	3.º estágio
N.º larvas expostas	95	88	96	106	100	121
Larvas mortas	30 (±32%)	10 (±11%)	7 (±7%)	52 (±49%)	14 (14%)	2 (±2%)
c/melanismo	0	0	4 (±57%)	0	0	0
s/melanismo	30 (100%)	10 (100%)	3 (43%)	52 (100%)	14 (100%)	2 (100%)
Larvas sobreviventes	65 (±68%)	78 (±89%)	89 (±93%)	54 (±51%)	86 (86%)	119 (±98%)
c/massas melanóticas	0	0	0	2 (±4%)	3 (±3%)	3 (±3%)
s/massas melanóticas	65 (100%)	78 (100%)	89 (100%)	52 (±96%)	83 (±87%)	116 (±97%)
Pupas formadas	65	78	89	54	86	119
c/melanismos	0	0	0	0	3 (±3%)	0
s/melanismos	65 (100%)	78 (100%)	89 (100%)	0	83 (±97%)	119 (100%)
c/anomalias morfológicas	0	0	0	0	0	0
c/morfologia normal	65 (100%)	78 (100%)	89 (100%)	54 (100%)	86 (100%)	119 (100%)
Pupas mortas	2 (±3%)	0	4 (±4%)	3 (±6%)	0	4 (±4%)
c/melanismo	0	0	0	0	0	2 (50%)
c/anomalias morfológicas	0	0	0	0	0	0
c/morfologia normal	2 (±3%)	0	4 (100%)	3 (100%)	0	2 (50%)
Pupas sobreviventes	63 (±97%)	78 (100%)	85 (±96%)	51 (±94%)	86 (100%)	115 (97%)
c/melanismo	0	0	0	0	3 (100%)	0
c/anomalias morfológicas	0	0	0	0	0	0
c/morfologia normal	63 (100%)	78 (100%)	85 (100%)	51 (100%)	86 (100%)	115 (100%)
Adultos formados	63	78	85	51	86	115
c/anomalias	0	0	0	0	3 (±3%)	5 (±4%)
c/ morfologia normal	63 (100%)	78 (100%)	85 (100%)	51 (100%)	83 (±97%)	110 (±96%)
machos	27 (±43%)	40 (±51%)	38 (±45%)	27 (±53%)	50 (±58%)	59 (±51%)
fêmeas	36 (±57%)	38 (±49%)	47 (±55%)	24 (±47%)	36 (±42%)	56 (±49%)