

DIVISÃO DAS TURMAS PRÁTICAS

TURMA A	TURMA B
Adriano Prado Pontes Aline Carvalho Anali Del Milagro Bernabe Garnique Andre Hideki Yamachi Caio Antonio Righetti Marcondes Edmar Ramos de Oliveira Filho Eric Cito Becman Felipe Martins Elias Henrique Iglesias Neves Isabel Paiva de Castro	Jaqueline Costal dos Santos Jennifer Rocha Rodrigues Joana Guiro Carvalho da Rocha Jonathan A R do Nascimento Maria Gabriela Soares de Lima Maria Laura Fierro Davi Guimarães Mariana Monteiro de Lima Edaes Murilo Marconi dos Santos Renata Filipa Barbosa Rodrigo Hashimoto Talita Lopes da Cruz

BMC-0132 Embriologia Molecular

Informação sobre o curso

Prof. Coordenadora: Irene Yan, ICB-I, sala 407, Tel: 3091-7742

Pré-requisitos: BIO 0211
BIO 0204

Objetivos: Este curso visa prover ao estudante uma visão geral de embriologia e suas técnicas afins para melhor compreender as implicações das descobertas nesta área. Desta forma, este curso foi formulado com uma ênfase em manipulações experimentais. Os tópicos incluem: conceitos básicos de embriologia molecular e morfogênese; fertilização, clivagem e sua coordenação com o ciclo celular; gastrulação; vias de sinalização da gastrulação; estabelecimento dos eixos embrionários; organogênese; e o papel da embriologia comparada no estudo da evolução das espécies.

Avaliação

Média final = $\frac{\text{(soma das notas das 3 provas teóricas)} + \text{(projeto experimental)}}{4}$

- ❖ As provas teóricas terão duração de 120 minutos e serão dissertativas.
 - ❖ A avaliação do projeto experimental será feita de duas formas: **a proposta escrita e a apresentação oral** no final do curso.
 - ❖ A proposta escrita do projeto experimental deve incluir:
 - **Introdução**, onde serão descritos os objetivos do projeto, a hipótese a ser comprovada, e uma breve explicação do contexto e significância do projeto.
 - **Metodologia**, onde deve ser descrito *em detalhe* o procedimento experimental
 - **Resultados esperados e discussão.**
- Máximo 20 páginas datilografadas em espaço duplo**
- ❖ A apresentação oral do projeto ao final do curso deverá incluir breve introdução da problemática, hipótese formulada e os experimentos propostos para comprovação da hipótese. A avaliação será feita baseada na clareza da apresentação, na compreensão do significado da problemática e da lógica utilizada nos experimentos.
 - ❖ Website com sugestões para os projetos:

http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Chick/chick_adv.html

Bibliografia básica

Gilbert, S.F. Biologia do Desenvolvimento, ed. SBG- Ribeirão Preto, 578p, 1994

Carlson, B Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento, ed. Guanabara Koogan 408p, 1998 ISBN 8527703629

Wolpert, L, Beddington, R Princípios de Biologia do Desenvolvimento, ed. Artmed, 484 p, 2000 ISBN 8573076496

Gilbert, S.F. Developmental Biology 8ª Edição ed. MacMillan, 750 p., 2000 ISBN 0878932437

Gilbert S.F e Raunio A.M. , (Editores) Embryology, Constructing the Organism, Sinauer Associates, Inc, 1997 ISBN 0-87893-237-2

Cruz, Y.P Laboratory Exercises in Developmental Biology Academic Press, Inc. 1993 ISBN 0-12-198390-0-4

Schoenwolf G.C. Laboratory Studies of Vertebrate and Invertebrate Embryos, (8ª Edição) Prentice Hall, 2000 ISBN 0-13-857434-0

Material de laboratório

O aluno deve providenciar:

- ❖ 2 pinças de relojoeiro tamanho 5
- ❖ 1 tesoura de manicure
- ❖ Roteiro de aulas práticas
- ❖

O roteiro de aulas práticas é **INDISPENSÁVEL** para o acompanhamento das mesmas. Este roteiro está disponível no Xerox do IB.

É ALTAMENTE RECOMENDÁVEL QUE

- 1. OS ROTEIROS DE AULA PRÁTICA SEJAM LIDOS ANTES DAS AULAS.**
- 2. DESENHE O QUE VOCÊ VÊ NAS AULAS PARA SUA PRÓPRIA REFERÊNCIA. SUA CAPACIDADE ARTÍSTICA NÃO VAI SER AVALIADA, MAS O DESENHO AUXILIARIA SEU PRÓPRIO APRENDIZADO DAS PRÁTICAS.**

REGRAS A SEREM CUMPRIDAS NAS AULAS PRÁTICAS

O CUMPRIMENTO DESTAS REGRAS É **OBRIGATÓRIO** PARA AS AULAS !!!!

1. **SEJA CUIDADOSO COM A INCUBADORA.** Todos os ovos devem ser mantidos na incubadora até você estar pronto para utilizá-la. **MINIMIZE O TEMPO DE ABERTURA DA INCUBADORA** para manter a temperatura interna o mais homogênea possível. Retire um ovo por vez.

2. **MELECA E MALOCA NÃO!!!** Vocês terão a sua disposição, baldes forrados com saco plástico e papel higiênico. Eles estão aí para que **VOCÊ MANTENHA A SUA BANCADA, CHÃO, TETO ETC LIMPOS!!** É imprescindível que a sala esteja limpa no final das aulas, caso contrário o curso perde o direito a aulas práticas.

3. **LAVE AS MÃOS.** Ovos podem ter *Salmonella*. Lavem as mãos depois das aulas.

DICAS PARA MANIPULAR OS EMBRIÕES

1. **MANTENHA OS EMBRIÕES ÚMIDOS.** Depois de abrir o ovo, pingue algumas gotas de salina no embrião (não diretamente em cima) para mantê-lo úmido.

2. **SEJA O MAIS “LIMPO” POSSÍVEL.** Para as manipulações cirúrgicas como a ablação do ectoderma óptico, a sobrevivência do embrião é diretamente proporcional a esterilidade do procedimento. Limpe tudo com álcool 70%, e limpe o ovo com álcool 70% (sem afogá-lo) antes de abrí-lo. Tente não respirar no embrião durante a manipulação.

Prática 1: Observação do Embrião Ex-ovo

Objetivo: Familiarizar com os diferentes estágios do embrião de galinha

- papel filtro: 1cmx1cm para estágios até 13 (HH)
- 1,5cmx1,5cm para embriões maiores;
- PBS;
- placa de Petri de 35mm
- tesoura de ponta fina;
- lupa com luz transmitida;
- pinças;
- papel absorvente;
- recipiente para lixo;
- pirex;
- solução salina;

DEVELOPMENTAL DYNAMICS 220:284-289 (2001)

BRIEF COMMUNICATION

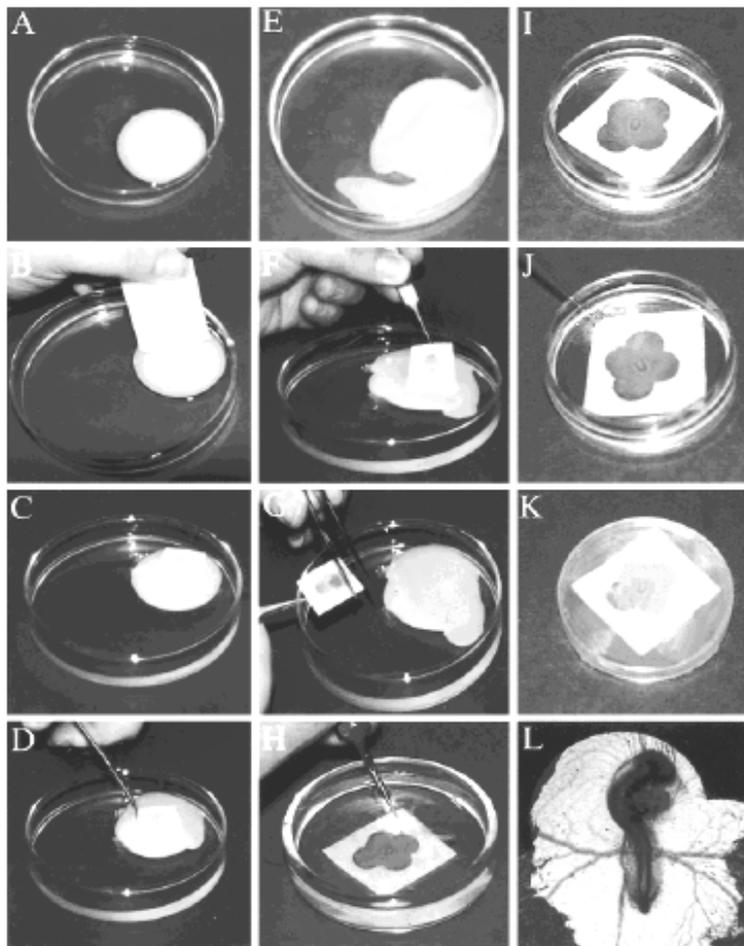
Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier

SUSAN C. CHAPMAN^{1,2} JÉRÔME COLLIGNON,^{1,2} GARY C. SCHOENWOLF,³ AND ANDREW LUMSDEN¹

¹MRC Centre for Developmental Neurobiology, King's College London, Guy's Hospital, London, United Kingdom

²Department de Biologie du Développement, Institut Jacques Monod, Paris, France

³Department of Neurobiology and Anatomy, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA



1. Observe o tubo neural e seus derivados, os somitos (note o número deles), o sistema cardiovascular (vide anexo I).
2. Observe nos estágios mais maduros, o alantóide
3. Classifique o estágio HH dos embriões de acordo com a tabela fornecida.
4. Recomenda-se fortemente que se desenhe os diferentes estágios.

Prática 2: Observação *in Ovo* do Embrião de Galinha

Objetivo: Familiarizar com os diferentes estágios do embrião de galinha e com a metodologia básica de manipulação *in ovo*.

- placa de Petri de 35mm com gaze
- lupa com luz transmitida;
- recipiente para lixo;
- solução salina;
- seringa com agulha 18.5G (torta)
- Solução de tinta nanquim 10%
- Tabela HH

- 1) Retire os ovos da incubadora, e posicione os ovos de lado por 2-5 min. Gire o ovo lentamente 360° para soltar o embrião da casca. Use uma seringa de 10ml com agulha 18.5G , e faça um furo na extremidade mais larga do ovo. Apontando a agulha para a porção inferior do ovo, retire 2-3ml de albumina. Este procedimento abaixa o embrião e lhe dá mais espaço para manipulações.
- 2) Utilizando a ponta afiada da tesoura ou da pinça faça um furo na porção mediana do ovo, e corte uma janela de 1,5cmX1,5cm. A janela pode ser oval também. Se quiser, para facilitar o corte, e diminuir as rachaduras na casca, pode-se colar uma fita adesiva transparente na região a ser cortada antes.



Observe as várias membranas que envolvem o embrião. Contraste o embrião injetando a solução de corante (1:10 de tinta nanquim em solução salina estéril) com uma seringa de 3ml com uma agulha curv...
 Insira a agulha na área opaca e manipule a agulha de forma que fique logo abaixo do embrião. A solução deve ser injetada logo abaixo do



- embrião. Tente minimizar o tamanho do furo nas membranas, para que o corante não cubra o embrião.
- 3) Pingue algumas gotas de salina no embrião para que não seque (e morra tragicamente) durante sua observação.

 - 5) Observe as estruturas relevantes (vide anexo) nos diferentes estágios:
 1. Artéria e Veia Vitelínica
 2. Linha primitiva
 -  Dobras neurais e neuróporo 😊
 4. Cálice óptico e cristalino
 5. Vesícula ótica/auditiva
 6. Somitos (note o número)
 7. Telencéfalo, Diencefalo e Rombômeros.

 - 4) Diagnostique o estágio HH pela tabela.

Prática 3: Injeção de Cloreto de Lítio

O objetivo desta prática é a familiarização com manipulações intra-ovo. Para isto, vocês injetarão uma solução de corante no tubo neural. Este procedimento é utilizado em experimentos farmacológicos e de superexpressão por eletroporação (vide prática 5)

- placa de Petri de 35mm com gaze
- lupa com luz transmitida;
- recipiente para lixo;
- solução salina;
- seringa com agulha 18.5G (torta);
- Solução de tinta nanquim 10%;
- Solução de álcool 70% (em tubos de 50ml);
- Microagulha acoplado à mangueira;
- Salina com Fast Green;
- Tabela HH

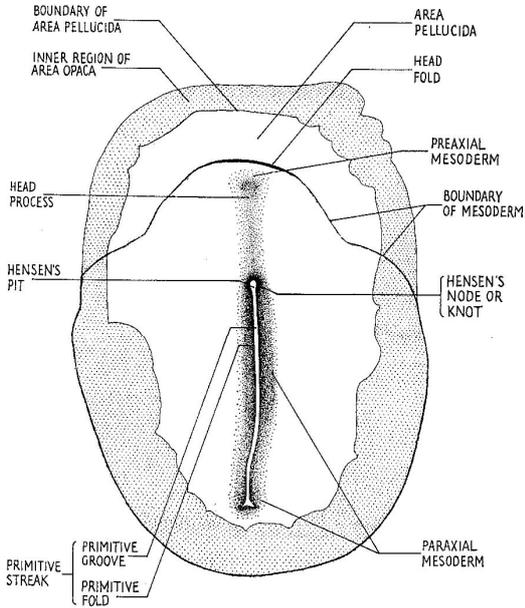
- 1) Como esta é uma manipulação cujo sucesso requer a sobrevivência do embrião, tente ser o mais estéril possível:
 - a. Lave as mãos;
 - b. Limpe o ovo com álcool 70%;
 - c. Limpe seus instrumentos cirúrgicos com álcool 70%.

- 2) Utilizando as técnicas de manipulação de embrião *in ovo*, abra o ovo da forma mais estéril possível (e.g. não respire em cima do ovo). Injete a tinta Nanquim para contraste.

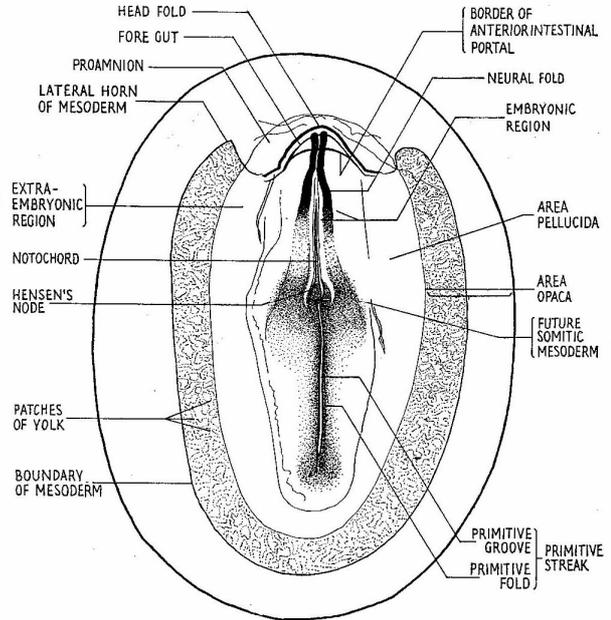
- 3) Utilizando a microagulha acoplada à mangueira, injete a solução salina com Fast Green nos embriões controle.

- 4) Pingue umas gotas de salina com antibiótico e sele a abertura do ovo com uma fita transparente.

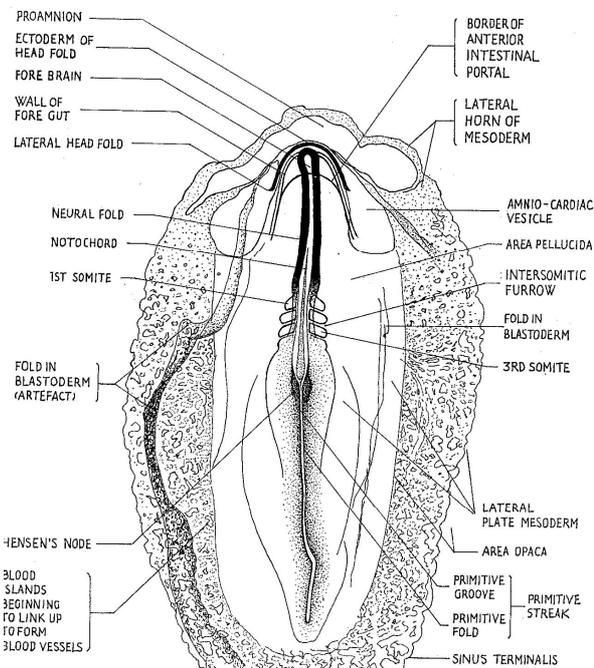
Anexo I- Estruturas embrionárias



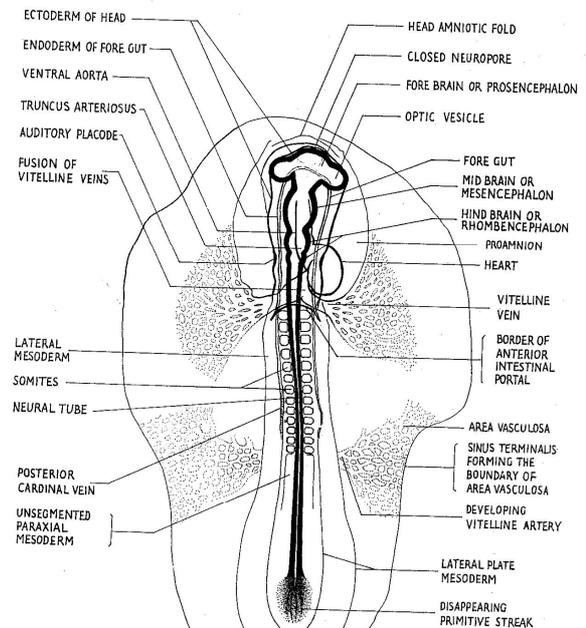
Drawing of specimen 27



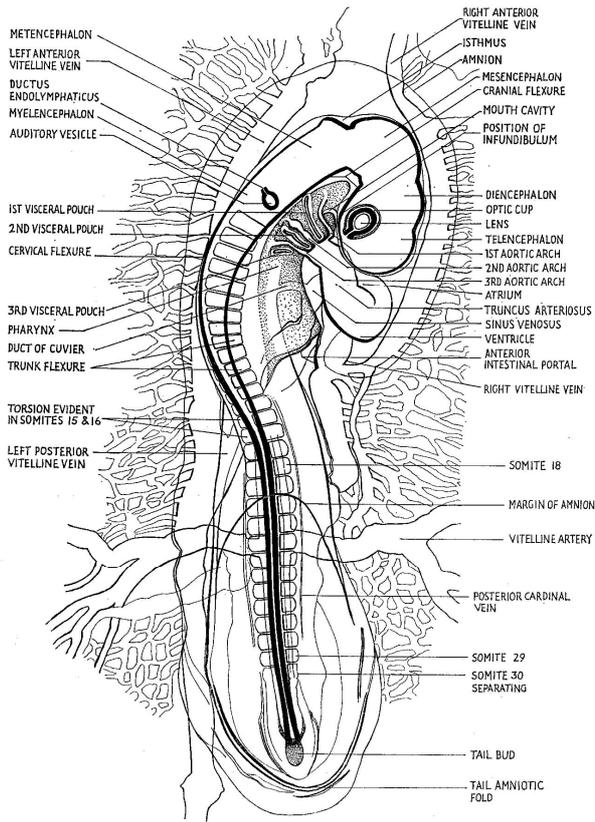
Drawing of specimen 28



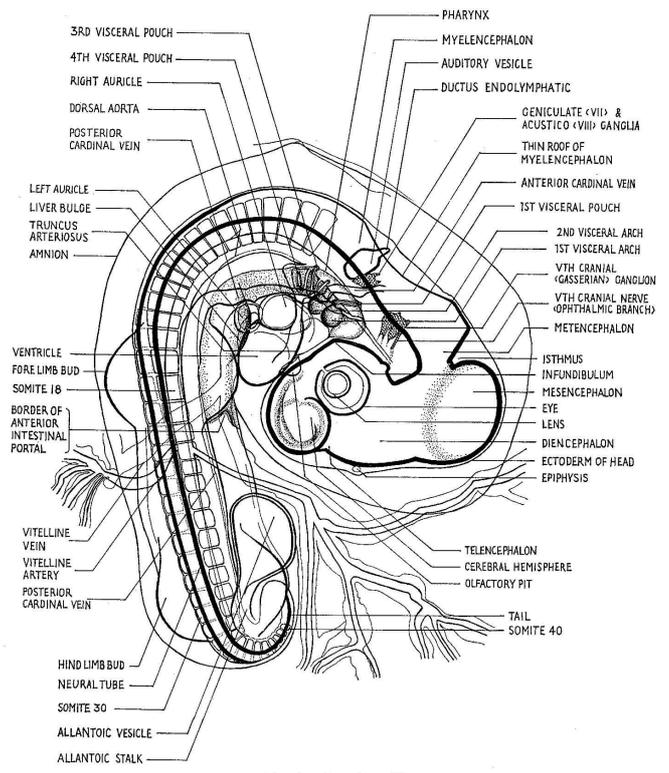
Drawing of specimen 29



Drawing of specimen 32



Drawing of specimen 36



Drawing of specimen 38