**Aula Prática N°1: Regeneração de Planárias**

**Protocolo da Aula 3 (20/03)**

**Entregar respondido no dia 27/03**

 A regeneração inclui todos os processos que permitem ao organismo substituir tecidos ou partes do corpo. A regeneração tem sido observada na maioria dos filos animais e em diferentes níveis biológicos: (a) regeneração de estruturas celulares, como fibras musculares; (b) tecidos, como a pele; (c) órgãos internos, como o fígado; (d) extremidades, como pernas ou caudas em salamandras; e (e) regeneração de corpo completo a partir de um grupo de tecidos e células, como nas planárias (Bely & Nyberg, 2010).

 Em cada nível de regeneração diferentes estratégias são usadas para repor as partes danificadas. A primeira estratégia da regeneração se origina a partir da reorganização de células pré-existentes. A segunda estratégia envolve a aparição de novas células, que podem implicar processos de-diferenciação ou trans-diferenciação a partir de células diferenciadas, ou processos de proliferação a partir de células tronco preexistentes. Em alguns casos, as novas células geram uma estrutura especializada conhecida como o blastema que aparece após o fechamento da lesão. O blastema está composto por um epitélio externo e uma matriz extracelular com células de origem mesenquimal. As células mesenquimais proliferam e dirigem a regeneração (Alvarado, 2000).

 As planarias de água doce têm sido estudadas pela capacidade de regeneração do corpo completo. Elas podem regenerar um indivíduo com todos os órgãos e estruturas a partir de um único pequeno pedaço do corpo. Por meio de células pluripotentes no blastema, também conhecidas como neoblastos, os pedaços regeneram o corpo completo. Os neoblastos são células indiferenciadas que proliferam ao longo do corpo da planária que migram e proliferam no blastema, e se diferenciam durante a regeneração (Rink, 2013).

 Nesta prática vamos estudar os processo da regeneração em planarias por meio de três ensaios de recuperação comportamental: (1) recuperação da fototaxia negativa, (2) recuperação da quimiorrecepção, e (3) recuperação da mecanorrecepção.

**Bibliografia**

-Alexandra E. Bely, Kevin G. Nyberg, Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field, Trends in Ecology & Evolution, Volume 25, Issue 3, March 2010, Pages 161-170, ISSN 0169-5347, http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.08.005.

-Alvarado, A. S. (2000). Regeneration in the metazoans: why does it happen? Bioessays 22 (6):578-590.

-Bely, A.B and Nyberg, K.G. (2009). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field, Trends in Ecology & Evolution, Volume 25, Issue 3, March 2010, Pages 161-170, ISSN 0169-5347, http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.08.005.

-Rink, J. C. (2013). Stem cell systems and regeneration in planaria.*Development Genes and Evolution*, *223*(1-2), 67–84. http://doi.org/10.1007/s00427-012-0426-4

**Instruções iniciais:**

1. Cada grupo deve receber 3 planárias controle e 12 planárias já cortadas (3 réplicas do experimento), seguindo o esquema da tabela abaixo:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Data do corte** | 03/10/17 | 03/13/17 | 03/18/17 | 03/20/17 |
| **No Planárias cortadas** | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **No Planárias controle** | 3 |
| **Dia/Tempo do Experimento** | 10 (t3) | 7 (t2) | 3 (t1) | 0 (t0) |

OBS: Os grupos só receberão a parte posterior (as caudas) das planárias cortadas.

1. Mantenha todas as placas de petri cobertas para evitar o contato das planárias com a luz.
2. Você realizará 45 medições no total. Quinze medições (3 medições com planárias controle e 12 com planárias cortadas) em cada tratamento: fototaxia, quimiorrecepção e mecanorrecepção. A quarta planária “corte” e “controle” são apenas uma garantia, caso alguma morra.

**Materiais**

* Planárias (12 cortadas e 3 controles por grupo)
* Placa de Petri com planárias (5 por grupo, sendo 4 com planárias cortadas e uma com as controle)
* Placa de Petri (3 por grupo)
* Placa de Petri com areia (2 por grupo)
* Papel milimetrado (1 por grupo)
* Água destilada (2L para todos)
* Estereoscópio (1 por grupo)
* Cronômetros (1 por grupo)
* Álcool (1L para todos)
* Pincéis (1 por grupo)
* Papel toalha
* Pipetas de plástico
* Luminária
* Canetas retroprojetor
* Fígado

***Experimento 1 - Recuperação da fototaxia durante a regeneração:***

**Metodologia**

1. Pegue uma planária do controle e coloque-a no centro de uma placa de Petri com água destilada e que esteja sob a luminária ligada.
2. Imediatamente fechar a placa e desenhar o percurso da planária com a caneta retroprojetora sobre a tampa da placa de Petri por 1 minuto. Por conta da fototaxia negativa, o verme fugirá da luz até chegar à parede da placa de Petri. Anote o tempo em segundos que o verme levou para chegar até a parede da placa.
3. Desenhe o percurso da planária no papel milimetrado e faça o cálculo da distância percorrida, contando o número de quadrados obtidos no papel milimetrado seguindo-se o percurso que você desenhou no papel. Calcule a velocidade da planária.
4. Apague o percurso da tampa da placa de Petri com álcool, e repita o procedimento mais 2 vezes com as outras planárias controle.
5. Repita os passos 1-4 nas planárias cortadas (n=12) durante três tempos de regeneração (t0 = após o corte; t1=3 dias; t2=7 dias; t3=10 dias).
6. Complete a tabela:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamento: FOTOTAXIA** | Vel\* Verme 1 | Vel\* Verme 2 | Vel\* Verme 3 | Vel\* Média |
| **Tempo 0 (0 dias, após o corte) = 20/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 1 (3 dias, após o corte) = 18/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 2 (7 dias, após o corte) = 13/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 3 (10 dias, após o corte) = 10/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |

\*Vel = velocidade

**OBS:** os dados de “presença de olhos” e “outras observações morfológicas” devem ser colocadas na tabela abaixo do dado da velocidade.

1. Complete a figura:



1. Analise as linhas dos percursos das planárias no papel milimetrado e discuta-os com os resultados das velocidades médias dos tratamentos. Quais são as razões para a variabilidade?

***Experimento 2 - Recuperação da quimiorrecepção durante a regeneração:***

**Metodologia**

1. Pegue uma planária do controle e coloque-a a 1 cm de distância da lateral de uma placa de Petri com água destilada e um pequeno pedaço de fígado a 1 cm de distância da lateral da placa no lado oposto.
2. Imediatamente fechar a placa e desenhar o percurso da planária com a caneta retroprojetora sobre a tampa da placa de Petri por 1 minuto. Anote o tempo em segundos que o verme levou para chegar até o alimento.
3. Desenhe o percurso da planária no papel milimetrado e faça o cálculo da distância percorrida, contando o número de quadrados obtidos no papel milimetrado seguindo-se o percurso que você desenhou no papel. Calcule a velocidade da planária.
4. Apague o percurso da tampa da placa de Petri com álcool, e repita o procedimento mais 2 vezes com as outras planárias controle.
5. Repita os passos 1-4 nas planárias cortadas (n=12) durante três tempos de regeneração (t0 = após o corte; t1=3 dias; t2=7 dias; t3=10 dias).
6. Complete a tabela:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamento: QUIMIORRECEPÇÃO** | Vel\* Verme 1 | Vel\* Verme 2 | Vel\* Verme 3 | Vel\* Média |
| **Tempo 0 (0 dias, após o corte) = 20/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 1 (3 dias, após o corte) = 18/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 2 (7 dias, após o corte) = 13/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 3 (10 dias, após o corte) = 10/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |

\*Vel = velocidade

**OBS:** os dados de “presença de olhos” e “outras observações morfológicas” devem ser colocadas na tabela abaixo do dado da velocidade.

1. Complete a figura:



1. Analise as linhas dos percursos das planárias no papel milimetrado e discuta-os com os resultados das velocidades médias dos tratamentos. Quais são as razões para a variabilidade?

***Experimento 3 - Recuperação da mecanorrecepção durante a regeneração:***

**Metodologia**

1. Pegue uma planária do controle e coloque-a na área da areia a um centímetro do centro da placa de Petri com água destilada.
2. Imediatamente fechar a placa e desenhar o percurso da planária com a caneta retroprojetora sobre a tampa da placa de Petri por 1 minuto. Anote o tempo em segundos que o verme ficou na área com a areia.
3. Desenhe o percurso da planária no papel milimetrado. Apague o percurso da tampa da placa de Petri com álcool, e repita o procedimento mais 2 vezes com as outras planárias controle.
4. Repita os passos 1-4 nas planárias cortadas (n=12) durante três tempos de regeneração (t0 = após o corte; t1=3 dias; t2=7 dias; t3=10 dias).
5. Complete a tabela:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamento: QUIMIORRECEPÇÃO** | Vel\* Verme 1 | Vel\* Verme 2 | Vel\* Verme 3 | Vel\* Média |
| **Tempo 0 (0 dias, após o corte) = 20/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 1 (3 dias, após o corte) = 18/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 2 (7 dias, após o corte) = 13/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |
| **Tempo 3 (10 dias, após o corte) = 10/03** |
| Controle (sem corte) |  |  |  |  |
| Vermes cortados (caudas apenas)- Presença olhos (sim/não/em formação)- Outras observações morfológicas |  |  |  |  |

\*Vel = velocidade

**OBS:** os dados de “presença de olhos” e “outras observações morfológicas” devem ser colocadas na tabela abaixo do dado da velocidade.

1. Complete a figura:



1. Analise as linhas dos percursos das planárias no papel milimetrado e discuta-os com os resultados das velocidades médias dos tratamentos. Quais são as razões para a variabilidade?
2. Usando as informações da organização do sistema nervoso da planária na figura abaixo e as informações que você reunir a partir de suas próprias observações sobre o comportamento de planárias durante a regeneração, construa um modelo (ilustrando um cenário hipotético) para mostrar como o sistema nervoso é regenerado a cada ponto experimental.

Imagem retirada de: <http://sharon-taxonomy2010-p2.wikispaces.com/Platyhelminthes>

**MODELO:** desenho dos animais (morfologia externa e cenário hipotético da regeneração do sistema nervoso):

**Controle: Corte t1=3 dias**

**Corte t2=7 dias Corte t3=10 dias**