

## Aula Prática N° 2. Nemátodos

### Protocolo da Aula 4 (27/03)

#### Entregar respondido no dia 27/03

Muitos dos nemátodos são modelos de estudos na biologia do desenvolvimento, e.g. *Caenorhabditis elegans*, *C. briggsae*. O nematódeo *Caenorhabditis elegans*, é um organismo pequeno (1 mm de comprimento) e de rápido desenvolvimento. O genoma de *C. elegans* foi um dos primeiros a ser sequenciado, permitindo entender o papel dos genes em muitos processos biológicos, motivo pelo qual *C. elegans* é um dos modelos animais mais usados no desenvolvimento e na biologia em geral (Hope, 2005). *C. elegans* tem o corpo translúcido e apresenta uma condição chamada Eutelia, ou seja, o número de células no adulto é constante. Essa condição permitiu o estabelecimento da linhagem celular completa no animal e o registro dos eventos de apoptose, ou morte celular programada, durante o desenvolvimento.

O desenvolvimento embrionário nos nemátodos é bem determinado desde a fertilização, momento no qual é determinado o eixo antero-posterior. A segmentação dos ovos é holoblástica, e neste processo são estabelecidas as seguintes linhagens: (1) AB que origina a faringe, a hipoderme e os neurônios; (2) EMS que é a linhagem formadora de músculo, faringe, gônadas e intestino; e, (3) linhagem P2 que está envolvida na formação de músculo e da linha germinativa. Depois da segmentação ocorre a gastrulação, e, nas 6 horas seguintes os órgãos são desenvolvidos e o embrião sofre um alongamento, até obter a forma de verme (forma que eclode do ovo). O nematódeo juvenil sofre vários processos de ecdises até se tornar adulto (Gilbert, 2014).

Alguns vermes apresentam uma resposta de diapausa em condições ambientais adversas durante o desenvolvimento da larva, motivo pelo qual este estágio do desenvolvimento tem sido muito estudado: a larva apresenta resposta plástica de entrada e saída de diapausa influenciada diretamente pelos fatores ambientais. As larvas Dauer são interessantes pelas adaptações fisiológicas de alta resistência, longevidade, armazenamento da gordura e estado de jejum permanente.

Nessa prática vamos observar e descrever alguns aspectos da biologia do desenvolvimento do nematódeo *C. elegans*. Descrever-se-á a sua morfologia externa, e os distintos estágios do desenvolvimento. Além disso, vamos identificar a linhagem N2 (referência ou “selvagem”) e comparar o fenótipo com outra linhagem mutante.

#### Referências:

1. Gilbert, S. 2014. *Developmental Biology*, 10a Edition. Sinauer Assoc, Sunderland.
2. Hope, I.A. 2005. *C. elegans a practical approach*. Oxford University Press. UK.
3. Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>

4. Mounting animals for observation with Nomarsky DIC optics by Monica Driscoll.
5. Outros protocolos: <http://www.wormatlas.org/methods.htm>

### Materiais:

- Placa Petri com indivíduos das linhagens N2 e ST53 de *C.elegans*
- Buffer M9 (1 L contém 3g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 5g de  $\text{NaCl}$ ; 1 mL de  $\text{MgSO}_4$ ; 1 M. Esterilizado por autoclave)
- Pipetas Pasteur
- Lâminas e lamínulas
- Lupa e microscópio
- Palitinho de madeira
- Fita crepe
- Agar 1%, em estado líquido (manter quente)

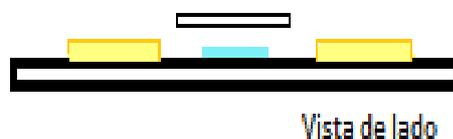
### Metodologia



1. Pegue uma lâmina e coloque fita crepe nas extremidades, como demonstrado na figura acima.
2. Entre os pedaços de fita crepe, colocar 1 gota de ágar quente.
3. Colocar uma lâmina em cima do ágar. Assim que o ágar secar, ele ficará no formato de um disco com espessura de 1-2mm.
4. Usando a lupa, pegue os nemátodos da placa de petri usando o palitinho de madeira: raspe suavemente a superfície do ágar sem romper ele para pegar os vermes.
5. Depois de pegar um grupo de vermes com o palitinho coloque eles no ágar da lâmina, sem romper o ágar.
6. Para evitar que os vermes se movam demais, esquente um pouco a lâmina.



7. Se ainda assim os nemátodos se moverem demais, coloque a lamínula em cima deles e faça um pouquinho de pressão.



8. Cada grupo vai receber: uma caixa NGM com a linhagem da referencia N2, e uma linhagem mutante para determinação do fenótipo:
- (a) Observe-as ao estereoscópico e microscópio utilizando as técnicas descritas no protocolo.
  - (b) Tente observar o máximo de estágios de desenvolvimento que forem possíveis, desde ovos até adultos já fecundados.
  - (c) Determinar o sexo do indivíduo.
  - (d) Identificar as partes do verme, por exemplo, a faringe, a cutícula, as gônadas, a vulva, os embriões, etc.

## **DESENHE OS ESTÁGIOS LARVAIS DE *C. elegans* N2**

**J1**

**J2**

**J3**

**J4**

**ADULTO**  
HERMAFRODITA

**ADULTO**  
MACHO

## Ovos/embriões

9. Completar tabela com o número de vermes observados na placa entregada:

<b>N2</b>					
<b>Estágios larvais:</b>				<b>Adultos:</b>	
L1	L2	L3	L4	Macho	Fêmea

<b>Mutante</b>					
<b>Estágios larvais:</b>				<b>Adultos:</b>	
L1	L2	L3	L4	Macho	Fêmea

10. Determine o fenótipo da linhagem mutante:

11. Propor uma hipótese para a ocorrência deste fenótipo: