

Caenorhabditis elegans:

modelo biológico para o século XXI



Ana Diogo e Manuel M. Mota

Laboratório de Nematologia/ ICAM
Dept. de Biologia, Universidade de Évora
7000 Évora

Editado por Nelson Simões, Universidade dos Açores

Os nemátodes são organismos pertencentes ao filo *Nemata* (= *Nematoda*), e constituem o mais numeroso grupo de metazoários existente no solo. Para além deste habitat, também se encontram em elevado número em ambientes aquáticos e parasitando animais e plantas. Talvez nenhum outro grupo taxonómico seja tão universal quanto ao habitat; no entanto, a maioria das espécies existentes são de vida livre. Entre os animais multicelulares, ocupam o terceiro lugar em número de espécies após os artrópodes e moluscos, podendo esse número talvez ultrapassar o meio milhão (Politz & Philipp, 1992). Como qualquer outra forma de vida, os nemátodes variam consideravelmente conforme a espécie, existindo assim uma variedade notável nas dimensões, na forma e no habitat. Os nemátodes parasitas constituem um importante grupo económico, uma vez que causam elevados danos, tanto a nível das plantas como de animais (Mota, 1989).

O *Caenorhabditis elegans* (Fig.1) é um pequeno nemátode do solo (cerca de 1 mm de comprimento) que tem sido utilizado como organismo modelo, por mais de 200 laboratórios mundiais (web sites 2, 3, 4). É o ser vivo mais utilizado para estudos de biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia. Este organismo possui uma série de características que o torna ideal para este tipo de estudos: possui um ciclo de vida curto, dimensões reduzidas, um pequeno genoma e é fácil de cultivar (Quadro 1).

Em 1965 Brenner (web site 1) propôs o nemátode *C. elegans* como modelo biológico para o estudo da genética e desenvolvimento animal, possuindo uma combinação de simplicidade e complexidade, razão pela qual é bem conhecido. O *C. elegans* pertence à família *Rhabditidae*, um diversificado grupo de nemátodes com grande distribuição em habitats terrestres (Gilbert, 1988). É

um nemátode bacteriófago facilmente cultivado sob condições laboratoriais, sendo alimentado geralmente de *E. coli*, sendo possível obter-se um elevado número de organismos, o que é fundamental para um bom modelo biológico (Gilbert, 1988).

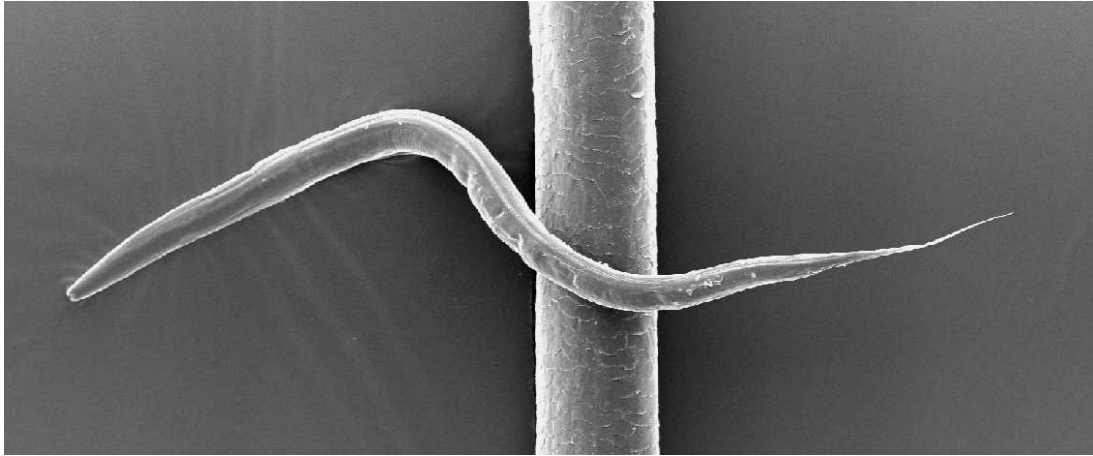


Fig. 1. Hermafrodita de *C. elegans* sobre cabelo humano (microscopia electrónica de varrimento x200).

Quadro 1- Características que tornam o nemátode *Caenorhabditis elegans*, um excelente organismo para estudos da biologia do desenvolvimento

Características vantajosas que tornam o <i>C. elegans</i> um modelo biológica ideal
<ul style="list-style-type: none">↳ Curto ciclo de vida (aproximadamente 3.5 dias a 20°C)↳ Transparentes↳ pequenos (1 mm)↳ Fáceis de cultivar (<i>E. coli</i>)↳ Número constante de células (“eutelia”); 959 células somáticas↳ Hermafroditas & Machos↳ Pequeno genoma (10^8 bp)

Normalmente são mantidos à temperatura de 20-25°C em placas de Petri com agar e *E. coli* como fonte de alimento (Wood, 1988). Para além disso, possuem um ciclo de vida relativamente curto (cerca de 3.5 dias a 20°C) (Byerly; *in* Zuckerman, 1980). Os adultos são normalmente

hermafroditas (Fig.2b), sendo os machos raros (cerca de 0.2% da população total). Os hermafroditas produzem tanto oócitos como espermatozoides e são organismos protândricos. Cada hermafrodita produz uma descendência de cerca de 200-300 indivíduos, apresentando portanto uma capacidade reprodutiva bastante elevada (Bernt & Schierenberg, 1998).

O *C. elegans* é um organismo simples tanto anatomicamente como geneticamente. Essa simplicidade, aliada à sua transparência, permitem a compreensão do desenvolvimento do organismo. Os adultos hermafroditas possuem apenas 959 células somáticas enquanto que os machos adultos possuem 1031 (Riddle, 1988) conhecendo-se o número e a posição de todas as células somáticas. Logo, é o organismo ideal para o estudo de uma variedade de processos biológicos, nomeadamente de embriologia e desenvolvimento (Schierenberg, 1985).



a



b

Fig.2 a) Hermafroditas, ovos e juvenis de *C. elegans* em meio de cultura (x90).
b) Pormenor de hermafrodita (x500) observado ao microscópio electrónico de varrimento, observando-se a região anterior com orifício bucal e a vulva em posição ventral.

O facto de terem um ciclo de vida curto e de serem transparentes ao longo de todas as fases do seu ciclo de vida, permite acompanhar todos os acontecimentos celulares durante a embriogénese, seguindo o desenvolvimento a partir de um único ovo até à fase adulta (Wood, 1988). Para além de possuir um grande número de características que os tornam excelentes organismos bioindicadores (ou seja, capazes de indicar de forma facilmente observável, alterações de funcionamento ou desenvolvimento em função da introdução de substâncias externas) possuem ainda propriedades comuns a todos os nemátodes, como a divisão, reprodução, desenvolvimento de

células, eutelia (ou seja, uma constância no número de células, na espécie) e simplicidade de organização de tecidos.

Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário pode ser seguido ao microscópio óptico (em preparações temporárias) utilizando a técnica de interferência de contraste diferencial (Nomarski) (Fig.3).

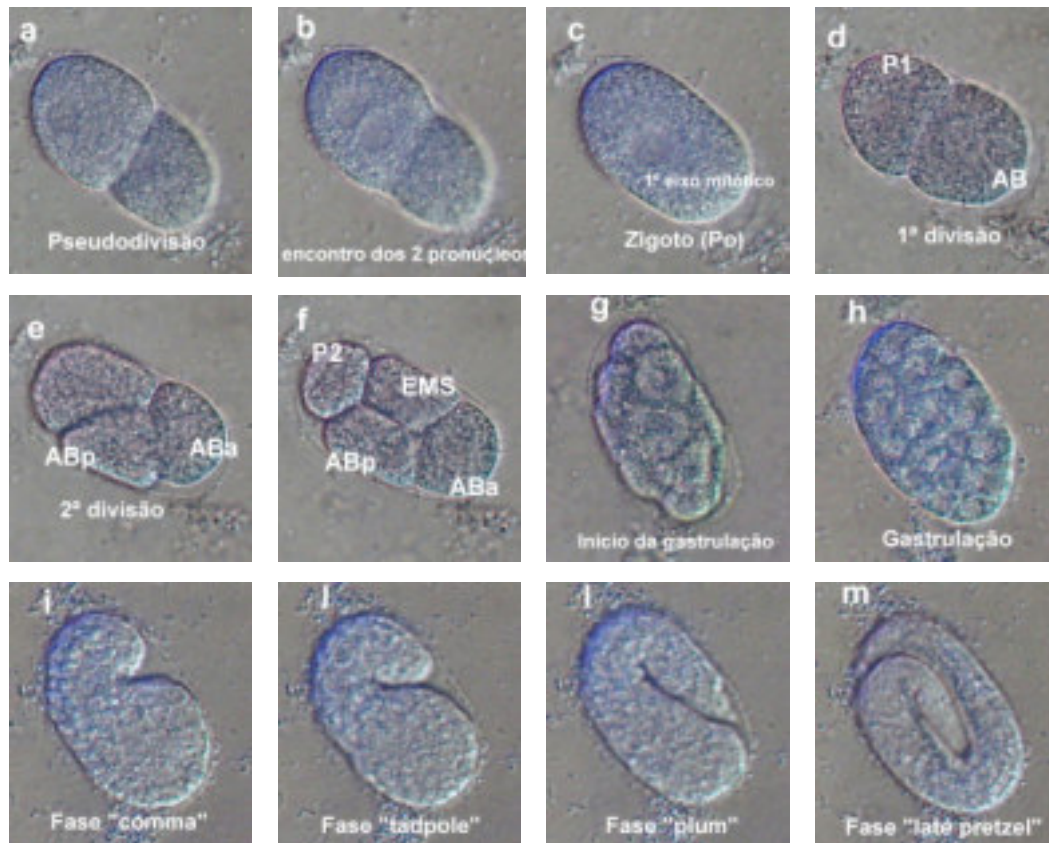


Fig.3 - Desenvolvimento embrionário do nemátode *C. elegans* em meio de cultura (x400).

Esta técnica põe em evidência os diversos gradientes de contraste das células vivas, sem que seja necessário a sua fixação e coloração. Os ovos quando montados apropriadamente em lâminas de microscópio com meio de cultura, prosseguem normalmente o seu desenvolvimento. Normalmente os núcleos e os nucléolos são claramente visíveis; no entanto, os limites das células são por vezes difíceis de identificar (Sulston, 1977).

A embriogênese constitui todo o processo de desenvolvimento que ocorre após a fase de fertilização até à eclosão do ovo (Fig.4). Este processo no nemátode *C. elegans* é relativamente

rápido, ocorrendo normalmente durante 11.5 horas à temperatura de 25°C (Schierenberg, *in* Zuckerman, 1980). Após o desenvolvimento embrionário, o ovo eclode e liberta um jovem verme denominado larva L₁. Este desenvolve-se por mais três sucessivas fases larvares (L₂, L₃ e L₄), conhecido como desenvolvimento pós-embrionário; é um processo mais moroso que a embriogénese, com duração de cerca de 40 h à temperatura de 20°C (Wood, 1988) (Fig.4).

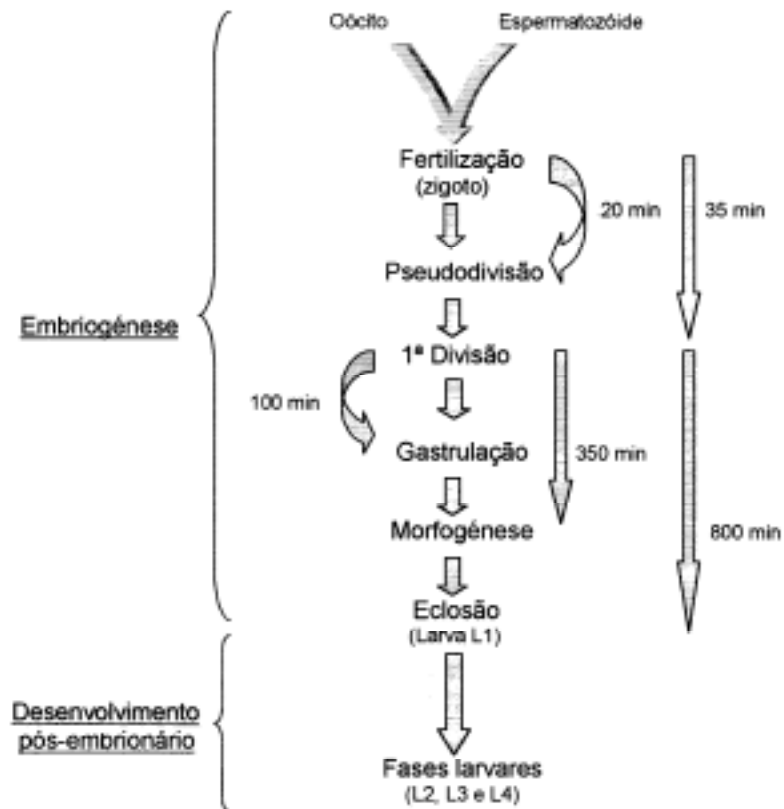


Fig.4-Fases do desenvolvimento embrionário e pós-embrionário à temperatura de 20°C.

O desenvolvimento embrionário de organismos multicelulares a partir do ovo envolve uma série de divisões visivelmente desiguais, em que uma célula dá origem por divisão a duas células filhas, uma relativamente maior do que a outra, e assim sucessivamente (Wood, 1988). O *C. elegans* é um excelente organismo para este tipo de estudos. A embriogénese pode ser considerada em 3 fases:

1) Primeira divisão e formação do zigoto: Após cerca de 35 min da fertilização ocorre a primeira divisão assimétrica do ovo. A célula mãe dá origem a duas células filhas: uma célula maior e anterior denominada AB e a uma célula mais pequena e posterior denominada P₁ (Wood, 1988). Cerca de 10 min depois de concluída a 1ª divisão, a célula AB inicia a 2ª divisão dando origem a

duas células desiguais: a célula AB_p , que constitui o polo dorsal do embrião e a célula AB_a que constitui o polo anterior do embrião. Três minutos após esta divisão a célula P_1 divide-se para formar a célula EMS e P_2 (Wood, 1988). Durante esta fase ocorrem uma série de divisões assimétricas da qual resultam as células fundadoras e as células da linha germinativa. As células fundadoras dão origem a determinados tecidos presentes no adulto. Isto é possível através da determinação da linhagem de células durante a embriogénese, de tal modo que é possível traçar a origem de todas as células e tecidos presentes no adulto (Sulston, 1988). As células da linha germinativa são células precursoras das gónadas (Wood, 1988).

2) A segunda fase inclui a gastrulação, a conclusão da proliferação da maioria das células e o começo da diferenciação de células. A gastrulação no *C. elegans* tem início após a fase de 24 células, a cerca de 100 min após a 1ª divisão (Deppe et al., in Zuckerman, 1980). Quando o embrião atinge aproximadamente 30 células, dá-se a postura do ovo. O ovo é libertado do corpo do hermafrodita pela vulva (Fig.2b), e é depositado no meio, onde prossegue o seu desenvolvimento (Wood, 1988).

3) A terceira fase inclui a morfogénese, assim como a conclusão da diferenciação de células embrionárias. Durante a embriogénese o aspecto vermiforme é produzida em grande parte por alteração da forma e organização das células da hipoderme. Este processo é denominado de morfogénese.

A postura do ovo dá-se na fase de gastrulação, quando este atinge cerca de 30 células. Para se poder seguir um maior número de fases do desenvolvimento é necessário obter embriões nos primeiros estados de desenvolvimento. Para isso, é necessário efectuar um corte na região posterior do hermafrodita de modo a que este possa libertar todos os ovos que se encontram no seu interior. O corte é realizado sobre uma lâmina de microscópio contendo meio de cultura (NGM). Quando a embriogénese dura mais do que um dia, as preparações são guardadas no frigorífico durante a noite à temperatura de 6-8°C. Quando colocados à temperatura ambiente, os indivíduos recomeçam o desenvolvimento. Geralmente, os nemátodes não podem permanecer mais do que 15 h no frigorífico (Sulston & Horvitz, 1977).

Potencialidades de estudo

O *Caenorhabditis elegans* constitui um modelo biológico bastante utilizado para um grande número de estudos de desenvolvimento biológico: estudos de comportamento, envelhecimento,

ecotoxicológicos e genéticos. Este organismo é utilizado também como modelo para o estudo dos nemátodes fitoparasitas, uma vez que possui um grande número de características comuns à maioria dos nemátodes como a divisão, reprodução, desenvolvimento de células e simplicidade de organização de tecidos. As informações genéticas, bioquímicas e anatómicas obtidas deste organismo podem ser aplicadas directamente em outros nemátodes (Ward, 1988). Estes organismos bioindicadores são também utilizados para determinar a presença de contaminantes tóxicos no meio aquático e terrestre.

Sendo este organismo um excelente sistema experimental para estudos biológicos, foi recentemente realizado no Laboratório de Nematologia da Universidade de Évora, o primeiro trabalho com este nemátode em Portugal (Diogo, 1999). Este trabalho consistiu na utilização deste organismo como bioindicador dos efeitos tóxicos dos fitocomponentes a erva de São João (*Hypericum perforatum*). O desenvolvimento embrionário deste nemátode foi analisado na presença de diferentes concentrações de extracto da erva no meio de cultura. Sendo uma planta com muitos usos medicinais tradicionais em que os seus extractos são normalmente utilizados como antidepressivos e com propriedades antivirais e antibacterianas, pretendeu-se com este trabalho avaliar a sua acção toxicológica, utilizando para isso o *C. elegans* como modelo biológico. Como conclusão principal, verificou-se que diferentes concentrações de extracto de *Hypericum perforatum*, quando adicionadas ao meio de cultura não induziram qualquer tipo de alterações no desenvolvimento embrionário. O ovo desenvolve-se normalmente desde o zigoto até à fase larvar, sem que haja alterações visíveis na morfologia do ovo.

Para concluir

O nemátode *Caenorhabditis elegans* representa sem dúvida um excelente modelo biológico com inúmeras vantagens. Tendo em conta as características referidas acima, podemos classificar este nemátode como um organismo relativamente simples, possível de ser utilizado num variadíssimo número de estudos. É um dos modelos biológicos de escolha para o século XXI,

Referências Bibliográficas

- BERNT et al., 1988 . Effects of anthelmintics with different modes of action on the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Fundamental and Applied Nematology*, vol .21, nº 3:.251-263
- DIOGO, A., 1999 . Utilização de nemátodes de vida livre como bioindicadores da acção de extractos da erva de São João (*Hypericum perforatum*).Trabalho de fim de curso de Biologia, Évora. 83 pp.
- GILBERT, 1988 . *Developmental Biology*, fourth edition, Sinauer Associates Publishers: 510-798
- GILBERT, 1988 . *Developmental Biology*, Second edition, publishers: 261-264
- MOTA, M., 1989 . Extracção de nemátodes do solo e de tecidos vegetais. Relatório para aula prática de Biologia do Solo, Universidade de Évora.
- POLITZ & Philipp, 1992 . *Caenorhabditis elegans* as model for parasitic nematodes: A focus on the cuticule. *Parasitology Today*, vol 8, nº 1: 6-12
- RIDDLE, 1980 . Developmental genetics of *Caenorhabditis elegans* in: Nematodes as Biological models, Vol I, Academic Press: pp 263-277. B. Zuckerman, ed.
- RIDDLE, 1988. The Dauer larva in: The Nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory: 393-412. W.B. Wood, ed.
- SULSTON & Horvitz, 1977. Post-embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, Vol 56: 110-156
- WARD, S., 1988 . *Caenorhabditis elegans*: A model for parasitic nematodes in: *The Biology of Parasitism*, Alan R. Liss, Inc.: 503-516.
- WOOD, 1988. Introduction to *C. elegans* in: The nematode- *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory: 1-6. W.B. Wood, ed.
- WOOD, 1988 . Embryology in: The nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory: 215-241. W.B. Wood, ed.
- ZUCKERMAN & Himmelhoch, 1980. Nematodes as models to study aging in: Nematodes as Biological models, vol II, Academic Press: pp. 3-28. B. Zuckerman, ed.

Web sites

1. <http://elegans.swmed.edu/Sydney.html>
2. <http://elegans.swmed.edu>
3. <http://www.ifns.org>
4. <http://www.biotech.missouri.edu/Dauer-World/index.html>