

Aula Prática Ciclos de Vida:

Efeito da salinidade na locomoção durante o desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*

Protocolo (13/05)

Entregar respondido no dia 02/04

O nematoide *C. elegans* é composto principalmente de hermafroditas auto-férteis, com a ocasional ocorrência de machos (aprox. 0,5%) que se reproduzem cruzando-se com um hermafrodita. A vida de *C. elegans* é de cerca de 2-3 semanas. A fertilização e o desenvolvimento embrionário cedo até a gástrula (aprox. 2h) ocorre internamente no útero dos hermafroditas, seguido do desenvolvimento embrionário tardio (aprox. 9h) que ocorre no ovo depositado externamente. A primeira fase juvenil (J1) eclode do ovo, passa por quatro ecdises nos estágios juvenis (J2-J4), e atinge a fase adulta em aprox. 2,5 dias. Juvenis J1 de *C. elegans* podem sofrer um desenvolvimento alterno de diapausa em condições ambientais adversas, conhecido como o desenvolvimento do estágio *dauer*. O juvenil J1 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 descrever alguns aspectos da biologia do desenvolvimento do nemátodo *C. elegans*, os distintos estágios do desenvolvimento observar, e estudar o comportamento de vários estágios do desenvolvimento de *C. elegans* quando exposto a diferentes concentrações de NaCl.

Referências:

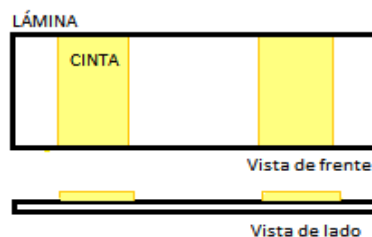
1. Leung H, Liang C, Marcotte D, McEachern H. 2014. Effect of salinity on the locomotion of *Caenorhabditis elegans*. *The Expedition*. Vol 4, 1-14.
2. Munn M, Shaver J, Griswold J, Aronson J. 2013. What can we learn from worms? How the nematode *C. elegans* maintain balance in a changing environment. University of Washington.
3. Hope, I.A. 2005. *C. elegans* a practical approach. Oxford University Press. UK.
4. 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>
5. Mounting animals for observation with Nomarsky DIC optics by Monica Driscoll.
6. Outros protocolos: <http://www.wormatlas.org/methods.htm>

Materiais:

- Placas NGM com *C. elegans* sincronizados em 4 estágios: (i) jovem juvenil (J1 ou J2), (ii) velho juvenil (J3 ou J4), (iii) adulto, (iv) *dauer*. J1-J4 podem ser gerados colocando hermafroditas grávidos numa gota de cloro numa placa com gramado de OP50 (200µl) e colocados em três diferentes temperaturas: (i) 15°C para gerar J1 ou J2; (ii) 20°C para gerar J3 ou J4, e (iii) 25 para gerar adultos. Os *dauers* podem ser obtidos de placas velhas, inducidos em meio líquido com OP50 concentrado, ou inducidos inoculando bastante adulto jovem (aprox. 50) numa placa com 100µl de gramado de OP50 uma semana antes da aula.

- Buffers M9 (100ml de cada):
 - 0.1M buffer M9: 100ml contém 0.3g de KH_2PO_4 ; 0.6g de Na_2HPO_4 ; **0.6g** de NaCl esterilizado por autoclave, e depois de autoclavar incluir 100 μl de MgSO_4 ; 1 M
 - 0.5M buffer M9: 100ml contém 0.3g de KH_2PO_4 ; 0.6g de Na_2HPO_4 ; **3g** de NaCl esterilizado por autoclave, e depois de autoclavar incluir 100 μl de MgSO_4 ; 1 M
 - 1M buffer M9: 100ml contém 0.3g de KH_2PO_4 ; 0.6g de Na_2HPO_4 ; **6g** de NaCl esterilizado por autoclave, e depois de autoclavar incluir 100 μl de MgSO_4 ; 1 M
- Pipetas Pasteur
- Lâminas e lamínulas
- Lupa e microscópio
- Picks (espatulinhas de platino)
- Fita crepe
- Agar 1%, em estado líquido (manter quente)

Metodologia



1. Cada grupo vai receber: uma caixa NGM com um estágio do desenvolvimento, três tubos com as três concentrações de buffer M9 (0,1M; 0,5M; 1M NaCl), uma pipeta, e um pick.
2. Pegue uma lâmina e coloque fita crepe nas extremidades, como demonstrado na figura acima.
3. Entre os pedaços de fita crepe, colocar 1 gota de ágar quente.
4. Colocar uma lâmina em cima do ágar. Assim que o ágar secar, ele ficará no formato de um disco com espessura de 1-2mm.
5. Prepare três lâminas com a cama de ágar descritas acima.



6. Em cada lâmina coloque uma gota das três concentrações de buffer M9 (0,1M; 0,5M; 1M NaCl).
7. Usando a lupa, pegue aprox. 5 nemátodos da placa de NGM usando o pick de platino: raspe suavemente a superfície do ágar sem romper ele para pegar os vermes.
8. Depois de pegar um grupo de vermes do mesmo estágio com o pick de platino coloque eles sobre a gotinha de buffer M9 descritas acima, sem romper o ágar.
9. Coloque uma lamínula e observe-as ao microscópio.
10. Para cada lâmina (0,1M; 0,5M; 1M NaCl), conte o número de giros que três vermes fazem em 30 segundos (e multiplique x2 para colocar na tabela abaixo que está em minutos).
11. Repita o procedimento depois de 30 minutos
12. No tempo livre, observe como se comportam os outros estágios nas diferentes concentrações de NaCl de seus colegas da turma.

DESENHE O ESTÁGIO DE *C. elegans* QUE RECEBEU

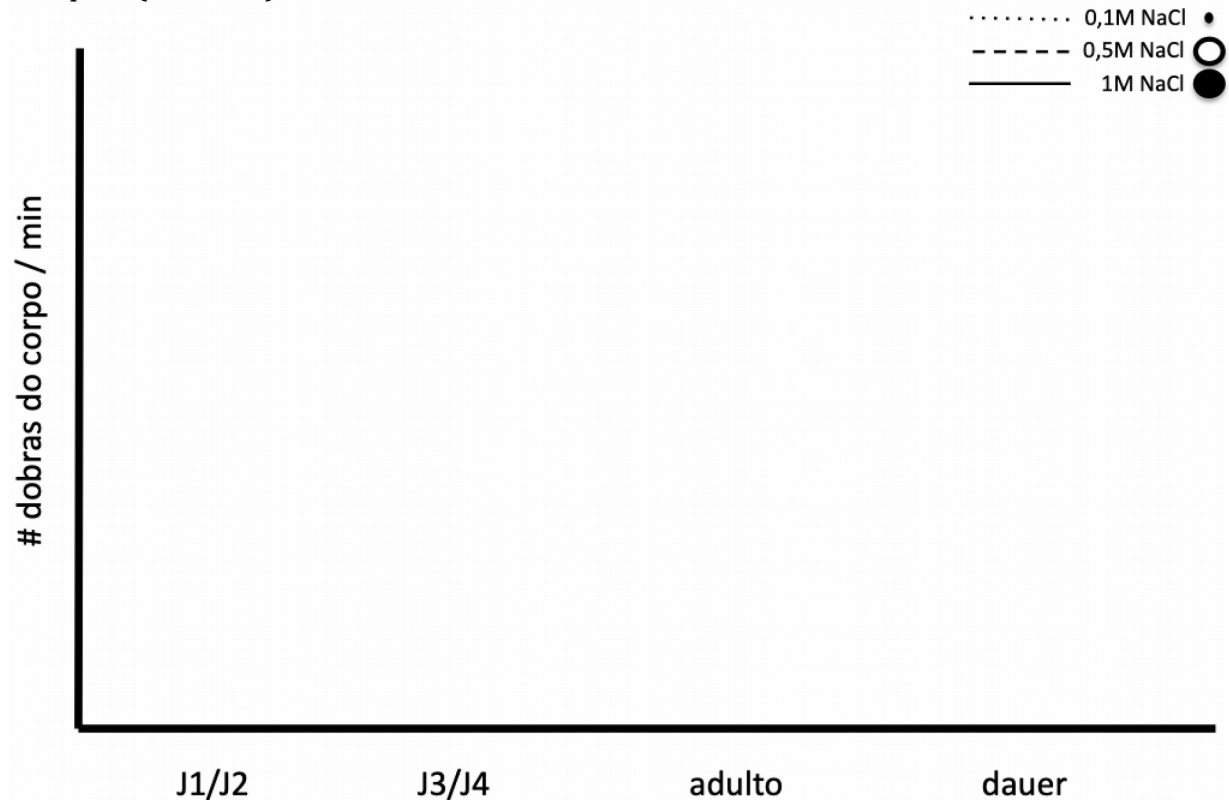
Estágio:_____

13. Completar a tabela com seus dados e os dados obtidos pelos seus colegas da turma:

[illegible]

14. Complete os próximos gráficos (Tempo 1 e 2) usando todos os dados das médias e contribua para uma discussão geral em classe.

Tempo 1 (no início):



Tempo 2 (depois de 30 min):

