

## Aula Prática N° 4. Nemátodes

Muitos dos nemátodes 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* têm 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 nematódeos é bem determinado desde a fertilização, momento no qual é determinado o eixo anteroposterior. A segmentação dos ovos é holoblástica, e neste processo são estabelecidas quatro linhagens: AB que origina a faringe, a hipoderme e os neurônios; EMS que é a linhagem formadora de músculo, faringe, gônadas e intestino; e, a 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: 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.

### **Materiais:**

- Placa Petri com indivíduos das linhagens N2 e ST53 de *C. elegans*.
- Buffer M9 (1 L contém 3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 5g NaCl; 1 mL  $\text{MgSO}_4$  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).

### Referências:

- Gilbert, S. 2014. Developmental Biology, 10a Edition. Sinauer Assoc, Sunderland.
- Hope, I.A. 2005. *C. elegans* a practical approach. Oxford University Press. UK.

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

## 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 o ágar vai secar e ficar no formato de um disco com espessura de 1-2mm.
4. Usando a lupa, pegar os nemátodos da placa de petri usando o palitinho de madeira. Raspar suavemente a superfície do ágar sem romper ele.
5. Depois de pegar um grupo de vermes com o palitinho coloque eles no ágar, sem romper o ágar.
6. Para evitar que os vermes se movam demais, esquente um pouco a lâmina.



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



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

- Determinar o sexo do indivíduo.
- Identificar as partes do verme, por exemplo, a faringe, a cutícula, as gônadas, a vulva, os embriões, etc.

### ESTÁGIOS LARVAIS *C. elegans* N2

J1

J2

J3

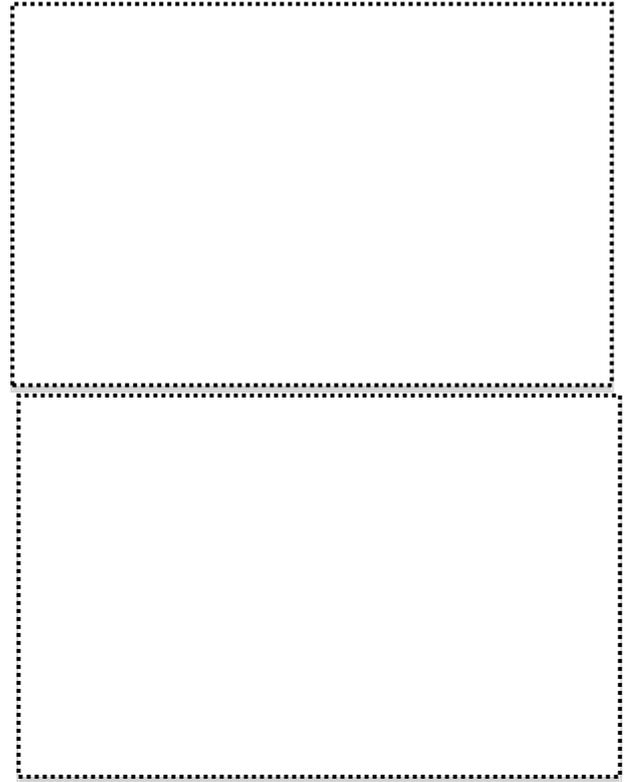
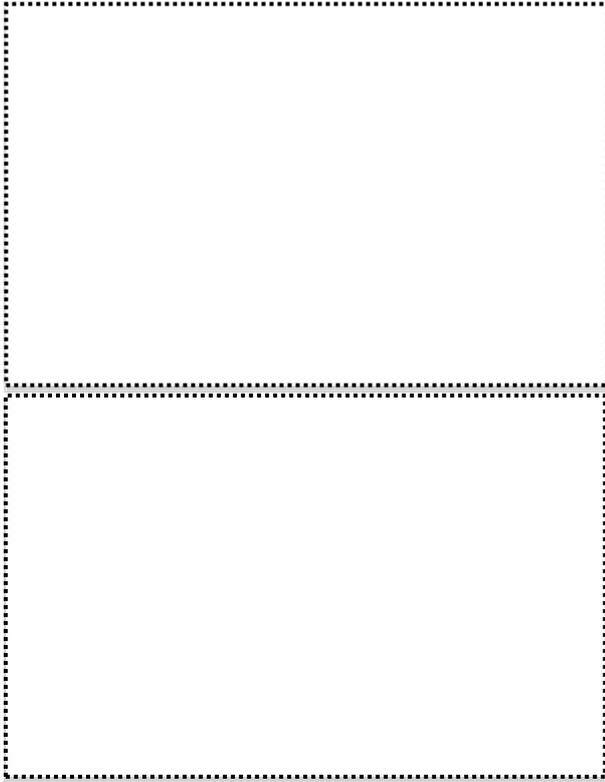
J4

**ADULTO**  
HERMAFROFITA

**ADULTO**  
MACHO

**Ovos/embriões**





(b) Completar tabela com o número de vermes observados na placa entregada:

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

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

(c) Determine o fenótipo da linhagem mutante: \_\_\_\_\_

Propor uma hipótese para a ocorrência deste fenótipo: \_\_\_\_\_

---

---