**Aula Prática N° 2. Nemátodos**

**Protocolo da Aula 4 (19/03)**

**Entregar respondido no dia 02/04**

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. eleganstem 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 nemátodo *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](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 KH2PO4; 6g de Na2HPO4; 5g de NaCl; 1 mL de MgSO4; 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 lâminula em cima deles e faça um pouquinho de pressão.

****

1. Cada grupo vai receber: uma caixa NGM com a linhagem da referencia N2, e uma linhagem mutante para determinação do fenótipo:
2. Observe-as ao estereoscópico e microscópio utilizando as técnicas descritas no protocolo.
3. Tente observar o máximo de estágios de desenvolvimento que forem possíveis, desde ovos até adultos já fecundados.
4. Determinar o sexo do indivíduo.
5. 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**

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

|  |
| --- |
| **N2** |
| **Estágios larvais:** | **Adultos:** |
| L1 | L2 | L3 | L4 | Macho | Fêmea |
|  |  |  |  |  |  |

|  |
| --- |
| **Mutante** |
| **Estágios larvais:** | **Adultos:** |
| L1 | L2 | L3 | L4 | Macho | Fêmea |
|  |  |  |  |  |  |

1. Determine o fenótipo da linhagem mutante:
2. Propor uma hipótese para a ocorrência deste fenótipo: