

## Trabajo Práctico Nº 3

### Desarrollo embrionario de *Caenorhabditis elegans*

#### Introducción

Sydney Brenner fue uno de los fundadores de la Biología Molecular. Sus investigaciones se focalizaron en el estudio de los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan el desarrollo de un organismo y el funcionamiento del sistema nervioso.

Para estudiar el desarrollo, Brenner trabajó con un pequeño nematodo, de tan solo 1 mm de longitud, conocido como *Caenorhabditis elegans*. El ciclo de vida de estos animales es muy corto (alrededor de 3 semanas), con un período de embriogénesis que dura aproximadamente 14 horas (Figura 1). Brenner inició sus estudios identificando el destino celular de cada una de las células que forman parte de este organismo durante la embriogénesis, con el propósito de obtener un linaje celular. En 1977 y 1983, Sulston, Horvitz y colaboradores reportaron el linaje celular de *C. elegans* durante la embriogénesis (Sulston y Horvitz 1977; Sulston, et al. 1983). Estos investigadores describieron cómo cada una de las células de este nematodo tiene un destino distinto, es decir, que puede diferenciarse en célula del aparato digestivo, en una neurona, en una célula germinal, etc. Por otra parte, los investigadores hallaron que algunas de las células de este organismo tenían como destino morir, y así fue como se descubrió por primera vez la muerte celular programada o apoptosis. Además, encontraron los genes que participan en la apoptosis de cualquier organismo vivo incluyendo a los humanos (Hedgecock, et al. 1983). En el 2002 Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz recibieron un Premio Nobel por sus descubrimientos en este gusano.

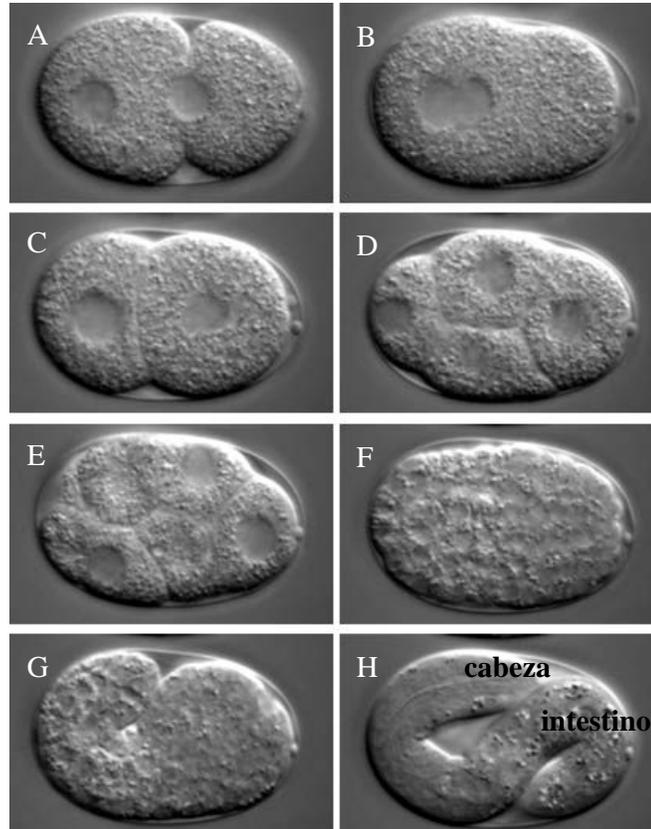
#### El modelo *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* es un gusano nematodo microscópico que es utilizado como modelo para diversos estudios genéticos, especialmente en genética del desarrollo. Fue propuesto como organismo modelo por el científico Sydney Brenner en el año 1976.

Algunas ventajas que proporciona este nematodo como sistema experimental son: es hermafrodita; puede poner de 200 a 300 huevos durante el período de fertilidad; mide aproximadamente un milímetro de longitud en su estado adulto; se alimenta de bacterias y vive en el suelo; posee un total de 959 células, de las cuales 300 son neuronas; su genoma está totalmente secuenciado; una gran ventaja es que es transparente, esto permite diferenciar visualmente todas sus estructuras.

## Trabajo experimental

El objetivo del trabajo práctico es observar en el microscopio cada una de las divisiones celulares que ocurren durante la embriogénesis en *C. elegans* (Figura 1).



**Figura 1.** Desarrollo embrionario de *C. elegans*. Los embriones son transparentes lo que facilita su observación al microscopio. Se muestran embriones de una (A y B), dos (C), cuatro (D), siete (E) y aproximadamente 100 células (F). En G se muestra a un embrión en gastrulación y en H a un animal totalmente formado y a punto de salir del huevo. En A y B se puede apreciar la migración de núcleo paterno y materno para fusionarse antes de llevarse a cabo la primera división. La embriogénesis se completa en 14 horas.

### Esquema experimental

1. Crecer gusanos a 18,5°C (cepa N2) sobre placas con NGM agar sembradas con *E. coli* (cepa HB101) como fuente de comida. Obtener una población de nematodos con abundantes huevos en las gónadas.
2. Sincronización de la población: obtención de huevos.
3. Montaje de los huevos para microscopía.

## Protocolos

### Sincronización

1. Levantar los gusanos de la placa con 3ml de buffer M9, aspirando y botando con pipeta (P1000) para despegar los gusanos. Transferir el producto lavado a un tubo de 15 ml (no más de dos placas por tubo).
2. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
3. Agregar 5 ml de una solución de NaOH/Cl<sub>2</sub> y agitar con la mano por 4 minutos (exactos). Con este tratamiento se rompen los gusanos y se liberan los huevos.
4. Agregar 2 volúmenes de M9 estéril para diluir la solución de cloro/NaOH.
5. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
6. Realizar dos lavados con 15ml de buffer M9 estéril. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos entre cada lavado. Descartar el sobrenadante.
7. Resuspender los huevos en 50 µl buffer M9.
8. Colocar 5 µl de la suspensión de huevos sobre un portaobjetos (cubrirlo con un cubreobjetos).
9. Visualización de los huevos al microscopio.

Solución de NaOH/Cl<sub>2</sub>

Volumen (ml)	10	15	20	30	40
Cloro 5% (ml)	3,8	5,7	7,6	11,4	15,2
NaOH 1N (ml)	5	7,5	10	15	20
H <sub>2</sub> O (ml)	1,2	1,8	2,4	3,6	4,8

### Microscopía

Para la visualización de los embriones por microscopía colocar 5 µl de la suspensión de huevos sobre un portaobjetos y cubrirlo con un cubreobjetos.

### Bibliografía

- Hedgecock, E. M., J. E. Sulston y J. N. Thomson. 1983. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220:1277-1279.
- Sulston, J. E. y H. R. Horvitz. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56:110-156.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White y J. N. Thomson. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100:64-119.