



Instituto
de Física

Motilidade de Células e de Grupos de Células

Aline Lütz, Nicolas Mallmann, Carine Beatrici, Leonardo Brunnet

Instituto de Física
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre - Brasil

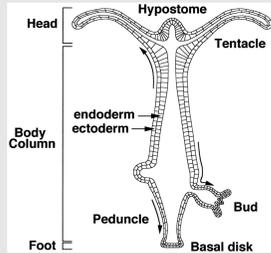


Motivação

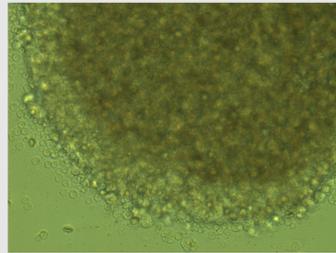
O processo de segregação celular tem um importante papel em fenômenos como o desenvolvimento dos organismos a partir do zigoto, na morfogênese, ou a proliferação de células cancerosas em um organismo, a partir da mutação de uma única célula. Dessa forma, se torna interessante entender que fatores estão envolvidos nesse processo. A hidra, um cnidário de água doce, vem sendo utilizada neste tipo de estudo há bastante tempo, devido a sua simplicidade e grande capacidade de regeneração. Experimentos [1] mostram que, ao serem separadas e misturadas aleatoriamente, suas células começam a segregar-se, até o animal estar completamente reconstituído. A hidra é formada, basicamente, por dois tipos de tecido: a endoderme e a ectoderme. As células da endoderme e da ectoderme podem ser facilmente distinguidas umas das outras em hidras transgênicas, modificadas geneticamente para que as células dos dois tecidos fluoresçam em comprimentos de onda diferentes.



(a) Foto de uma hidra



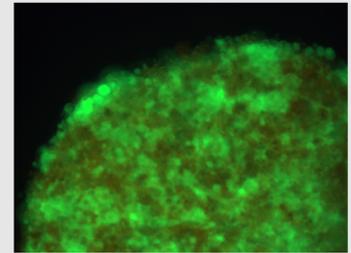
(b) Diagrama da estrutura de uma hidra



(c) Agregado de células já segregado



(d) Foto de uma hidra transgênica com luz fluorescente



(e) Um agregado de células de hidras transgênicas, também com luz fluorescente.

Objetivo

A forma como as células segregam, dentro de um agregado, está diretamente relacionada com o tamanho desse agregado e os tipos de células que o constituem. Para estudar essa relação, é preciso identificar cada tipo de célula e respectiva quantidade. Os agregados contêm milhares de células. Portanto, não é viável fazer essa contagem manualmente. Assim, nos interessa investigar a relação entre o número de células de um agregado e o número de pixels em uma imagem desse agregado, para um determinado aumento e resolução. Isso permitiria automatizar a estimativa do tamanho dos agregados.

Metodologia

As células de endoderme e ectoderme são dissociadas e misturadas aleatoriamente, seguindo o método descrito em [2]. O agregado resultante é dividido em agregados menores. Finalmente, estes agregados são colocados entre duas lâminas separadas por uma distância de 10 à 20 μm , espessura de uma monocamada. Através de uma câmera, presente no microscópio utilizado nos experimentos, é feita a captura de imagens, com ou sem o uso de fluorescência. As células de endoderme e ectoderme fluorescem em comprimentos de onda diferentes, o que permite a sua identificação. Usando fluorescência em experimentos com agregados muito pequenos, como os mostrados na figura 2, podemos traçar a relação entre o número de pixels das imagens dos agregados com o seu número de células, através do programa octave [3], utilizado tanto para o tratamento das imagens, como para a contagem de pixels, em cada uma delas. A partir dessa relação, podemos, então, estimar o número de células para agregados maiores.



Figura 2: Agregados de células de hidras transgênicas expostos à luz fluorescente.

Resultados

A figura 3 mostra o tamanho, em pixels, de uma célula, em agregados de diferentes tamanhos, com o maior agregado contendo menos de 25 células. No gráfico, é possível perceber uma diminuição no tamanho da célula com o crescimento do número de células nos agregados. Para agregados bem pequenos, menores do que 10 células, há uma variação significativa no tamanho das células. Isso se torna evidente nos altos valores de desvio expressos no gráfico abaixo. Para agregados maiores, a diferença no tamanho das células tende a diminuir estabilizando-se em um valor em torno de 4300 pixels. A diminuição no tamanho das células nesses agregados era um resultado esperado pois observamos que as células encontram-se mais próximas umas das outras, provavelmente passando por maiores deformações resultantes de interações com células vizinhas.

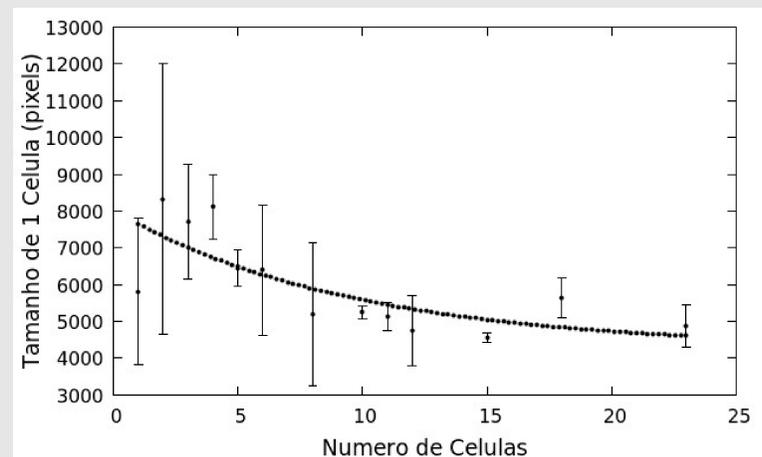


Figura 3: Relação entre o tamanho de cada célula em um agregado com o número total de células que o constituem. A função $f(x) = ae^{-bx} + c$, representada pela linha pontilhada, indica o comportamento esperado para o tamanho das células com o aumento do tamanho dos agregados, sendo $c = 4272$ a tendência limite para esse valor.

Conclusões e Perspectivas

Traçando a relação entre o número de células em um agregado, e o tamanho, em pixels, de cada uma delas, para pequenos agregados, foi verificado que o tamanho da célula desce com o aumento do agregado, e tende a estabilizar-se em um valor em torno de 4300 pixels. Foram analisados agregados contendo menos de 25 células. Agregados maiores tornam a estimativa do número de células mais susceptível a erros. Apesar disso, é interessante fazer a análise realizada aqui, para agregados contendo mais do que 25 células.

Obtida a relação entre o número de pixels e o número de células, para pequenos agregados, podemos fazer uma extrapolação para agregados maiores, a fim de estimar o seu número de células. Dessa forma, podemos prosseguir com o estudo dos diferentes padrões de organização celular em um agregado, dependendo do seu tamanho, tipos de células presentes e respectivas quantidades de cada tipo.

Referências

[1] LENHOFF, S. G. *Hydra and the birth of experimental biology-1744*. Pacific Grove: Boxwood Press, 1986.

WILSON, H. V. *J. Exp. Zool.*, v. 5, p. 245, 1907.

HOLTFRETER, J. *Rev. Can. Biol.*, v. 3, n. 220, 1944.

MOSCONA, A. *Exp. Cell Res.*, v. 3, n. 535, 1952.

TRINKAUS, J. P., GROVES, P. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 41, n. 787, 1955.

[2] KISHIMOTO, Y., MURATE, M., SUGIYAMA, T. Hydra regeneration from recombined ectodermal and endodermal tissue. *Journal of Cell Science*, v. 109, n. 4081, p. 763–772, 1996.

[3] Octave. <http://www.gnu.org/software/octave/>.