

## Aula Prática N° 6. Estudo do Desenvolvimento de Membros Inferiores e Superiores em Galinha

### Protocolo da Aula 11 (29/05)

O experimento que será realizado nesta aula foi feito por J. F. Saunders (Saunders, 1948). Saunders tinha por objetivo entender como ocorria a especificação de células nos membros inferiores/superiores e como se dava o desenvolvimento destes membros. Como visto em aula, 2 modelos foram propostos para explicar o desenvolvimento de membros: o Modelo de Zona Progressiva e o Modelo de Alocação Inicial (ou Expansão do Progenitor). Mais recentemente, Mariani et al. (2008) propôs o Modelo de Dois Sinais.

O objetivo desta aula é que vocês refaçam os experimentos realizados por J. F. Saunders e concluam qual modelo é mais apropriado para descrever o desenvolvimento dos membros inferiores/superiores.

#### Materiais:

- Seringa de 1ml
- Pipetas plásticas (autoclavado)
- Solução de Ringers (Salina – autoclavada)
- Tesoura cirúrgica (de ponta fina, preferencialmente - autoclavado)
- Pinça de ponta fina (autoclavado)
- Durex
- Etanol 70%
- Lupa
- Suporte para o ovo
- Placa de Petri
- Luvas cirúrgicas

**Não inicie o procedimento antes da demonstração!**

**Lembre-se de manter todos os instrumentos que foram autoclavados dentro da placa de petri!**

Lembre-se se utilizar todos os materiais esterilizados com etanol 70% para diminuir as chances de contaminação.

Após a Demonstração, siga os passos a seguir:

1. Pegue um suporte para o ovo e um ovo que já foi encubado a 37,5 °C por 3-4 dias.
2. Limpe o ovo com etanol 70%, sem virá-lo. Lembre-se de que o embrião de galinha se desenvolve no topo da gema/vitelo (ovo telolécito). Dessa vez, a ponta mais fina do ovo

estará virada para baixo e a ponta mais arredondada do ovo estará virada para cima (na última aula prática vocês abriram o ovo pela “lateral” - Figura 1).

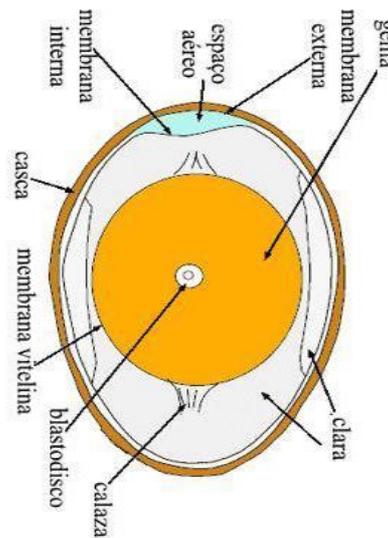


Figura 1: Estrutura de um ovo de galinha.

3. Use uma tesoura ou pinça de ponta fina para fazer um furo na ponta mais arredondada do ovo. Você deve ter feito este furo logo acima do saco de ar do ovo.
4. Com a tesoura de ponta fina, recorte um pequeno círculo da casca. Com a pinça de ponta fina, cuidadosamente, retire a membrana que recobre o embrião, separando-o do saco de ar. Cuidado para não furar o embrião ou seus vasos sanguíneos, nem afundá-lo na gema.
5. Observe o embrião. **Quantos somitos tem o embrião?** (Figura 2).
6. Localize as “limb buds”, ou, “brotos dos membros”. Você deve ser capaz de ver uma “limb bud” superior e uma inferior, dado que as outras duas estão do outro lado do embrião (o lado que está em contato com a gema). **Quais “limb buds” (ou brotos dos membros) estão visíveis e acessíveis para operação? Compare o estágio de desenvolvimento dos “fore limbs” (= membros superiores) e dos “hind limbs” (= membros inferiores). Eles são os mesmos?** (Figura 2).

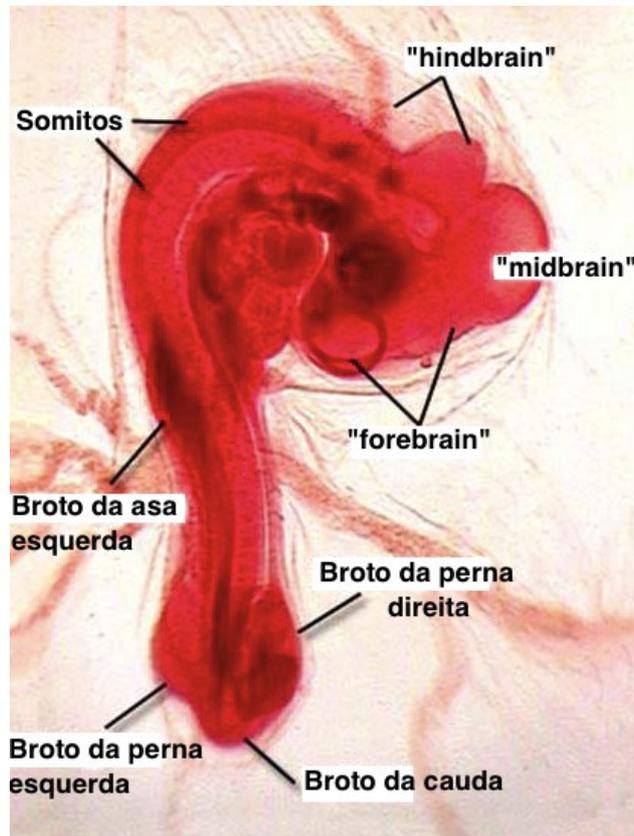


Figura 2: Estrutura de um embrião incubado por 72 hrs.

Imagem modificada de Gilbert S. F. *Developmental Biology*. 8th Edition, 2006, Sinauer Press, Sunderland MA.

7. Escolha um dos dois “buds” para fazer a cirurgia. Dê preferência para o “bud” de mais fácil acesso e com menos vasos sanguíneos ao redor (neste estágio os vasos sanguíneos do embrião são completamente funcionais. Romper estes vasos pode matar o embrião). Use a agulha das seringas de 5ml para perfurar as membranas vitelínica e amniótica sobre o “bud” escolhido. Pingue algumas gotas de salina (solução Ringers) para evitar que o embrião resseque e para ajudar a separar a membrana do embrião.
8. Ainda com a agulha da seringa, perfure o “bud” algumas vezes, até que você consiga separá-lo do corpo do embrião. Se não for possível remover o “bud” por completo, tente raspar a ponta do mesmo, o máximo que conseguir, para retirar a AER (apical ectodermal ridge, Figura 3). Cuidado para não perfurar o “bud” muito próximo do embrião (o que matará o embrião) ou perfurar a gema, afundando o embrião. Você vai perceber que essa tarefa não é tão simples. O embrião é muito flexível/maleável. Além disso, os “limb buds” são pequenos e nem sempre de fácil visualização.
9. Após o término da cirurgia, sele **MUITO BEM** o ovo com durex, segundo a demonstração. Não se esqueça de marcar os ovos nos quais você realizou a cirurgia. Coloque os ovos na bandeja com suporte para que sejam levados à incubadora.
10. Repita o procedimento com mais 3 ovos, totalizando 2 ovos operados de 3.5 horas de incubação e 2 ovos operados de 4 horas de incubação, por aluno.

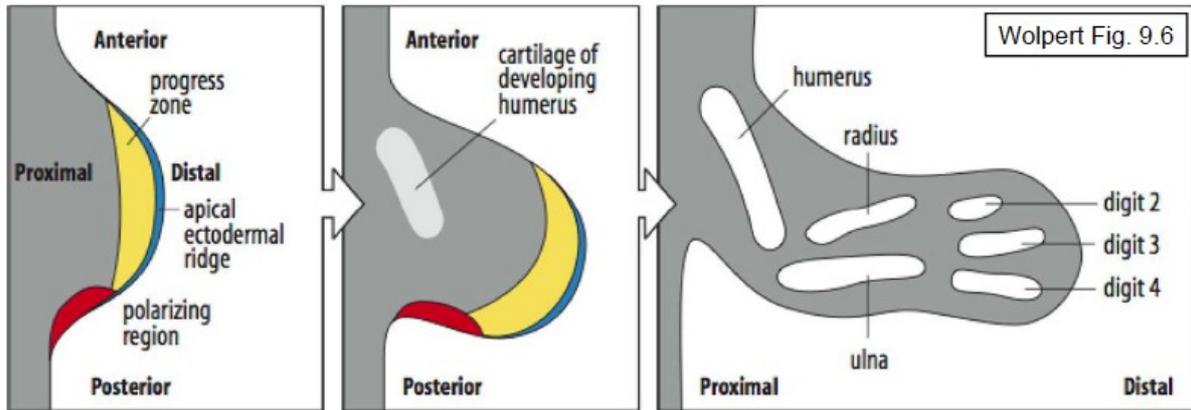


Figura 3: AER (apical ectodermal ridge) demonstrada.

## Referências

- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88(1), 49-92.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P., & Martin, G. R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal–distal patterning. *Nature*, 453(7193), 401-405.
- Saunders, J. W. (1948). The proximo–distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *Journal of Experimental Zoology*, 108(3), 363-403.