

Escola Secundária Dr Manuel Candeias Gonçalves - Odemira

Professora coordenadora: Paula Canha

# Toda a vida numa célula só

Estela Silva, Ana Santos, Cláudia Fialho

## Lista de conteúdos

1. Objectivos do trabalho
2. Introdução
  - 2.1 Células estaminais
  - 2.2 Planárias
3. Metodologia, resultados e discussão
  - 3.1 Actividades de divulgação
  - 3.2 Actividades experimentais
4. Avaliação e conclusões
5. Fontes bibliográficas

# 1. Objectivos do trabalho

Este projecto tem como objectivos:

- a aquisição de conhecimentos sobre as células estaminais,
- a sensibilização da população para as vantagens da conservação de células estaminais,
- a investigação da planária como modelo de estudo de totipotência.

## 2. Introdução

### 2.1 Células estaminais

#### O que são as células estaminais?

São células com a capacidade de se dividirem para produzir mais células com as mesmas características, ou qualquer outra célula diferenciada. Uma célula estaminal apresenta potencialidade para originar todo o tipo de células que constituem o organismo. São células indiferenciadas; a diferenciação atribui uma “função” às células, por aquisição de especializações em termos de estrutura e função; essa aquisição é geralmente irreversível. A capacidade de se dividirem infinitamente e o facto de poderem originar todos os tipos de células são as características-chave das células estaminais.

#### Fontes de células estaminais

No Homem, podemos encontrar células estaminais no(a):

- Embrião: Quando as células estaminais do embrião são utilizadas, este já não se desenvolve. O facto de o embrião morrer para serem usadas as células estaminais tem levantado problemas éticos. Em alguns países nem sequer é aceite a utilização de embriões mesmo para fins terapêuticos, pois o embrião é considerado já um ser humano. Pela utilização desta fonte ser tão controversa, os cientistas procuraram outras fontes de células estaminais.
- Medula óssea de um adulto: as células estaminais nela presentes produzem normalmente glóbulos vermelhos e células da medula óssea. Ainda não há a certeza da versatilidade das células estaminais provenientes desta fonte, pois estas têm tendência para se diferenciar apenas nas células que constituem o tecido onde se encontram.
- Sangue do cordão umbilical: as células estaminais presentes no sangue do cordão umbilical apresentam grande versatilidade. Também existem em quantidade suficiente para permitir a sua utilização terapêutica.

### **Capacidades Terapêuticas**

As células estaminais apresentam grandes potencialidades na área da saúde, uma vez que a sua versatilidade pode ser utilizada para reparar e substituir tecidos humanos ou órgãos que estejam danificados. O facto de terem a capacidade de se dividir e originar qualquer tipo de célula do organismo pode representar o tratamento para algumas doenças, como por exemplo Parkinson e Alzheimer, visto que estas resultam de lesões de células presentes no sistema nervoso. Outras doenças que poderão ser tratadas através do transplante de células estaminais são, por exemplo, doenças imunológicas, doenças oncológicas, doenças genéticas e doenças hematológicas. Outras aplicações futuras das células estaminais são a reconstrução do tecido cardíaco, dos ossos, da cartilagem e o tratamento da diabetes e da esclerose múltipla.

### **Criopreservação**

É um método de conservação pelo frio (aproximadamente  $-196^{\circ}\text{C}$ ) de células estaminais que se encontram no cordão umbilical. Antes do parto pode ser pedido o kit, que contém um saco de colheita de sangue do cordão umbilical, instrumentos cirúrgicos para efectuar a colheita e uma caixa térmica para protecção térmica e mecânica durante o transporte. No momento do parto é feita uma recolha do sangue do cordão umbilical que é acondicionada e enviada para a instituição à qual se fez o pedido do kit. A criopreservação das células estaminais pode ser feita através de empresas privadas ou através de bancos públicos.

## **2.2 Planária (*Dugesia sp.*)**

### **O que são planárias?**

Planárias (figura 1) são vermes planos aquáticos, de água doce ou salgada, pertencentes ao Filo Platyhelminthes. São pequenos animais que geralmente não medem mais de um centímetro (cerca de 10000 células). Não têm sistema circulatório nem sistema respiratório. O seu sistema digestivo é simples, com uma única abertura com função de boca e ânus, situada a meio do corpo, na face ventral. Na cavidade gastrovascular dá-se digestão parcial dos alimentos, complementada pela digestão intracelular subsequente. As planárias têm um gânglio cerebral que trabalha como cérebro incipiente e um sistema nervoso muito simples. Trata-se de uma rede nervosa com origem na cabeça e que se prolonga até à cauda da planária em forma de cordões nervosos ligados por fibras transversais. É na cabeça da planária que se situam os sensores de movimento, que lhe permitem nadar ou arrastar o corpo em diferentes meios. É ainda na cabeça que existem os sensores de luz: olhos ou ocelos.

Reproduzem-se sexuadamente, mas também assexuadamente por fragmentação. Quando o meio é favorável, estas reproduzem-se assexuadamente por fragmentação, de modo a poderem aumentar o seu número rapidamente. Têm uma espantosa

capacidade regenerativa. Quando o meio não é favorável ao seu desenvolvimento, reproduzem-se sexuadamente, pondo ovos debaixo de pedras ou folhas, com eclosão ao fim de vinte e um dias.

As planárias alimentam-se de larvas e de restos de outros seres vivos, por sucção, mas também praticam canibalismo quando se encontram em situações precárias. Alimentam-se durante a noite. As planárias de água doce podem encontrar-se debaixo de pedras em riachos de água corrente. São dependentes de elevados níveis de humidade e são fotonegativas. As planárias segregam um muco produzido por uma glândula, que as ajuda a deslizar suavemente pelo meio.

### **O que são neoblastos?**

São pequenas células indiferenciadas existentes no organismo da planária, com um núcleo grande e um citoplasma pequeno, contendo essencialmente ribossomas e mitocôndrias. Dividem-se por mitose e são responsáveis pela proliferação das células na planária, ou seja, são as células estaminais da planária. Os neoblastos podem dar origem a qualquer tipo de célula da planária (que apresenta cerca de 40 tipos de células), sendo também designadas células totipotentes. Estão distribuídas pelo corpo da planária e constituem cerca de 25 a 30% do seu todo.

### **Porquê trabalhar com a planária quando se quer estudar células estaminais?**

Os neoblastos são células totipotentes e por isso podem ser usadas para identificar e testar mecanismos que regulam a actividade destas células. Se soubermos como funcionam estas extraordinárias células da planária, talvez se consigam programar células humanas para se comportarem da mesma forma. Não seria fantástico que células humanas pudessem produzir novos rins, fígados ou membros amputados? Quem sabe se não é neste pequeno ser vivo que está a chave para as doenças que permanecem até hoje incuráveis?

## 3. Metodologia, resultados e discussão

### 3.1 Actividades de divulgação

Para a divulgação das potencialidades das células estaminais, desenvolvemos diferentes materiais: um vídeo que aborda a importância das células estaminais e da criopreservação, um panfleto com todas as informações necessárias sobre as células estaminais, a criopreservação e o que é necessário fazer para proceder à conservação das células estaminais e ainda um cartaz informativo para afixar no Centro de Saúde e nas Extensões de Saúde locais. Como é evidente, todos estes materiais tiveram de obter aprovação dos profissionais de saúde e autorização para divulgação da direcção do Centro de Saúde de Odemira.

Realizámos ainda uma sessão com mulheres grávidas no Centro de Saúde de Odemira com visionamento do vídeo de sensibilização seguido de uma conversa acerca das células estaminais e a criopreservação de forma mais aprofundada, assim como as vantagens e desvantagens do banco público de células e das empresas privadas de criopreservação. A sessão terminou com o esclarecimento de dúvidas e entrega de panfletos, assim como a avaliação da sessão pelas grávidas participantes e pela enfermeira responsável pelo grupo.

### 3.2 Actividades experimentais

#### A. Regeneração na planária

Objectivo – comprovar experimentalmente a capacidade de regeneração da planária.

#### Métodos

- Cortaram-se 6 planárias, com diferentes tipos de cortes (figura 2) e colocaram-se em diferentes caixas de Petri, devidamente identificadas.
- Numa das planárias, planária E, colocaram-se cristais de mentol na água na tentativa de a anestesiar e facilitar o corte.
- Taparam-se as caixas de Petri e colocaram-se num lugar escuro, cheias de água.
- Registou-se a evolução das planárias durante duas semanas, observando à lupa binocular.

## Resultados

Após o corte verificou-se sempre algum movimento dos fragmentos, mas a cabeça era sem dúvida o fragmento que apresentava mais movimento. Com exceção da planária 2, cujos fragmentos apresentaram necrose total poucas horas após o corte, todos os fragmentos das planárias 1, 3, 5 e E deram origem a novas planárias. Observou-se a regeneração dos olhos, do sistema digestivo, da cabeça e de todas as partes do corpo em falta. As partes recém-formadas apresentaram ausência de coloração. As planárias 4 e 6 não se dividiram em duas após o corte; os dois lados do corte uniram ficando uma cicatriz no local do corte. Estes processos foram muito rápidos; menos de uma semana depois dos cortes já se reconheciam novas planárias, mesmo nos fragmentos de menor dimensão!

## Discussão e conclusões

Com esta actividade comprovámos e observámos na realidade aquilo que já tínhamos lido sobre estes animais. Ficámos verdadeiramente impressionadas com o processo e a rapidez com que ocorre! Enquanto observávamos a regeneração das planárias surgiram-nos várias questões:

- Como conseguem as planárias às quais foram efectuados os cortes sobreviver e regenerar sem alimentação? As células precisam de matéria (orgânica e inorgânica) para fazer novas células... Onde vão as planárias buscar essa matéria?!
- Porque é que após o corte a parte da cabeça se movimenta mais rapidamente do <que as restantes?
- Depois de um corte, o que determina:
  - Que a planária regenera para formar duas planárias ou
  - Que a planária volta a unir as partes cortadas formando de novo uma só planária, como aconteceu nas planárias 4 e 6?
- Como é que a planária sabe para que lado é a cabeça? Será que a cabeça regenera sempre do lado em que estava anteriormente?
- Todas as partes do corpo têm capacidade de regenerar uma nova planária?
- Qual o menor tamanho capaz de regenerar uma nova planária?
- Será que as planárias regeneram indefinidamente? Assim as planárias não teriam idade... Seriam imortais!

Na tentativa de responder a estas questões, planificámos uma segunda série de experiências.

## **B. Experiências com Planárias – 2ª série**

### Problema (AL 1)

Como é que, sem serem alimentadas, as planárias conseguem regenerar? Haverá a mesma quantidade de biomassa mas distribuída pelas várias planárias regeneradas? Há surgimento de nova biomassa? De onde veio?

### Métodos

- 1- Cortar três planárias a meio (figura 3). Fotografar os seis fragmentos nas quadrículas de um contador de colónias de bactérias (este procedimento destina-se a avaliar, embora de forma aproximada, a biomassa dos fragmentos, a partir da sua área, uma vez que não temos balança com sensibilidade para pesar as planárias).
- 2- Colocar os fragmentos em recipientes distintos.
- 3- Observar o processo de regeneração de cada um dos fragmentos e medir o tempo necessário para a regeneração.
- 4- Fotografar novamente as planárias regeneradas pelo processo descrito em 1.
- 5- No programa ZWCAD 2011 medir a área de cada fragmento, antes e após o processo de regeneração, a partir das fotografias com a quadrícula do fundo da fotografia como referência.

### Resultados

Os fragmentos da cauda apresentaram um tempo de regeneração de entre três a quatro semanas, já os da cabeça foram um pouco mais rápidos, ficando regenerados entre duas a três semanas após o corte. O fragmento da cabeça da planária 3 morreu pouco depois do corte. Os fragmentos da cabeça apresentaram um movimento normal durante toda a regeneração, enquanto os da cauda mostraram sempre alguma dificuldade de movimentação durante todo o processo, necessitando por vezes de ser estimulados para que se desse o movimento. A área inicial e final de cada fragmento encontra-se na Tabela I.

### Discussão e conclusões

Aparentemente os fragmentos não variam muito em área, ou seja, uma planária grande fragmentada dará origem a duas planárias pequenas, uma planária pequena fragmentada dá origem a duas planárias minúsculas (como verificámos posteriormente noutra experiência)... Assim, parece que a hipótese que tínhamos colocado inicialmente se verifica: a biomassa das duas planárias regeneradas será equivalente à biomassa da planária-mãe. No entanto, há um padrão comum nas pequenas variações de área encontradas: o fragmento posterior diminui a sua área e a parte anterior, contendo a cabeça, aumenta ligeiramente a sua área. Como a cabeça tem um maior número de estruturas no seu interior (ocelos ou olhos, gânglios nervoso, divertículos

intestinais, quimiorreceptores, sensores de movimento), pensamos que o fragmento da cauda vai ter um maior gasto de energia e matéria para formar todas essas estruturas. Assim, a diminuição da área destes fragmentos poderá dever-se em parte à utilização de matéria orgânica mobilizada para a produção de energia por respiração aeróbia. Por outro lado, para a formação de todas as estruturas da cabeça, será necessária uma maior concentração de células na pequena área correspondente à cabeça regenerada, células essas que migrarão do fragmento original - uma cauda. Quanto ao aumento do fragmento da cabeça, uma explicação possível seria: algumas células da cabeça e da parte anterior do tronco migrariam para a periferia, para formar a cauda, sem existir uma redução significativa da área inicial (cabeça), mais espessa e rica em células.

Devemos ainda considerar os erros experimentais, que neste caso correspondem à acumulação de erros aleatórios; os fragmentos podem estar mais ou menos contraídos (apesar de tentarmos fotografar sempre os fragmentos em movimento para terem o mesmo grau de estiramento), a aplicação do programa ZWCAD tem uma margem de erro nas medições e ainda devemos considerar os erros de arredondamento.

Concluimos que a regeneração de planárias a partir de fragmentos se realiza à custa de matéria (moléculas de reserva e células) pré-existentes, o que implica um sistema de coordenação espantoso entre células do fragmento. De facto, será necessário mobilizar os recursos do fragmento de forma a criar as estruturas em falta sem sacrificar as estruturas existentes. Isto parece-nos extremamente complexo para um ser já de si tão simples e ainda por cima reduzido a um pedaço de corpo amputado, o que nos sugere que existe uma enorme complexidade ao nível da química celular nas células da planária. Uma hipótese que colocámos nesta fase, foi a seguinte: será que os gânglios nervosos da cabeça, por exemplo, segregam uma substância que inibe a produção de outros gânglios cefálicos? Ou as células dos olhos (ocelos ou fotoreceptores) poderiam segregar uma proteína que impediria os neoblastos de se diferenciarem em células fotossensíveis. Se as células dos órgãos diferenciados segregassem proteínas que inibissem a diferenciação dos neoblastos nessas células, seria uma forma de os neoblastos “saberem” que estruturas existiam e quais faltavam e não se repetirem órgãos no processo de diferenciação.

### Problemas (AL 2)

O que determina, depois de um corte, que (1) a planária regenera e forma duas planárias diferentes ou (2) volta a unir as partes cortadas formando de novo uma só planária? As células totipotentes iniciam o processo de regeneração apenas quando há falta de uma parte do organismo, desencadeando o processo de cicatrização quando há lesão sem amputação? Como se “apercebem” disso? Há uma mensagem química a circular pelo organismo? As células “sabem” que estão em contacto com o meio em vez de estarem no interior do corpo?



## Métodos

- 1- Cortar as planárias longitudinalmente mas abrangendo apenas a metade anterior, tirando uma estreita faixa do seu corpo para impossibilitar que as duas partes fiquem em contacto (figura 4).
- 2- Averiguar se as planárias ficaram com duas cabeças ou se voltaram a unir as cabeças retomando a posição inicial.

## Resultados

Planária 1 - uniu os dois lados da cauda e continuou como uma única planária.

Planária 2 - originou 3 planárias novas; o lado anterior direito da cabeça, após o corte, ficou estreitamente aderente ao corpo, ao contrário do lado anterior esquerdo, que ficou ligado por uma faixa mais larga. O lado anterior direito destacou-se e deu origem a uma nova planária. O fragmento minúsculo retirado do centro da parte anterior do corpo deu origem a outra planária. Toda a parte restante regenerou as partes perdidas.

Planária 3 - originou uma planária com 2 cabeças (figura 5). Ao início uma das cabeças era maior do que a outra, e nessa apareceram 3 olhos! Neste momento as cabeças já apresentam o mesmo tamanho, mas é a que tem 3 olhos que comanda o sentido do movimento quando as duas partes não estão coordenadas, desde o início das observações. Em alguns momentos as cabeças já coordenam o movimento entre si.

Nota: a planária 3 ainda está em observação.

## Discussão e conclusões

O movimento da planária dá-se por deslizamento ao longo das superfícies e sempre no sentido da cauda para a cabeça, impulsionado por ondulações da musculatura. Assim, quando as planárias 2 e 3 deslizavam durante o movimento pela caixa de Petri, os dois fragmentos da cabeça divergiam e afastavam-se. Este efeito deverá ter contribuído para a separação do fragmento anterior direito da planária 2 e para evitar o contacto e cicatrização dos dois lados da cabeça da planária 3.

Pelo contrário, na planária 1, mesmo havendo amputação de um pequeno fragmento (zona posterior do corpo), registou-se a cicatrização dos dois lados do corte, talvez por estarem em contacto a maior parte do tempo após o corte. Na planária 3, os dois lados da lesão não estavam em contacto e regeneraram-se duas cabeças. Mais uma vez nos parece existir um sistema de comunicação química entre todas as células do organismo, assim como uma capacidade de responder a estímulos exteriores. As planárias parecem ter noção do corpo como um todo e mesmo as células mais afastadas do corte “percebem” como actuar para a regeneração consoante o tipo de lesão. Estará essa capacidade localizada no sistema nervoso da planária? Mas se é assim, como explicar que a comunicação seja igualmente eficaz nos fragmentos de cauda, reduzidos a uns fragmentos de nervos com a continuidade interrompida? Parece-nos existir antes um complexo sistema de comunicação química intercelular.

Entretanto a hipótese que tínhamos colocado na experiência anterior (as células dos órgãos produziram proteínas inibidoras da diferenciação desses órgãos) foi posta em causa pelos resultados desta experiência: se os gânglios cefálicos, ou os olhos, ou outras estruturas produzissem sinais químicos inibidores da diferenciação de estruturas iguais a si mesmas, não se teria formado uma nova cabeça na planária 3, com todas as estruturas em duplicado.

### Problemas (AL 3)

Como é que a planária sabe para que lado é a cabeça? Será que num fragmento do centro do corpo regenera a cabeça do lado que era antes? As células totipotentes têm orientação espacial? Têm uma noção do organismo no seu todo mesmo quando este se desintegrou?

### Métodos

- 1- Cortar 3 planárias em três fragmentos: cabeça, fragmento central e cauda (figura 6).
- 2- Para tentar marcar, no fragmento central, qual o lado anterior, utilizar dois métodos: (1) cortar a planária com um corte específico na parte anterior, por exemplo forma de seta ou oblíquo e (2) pintar os dois lados do fragmento de cores diferentes, com corante alimentar.
- 3- Verificar se a cauda e a cabeça regeneram no mesmo lado em que se encontravam inicialmente.

### Resultados

O corante não funcionou, dissolvia-se rapidamente no meio. A técnica dos cortes diferentes funcionou e percebemos que, mesmo após o corte, os fragmentos centrais e cauda continuam a mover-se no sentido normal. As planárias regeneraram sempre a cabeça no lado anterior do fragmento. Num dos fragmentos-cauda verificou-se um resultado inesperado (figura 7).

### Discussão e conclusões

Qualquer que seja o fragmento, a noção das extremidades anterior e posterior não se perde. A cabeça é sempre regenerada na extremidade anterior do fragmento. Mais uma vez nos colocamos a questão: como se apercebem as células da sua posição no corpo de forma a dirigirem os seus esforços de regeneração no sentido correcto? Uma vez que todos os fragmentos acabam por ter células nervosas, esta capacidade pode estar associada a estas células, mas como já nos tinha sugerido a experiência anterior, os fragmentos mais pequenos têm apenas algumas fibras nervosas com a ligação aos gânglios cefálicos interrompidas, pelo que nos parece mais uma vez que o sistema de informação e comunicação se verifica a nível celular e intercelular. Afinal, na história

da vida decorreram mais de três mil milhões de anos de evolução ao nível celular, e os seres pluricelulares simples, como a planária, terão surgido há dois mil e quinhentos milhões de anos. Se pensarmos que os seres mais complexos, com sistemas de órgãos responsáveis pela comunicação e pelo processamento da informação, possuem pouco mais de quinhentos milhões de anos de evolução, parece-nos legítimo admitir que os sistemas de informação química intracelular nos organismos simples e de pequenas dimensões seja muito complexo e eficaz.

Esta ideia é reforçada pelo caso da planária em que um fragmento de cauda regenerou uma nova cauda. Apesar da noção das extremidades ter persistido, o fragmento criou uma parte posterior nova, apesar de não ter existido remoção dessa extremidade. Esta será, provavelmente, uma estratégia para acelerar o processo de regeneração, uma vez que há assim duas “frentes de regeneração”. Isto implica que o fragmento é capaz de se aperceber das estruturas em falta mas também de organizar o processo de regeneração de diferentes formas, para agilizar o processo e provavelmente economizar energia e materiais, o que nos parece verdadeiramente espantoso para um pedaço amputado de um verme! Permanece a nossa dúvida: como se processa este complexo e eficiente sistema de informação?

#### Problemas (AL 4)

Porque é que depois do corte alguns fragmentos têm mais mobilidade que outros? Terá a ver com o sistema nervoso rudimentar da planária? O sistema nervoso da planária desempenha algum papel na regeneração? A comunicação entre células totipotentes estará dependente deste sistema?

#### Métodos

- 1- Fazer cortes numa planária, em locais específicos (figura 8), de acordo com a localização das estruturas nervosas (gânglios, cordões nervosos).
- 2- Observar a mobilidade de cada fragmento imediatamente a seguir ao corte e após períodos de 5 minutos, intervaladamente.
- 3- Repetir os procedimentos 1 e 2 para mais duas planárias.
- 4- Observar a regeneração dos diferentes fragmentos.

#### Resultados

Quando se realiza o corte, separando apenas a cabeça do resto do corpo (planária 3), a cabeça não regenera (estes resultados foram comprovados com a realização de um novo ensaio). Os fragmentos anteriores das planárias 1 e 2 movimentam-se normalmente, deslocando-se com rapidez na placa de Petri. Por sua vez, as caudas apresentam um movimento mais lento e com uma menor frequência. Nos dias seguintes, observou-se que as cabeças continuaram a apresentar um movimento normal, enquanto as caudas só se movimentavam como resposta a estímulos. Mesmo

após um estímulo, o movimento da cauda corresponde essencialmente a contracções do corpo, enquanto a cabeça se desloca sobre a placa com facilidade e com um movimento orientado.

Na planária 2, os fragmentos correspondentes aos lados direito e esquerdo do corpo apresentaram um movimento diferente, enrolando-se em espiral.

Os fragmentos resultantes das caudas regeneram mais rapidamente do que os da cabeça, dando origem a uma planária completa uma semana mais cedo.

### Discussão e Conclusões

Parte das questões que deram origem a esta experiência já tinha sido discutida antes, uma vez que quando se obtiveram os resultados deste ensaio já se tinham discutido os resultados dos ensaios AL1, AL2 e AL3; referimo-nos às questões “o sistema nervoso rudimentar da planária desempenha algum papel na regeneração?” e “a comunicação entre células totipotentes estará dependente deste sistema?”

A cauda quase não tem sistema nervoso, estando reduzida a algumas terminações de fibras nervosas, mas no entanto é aquela que regenera mais rapidamente, o que nos sugere mais uma vez que o sistema nervoso não parece ter um papel importante na regeneração da planária.

A cabeça por si só não é capaz de regenerar uma nova planária. Como apenas 30% das células da planária correspondem a neoblastos e a cabeça possui diversas estruturas com diferentes funções, pensamos que o número de neoblastos neste fragmento seja insuficiente para realizar a regeneração. Em contrapartida, o corpo e cauda da planária tem menor número de estruturas especializadas (apenas cordão nervoso, sistema reprodutor e digestivo) numa maior área corporal, pelo que a percentagem de neoblastos será mais elevada. Esta quantidade de neoblastos explicaria também a maior rapidez na regeneração dos fragmentos do corpo em comparação com a cabeça. No entanto a mobilidade destes fragmentos é reduzida, o que sugere um papel importante do sistema nervoso no movimento destes animais.

Os fragmentos que contêm a cabeça e uma parte do corpo não só regeneram como ainda têm uma maior mobilidade. Neste caso parece que, além de ter um número de neoblastos suficiente para regenerar, o fragmento ainda possui todas as estruturas nervosas principais intactas, o que facilita o seu movimento e coordenação.

A metade do corpo sujeita ao corte longitudinal inicialmente apresenta movimento normal, mudando este, após o início da regeneração, para um movimento em espiral. Parece-nos que as novas células, apesar de formadas, ainda não estão a desempenhar a sua função no movimento, provocando uma assimetria que será responsável pelo espiralar do fragmento. É como se as novas células nervosas ainda não soubessem o que fazer. Talvez esse fenómeno ocorra quando as novas células nervosas já estão formadas e recebem informação para o movimento, mas ainda não existe conexão com as fibras musculares correspondentes, pelo que ordem não é executada. Enquanto as novas células não se reorganizam para restabelecer o cordão nervoso e os

nervos transversos, assim como as conexões com as fibras musculares, a metade regenerada não participa no movimento do corpo, dando origem ao movimento em espiral.

Assim, parece-nos que o sistema nervoso não tem um papel importante na regeneração da planária, mas revela-se essencial na realização do seu movimento coordenado.

### Problemas (AL 5)

As planárias são imortais? Regeneram indefinidamente?

As células totipotentes têm a capacidade de se dividir para sempre? Ou há um limite de divisões para além do qual as células envelhecem e morrem?

### Métodos

- 1- Cortar três planárias – um corte transversal a meio do corpo (figura 9).
- 2- Esperar que regenerem totalmente.
- 3- Alimentar as planárias.
- 4- Voltar a cortar as mesmas três planárias.
- 5- Repetir o processo 2, 3 e 4 por tempo indefinido.

### Resultados

- Cortaram-se 3 planárias no dia 11 de Janeiro.
- 21 de Janeiro - as cabeças das planárias 1 e 2 morreram.
- 8 de Fevereiro todos os fragmentos estavam regenerados – uma cabeça e duas caudas deram origem a 4 planárias (entre 3 a 4 semanas de regeneração).
- As planárias foram alimentadas duas vezes e das 4 apenas sobreviveram 2.
- 1 de Março – as duas planárias voltaram a ser cortadas.
- 11 de Março – 4 planárias completas (10 dias de regeneração)
- As 4 planárias foram alimentadas 2 vezes e todas sobreviveram.
- 18 de Março – cortaram-se as 4 planárias.
- 28 de Março – todas as planárias estavam regeneradas (10 dias de regeneração). Observação: no dia 25 de Março alguns fragmentos já estavam regenerados mas as cabeças dos fragmentos da cauda ainda não estavam totalmente formadas.

Experiência ainda a decorrer.

Tem-se observado que as planárias cada vez estão mais claras e pequenas, tendo uma cor ainda mais clara que a pigmentação do tecido novo em planárias maiores em que só é feito um corte.

## Discussão

Parece-nos que quanto menor é o fragmento, mais rápida é a sua regeneração. Talvez seja mais fácil para a planária reorganizar um menor número de células, tanto a comunicação como a organogénese serão mais rápidas num organismo mais pequeno. Uma hipótese nos surgiu nesta fase: os neoblastos, depois de uma planária ser sujeita a vários processos de regeneração, já foram várias vezes solicitados a regenerar partes perdidas. A matéria orgânica disponível para formar novas células, incluindo moléculas de reserva, deve ser muito escassa. Provavelmente algumas células diferenciadas devem ser digeridas para obtenção de pequenas moléculas orgânicas, como aminoácidos e ácidos gordos, que são necessários para formar as novas células. A migração de células, diferenciadas ou neoblastos, para as partes regeneradas, não nos parece ser suficiente, pelo menos a partir de um certo tamanho da planária. Será possível que a planária “sacrifique” algumas células diferenciadas para obter matéria-prima para a formação de novas células?

Nota: Esta experiência ainda está a decorrer.

Após esta série de experiências, conseguimos responder a algumas questões levantadas no início deste projecto, mas muitas outras questões nos foram surgindo à medida que novos dados se obtinham. Algumas dessas questões deram origem à terceira série de experiências, que estamos agora a realizar. No entanto, para algumas questões, as respostas não poderiam ser encontradas experimentalmente, pois os nossos laboratórios têm muitas limitações. Realizámos então uma pesquisa bibliográfica mais profunda, consultando artigos científicos (as pesquisas anteriores tinham sido realizadas em sites de Universidades e Institutos de Investigação e ainda livros de Biologia na Biblioteca da Escola).

## **C. Experiências com planárias – 3ª série**

### Problemas (AL 6)

A partir de que momento os olhos (receptores de luz) ficam funcionais?

É logo que se formam? Algum tempo depois? Ou até a planária é sensível à luz antes de os olhos estarem visíveis?

### Métodos

1. Forrar metade de uma caixa de Petri com plástico preto, criando assim uma zona escura e outra iluminada.
2. Colocar 3 planárias, uma em cada caixa, na zona iluminada, observando o seu comportamento (grupo controlo).
3. Cortar 3 planárias e colocar cada fragmento numa caixa de Petri previamente preparada.

4. Observar o comportamento em relação à luz, ao longo da regeneração.

### Problemas (AL 7)

Como é que a planária reorganiza as suas células para formar novamente um corpo completo? Há migração de células diferenciadas? Como é que as células sabem para onde têm que ir?

### Métodos

1. Cortar três planárias da forma esquematizada na figura 10.
2. Colocar os fragmentos em diferentes caixas de Petri.
3. Observar se os fragmentos a) movem os olhos para a parte anterior, formando a cabeça, ou se deixa todas as suas células no mesmo sítio e forma uma cabeça criando dois olhos novos. O nosso objectivo é observar dois órgãos que são fáceis de “seguir” durante a regeneração: os olhos.

Estamos ainda a planificar algumas experiências para testar a influência de factores ambientais na regeneração das planárias.

As figuras 11, 12 e 13 representam alguns aspectos do trabalho experimental no laboratório de biologia.

### **D. Pesquisa bibliográfica**

Esta fase de pesquisa está ainda a decorrer, mas encontrámos já alguns dados interessantes para a nossa investigação. De acordo com Alvarado & Kang (2005) os neoblastos são as únicas células mitóticas nas planárias, pelo que a regeneração se fará exclusivamente à custa da divisão destas células e diferenciação de algumas células filhas. Existem cerca de 40 tipos de células diferenciadas nas planárias, segundo os mesmos autores. Os neoblastos dão origem a todas elas, incluindo as da linha germinativa, o que não acontece noutros animais com capacidade de regeneração; na planária as células da linha germinativa não se formam durante a embriogénese, mas surgem quando a planária tem já algum tamanho. Ainda segundo Alvarado e Kang (2005) na planária estudada (*Schmidtea mediterranea*) os neoblastos encontram-se por todo o corpo da planária excepto na área em frente aos olhos e na faringe. Este facto fez-nos pensar que, se em *Dugesia* sp. se verificar a mesma distribuição, talvez na experiência AL7 o fragmento a) não regenere, mas ainda assim decidimos manter esta actividade como tínhamos planeado.

Rossi *et al.* (2008) referem que existem diferentes sub-tipos de neoblastos na planária. O uso de marcadores moleculares permitiu perceber que os neoblastos se encontram no parênquima e estão praticamente ausentes da cabeça e da faringe.

Reddien *et al.* (2005) investigaram o papel de alguns genes na regeneração da planária. Desactivaram 1065 genes individualmente e descobriram que 240 estavam envolvidos nos fenómenos de regeneração. Destes, 85% encontram-se também no genoma de outras espécies, incluindo os humanos. Este resultado pareceu-nos especialmente interessante do ponto de vista das potencialidades terapêuticas das células estaminais humanas. Actualmente, as investigações centram-se num dos genes identificados – *smedwi-2* – que se encontrava sempre activo em neoblastos em divisão. Quando se desactiva este gene, os neoblastos detectam a ferida, começam a dividir-se como em planárias normais, mas quando migram e chegam ao local onde deveriam substituir o tecido perdido, não o fazem. Este gene codifica uma proteína de um grupo chamado PIWI, semelhante a outras já identificadas por exemplo na mosca da fruta. Quando um neoblasto se divide, dá origem a duas células: um neoblasto e uma célula que pode converter-se em qualquer tipo. Sem esta proteína (PIWI) essa diferenciação não ocorre.

## **4. Avaliação e conclusões**

### **4.1 Actividades de divulgação**

Os materiais de divulgação foram aprovados pelas enfermeiras que fazem o acompanhamento das grávidas e foram aceites pela Direcção do Centro de Saúde, uma vez que cumpriam todos os requisitos necessários, como a ausência de publicidade e a linguagem adequada ao público-alvo. A sessão com o grupo de grávidas foi avaliada através de inquéritos preenchidos pelas participantes e no geral correu muito bem. Tanto a enfermeira como as participantes acharam as nossas explicações claras e acessíveis. As críticas que fazemos nós próprias à apresentação são as seguintes: não estávamos preparadas para responder a algumas questões muito específicas como o tipo de análises prévias à criopreservação e não esperávamos ter uma grande heterogeneidade entre as participantes quanto ao nível de informação. Estes pontos serão trabalhados para a próxima apresentação.

### **4.2 Actividades experimentais**

Concluimos que a planária consegue regenerar todo o organismo a partir de fragmentos minúsculos (por vezes menos de 2mm<sup>2</sup>) do seu corpo e que o faz sem sequer obter alimentação durante o processo de regeneração. Pareceu-nos que a



regeneração se processa por reorganização da sua biomassa, o que foi confirmado por uma experiência realizada por nós e por posterior pesquisa bibliográfica. Os neoblastos migram para o local do corte e diferenciam-se de forma a organizar os órgãos perdidos. Deverá ainda ocorrer mobilização de materiais de reserva e talvez de matéria resultante da digestão de células diferenciadas para a formação de novas células. Concluímos ainda que na planária deverá existir um complexo sistema de comunicação, uma vez que as experiências realizadas mostram que o processo de regeneração se faz de forma diversa, consoante as características da amputação, como a parte do corpo amputada ou o tamanho e forma do fragmento retirado. Pareceu-nos haver sempre uma estratégia adequada à situação de cada planária, o que implica a existência de processos de “decisão” que estamos habituadas a associar a um sistema nervoso complexo como o dos animais superiores. Nas planárias achamos que não é o sistema nervoso que coordena este processo de reconhecimento da lesão e organização da melhor estratégia de regeneração; de facto, por vezes os fragmentos regenerados quase não têm células nervosas e as que existem deverão estar desconectadas. Será, na nossa opinião, um sistema de comunicação químico muito complexo e eficiente, a nível celular.

Quando iniciámos esta investigação não fazíamos ideia do que ela ia fazer connosco. Na verdade, quando vimos as planárias pela primeira vez elas pareceram-nos tão insignificantes que as encarámos com algum desdém. À medida que a primeira experiência decorria, as planárias conquistaram-nos completamente e quando demos conta estávamos a passar as horas de almoço no laboratório a observar a regeneração e interrogar-nos sobre o espantoso poder de recuperação deste minúsculo animal. O que estava programado para ser uma experiência breve sobre regeneração nas planárias transformou-se afinal no apaixonante trabalho de um ano lectivo!

## 5. Fontes bibliográficas

Alvarado, A. S. & Kang, H. (2005). Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Experimental Cell Research* 306: 299 – 308.

Nápoles, A.M & Branco, M.C. (2001). Técnicas Laboratoriais de Biologia-bloco 3. Didáctica Editora, Lisboa.

Peter W. Reddien, Néstor J. Oviedo, Joya R. Jennings, James C. Jenkin, and Alejandro Sánchez Alvarado (2005) SMEDWI-2 Is a PIWI-Like Protein That Regulates Planarian Stem Cells *Science*. 310:1327-1330.

Reddien, P. W.; Bermange, A. L.; Murfitt, K. J.; Jennings, J. R.; Alvarado, A. S. (2005). Identification of Genes Needed for Regeneration, Stem Cell Function, and Tissue Homeostasis by Systematic Gene Perturbation in Planaria. *Developmental Cell*, Vol. 8, 635–649.

Rossi, L.; Planarians, a tale of stem cells. Salvetti, A.; Batistoni, R.; Deri, P. & Gremigni, V. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 16 – 23.

### Internet

#### **Células Estaminais:**

De que se trata?. [online] disponível na internet via: [www.bionetonline.org/portugues/content/sc\\_intro.htm](http://www.bionetonline.org/portugues/content/sc_intro.htm), acedido em 28 de Setembro de 2010

CÉLULAS ESTAMINAIS- Criopreservação de Células Estaminais. [online] disponível na internet via: [www.celulasestaminais.org](http://www.celulasestaminais.org), acedido em 2 de Novembro de 2010

Celulas Estaminais. [online] disponível na internet via: [www.celulasestaminais.net](http://www.celulasestaminais.net), acedido em 2 de Novembro de 2010

CHN ::: Centro de Histocompatibilidade do Norte. [online] disponível na internet via: <http://wwwchnorte.min-saude.pt/>, acedido em 3 de Novembro de 2010

#### **Planárias:**

EENY-049/IN206: Land Planarians, *Bipalium kewense* Moseley and *Dolichoplana striata* Moseley. [online] disponível na internet via: <https://edis.ifas.ufl.edu/in206>, acedido em 19 de Outubro de 2010

The Sánchez Lab Home Page. [online] disponível na internet via: <http://planaria.neuro.utah.edu/>, acedido em 19 de Outubro de 2010

PloS Genetics: A Peer-Reviewed Open Acces Journal. [online] disponível na internet via: [www.prosgenetics.org/search/simpleSearch.action;jsessionid=F41A4F202F7FEE4B566BCEF008C6D680.ambra02?from=globalSimpleSearch&filterJournals=PLoSGenetics&query=planarians](http://www.prosgenetics.org/search/simpleSearch.action;jsessionid=F41A4F202F7FEE4B566BCEF008C6D680.ambra02?from=globalSimpleSearch&filterJournals=PLoSGenetics&query=planarians), acedido em 19 de Outubro de 2010

Capacidade de regeneração da Planária é desvendado por cientistas. | Elite Tecnológica. [online] disponível na internet via: [www.elitetecnologica.com/2010/04/capacidade-de-regeneracao-da-planaria-e-desvendado-por-cientistas](http://www.elitetecnologica.com/2010/04/capacidade-de-regeneracao-da-planaria-e-desvendado-por-cientistas), acedido em, 19 de Outubro de 2010

#### **Imagens:**

Todas as imagens presentes no projecto são originais da autoria dos membros do grupo.

# Toda a vida numa célula só

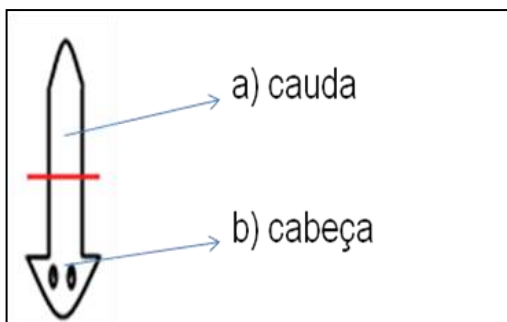
## Tabelas e Figuras

**Figura 1** – Planária (*Dugesia* sp.) fotografada à lupa (10X).



Planária	1	2	3	4	5	6	E
Corte							

**Figura 2** – Esquema dos cortes efectuados nas planárias – actividade experimental A – regeneração na planária.



**Figura 3** – Esquema do corte efectuado nas planárias do ensaio AL1.

**Tabela I** – Área dos fragmentos de três planárias (P1, P2 e P3) do ensaio AL1, antes e depois da regeneração. Os fragmentos anteriores (cabeça) assinalam-se com b) e os fragmentos posteriores (cauda) assinalam-se com a).

Área (mm <sup>2</sup> )	<u>P1 a)</u>	<u>P1 b)</u>	<u>P2 a)</u>	<u>P2 b)</u>	<u>P3 a)</u>	<u>P3 b)</u>
<u>Área inicial</u>	<u>5,6</u>	<u>4,4</u>	<u>4,2</u>	<u>3,5</u>	<u>2,1</u>	<u>2,3</u>
<u>Área final</u>	<u>4,6</u>	<u>5,5</u>	<u>3,8</u>	<u>5,0</u>	<u>1,4</u>	—
<u>△ área</u>	<u>- 1,0</u>	<u>+ 1,1</u>	<u>- 0,4</u>	<u>+ 1,5</u>	<u>- 0,7</u>	—

Planária 1



Planária 2



Planária 3



**Figura 4** - Esquema do corte efectuado nas planárias do ensaio AL2.

**Figura 5**

Foto da planária com as duas cabeças (a Ana ainda não me passou a foto e está incontactável.)

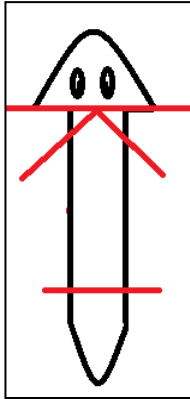


Figura 6 - Esquema de cortes da AL3

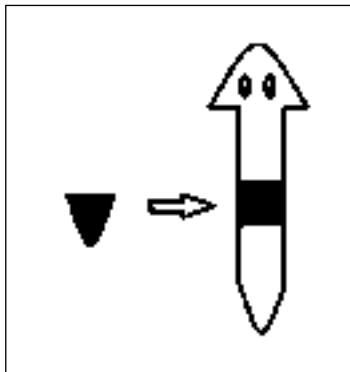
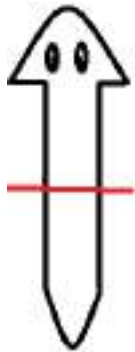
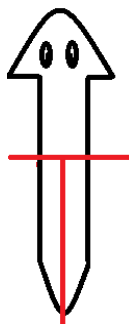


Figura 7 – Fragmento-cauda que regenerou uma nova cauda, regenerando também a cabeça (a negro o fragmento original).

Planária 1



Planária 2



Planária 3

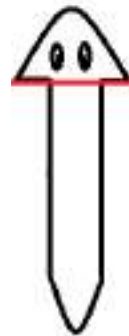


Figura 8 – Cortes efectuados nas planárias do ensaio AL4.

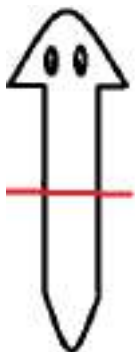


Figura 9 - Esquema de corte AL 5

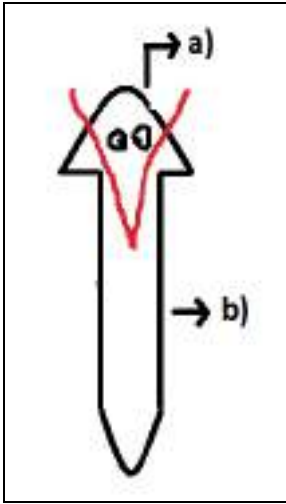


Figura 10 - Esquema de corte AL 7