

Marília Girardi Zorzato

ESTUDOS DE REGENERAÇÃO EM TECIDOS DE HIDRA

Porto Alegre

2010

Marília Girardi Zorzato

Estudos de Regeneração em Tecidos de Hidras

Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador: Professor Marco A. P. Idiart

Instituto de Física

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2010

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. UM POUCO SOBRE HIDRAS	4
1.2. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	5
2. DESENVOLVIMENTO	
2.1. MÉTODOS EXPERIMENTAIS	7
2.2. MODELOS MATEMÁTICOS	
2.2.1. MODELO DE GIERER E MEINHARDT	9
2.2.2. MODELO DE SHERRAT ET AL. (1995).....	13
3. RESULTADOS	
3.1. RESULTADOS EXPERIMENTAIS	16
3.1.1. PROBABILIDADES DE REGENERAÇÃO	18
3.2.COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM O MODELO DE GIERER E MEINHARDT.....	21
4. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

1.1. UM POUCO SOBRE HIDRAS

As hidras, que são animais de água doce do filo dos cnidários, são pólipos solitários de simetria radial e corpo cilíndrico, com uma cavidade no meio. São animais pequenos, variando de poucos milímetros a um centímetro de comprimento e raramente excedendo um milímetro de diâmetro. São constituídas por apenas dois tecidos celulares, a endoderme e a ectoderme, separados por um tecido acelular chamado mesogléia.

A endoderme reveste a cavidade intestinal, que em um dos extremos é aberta formando uma boca rodeada de tentáculos usados na captura e ingestão do alimento, e em outro extremo é fechada formando um pé usado para a fixação do animal ao solo. A ectoderme reveste a parte externa do corpo da hidra.



Figura 1: Uma hidra é composta por um pé, uma região gástrica e uma cabeça (formada por uma boca e tentáculos). Internamente possui uma cavidade intestinal, também chamada cavidade gastrovascular.

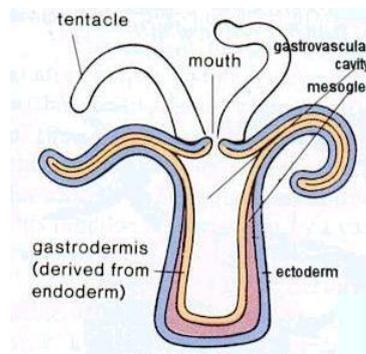


Figura 2: Anatomia da hidra. De dentro para fora: cavidade intestinal, endoderme, mesogléia e ectoderme. Composto a cabeça estão os tentáculos e a boca. Fonte: universe-review.ca/R10-33-anatomy.htm

Sua principal forma de reprodução é assexuada, com a formação de brotos que surgem a partir de uma contínua migração de células para a região do último terço do

seu corpo e que lá se diferenciam para formar uma nova hidra idêntica à mãe. Também podem se reproduzir sexuadamente, mas apenas sob condições não convencionais de ambiente e temperatura.

1.2. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

Por ser um organismo simples, estar continuamente produzindo células novas e ter uma boa quantidade de células não-diferenciadas em seu corpo, sua capacidade de regeneração é notável. Quando uma parte do seu corpo é cortada, ela pode se regenerar completamente e formar uma nova hidra adulta em menos de uma semana. Como são animais primitivos e suas interações célula-célula são relativamente simples, os processos bioquímicos não são tão complexos. Por estes motivos podem servir para estudar comportamentos onde a interação entre as células é mais facilmente compreendida. Existe, assim, a possibilidade de uma descrição mais matemática da sua biologia. Neste sentido pode-se dizer que a biologia se aproxima da física.

Com experimentos de corte e fragmentação de tecidos é possível observar a regeneração desses animais, que a partir de pequenas porções de células podem formar novas estruturas e resultar em uma hidra completa. Um dado interessante proveniente destes experimentos é a existência de um tamanho mínimo em que se pode cortar a hidra para que ela consiga se regenerar, ou seja, os fragmentos de tecido devem exceder um tamanho crítico para que a regeneração possa acontecer.

As hidras podem ser usadas como sistemas-modelo para a embriogênese (processo de formação e desenvolvimento do embrião), sendo possível o estudo da organização e diferenciação celular, assim como o estudo da formação de padrões e estruturas no animal a partir de tecidos quase homogêneos. Outra motivação para o estudo de hidras é a possível existência de genes homólogos aos das hidras atuantes na regeneração de animais de filos superiores.

O objetivo deste trabalho é estudar a probabilidade de regeneração de fragmentos de tecidos de hidras da espécie *Hydra vulgaris* como função do seu tamanho inicial e da região de onde eles procedem, observando também a influência do tamanho na qualidade do organismo regenerado. Também pretendemos analisar como se regeneram estes tecidos e como suas estruturas são formadas, revisando a literatura para explorar os fatores que contribuem na regeneração e que podem ser determinantes na

sua forma final. Em adição à revisão bibliográfica, serão usados dados experimentais coletados no Laboratório de Estruturas Celulares do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para ilustrar e caracterizar os diferentes aspectos que contribuem para o aparecimento das estruturas principais da hidra – cabeça e pé – e procurar relacioná-los com o modelo de Meinhardt (1993) de reação-difusão.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Os animais de estudo deste trabalho são da espécie *Hydra vulgaris*, também cultivados no Laboratório de Estruturas Celulares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todas as amostras coletadas partiram de hidras alimentadas três vezes por semana, com limpeza freqüente dos seus aquários e vivendo em meio de cultura ideal antes e depois do experimento, a uma temperatura entre 18 e 20°C. Os animais foram usados para experimento 48 horas depois da última refeição e, após o experimento, foram mantidos em jejum durante o período de observação, que durou em média nove dias.

A cabeça e o pé da hidra possuem funções bastante específicas: captura e ingestão de alimentos, e fixação ao solo, respectivamente. Estas estruturas contêm células diferenciadas que ocorrem apenas nestas regiões para garantir o bom funcionamento do organismo. Alguns tipos de célula também aparecem em maior quantidade na cabeça do que no resto do corpo, como os cnidócitos. Cnidócitos são células características do filo dos cnidários e nelas localizam-se estruturas urticantes usadas para paralisar a presa, denominadas nematocistos. Para que estas células não exerçam qualquer tipo de influência no processo regenerativo das hidras, a cabeça e o pé do animal usado para experimento devem ser retirados, restando apenas a parte central ou região gástrica.

Após a retirada do pé e da cabeça, é feito um corte transversal no animal. Por possuir uma cavidade no centro do seu corpo, o pedaço proveniente do corte transversal tem a forma de um anel com tecido endodérmico na parte interna e tecido ectodérmico na parte externa. Este anel é então aberto em uma tira e desta tira são retirados fragmentos menores. Os fragmentos observados possuem tamanhos diferentes, variando entre o tamanho de um anel (ou tira) inteiro e um quinto do tamanho do anel. Os pedaços – compostos por endoderme, ectoderme e mesogléia – são colocados separadamente em recipientes plásticos (petris) e examinados uma vez por dia num microscópio óptico.

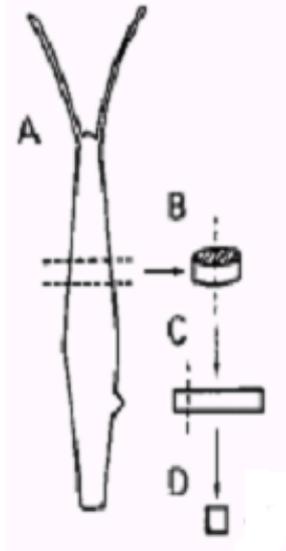


Figura 3: Ilustração de como são feitos os cortes e obtidos os fragmentos a serem analisados. (A) representação de uma hidra completa; (B) porção derivada do corte transversal; (C) anel aberto em uma tira; e (D) fragmentos menores cortados a partir das tiras. Figura retirada do artigo “Minimum Tissue Size Required for Hydra Regeneration”, de H. Shimizu, Y. Sawada, e T. Sugiyama.



Figura 4: Foto do anel resultante do corte transversal feito na hidra, correspondente a (B) na figura anterior. É possível ver as diferentes camadas celulares: endoderme (mais escura) e ectoderme (pequena porção externa mais clara), separadas por uma linha tênue, a mesoderme. Essa diferença de coloração entre os tecidos é uma vantagem para o estudo das hidras em diversos experimentos. Foto feita no Laboratório de Estruturas Celulares da UFRGS.

Após os cortes, os tecidos que compõem o pedaço de hidra ficam expostos ao meio de cultura. Isso causa um estresse osmótico, pois antes dos cortes as únicas células expostas ao meio eram as células ectodérmicas, enquanto que as endodérmicas permaneciam protegidas na parte interna do animal. Diferentemente das células ectodérmicas, as células endodérmicas não possuem um mecanismo eficiente para controlar o fluxo de água que entra na célula e, por isso, não conseguem manter um

equilíbrio osmótico com o meio. Sendo assim, estas células endodérmicas acabariam se rompendo e morrendo se continuassem expostas ao meio.

Com a finalidade de proteger estas células vulneráveis agora expostas, o fragmento da hidra se arredonda e se fecha em uma esfera, mantendo apenas a camada ectodérmica em contato com o meio. A forma esférica é escolhida pelo fragmento para que haja diminuição na área de superfície exposta ao meio externo e, assim, permanecer no estado de mais baixa energia. É como uma gota de óleo na água: a gota vira uma esfera para minimizar a energia de contato com a água.

Com a formação da barreira osmótica, a hidra pode começar a se desenvolver. A esfera se alonga e começam a surgir protuberâncias em dos extremos, indicando o início da formação dos tentáculos. Os tentáculos se alongam e entre cinco e seis dias depois do corte a nova hidra já está formada. Porém, esta nova hidra nem sempre é perfeita. Algumas vezes possui apenas um tentáculo, assim como pode também ter tentáculos espalhados pelo corpo todo e/ou múltiplos pés, revelando “falhas” no processo regenerativo. É possível também que a esfera não consiga se desenvolver e a nova hidra não seja formada.

2.2. MODELOS MATEMÁTICOS

A partir destes experimentos surgem diversas questões. Como que de um tecido praticamente homogêneo é possível a regeneração completa de um animal? Por que muitas vezes se obtém um animal com, por exemplo, mais de uma cabeça ou com vários pés? Por que alguns animais não conseguem desenvolver estruturas? Diversos modelos matemáticos surgiram na tentativa de explicar estes resultados experimentais. Aqui serão tratados dois modelos bastante conhecidos, porém diferentes entre si: o modelo de Gierer e Meinhardt(1972), complementado pelo modelo de Meinhardt (1993), e o modelo de Sherratt et al (1995).

2.2.1. MODELO DE GIERER E MEINHARDT

O modelo de Gierer e Meinhardt é mais antigo e baseia-se na dispersão de sinais pelo corpo da hidra, que têm como função regular a formação de padrões. Esses sinais

podem ser, por exemplo, moléculas que se difundem ao longo do animal através de um ou mais gradientes bioquímicos. Os sinais são denominados “morfogens” e se dispersam formando um campo morfogenético.

O primeiro passo da regeneração, segundo este modelo, é a formação local de uma alta concentração de morfogens em um pequeno grupo de células, que passa então a determinar a estrutura a ser formada naquela área particular. Esses morfogens ativam a formação da estrutura.

A produção de morfogens ativadores é dita autocatalítica, ou seja, ela induz um aumento na taxa de produção dela mesma. Para que esse processo seja mais facilmente compreendido, pode-se imaginar a formação de uma duna em um terreno arenoso: se há uma pequena porção mais elevada no solo, como, por exemplo, uma pedra, e surge um vento trazendo areia, a areia se depositará junto da porção elevada e fará com que a porção cresça, formando a duna. Quanto maior a duna, maior é a probabilidade de mais areia se depositar junto a ela e maior ela será. Esse é um processo autocatalítico que ocorre na natureza.

A produção autocatalítica dos morfogens ativadores deve ser considerada no modelo porque um padrão só é formado a partir de um pico de ativação. Porém, uma distribuição homogênea de uma substância não forma nenhum padrão. Para que a produção de morfogens ativadores não seja grande demais a ponto de se espalhar por uma região extensa do corpo da hidra estimulando uma área exagerada a formar uma única estrutura e, portanto, não permitindo que outras estruturas sejam formadas, é necessário que haja também uma produção de morfogens inibidores em torno do pequeno grupo de células com alta concentração de morfogens.

A pequena região de morfogens que ativa a formação de uma estrutura deve também estimular a produção de morfogens que inibem a formação da mesma estrutura. Os inibidores são gerados somente como consequência da produção de ativadores no organismo, e não estimulam a produção deles mesmos.

O inibidor deve interagir com regiões mais distantes do corpo da hidra e sua difusão precisa ser mais rápida que a difusão do ativador, para que o ativador não se espalhe por todo o corpo do animal. Diz-se que os ativadores tem uma interação *short-range* e os inibidores uma interação *long-range*.

Os ativadores e inibidores são gerados por fontes de ativadores e inibidores. Existe uma diferença entre a densidade de fonte dos morfogens e a concentração destes morfogens. A densidade de fonte dos morfogens pode ser, por exemplo, a concentração

de um tipo específico de célula que libera morfogens. Logo, se a densidade de fonte depende de uma célula ou de estruturas subcelulares, que são parâmetros que só podem mudar lentamente visto que a diferenciação celular é um processo de algumas horas duração, então a densidade de fonte muda também lentamente. Já a produção e emissão de morfogens deve ser um processo mais rápido. Com isto, um padrão pode ser formado mesmo a partir de uma pequena densidade de fonte, e a produção de inibidores pode se adequar rapidamente a qualquer variação na produção de ativadores para que o estabelecimento do padrão seja controlado.

Considerando que em uma hidra as estruturas a serem regeneradas são a cabeça e o pé, Gierer e Meinhardt formularam um modelo de reação-difusão de substâncias que ocorre através da interação de quatro variáveis: ativador e inibidor de formação de cabeça e ativador e inibidor de formação de pé. Os morfogens ativadores de cabeça interagem com morfogens inibidores de cabeça, e morfogens ativadores de pé interagem com morfogens inibidores de pé. Deve-se também considerar uma interação direta entre os morfogens da cabeça e do pé, para que não seja permitida a formação de cabeça na mesma região de formação do pé. Porém, essa interação cruzada não aparece nas equações a seguir.

Sendo a concentração de um ativador $a(x, t)$, a concentração de um inibidor $h(x, t)$, a densidade de fonte do ativador $\rho(x)$ e a densidade de fonte do inibidor $\rho'(x)$, e assumindo que há degradação da concentração do ativador e do inibidor por fatores diversos de primeira ordem, temos que as variações da concentração do ativador e do inibidor por unidade de tempo são, respectivamente, dadas pelas seguintes equações:

$$\frac{\partial a}{\partial t} = \rho_0 \rho + c \rho \frac{a^2}{h} - \mu a + D_a \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} , \quad (1)$$

$$\frac{\partial h}{\partial t} = c' \rho' a^2 - \nu h + D_h \frac{\partial^2 h}{\partial x^2} , \quad (2)$$

onde ρ_0 , c , e c' são constantes numéricas, e D_a e D_h são as constantes de difusão do ativador e do inibidor. Os termos $-\mu a$ e $-\nu h$ referem-se às perdas na concentração dos ativadores e inibidores, por diversos motivos tais como degradação enzimática, vazamento, ou até reabsorção pela fonte. As perdas são proporcionais à concentração dos morfogens.

Os termos dependentes de a^2 nas duas equações descrevem a taxa de produção dos morfogens, que dependem não-linearmente da concentração do ativador (lembrando que a produção do inibidor é estimulada pela produção do ativador). Porém, a produção dos morfogens ativadores é diminuída pela concentração do inibidor por um fator $1/h$. Finalmente, a difusão espacial dos morfogens pelo corpo da hidra é dada pelo último termo de cada equação.

Pode-se observar um termo $\rho_0\rho$ na variação da concentração do ativador que não aparece para o inibidor. Esse termo, que é proporcional à densidade de fonte do ativador, é necessário para que seja iniciada a autocatálise do ativador mesmo quando a concentração dele é muito baixa, como acontece na regeneração. As equações mostram que são necessárias duas moléculas ativadoras para que comece a produção de ativadores, enquanto que apenas uma molécula é necessária para despertar a produção de inibidores.

Hans Meinhardt (1993) estendeu este modelo para incluir uma interação entre pé e cabeça, considerando a existência de apenas uma fonte geradora de todos os morfogens. É essa fonte que acopla os morfogens ativadores e inibidores das diferentes estruturas. Antes, os morfogens de cabeça e pé deviam interagir diretamente entre si; neste modelo de Meinhardt, a interação se dá apenas através da fonte.

O ativador de cabeça faz com que a densidade de fonte cresça, e essa ativação ocorre em regiões de maior densidade de fonte. Já o pé cresce onde a densidade de fonte é mais baixa e ele faz diminuir a densidade de fonte. Com isso, pé e cabeça se formam em lados opostos do corpo da hidra e não há a necessidade de interação direta entre os inibidores da cabeça e do pé. As estruturas inibem umas às outras localmente, mas em distâncias maiores se ativam mutuamente.

Neste modelo computacional, a concentração dos ativadores a_H e inibidores h_H de cabeça são descritos pelas seguintes equações:

$$\frac{\partial a_H}{\partial t} = \frac{\mu_H \rho (a_H^2 + \rho_{0H})}{h_H} - \mu_H a_H + D_{a_H} \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} , \quad (3)$$

$$\frac{\partial h_H}{\partial t} = \mu_H \rho a_H^2 - \nu_H h_H + D_{h_H} \frac{\partial^2 h}{\partial x^2} + \rho_{1H} , \quad (4)$$

onde se percebe algumas diferenças em relação às equações propostas por Gierer e Meinhardt (1972), como a expressão da densidade de fonte comum aos dois morfogens em suas respectivas equações.

As equações usadas para descrever a concentração dos ativadores e inibidores de pé são semelhantes às equações (3) e (4), com a única diferença de que ao invés de a densidade de fonte aparecer no numerador, ela passa a agir no denominador:

$$\frac{\partial a_F}{\partial t} = \frac{\mu_F(a_F^2 + \rho_{0F})}{\rho h_F} - \mu_F a_F + D_{a_F} \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} \quad (5)$$

$$\frac{\partial h_F}{\partial t} = \frac{\mu_F a_F^2}{\rho} - \nu_F h_F + D_{h_F} \frac{\partial^2 h}{\partial x^2} + \rho_{1F} \quad . \quad (6)$$

Os termos ρ_0 e ρ_1 que aparecem nas equações acima se referem, respectivamente, a uma produção básica de ativador e de inibidor. Esta pequena produção de ativadores permite o início da formação dos padrões ou de novos picos de ativação mesmo em regiões de baixa concentração de ativadores. Já a pequena produção de inibidores pode estabilizar regiões de baixa concentração de ativadores, onde a autocatálise não é dominante.

Sob a influência dos ativadores de pé e de cabeça, a densidade de fonte varia da seguinte forma:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \mu_\rho a_H - \mu_\rho \rho - \gamma \rho a_F + \rho_{0\rho} + D_\rho \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} \quad . \quad (7)$$

A variação cresce com a concentração do ativador de cabeça e com uma produção pequena $\rho_{0\rho}$, decresce com a concentração de ativador de pé e está sujeita a perdas lineares do tipo $-\mu_\rho \rho$. A densidade de fonte decresce gradualmente da cabeça ao pé.

2.2.2. MODELO DE SHERRATT ET AL. (1995)

Este modelo é mais parecido com o último modelo proposto por Meinhardt (1993). A diferença principal é que, ao invés de considerar mecanismos separados que regulam a formação de cada estrutura, Sherratt et al. (1995) assumem que apenas um

valor posicional é capaz de gerar os padrões na hidra. Eles consideram um regulador bioquímico que se liga a receptores localizados na superfície das células ectodérmicas. As próprias células produzem esse regulador, que se difunde no espaço entre elas. Assume-se que a taxa de secreção dos reguladores é uniforme por grande parte do corpo da hidra, mas decresce no pé.

O que importa aqui é o número de reguladores que estão ligados à superfície das células. Se uma célula ou um grupo de células possuem mais reguladores ligados à superfície do que as células vizinhas, diz-se então que essas células têm um valor posicional maior. O valor posicional é determinado pela densidade de reguladores ligados à célula.

A variação do número de receptores ao longo do corpo da hidra dá origem à possibilidade de uma competição local entre as células, e isso é o determinante da formação do pé e da cabeça. No entanto, é considerada também a secreção de uma enzima degradadora de reguladores bioquímicos pelas células. Quatro equações matemáticas são usadas no modelo:

$$\frac{\partial a}{\partial t} = D_a \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} + s_a(x) - \mu_a a - k_e a e - k_a a f + k_d b , \quad (8)$$

$$\frac{\partial f}{\partial t} = k_d b - k_a a f + k_i b , \quad (9)$$

$$\frac{\partial b}{\partial t} = k_a a f - (k_d + k_i) b , \quad (10)$$

$$\frac{\partial e}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 e}{\partial x^2} + s_e(x) - \mu_e e . \quad (11)$$

A equação (8) descreve a variação da concentração do regulador bioquímico a no corpo do animal, que depende da difusão dele pelo corpo da hidra, da taxa de secreção $s_a(x)$ do bioquímico, das perdas $-\mu_a a - k_e a e$, do número de reguladores que se ligam às células $-k_a a f$, e da quebra da ligação entre os reguladores os receptores na superfície das células $+k_d b$. A equação (9) é a densidade de receptores livres na célula, que não possuem reguladores bioquímicos ligados a eles. Essa densidade depende da quebra da ligação entre os reguladores e os receptores e do número de reguladores que se ligam a esses receptores livres. A equação (10) é a

variação na densidade de receptores ligados b na superfície das células, que é exatamente a forma negativa da equação (9). A variação na concentração das enzimas degradadoras e é mostrada na equação (11), e depende da sua difusão pelo corpo da hidra, da sua taxa de secreção $s_e(x)$, e das perdas $-\mu_e e$.

Este modelo foi apenas relacionado a experimentos de transplante de partes do corpo de uma hidra para outra hidra. Ele ainda não foi moldado para simular o ressurgimento de todas as estruturas a partir de um fragmento, ou seja, ele não é um mecanismo que simule a formação *de novo* de padrões. Por isso, este modelo não será usado neste trabalho, mas fica aqui uma idéia para possíveis interessados no assunto.

3. RESULTADOS

3.1. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

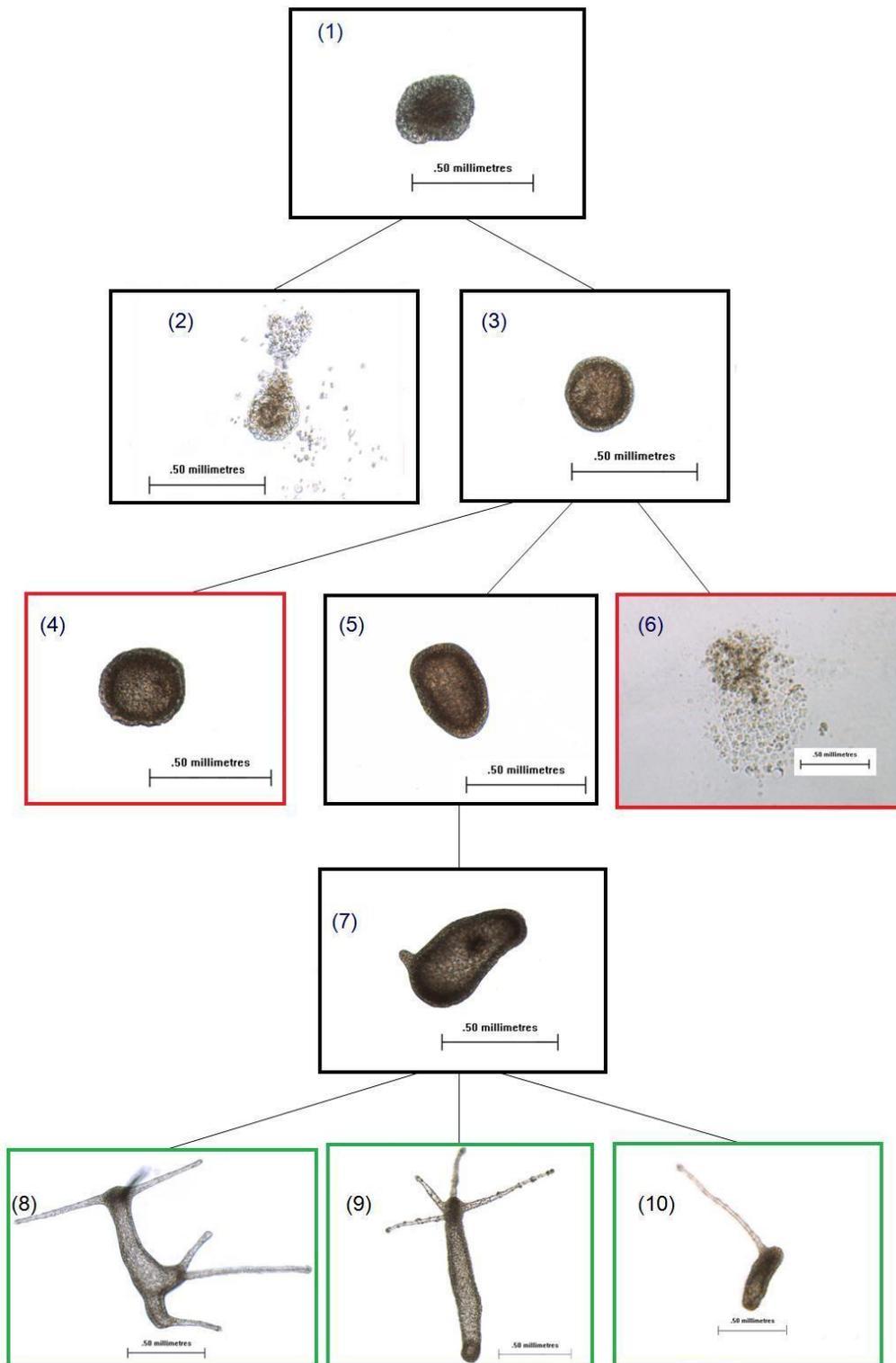
Como vimos anteriormente, quando um pedaço de hidra é isolado ele deve se fechar em uma esfera para que suas células endodérmicas não se rompam com a osmose e acabem morrendo. Se isto não acontecer, o pedaço não consegue evoluir e acaba sendo desfragmentado em até 24 horas após os cortes.

É essa necessidade de formar uma esfera o fator principal na determinação do tamanho mínimo de regeneração da hidra. Quanto menor o pedaço cortado, maior será a curvatura da esfera formada, e mais esticadas as células estarão. Porém, estas células possuem uma elasticidade finita, e chega um ponto onde a curvatura é tão grande que as células nem conseguem se juntar para formar a esfera. Sem conseguir formar a barreira osmótica, o fragmento de tecido se desintegra. É por isto que se o fragmento consegue se fechar em uma esfera, ele pode se regenerar.

Em todos os fragmentos observados, a regeneração só ocorreu após o tecido conseguir formar a esfera. Isso significa que no processo regenerativo essa etapa é necessária para a sobrevivência e eventual regeneração do tecido.

Na verdade, as células ectodérmicas não possuem uma informação que diga que elas devem envolver as células endodérmicas para que as últimas fiquem protegidas. O que acontece é que a tensão superficial entre as células ectodérmicas e o meio de cultura é menor do que a tensão superficial entre células endodérmicas e o meio. A minimização da energia aqui é então extremamente necessária: para manter a menor tensão superficial possível, o tecido ectodérmico irá sempre envolver o tecido endodérmico, permitindo a continuidade do desenvolvimento do organismo.

Mesmo conseguindo se fechar em uma esfera, alguns fragmentos ainda podem se desintegrar. Isso acontece provavelmente porque os pedaços são muito pequenos e a tensão é muito grande nas células esticadas, que não agüentam por muito tempo. Se a esfera continuar estável e sobreviver, ela poderá permanecer uma esfera durante todo o período de observação e não se desenvolver, ou poderá se alongar em até 48 horas depois dos cortes. Depois de alongada, apresenta protuberâncias em um dos extremos, que indicam o início da formação dos tentáculos.



Representação esquemática da evolução do fragmento. (1) Fragmento recém cortado da hidra. (2) Fragmento que não conseguiu formar uma esfera e se desintegrou. (3) Formação da esfera 24h após o corte, que pode tomar diferentes rumos: (4) permanecer uma esfera, (5) começar a se alongar ou (6) se desintegrar. Os fragmentos que começam a se alongar formam protuberâncias (7) que indicam a formação de tentáculos. Podem evoluir para (8) uma hidra anormal, (9) uma hidra normal e completa, ou (10) uma hidra com apenas um tentáculo. Contornados em verde estão os pedaços considerados bem-sucedidos na regeneração, e em vermelho os que não se regeneraram.

Os tentáculos crescem e entre cinco e seis dias depois do corte a nova hidra já está formada. A hidra regenerada é sempre menor do que a “hidra original”, pois é formada por um número de células consideravelmente menor. Esta nova hidra nem sempre é perfeita; Algumas vezes possui apenas um tentáculo, assim como pode também ter tentáculos espalhados pelo corpo todo e/ou múltiplos pés.

A regeneração nas hidras ocorre através da transformação de células e tecidos em estruturas reorganizadas, sem proliferação celular. Estas estruturas reorganizadas são formadas pela transformação de células sem funções específicas (não-diferenciadas) em células diferenciadas, com as funções necessárias para a formação de uma determinada estrutura. Ocorre também a migração de células de uma região para outra.

Neste trabalho foram consideradas como regeneradas apenas as hidras que conseguiram formar alguma estrutura. Aquelas que se desintegraram ou não se desenvolveram foram consideradas não-regeneradas. Ao todo foram usados mais de 800 fragmentos na análise dos resultados.

3.1.1 PROBABILIDADES DE REGENERAÇÃO

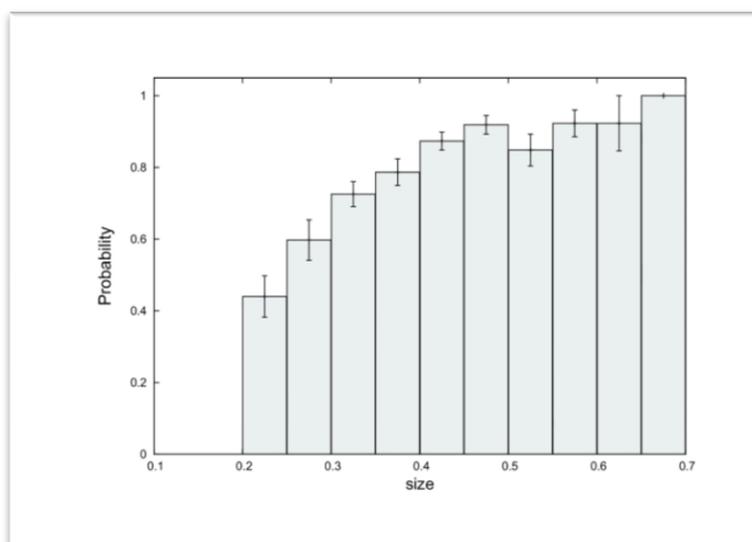
A probabilidade de regeneração de cada fragmento foi calculada relacionando-o ao seu tamanho inicial. É importante esclarecer que o “tamanho inicial” é o diâmetro da esfera em que se fechou o pedaço de hidra, medido a partir de fotos tiradas 24 horas depois dos cortes. Não é favorável medir o tamanho do fragmento assim que ele é cortado, pois no processo de arredondamento os tecidos perdem algumas células e é muito mais difícil comparar amostras com formas geométricas variadas tendo como objeto de análise fotos em duas dimensões. Portanto, a medida do tamanho inicial do fragmento é o diâmetro esfera formada.

Para cada intervalo de tamanho (por exemplo, de 0,2 a 0,3mm), o cálculo da probabilidade de sucesso na regeneração foi feito dividindo-se o número de hidras regeneradas naquele intervalo de tamanho inicial pelo número total de hidras com os tamanhos contidos neste intervalo.

A relação entre probabilidade de regeneração e tamanho inicial (diâmetro da esfera, em milímetros) está esboçada no Histograma 1. Não foram obtidos dados para esferas de diâmetro menor que 0,2mm, uma vez que os fragmentos de desintegram antes mesmo de formar a esfera. Ou seja, nos fragmentos que não conseguem formar uma

esfera de, pelo menos, 0,2mm de diâmetro, a probabilidade de regeneração é nula ou muito próxima de zero.

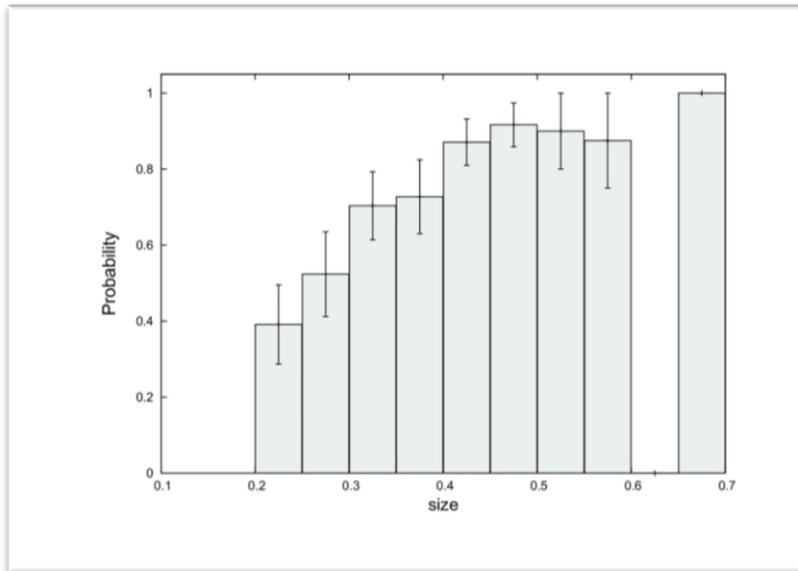
É possível observar que a probabilidade de regeneração aumenta com o aumento do tamanho inicial da esfera e chega a valores muito próximos de 1 para esferas com mais de 0.45 milímetros. Não foi possível obter esferas com mais de 0.67 milímetros nos experimentos.



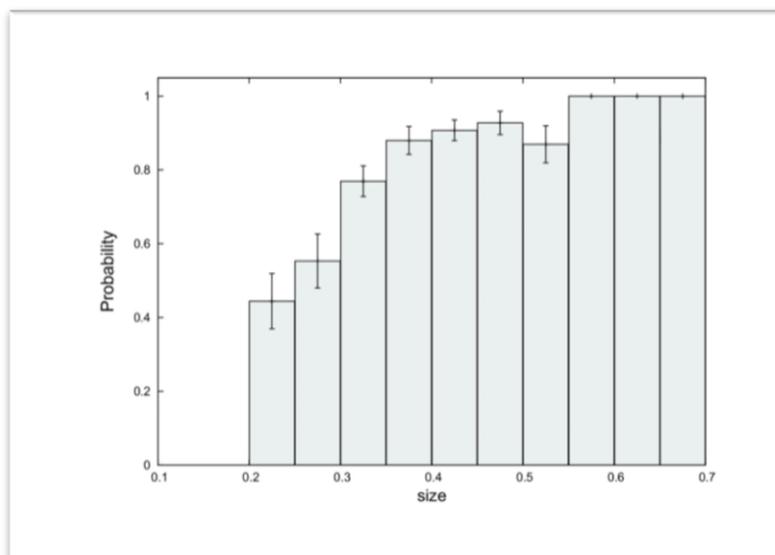
Histograma 1: Probabilidade de regeneração *versus* tamanho inicial. As barras de erro são indicadas pelas barras verticais em cada coluna do histograma.

Considerando a possível influência da região de onde foi retirado o fragmento no sucesso da sua regeneração, foram construídos os histogramas abaixo. A hidra foi dividida em três diferentes regiões e os fragmentos foram classificados segundo a sua região de proveniência.

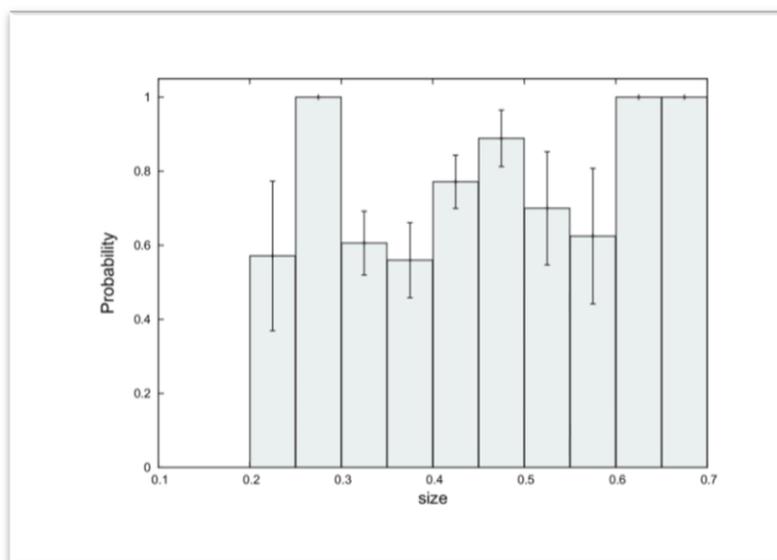
O Histograma 2 se refere à região mais próxima da cabeça, ou região aboral. Da mesma forma, o Histograma 3 se refere aos pedaços retirados da parte central do animal e o Histograma 4 aos pedaços provenientes da região mais próxima do pé, também chamada de região distal.



Histograma 2: Probabilidade de regeneração *versus* tamanho inicial da parte aboral. Novamente se observa a dependência entre sucesso da regeneração e diâmetro inicial da esfera. Não há uma coluna no intervalo entre 0,6mm e 0,65mm, pois existe apenas um dado correspondente a esse intervalo de tamanho inicial e ele não obteve sucesso na regeneração. As barras de erro são novamente representadas pelas barras verticais.



Histograma 3: Probabilidade de regeneração *versus* tamanho inicial da parte central. Nenhum fragmento proveniente dessa região com tamanho inicial maior que 0,54mm morreu no processo regenerativo. No intervalo de 0,54 a 0,67mm, houveram 48 pedaços retirados da parte central.



Histograma 4: Probabilidade de regeneração *versus* tamanho inicial da parte distal. Há poucos dados de fragmentos da região próxima do pé, e por isso as barras de erro são maiores. Nos intervalos em que as barras de erro são mínimas, elas deveriam na verdade ser infinitas, pois houve apenas a avaliação de um único fragmento.

3.2 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM O MODELO DE GIERER E MEINHARDT

Os dados experimentais indicam uma forte dependência entre o tamanho inicial e a probabilidade de regeneração. A formação da esfera não é uma garantia de que a hidra possa se regenerar e, quanto menor a esfera, mais alta a probabilidade de insucesso no processo regenerativo. Pelo modelo de Gierer e Meinhardt, é possível que não ocorra a formação de padrões no caso de um fragmento inicial muito pequeno, simplesmente pela falta de espaço para a competitividade dos diferentes ativadores e inibidores. Em uma esfera muito pequena, os ativadores e inibidores das diferentes estruturas não têm espaço suficiente para coexistirem e acabam se inibindo antes de formar os padrões.

Por outro lado, se o tamanho da esfera é suficiente para acomodar mais de um pico de ativação, a hidra pode regenerar estruturas a mais do que as necessárias. Esse é o caso em que ela apresenta mais de uma cabeça, mais de um pé, ou tentáculos

espalhados pelo corpo. Onde a concentração de inibidores é suficientemente pequena, pode haver a formação de um outro pico de ativação. É importante que o modelo se aplique a casos de deformidades na regeneração, pois quase um terço dos fragmentos observados no Laboratório de Estruturas Celulares se regenerou desta forma, e as incidências aumentaram com o aumento do tamanho inicial do fragmento.

Outro fator que parece influenciar na regeneração de um fragmento em uma hidra normal ou deformada é a forma em que a fonte de morfogens está inicialmente distribuída no fragmento. Patricia Bode e Hans Bode (1980) perceberam que pedaços verticais retirados da hidra para experimentos, apresentaram regeneração normal, com a formação de apenas um pé e uma cabeça. Já os fragmentos de orientação horizontal, como o anel da Figura 4, regeneraram muitas vezes com duas cabeças ou pés. Isso pode ser explicado pelo modelo de Meinhardt (1993), que trata de uma densidade de fonte gradualmente decrescente no corpo de uma hidra. Em um fragmento vertical, essa densidade é assimetricamente distribuída. Em um extremo está a região de maior densidade de fonte, e ali uma cabeça será formada. No lado oposto está a região de menor densidade de fonte, que vai gerar um pé. No fragmento anelar, o que acontece é justamente o contrário: a diferença entre a densidade de fonte na parte superior do anel e na parte inferior é bem menor, e células com a mesma densidade de fonte podem estar distantes no fragmento. Desta forma, as condições para o surgimento de mais de um pico de ativação estão satisfeitas.

O que talvez aconteça nas hidras regeneradas deformadas é uma tentativa de auto-ajuste das suas deformações. O acompanhamento de algumas hidras regeneradas deformadas no Laboratório de Estruturas Celulares sugeriu uma diminuição no tamanho de tentáculos localizados fora da região da cabeça. Porém, um acompanhamento mais longo de tais fragmentos não pôde ser feito porque as hidras acabam morrendo depois de muitos dias em jejum. As hidras regeneradas são muito pequenas e não conseguem ingerir o alimento, que é maior que elas.

Algumas vezes foi também observada a ocorrência de uma cabeça em cada extremo (e nenhum pé) em hidras que estavam sendo cultivadas e não passaram por nenhum tipo de experimento, apenas nasceram sob condições normais na colônia de criação. Tais hidras foram mantidas em observação e normalmente tratadas, e após alguns dias se separaram em duas hidras normais. Ainda não encontramos explicações para este fenômeno, mas pode ser que exista realmente algum mecanismo de auto-ajuste nas hidras.

4. CONCLUSÃO

A simplicidade do organismo da hidra e sua notável capacidade de regeneração permitem a realização de diversos tipos de experimentos com seus tecidos. Neste trabalho foram tratados experimentos de corte e regeneração de fragmentos de hidra.

Os dados obtidos experimentalmente indicam que existe uma escala típica de tamanho inicial de tecido que determina o sucesso da regeneração, sendo que quanto maior o tamanho inicial do fragmento, maior é a possibilidade de formação de uma nova hidra, enquanto que a probabilidade de morte ou de insucesso na regeneração diminui.

A formação das estruturas destes animais (como cabeça e pé) parece seguir padrões e é bastante bem descrita pelos modelos de reação-difusão. Os ativadores e inibidores podem ser imaginados como substâncias químicas sendo difundidas pelo corpo do animal que levam informações sobre onde uma estrutura deve ou não se formar. Ativadores e inibidores da mesma estrutura são produzidos no organismo, mas com diferentes coeficientes de difusão. Os inibidores difundem mais causando o fenômeno da inibição lateral, que impede que outras estruturas ou estruturas semelhantes se desenvolvam em regiões próximas à estrutura já existente ou em formação. Morfogens de diferentes estruturas competem entre si por um espaço para a formação de cabeças e pés. Entretanto, os morfogens ainda não foram experimentalmente identificados. Isso permite que outras teorias igualmente satisfatórias surjam na tentativa de explicar a formação de padrões nas hidras, e possam talvez até se aplicar à formação de padrões em outros animais.

Modelos teóricos são geralmente menos complexos que os processos que ocorrem nos organismos e nas células, mas eles podem ajudar muito na compreensão do funcionamento destes processos. Espera-se que, juntamente com os experimentos, novos modelos teóricos surjam e facilitem a identificação dos mecanismos que levam à regeneração.

REFERÊNCIAS

1. H. Meinhardt, 1993, “A Model for Pattern Formation of Hipostome, Tentacles, and Foot in Hydra: How to Form Structures Close to Each Other, How to Form Them at a Distance”, *Developmental Biology* **157**, 321-333.
2. A. Gierer and H. Meinhardt, 1972, “A Theory of Biological Pattern Formation”, *Kybernetik* **12**, 30-39.
3. A. J. Koch and H. Meinhardt, 1994, “Biological Pattern Formation: From Basic Mechanisms to Complex Structures”, *Reviews of Modern Physics*, Vol. **66**, No. 4, 1481-1507.
4. J. A. Sherratt, P. K. Maini, W. Jäger and W. A. Müller, 1995, “A Receptor Based Model for Pattern Formation in Hydra”, *Forma* **10**, 77-95.
5. W. A. Müller, 1995, “Competition for Factors and Cellular Resources as a Principle of Pattern Formation in Hydra”, *Developmental Biology* **167**, 175-189.
6. W. A. Müller, 1996, “Pattern Formation in the Immortal Hydra”, *Trends in Genetics* **12**, 91-96.
7. Hiroshi Shimizu, Yasuji Sawada, and Tsutomu Sugiyama, 1993, “Minimum Tissue Size Required for Hydra Regeneration”, *Developmental Biology* **155**, 287-196.
8. Yasuyuki Kishimoto, Motohide Murate and Tsutomu Sugiyama, 1996, “Hydra Regeneration from Recombined Ectodermal and Endodermal Tissue: I. Epibolic Ectodermal Spreading is Driven by Cell Intercalation”, *Journal of Cell Science* **109**, 763-772.
9. Motohide Murate, Yasuyuki Kishimoto, Tsutomu Sugiyama, Toshitaka Fujisawa, Hiromi Takahashi-Iwanaga, and Toshihiko Iwanaga, 1997, “Hydra Regeneration from Recombined Ectodermal and Endodermal Tissue: II. Differential Stability in the Ectodermal and Endodermal Epithelial Organization”, *Journal of Cell Science* **110**, 1919-1934.
10. T. W. Holstein, E. Hobmayer, and U. Technau, 2003, “Cnidarians: An Evolutionary Conserved Model System for Regeneration?”, *Developmental Dynamics* **226**, 257-267.
11. Patricia M. Bode and Hans R. Bode, 1980, “Formation of Pattern in Regenerating Tissue Pieces of *Hydra attenuata*: I. Head-Body Proportion Regulation”, *Developmental Biology* **78**, 484-496.

12. Patricia M. Bode and Hans R. Bode, 1984, "Formation of Pattern in Regenerating Tissue Pieces of *Hydra attenuata*: II. Degree of Proportion Regulation Is Less in the Hypostome and Tentacle Zone than in the Tentacles and Basal Disc", *Developmental Biology* **103**, 304-312.
13. Patricia M. Bode and Hans R. Bode, 1984, "Formation of Pattern in Regenerating Tissue Pieces of *Hydra attenuata*: III. The Shaping of the Body Column", *Developmental Biology* **106**, 315-325.
14. Patricia M. Bode and Hans R. Bode, 1987, "Formation of Pattern in Regenerating Tissue Pieces of *Hydra attenuata*: IV. Three Processes combine to Determine the Number of Tentacles", *Development* **1**, 89-98.
15. Livro: Models of Biological Pattern Formation – H. Meinhardt
16. Livro: Zoologia dos Invertebrados – Ruppert e Barnes. Sexta edição.
17. Dissertação de Mestrado: "Medidas Reológicas em Agregados Celulares", de Ana Cláudia Pereira.
18. Dissertação de Mestrado: "Estudo do estabelecimento de configurações em estruturas celulares", de Verônica A. Grieneisen.