

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA

Medidas reológicas em agregados celulares

Ana Cláudia Soares Pereira

Dissertação realizada sob orientação do professor Dr. Marco A. P. Idiart e apresentada ao Instituto de Física da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Física.

Porto Alegre
1^o semestre de 2006.

*À Ironda, minha mãe querida, pelo incentivo,
compreensão e carinho em todos os momentos de minha vida.
Ao Marcelo, meu amado esposo.
Agradeço a Deus todos os dias pela benção de conhecê-los.*

Agradecimentos

★ Ao orientador prof. Marco A. P. Idiart, pela dedicação demonstrada e pelo estímulo constante oferecido e, acima de tudo, pela amizade e compreensão durante este período de trabalho;

★ A professora Rita de Almeida pela colaboração;

★ Aos meus amigos Marcia, Luiz Fernando, Marcos André, Mauro, Luziane, Mário, João, Mairon, Evgeny, Fabiano, Rafael;

★ Aos professores e funcionários do Departamento de Física da UFPEL e do IF-UFRGS.

Muito Obrigado por tudo.

Resumo

Um dos problemas fundamentais da embriogênese é o posicionamento das células que compõe os diversos tecidos de um organismo durante desenvolvimento. A Hipótese da Adesão Diferenciada (HAD) de Steinberg afirma que parte do problema de posicionamento é resolvido por afinidade de adesão entre células. De acordo com esta visão, dois tipos celulares diferentes se comportariam como moléculas de líquidos imiscíveis, segregando-se naturalmente para minimizar sua energia superficial. Assim, agregados celulares apresentariam tensões superficiais cujos valores estão relacionados com sua adesividade. Neste trabalho, apresentamos uma técnica experimental nova para medida da tensão superficial de um agregados celulares e a testamos em agregados de células de hidras. Tais medidas são de fundamental importância para estudarmos as propriedades físicas de nosso sistema biológico. Pois, possibilitam previsões teóricas facilmente testáveis de como tecidos feitos de diferentes tipos celulares se comportam e organizam-se.

Abstract

The correct positioning of the cells that make the different tissues in developing organisms is a fundamental problem in embriogenesis. The Differential Adhesion Hypothesis (DAH), by Steinberg, proposes that part of the problem is resolved due to adhesion affinities between cells. According to this view, different cells in a tissue aggregates to minimize the surface energy similar to molecules in an immiscible liquid, segregating to minimize surface energy. Therefore cell aggregates present surface tensions that are related with the adhesion forces. In this work, we present a new technique to measure surface tensions in cell aggregates, using hydra cell aggregates as a model. For this, one equipament was developed in Physicist Institute at UFRGS.

Sumário

1. Introdução	2
2. Cnidários	6
2.1 Histologia e Fisiologia	7
2.1.1 Epiderme	8
2.1.2 Ectoderme	9
2.1.3 Mesoderme	9
2.1.4 Endoderme	10
2.2 Sistema nervoso	10
2.3 Movimento	10
2.4 Nutrição	11
2.5 Reprodução	11
2.6 Regeneração	13
3. Reologia	15
3.1 Tensão superficial	16
3.2 Comportamento elástico	20
3.2.1 Lei de Hooke	20
3.2.2 Elasticidade e Plasticidade	22
3.2.3 Campo de tensões	23
3.3 Comportamento viscoso	26
3.4 Comportamento viscoelástico	28
3.4.1 Modelo cinético para agregados celulares	33

4. Dinâmica de organização celular dos tecidos	37
4.1 Introdução	37
4.2 Junções celulares	38
4.3 Adesão Celular	39
4.4 Hipótese da adesão diferenciada	42
5. Trabalhos relacionados	48
5.1 Medida de tensão superficial de tecido embrionário de vertebrado	48
5.2 Experimento com <i>Rana pipies</i>	51
6. Procedimento experimental e Resultados	56
6.1 Preparação do agregado celular	56
6.2 Desenvolvimento do agregado	57
6.3 Materiais e métodos	59
6.4 Procedimento geral	62
6.5 Calculo da tensão superficial	65
6.6 Resultados	68
6.7 Análise das medidas	69
7. Conclusões	72
8. Trabalhos futuros	76
A. Protocolo de preparação de meio de cultura de hidras (Hydra Medium):	77
B. Protocolo de preparação de meio de dissociação (DM):	79
C. Protocolo para a realização da experiência de dissociação celular:	81
D. Cálculo do volume e da área do agregado:	83
D.1 Cálculo da área do agregado	83
D.2 Cálculo do volume do agregado	84
Referências bibliográficas	86

Capítulo 1

Introdução

O embrião inicialmente tem suas células iguais. Ao longo do seu desenvolvimento ocorre diferenciação e migração de células. A adesividade entre as células determina as relações de associação, ou seja, células apresentam diferentes intensidades de adesão de acordo com seu tipo. Estas relações de associação definem a direção do movimento celular que irão formar tecidos e órgãos. Em um agregado celular a adesividade entre as células determinam o ordenamento celular em camadas homogêneas e distintas. Este processo de organização celular é chamado de segregação celular.

Uma possível explicação para este processo é a hipótese da adesão diferenciada para a embriogenese de Steinberg. Ela postula que a célula explora aleatoriamente a sua vizinhança procurando uma posição de maior adesividade [1, 2]. Esta hipótese será o foco deste trabalho.

A hipótese da adesão diferenciada (HAD) não explica todo o fenômeno da embriogênese. Ela é mais adequada para explicar organizações celulares de escala de tempo mais curtas, onde mecanismos puramente biológicos como diferenciação ou reprodução ainda não tiveram tempo de agir. Em particular esta teoria descreve acuradamente o comportamento de agregados celulares feitos em laboratório (*in vitro*), para os quais se observa arredondamento e separação de fases quando o agregado é composto por mais de um tipo celular.

Como determinado pela HAD [3, 4, 5], a ordenação de células embriônicas e o envelopamento de tecidos embrionários são semelhantes ao comportamento de espalhamento de um líquido sobre a superfície do outro [1, 3, 4].

As primeiras pesquisas sobre adesão celular foram apresentadas no trabalho de Rec-

klingshausen (1862), o qual mostrava que os tecidos celulares em geral eram unidos por um cimento que atuava como selador do espaço intercelular, interconectando células vizinhas dentro de um tecido.

A experiência de separação de tecidos vivos, vista originalmente no trabalho de Schiefferdecker[6], que separou epiderme de derme, mostrou claramente que estes tecidos são conectados via uma material constituído por proteínas. Concluiu-se então, que tecidos celulares são unidas por um “cimento intercelular” ou “substrato” [7]. Esta visão foi adotada por Moscona e reforçada pela sua demonstração de que tecidos embrionários de vertebrados podem ser dissociados em células únicas[8]. Este conceito permaneceu até 1960[9] quando Moscona[10] introduziu o conceito de matriz extracelular. Ela seria responsável pela associação entre as células embriônicas.

Todas as propriedades que os tecidos celulares apresentam, tal como, afinidades e desafinidades em agregados celulares, movimento de massa celular tal como esticamentos e dobraduras e gradientes químicos foram então associados a matriz extracelular.

A matriz extracelular é responsável pelo preenchimento do espaço vazio e pela união de uma célula a outra, é de fundamental importância nas funções vitais dos tecidos animais e vegetais. A matriz extracelular é constituída de inúmeras proteínas e polissacarídeos que se organizam em forma de rede. Sendo responsável pela maior parte da diversidade morfológica, funcional e patológica dos tecidos. A quantidade de matriz é variável com o tipo de tecido, sendo abundante principalmente nos tecidos conjuntivos (cartilagem, osso, derme) e escassa no tecido nervoso e tecido epitelial, formando um substrato que fornece condições adequadas para o crescimento e diferenciação das células de vários tecidos[11].

A idéia que somente a matriz extracelular era responsável pela conexão de tecidos e afinidade celular foi abandonada quando Steinberg[12] demonstrou, através da dissociação de células embriônicas de vertebrados, que a forma como as células se associam é determinada por suas propriedades intrínsecas.

Johannes Holtfreter e colaboradores [13, 14, 15] investigaram o comportamento de células de tecidos embriônicas de anfíbios, associados em várias combinações *in vitro*, e concluíram que os mesmos demonstram preferências em associações com outros tecidos e se rearrajam em combinações particulares para adotar uma configuração semelhante demonstrada no

curso do desenvolvimento embriônico.

Holtfreter[13] introduziu o termo afinidade celular para descrever o processo de reordenamento celular e reconstrução do tecido original que ocorre após a dissociação total e da mistura aleatória com células de outros tecidos. Além disso, foi demonstrado que não existem somente preferências associativas, mas os tecidos também preferem posições particulares (interna, externa e ou intermediária) dentro de um agregado multicelular.

Townes e Holtfreter[14] desenvolveram a idéia que tensões superficiais e aderência, para tecidos celulares, são dois parâmetros separados que operam independentemente para especificar configurações de tecidos.

Várias hipóteses foram formuladas para explicar este tipo de comportamento. Harris[16] sugeriu a teoria da contração diferencial de superfície para explicar o ordenamento celular, a qual afirma que a célula mais contrátil está sobre a superfície exposta, por outro lado, a célula menos contrátil está em uma posição mais interna possibilitando um ordenamento relativo de ambas. Jones et al.[17] propuseram que a velocidade relativa pode determinar o posicionamento dos tecidos no agregado celular, conseqüentemente a população celular que movimenta-se mais rápido tende a envelopar a menos veloz. Mas a diferença de adesividade entre dois tecidos são fatores suficientes para causar o ordenamento celular, espalhamento de tecidos e a obtenção da mesma configuração anatômica concordando com a hipótese da adesão diferenciada[18].

A validação da hipótese da adesão diferenciada requer a demonstração de que tecidos apresentam propriedades que explicam o seu comportamento de líquido assim possibilitando as medidas de propriedades físicas como tensão superficial. Vários experimentos comprovaram que tecidos celulares possuem comportamento semelhante aos líquidos [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25].

As primeiras medidas da tensão superficial de tecidos mostraram as preferências de espalhamento mútuo [19, 20, 22]. Davis registrou os primeiros valores numéricos da tensão superficial de tecidos vivos, da superfície de ectoderme, mesoderme e endoderme de anfíbios, e Foty et al[24] analisaram os valores numéricos da tensão superficial de cinco tecidos embriônicos de vertebrado. Através dos valores medidos de tensão superficial, pode-se analisar a intensidade com a qual os tecidos aderem e corretamente predizer qual dos pares de tecidos

tendem a espalhar-se sobre a superfície de outro.

O objetivo deste trabalho é a realização de medidas reológicas sistemáticas de tensão superficial em agregados constituídos por dois tipos celulares de *Hidras vulgaris*. Quando tal organismo tem suas células dissociadas (devido a ação de uma solução apropriada, mas conservando suas funções vitais), misturadas em um centrífuga, e então recolocadas em meio de cultura, elas são capazes de se reagrupar, de tal maneira, a reconstruir um novo indivíduo perfeitamente funcional.

No capítulo 2 mostraremos a histologia e fisiologia das hidras, no capítulo 3 mostraremos de forma ampla todos os conceitos físicos que estão relacionadas as nossas medidas e características comportamentais do agregado celular. O capítulo 4 destina-se ao estudo, de forma básica, de alguns conceitos biológicos. No capítulo 5 mostraremos trabalhos relacionados com o nosso, que utilizam o mesmo método, para a obtenção de medidas de tensão superficial em vários tipos de agregados celulares. No capítulo 6 mostraremos de forma detalhada o material experimental utilizado para as medidas reológicas e nos apêndices encontram-se todos os protocolos seguidos para a manutenção e obtenção de agregados celulares de hidra.

Capítulo 2

Cnidários

O filo *Cnidária* ou *Celenterados* inclui as famílias hidras, águas-vivas, anêmonas-do-mar e corais. Os cnidários podem ser estruturados como polipos ou medusas. O polipo é a característica dos animais que possuem corpo tubular ou cilíndrico radialmente simétrico, com a extremidade oral direcionada para cima onde encontra-se ao redor da boca tentáculos (representando evaginações da parede corporal) responsáveis pela captura e digestão de alimento. A boca é a única abertura no interior da cavidade intestinal, enquanto que o pé se encontra fixo a superfície. Seu deslocamento é lento, porque ocorre através de saltos e contrações corporais[26].

Histologicamente os cnidários são mais primitivos na cadeia evolutiva, embora a sua estrutura possua alguma das especificações encontradas nos metozoários superiores. Um número considerável de tipos celulares compõem a ectoderme e a endoderme, mas há somente um grau limitado de desenvolvimento de órgãos. Por este motivo, geralmente são incluídos em uma divisão do *Reino Animal* chamada *Radiata*.

A estrutura do corpo de um cnidário consiste de 3 camadas básicas:

- **Epitélio externo** - ectoderme;
- **Camada extracelular** - mesogléia;
- **Epitélio interno** - endoderme.

Entre os dois epitélios, situa-se a mesogléia, que consiste em uma lâmina fina acelular, gelatinosa, constituída de substâncias que separam as células das camadas de ectoderme e endoderme, onde se encontra aderida a matriz extracelular.

Os cnidários são marinhos, com exceção das hidras e de uns poucos hidrozoários de água-doce. A maioria habita águas rasas e as formas sésseis (seus órgãos são fixados diretamente à parede do epitélio interno) abundam nas costas, rochas ou nas formações coralinas nas águas tropicais.

2.1 Histologia e Fisiologia

A hidra possui alta capacidade de regeneração, motivo pelo qual, é muito utilizada no estudo de reagrupamento celular e estabelecimento de configurações de equilíbrio por adesões diferenciadas, sendo este o objetivo deste estudo.

As hidras são animais de água-doce, com o corpo na forma de polipo (cilíndrico) que variam de uns poucos milímetros até 1 cm de comprimento. No entanto, seu diâmetro corporal raramente excede 1 mm. A extremidade aboral (direção inferior do corpo) forma um disco basal, por meio do qual o animal prende-se a superfície. A extremidade oral contém uma plataforma ou cone chamada de hipóstomo, com a boca no topo. Ao redor da base do cone encontra-se um círculo de cerca de seis tentáculos (fig. 2.1).

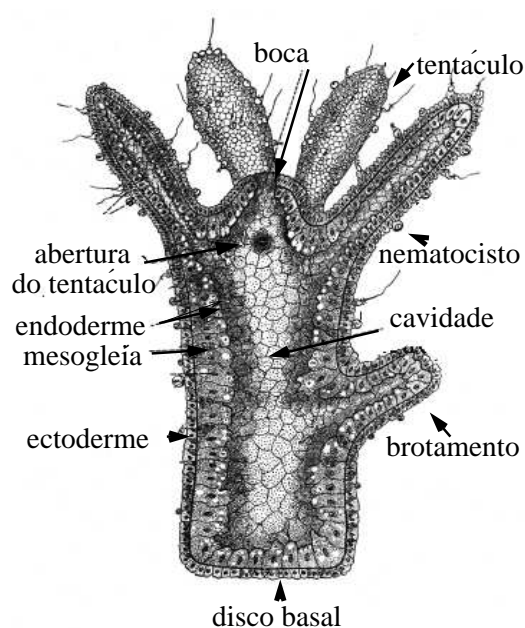


Fig. 2.1: *Estrutura geral da hidra adulta.*

Na epiderme (conjunto formado pela ectoderme, mesoderme e endoderme) encontram-se células ectodérmicas, localizada na camada externa. Os tentáculos são responsáveis pela defesa e alimentação, contendo nos tentáculos várias estruturas chamadas de nematocistos, capazes de injetar uma substância tóxica paralisante ou irritante na pele do animal que servirá de alimento. Também na epiderme localizam-se as células endodérmicas, encontradas apenas na camada interna, responsáveis pela atividade digestiva. A seguir estudaremos detalhadamente as camadas epiteliais das hidras.

2.1.1 Epiderme

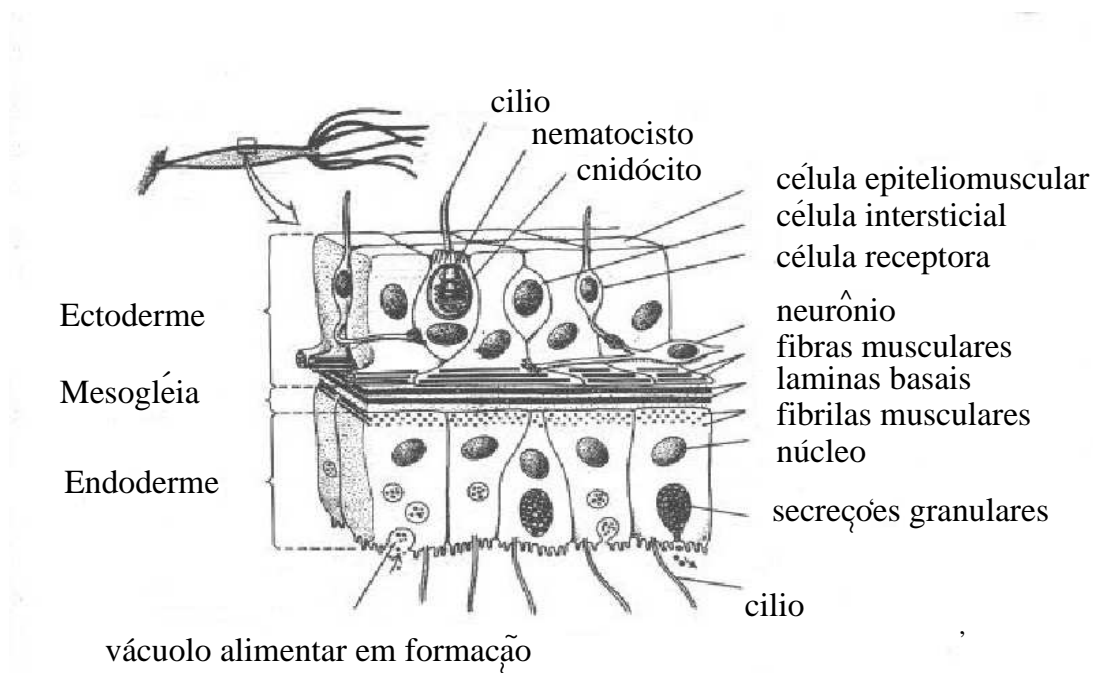


Fig. 2.2: Parede corporal de uma hidra (corte longitudinal)

As células epiteliais encontram-se permanentemente no ciclo mitótico, isto é, existe um estado estacionário de produção e perda de células, ou seja, existe uma freqüente renovação celular inclusive de neurônios o que torna a hidra um animal extremamente regenerativo. A sua vida celular possui a curta duração de três dias, desta forma a massa do tecido duplica em um intervalo de três a quatro dias. Mas o tamanho da hidra permanece o mesmo, ou seja, à medida que as células se dividem incrementando a massa da coluna, as camadas

epiteliais se movem ao longo do corpo. Os tecidos estão sempre se deslocando pelo corpo e eventualmente se perdem para o meio externo. O restante é utilizado na formação de brotamentos.

2.1.2 Ectoderme

A ectoderme é composta por quatro tipos de células principais: células epiteliomusculares, células intersticiais, células secretoras de muco e células receptoras e nervosas.

As células epiteliomusculares são os tipos mais comuns encontrados nos cnidários. Elas localizam-se sobre a mesogléia e são responsáveis pela locomoção. Na hidra o movimento ocorre devido a contrações corporais.

Abaixo da superfície epidérmica e enfiadas entre as células epiteliomusculares encontram-se as células intersticiais. Elas são células pequenas e redondas com núcleos relativamente grandes. As células intersticiais também agem como células germinativas ou formativas dando origem ao esperma e ovos e a qualquer outro tipo de célula, ou seja, são células totipotentes (células tronco).

As células secretoras de muco são encontradas em grande quantidade no disco basal (pé), sendo responsáveis pela fixação da hidra.

As células receptoras são alongadas e orientadas em ângulos retos em relação a superfície epidérmica. São abundantes nos tentáculos e podem invaginar no interior das células epiteliomusculares. Localizam-se na ectoderme e são superficialmente semelhantes aos neurônios multipolares dos animais superiores.

2.1.3 Mesoderme

A mesogléia é uma camada acelular, na qual, os tecidos da hidra aderem-se e onde encontra-se a matriz extracelular. Além de servir como ligação entre a ectoderme e endoderme, também influencia na migração, diferenciação e proliferação das células.

Localiza-se abaixo da ectoderme, onde encontram-se ramificações das células nervosas, que não se assemelham funcionalmente aos dentritos e axônios dos neurônios ou células nervosas desenvolvidas nos animais mais desenvolvidos. Essas células nervosas fazem contato

direto com os prolongamentos das células sensitivas e com as fibras contráteis das células epitélio-musculares. Dessa forma, surge um mecanismo sensitivo-neuromotor: as células sensitivas recebem estímulos, as células nervosas conduzem os impulsos e as fibras contráteis reagem com contração produzindo os movimentos do corpo.

2.1.4 Endoderme

A endoderme possui diversos tipos de células como: células sensitivas, células flageladas, células intersticiais, células glandulares e células epitélio-digestivas.

As células glandulares produzem enzimas digestivas que são lançadas na cavidade central ou cavidade gastrovascular, contribuindo para a digestão extracelular. Contudo, as células flageladas captam alimentos não digeridos ou parcialmente digeridos e os transferem às células epitélio-digestivas da endoderme, na qual ocorre também a digestão intercelular. O líquido da cavidade gastrovascular funciona como esqueleto hidráulico.

2.2 Sistema nervoso

As células nervosas arranjam-se em uma rede nervosa irregular, sobre a ectoderme e endoderme, e concentram-se particularmente ao redor da boca. Algumas sinapses são simétricas, ou seja, os terminais neuroniais de ambos os lados da sinapse secretam uma substância transmissora, e pode-se iniciar um impulso em qualquer direção através da sinapse. Os neurônios, que servem para as sinapses simétricas, transmitem impulsos em ambas as direções e são portanto direcionalmente não-polarizados, em contraste com o sistema nervoso dos animais superiores.

2.3 Movimento

O cilindro corporal e os tentáculos dos cnidários podem estender-se, contrair-se ou curvar-se para um lado ou outro de forma a ajudar na locomoção, que ocorre por saltos ou flutuação devido a contrações das fibras epidérmicas longitudinais. O fluxo de líquido no interior da

cavidade gastrovascular exerce um papel importante, pois funciona como esqueleto hidráulico, levando água através da boca. Uma hidra relaxada pode esticar-se até 20mm, enquanto que a contração das fibras epidérmicas pode reduzi-la a menos de 0.5mm.

2.4 Nutrição

Todos os cnidários são carnívoros e alimentam-se principalmente de pequenos crustáceos (artêmia). A hidra possui quatro tipos de nematocistos, que se arranjam nos tentáculos em grupos ou baterias. Cada bateria possui uma grande quantidade de substâncias tóxicas, aparecendo como saliências ou verrugas quando os tentáculos se estendem. Devido a uma descarga dos nematocistos a presa é paralisada quando entra em contato com os tentáculos.

Os nematocistos são utilizados apenas uma única vez, após a captura da artêmia são formados novos nematocistos pelas células intersticiais. Apenas uma parte é gasta na ingestão de uma artêmia. Os nematocistos utilizados são substituídos dentro de 48 horas.

Os tentáculos puxam o animal capturado em direção à boca, que se abre para engoli-lo. A boca pode distender-se enormemente e as secreções da mucosa ajudam a engolir. As células enzimático-glandulares descarregam enzimas proteolíticas, reduzindo gradualmente os tecidos da presa a um caldo ralo.

Curiosamente as hidras não apresentam boca permanente, quando o animal não está se alimentando, as células epidérmicas e gastrodérmicas ao redor da boca formam junções septadas selantes entre si e selam a boca reduzindo o transporte entre as células isolando o animal do ambiente. A abertura da boca parece dever-se à contração muscular.

Após essa fase extracelular inicial, a digestão continua intracelularmente. Os produtos da digestão são distribuídos por difusão. Os materiais indigeríveis são ejetados pela boca quando o corpo se contrai.

2.5 Reprodução

A reprodução pode ser assexuada ou sexuada. O fator determinante da forma de reprodução são as condições ambientais. Se o ambiente for favorável, fornecendo alimento regularmente,

luminosidade, temperatura adequada (não superior a $20^{\circ}C$), os animais preferencialmente irão adotar a reprodução por brotamento. Em condições não favoráveis, os animais irão adotar a reprodução sexuada.

Nas hidras o brotamento assexuado é o meio comum de reprodução durante os meses mais quentes do anos. Por este motivo, as hidras são animais que possuem alto poder de regeneração. O broto desenvolve-se como uma evaginação simples da parede corporal e possui uma extensão com a cavidade gastrovascular da hidra adulta. Na extremidade da protrusão se torna a cabeça da nova hidra, crescendo à medida que o broto adota tecido do corpo do adulto (fig. 2.3).

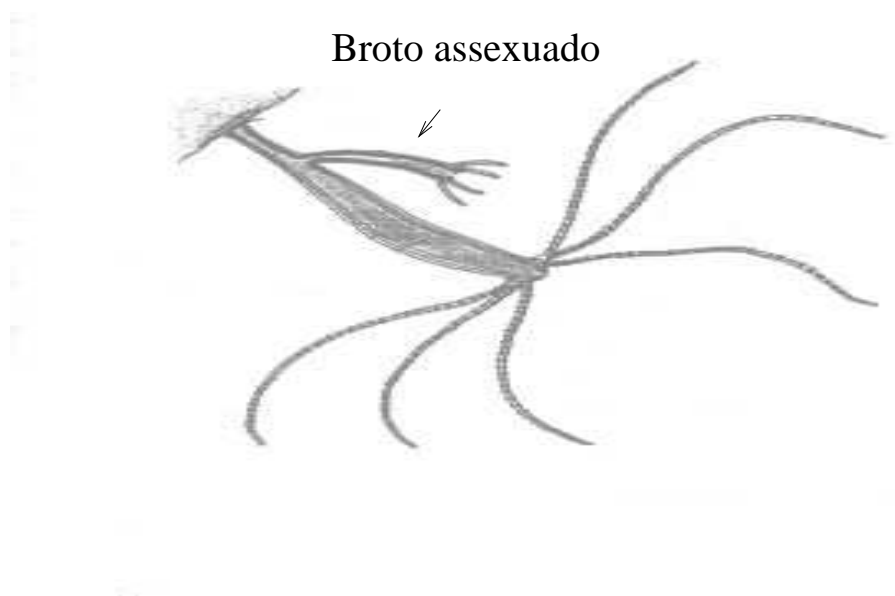


Fig. 2.3: *Corte de uma hidra com um broto assexuado.*

A morfogênese deste processo possui simetria, ou seja, o tecido localizado no ponto onde se inicia a formação da protrusão (futura cabeça), encontra-se concêntrico e esta origem se diferencia para organizar a formação de futura região gástrica e pé. Estas tendências geométricas indicam a formação de pré-padrões morfogênicos, ou seja, existe uma dependência espacial em relação ao pé e cabeça do adulto. Esta polaridade é ainda mais notável em experiências de regeneração, pois os tecidos obtidos de diferentes localidades do corpo vão apresentar tendências próprias quanto a probabilidade de se transformar em cabeça ou pé.

Nos brotos a boca e os tentáculos se formam-se na extremidade superior do corpo e

finalmente, destacam-se da hidra adulta e tornam-se independentes. O brotamento ocorre em muitos outros cnidários e é o meio pelo qual ocorre o aumento das colônias.

A reprodução sexuada ocorre principalmente no outono, através da produção de ovos. Como em todos os cnidários, as células germinativas originam-se das células intersticiais, que se agregam ao longo do corpo e formam ovários ou testículos. Apenas um único ovo é produzido em cada ovário.

2.6 Regeneração

Existe uma grande diversidade de animais dotados de tecidos que possuem alto poder de regeneração, pois são formados por células tronco. Estas células são tecidos auto-regenerativos porque possuem alta capacidade de divisão celular. A hidra é um exemplo deste sistema, ou seja, todos os seus tecidos são auto-regenerativos. Estando em constante renovação inclusive os neurônios. Dentro de um período de várias semanas, todas as células do corpo são substituídas. Conseqüentemente, as hidras nunca envelhecem.

As células intersticiais contribuem no processo de regeneração, mas o processo não depende apenas dessas células, em vez disso, as células ectodérmicas e endodérmicas não diferenciadas são a principal fonte de material regenerativo.

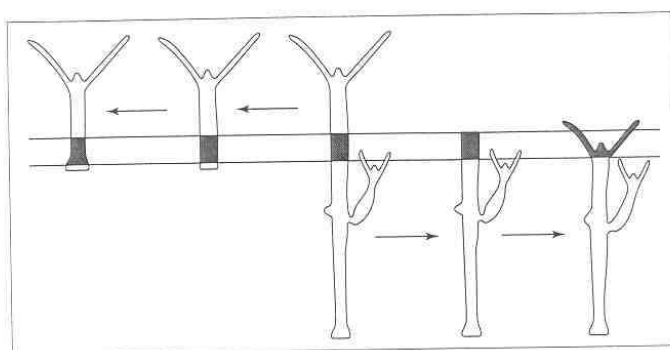


Fig. 2.4: *Regeneração de uma hidra*

Existe uma polaridade ou gradiente de dominância da extremidade oral (superior) até a

aboral (inferior). Se o corpo de uma hidra for interrompida em vários cortes, cada pedaço se regenera e forma um novo indivíduo. Além do mais, a polaridade original é mantida, de forma que os tentáculos sempre se formam na extremidade mais próxima a extremidade oral do animal intacto e o disco basal surgirá na direção oposta.

O gradiente oral/aboral também se reflete na velocidade de regeneração, pois um pedaço aboral regenera-se mais lentamente que outro retirado de uma região mais próxima à boca. Após a remoção por amputação dos pés e da cabeça, o tecido remanescente se regenera formando um novo pé e uma nova cabeça em poucos dias. Também se isolarmos apenas um cilindro da coluna, ambas as extremidades iram reaparecer mantendo a morfologia original. Estas propriedades confirmam a existência de polaridade oral-aboral. A polaridade é mantida mesmo após a secção, ou seja, todos os tipos de cortes são regenerados.

A regeneração também ocorre a partir de agregados de células dissociadas, ou seja, aglomerados aleatórios de células podem gerar um animal completo. Isto é, quando inicialmente produzido o agregado é uma massa de células aleatoriamente misturadas. Nesta massa celular, uma nova ordem é rapidamente estabelecida pelo processo de reagrupamento e rearranjo celular. A estrutura resultante é uma pequena esfera que consiste em uma camada ectodérmica envolvendo a camada endodérmica.

As hidras apresentam grande capacidade de reorganização celular, que pode ser observada após a separação e centrifugação de seus tecidos celulares. Quando obtemos *in vitro* agregados celulares formados por tecido celular de ectoderme e endoderme o comportamento observado é semelhante a de líquidos imiscíveis. Isto é, as células do agregado estão inicialmente misturadas e segregam (separam) e unem-se a células do mesmo tipo ou unem-se por afinidade com células diferentes. Isto possibilita analisar todo o processo de segregação e organização celular. Por este motivo nos permite obter medidas de tensão superficial, sendo este o objetivo deste estudo.

Capítulo 3

Reologia

A reologia é uma área da mecânica dos fluidos que estuda como corpos sólidos ou fluidos respondem quando aplicada uma força mecânica que causa deformação ou fluxo de matéria levando em conta a viscosidade, plasticidade, elasticidade e escoamento da matéria, ou seja, seu objetivo é estudar as mudanças na forma e no fluxo de um material, englobando todas estes fatores [27].

Para a determinação das propriedades reológicas de um material, devemos medir a deformação provocada por uma força ou medir a força necessária para causar uma determinada deformação num determinado intervalo de tempo, considerando as características físicas do material e levando em conta as condições ambientais como temperatura e pressão.

A deformação de um corpo pode ser dividida em dois tipos:

- **Deformação espontânea e reversível:** Conhecida também como deformação elástica;
- **Deformação irreversível:** Conhecida como fluxo ou escoamento viscoso.

Existem modelos mecânicos que descrevem o comportamento físico de agregados celulares. Estes modelos são constituídos pela associação de molas e amortecedores chamados de modelo de Kelvin e modelo de Maxwell, que descreveremos a seguir. Mas, primeiro, vamos definir os principais conceitos da teoria da elasticidade.

3.1 Tensão superficial

A tensão superficial ocorre na superfície dos líquidos, seus efeitos são percebidos quando a superfície do mesmo encontra-se em contato com outro líquido, gás ou sólido. Então, tensão superficial é denominada como uma força que se origina pelo contato entre superfícies diferentes (fig. 3.13) [28].

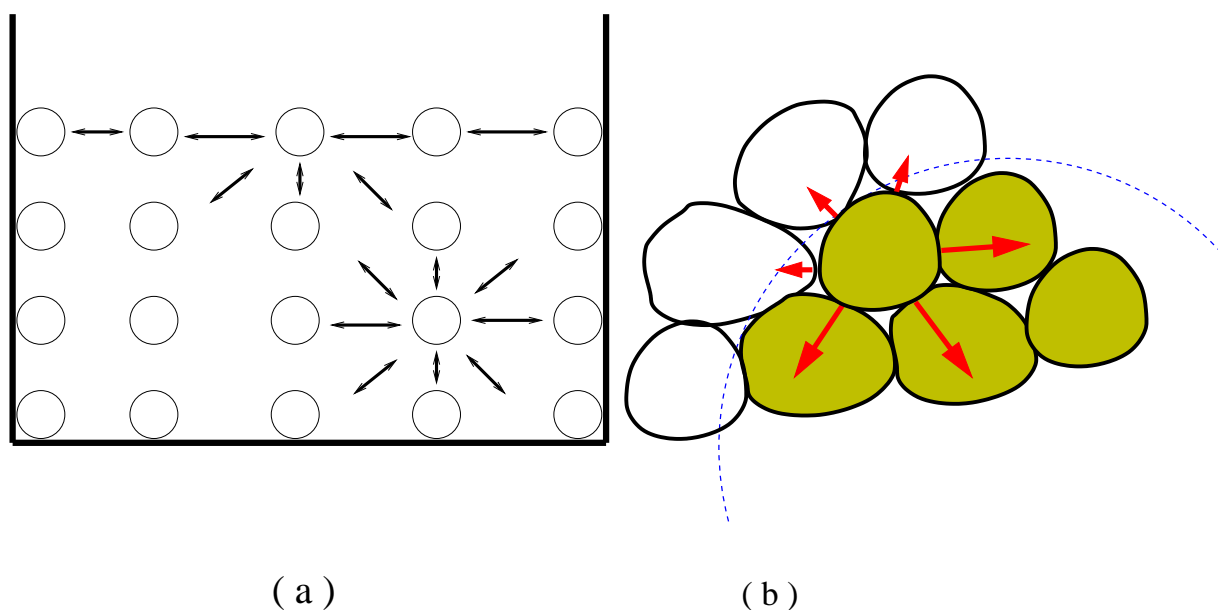


Fig. 3.1: (a) *Tensão superficial na superfície de um líquido;* (b) *Tensão superficial em tecidos celulares.*

Na superfície livre de um fluido em contato com a atmosfera, por exemplo, as forças que atraem as moléculas para fora do líquido são relativamente desprezíveis, pois existem relativamente poucas moléculas do mesmo no vapor sobre a superfície (fig. 3.13 (a)). No interior da massa líquida, as forças intermoleculares de atração e repulsão são equilibradas em todas as direções. Entretanto, para as moléculas do líquido na superfície, as forças de coesão na camada da fase de separação entre o líquido e a atmosfera não são equilibradas por uma camada superior. Assim, as moléculas da superfície são puxadas para a camada inferior e, em razão disto, as moléculas tendem a ficar mais unidas, produzindo uma diminuição na área relativa, comportando-se como uma membrana capaz de suportar tensões. Isto recebe o nome de tensão superficial.

Qualquer sistema tende a evoluir para uma condição de equilíbrio estável, na qual a energia potencial é mínima. Assim, uma porção de líquido ajusta sua forma até que a superfície livre, e conseqüentemente a sua energia de superfície, seja mínima. Por exemplo, uma gota de líquido, na ausência de outras forças, adota a forma de esférica, uma vez que a esfera é a forma geométrica que possui menor área superficial conservando o mesmo volume.

A tensão superficial representa a força aplicada sobre uma superfície líquida, por unidade de comprimento, atuando perpendicularmente a superfície do fluido. No sistema internacional de medidas, a tensão superficial é medida em N/m (Newton por metro) ou J/m^2 (Joule por metro quadrado), ou seja, é a energia de superfície livre por unidade de área.

As moléculas de um fluido estão ligadas entre si graças a forças de atração. Estas forças dão origem à coesão, ou seja, representa à tendência que o fluido tem para se manter como um conjunto coeso de moléculas. As forças exercidas entre as moléculas do fluido são chamadas de forças de adesão.

De forma semelhante aos líquidos, tecidos celulares diferentes quando colocados em contato apresentaram a formação de tensão superficial na interface de separação. As células irão associar-se as células as quais possuem maior afinidade. No exemplo da figura 3.1 (b) as células representadas pela cor cinza apresentam maior preferência de associação com células semelhantes e menor afinidade de contato com células representadas pela cor branca. Na interface de contato irá surgir uma tensão superficial devido a diferenças na adesividade das células.

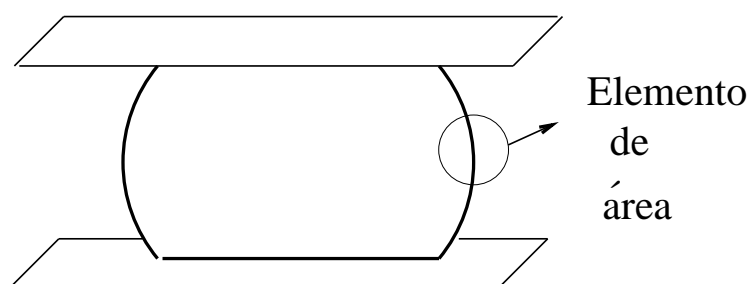


Fig. 3.2: Bolha comprimida entre duas placas paralelas.

Consideremos o exemplo de uma gota de um líquido comprimida entre placa paralelas (fig 3.2). Analisando um pequeno elemento $dx dy$ de uma superfície com dupla curvatura com

raios R e r chegaremos a um equação que relaciona tensão superficial, raios de curvatura local e pressão .

Sendo a diferença de pressão ($p_i + p_o$) para o equilíbrio estático do elemento deve acompanhar a tensão superficial (fig 3.3 e fig. 3.4).

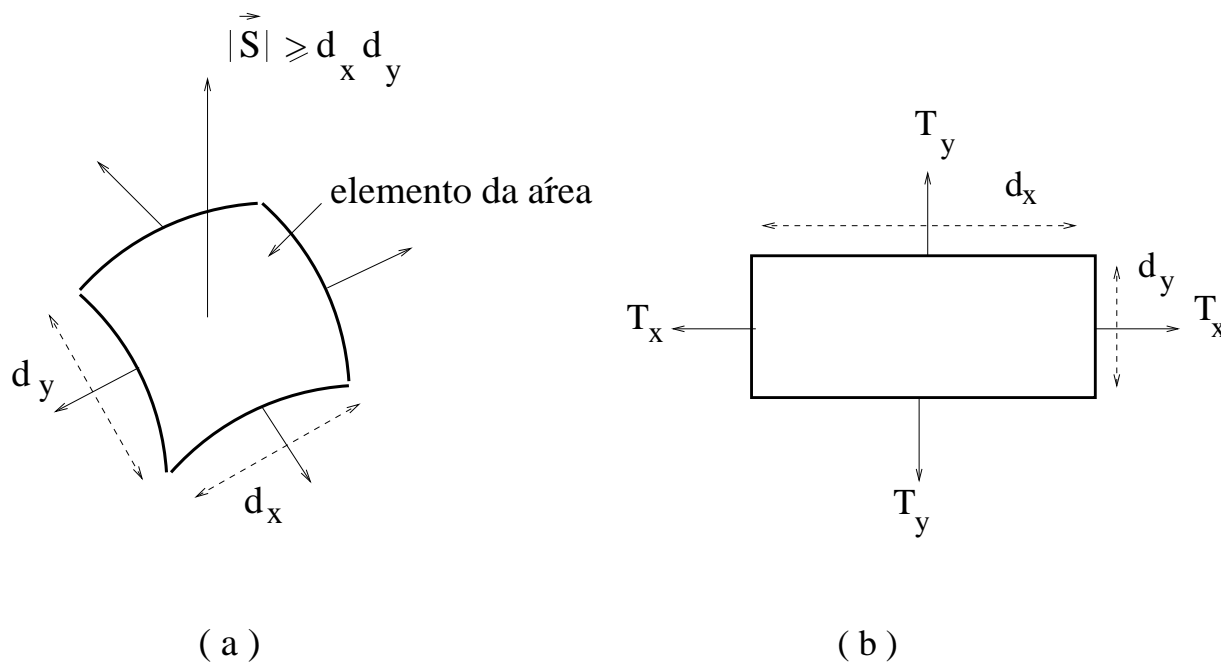


Fig. 3.3: a) Superfície curva. b) Forças atuando em um elemento de área

A relação da diferença de pressão e a tensão superficial pode ser obtida a partir deste equilíbrio fazendo $\Sigma F = 0$ para os componentes normais das forças que atuam no elemento de área [29].

A força atuante na gota:

$$F = P.A = 2T_x \text{sen}\theta + 2T_y \text{sen}\varphi$$

(Eq.1)

sendo que a tensão superficial é dependente da área:

$$T_x = \sigma dy$$

e

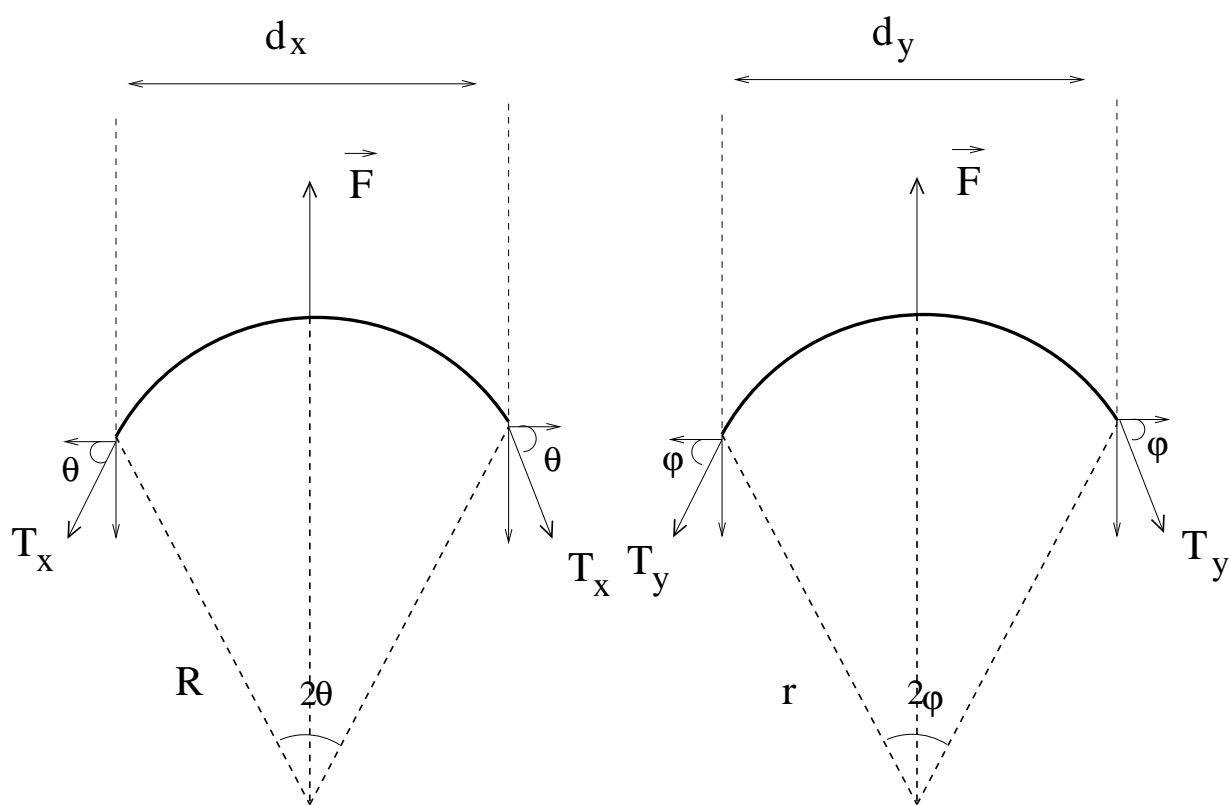


Fig. 3.4: Forças atuando em uma superfície curva

$$T_y = \sigma dx$$

e

$$\sin \theta = \frac{dx}{2R}$$

$$\sin \varphi = \frac{dy}{2r}$$

substituindo os termos na Eq. 1:

$$F = P dxdy = 2\sigma dy \frac{dx}{2R} + 2\sigma \frac{dxdy}{2r}$$

simplicando alguns termos, obtemos a relação básica entre tensão superficial e diferença de pressão:

$$P = \sigma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{r} \right)$$

Desta equação pode ser calculada a pressão (causada pela tensão superficial) em gotas e jatos finos. Esta equação é chamada de relação de Laplace.

3.2 Comportamento elástico

Um corpo elástico ideal é definido como um corpo que se deforma reversivelmente quando uma força é aplicada sobre o mesmo, ou seja, seu volume e forma original são recuperados após a cessação da força aplicada. Não existe nenhuma perda de energia no meio e todo o trabalho aplicado é recuperado.

Quando pressionado o agregado celular poderá responder de duas formas elasticamente ou viscosamente. A responsável pelo comportamento elástico é a tensão superficial gerada pela adesividade celular. O comportamento viscoso ocorre porque a viscosidade de um tecido celular é maior do que a viscosidade de um fluido imiscível. A seguir, veremos de forma detalhada a forma de comportamento apresentado pelo qualquer tipo de material incluindo agregados celulares.

3.2.1 Lei de Hooke

Elasticidade é a propriedade que alguns corpos tem em recuperar seu tamanho e forma após retirada a força que produz a deformação. Se a força aplicada é pequena, então, o deslocamento de vários pontos no material são proporcionais a força aplicada, este comportamento é característico de corpos elásticos [30].

Tomamos o exemplo de um bloco retangular de comprimento L , amplitude A e altura h (fig. 3.5). Se puxarmos suas extremidades com uma força F , então o comprimento varia em ΔL . Vamos supor que esta variação é pequena se comparada ao comprimento inicial, pois em materiais como madeira e aço poderão se romper se esta variação no comprimento for maior do que um dado valor. Assim, para pequenas deformações uma grande variedade de materiais demonstram uma variação no comprimento proporcional a força aplicada. Logo:

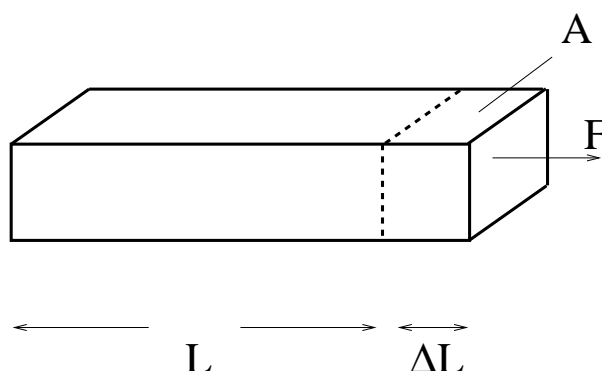


Fig. 3.5: *Deformação de um corpo sólido elástico*

$$F \propto \Delta L$$

Esta relação é chamada de lei de Hooke.

Sendo que ΔL é proporcional ao comprimento inicial, por exemplo, se unirmos dois blocos idênticos, ao aplicarmos a mesma força em cada bloco os mesmos irão variar seu comprimento em ΔL . Portanto, para o conjunto a variação no comprimento será duas vezes maior. Concluímos que a ΔL é proporcional ao comprimento inicial L , logo:

$$F \propto \frac{\Delta L}{L}$$

A força F também depende da área do bloco, ou seja, quanto maior for a área do bloco maior deverá ser a força aplicada no mesmo para variar seu comprimento ou deformá-lo. Podemos então escrever a lei de Hooke da seguinte forma:

$$F = KA \cdot \frac{\Delta L}{L}$$

Sendo K uma constante que depende apenas do tipo do material, chamado de módulo de Young. Assim podemos reescrever a lei de Hooke:

$$\frac{F}{A} = K \cdot \frac{\Delta L}{L}$$

F é a tensão desenvolvida no regime elástico; A área; K é o módulo de Young; $\frac{\Delta L}{L}$ é a deformação.

A constante de Young especifica completamente as propriedades elásticas de uma material isotrópico (não cristalino) homogêneo. Em materiais cristalinos as deformações e contrações podem ocorrer em diferentes direções, então teremos várias constantes elásticas para o mesmo material.

3.2.2 Elasticidade e Plasticidade

A relação entre tensão e suas correspondentes deformações é descrito pela teoria da elasticidade. Quando estudamos qualquer gráfico de tensão *versus* deformação, obtemos vários tipos de comportamento dependendo do tipo de material (fig. 3.6)[31].

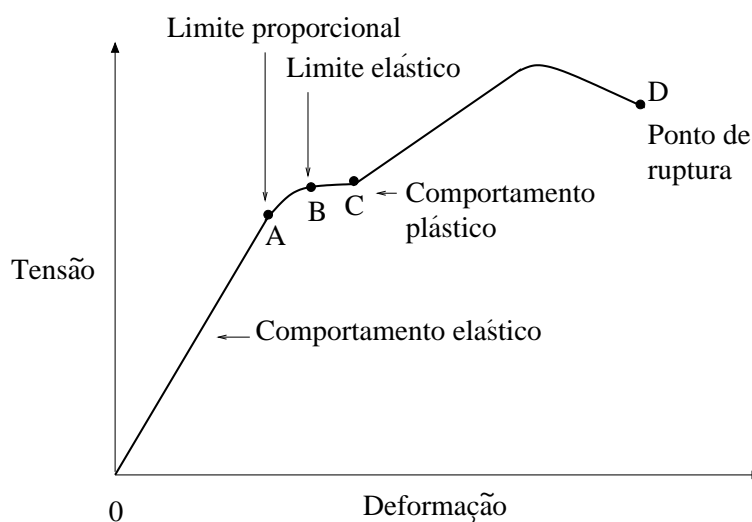


Fig. 3.6: Diagrama típico de tensão-deformação

O primeiro comportamento demonstrado no gráfico é uma reta, até o ponto A chamado de limite proporcional, na qual a tensão e a deformação são linearmente proporcionais. Este tipo de comportamento obedece a lei de Hooke.

De A a B a tensão e a deformação não são mais proporcionais, mas se a tensão for retirada em qualquer ponto entre O e B, o material retornará ao seu comprimento inicial. Na região OB, material ainda apresenta comportamento elástico e o ponto B é chamado de limite de elasticidade.

Se aumentarmos a tensão sobre o material a deformação do mesmo aumenta e se re-

tirarmos a tensão o mesmo retorna a sua posição original até o limite elástico. As forças atuantes até este ponto são conservativas, quando o material volta à sua forma original, o trabalho realizado na produção da deformação é recuperado e a deformação é reversível.

Aumentando-se ainda mais a tensão sobre o material, a deformação crescerá rapidamente, mas quando a tensão é retirada em algum ponto além de B , digamos em C , o material não retornará ao seu comportamento inicial. O novo comprimento, sob tensão nula, é maior que o comprimento inicial, então o mesmo apresenta deformação permanente. Ultrapassando o ponto C a deformação produzida é cada vez maior até atingir o ponto D onde ocorre a ruptura do material. De B a D diz-se que o material sofre um fluxo ou deformação plástica, durante o qual ocorrem deslizamentos das camadas internas do material e conseqüentemente rearranjos da sua estrutura atômica.

3.2.3 Campo de tensões

As tensões em um corpo tridimensional resultam de forças agindo em alguma parte deste corpo. O conceito de tensão descreve o modo como uma força atua sobre o corpo determinando os efeitos sentidos pelo mesmo.

A descrição do campo de tensões é desenvolvida a partir da análise da tensão em um ponto. Tomando um pequeno elemento de área, $\delta\vec{A}$, no ponto C , sofrendo a ação de uma força $\delta\vec{F}$ como mostra a figura 3.7.

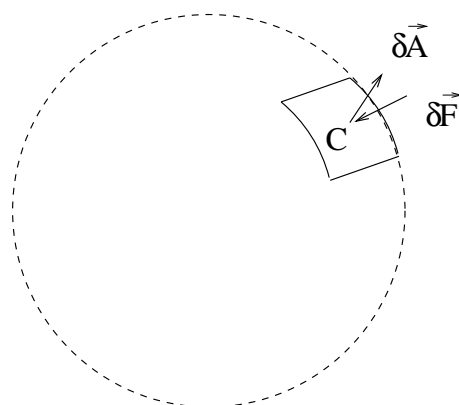


Fig. 3.7: *Definição de tensão*

A tensão no ponto é definida como:

$$\sigma = \lim_{\delta\vec{A} \rightarrow 0} \frac{\delta\vec{F}}{\delta\vec{A}}$$

O vetor $\delta\vec{A}$, cuja direção é perpendicular ao ponto C e o módulo é igual a área considerada, pode ser decomposto em três componentes, isto é:

$$\delta\vec{A} = \hat{i}\delta A_x + \hat{j}\delta A_y + \hat{k}\delta A_z$$

O vetor força $\delta\vec{F}$, agindo no ponto C também pode ser decomposto em três componentes:

$$\delta\vec{F} = \hat{i}\delta F_x + \hat{j}\delta F_y + \hat{k}\delta F_z$$

Ao definir tensão em um ponto podemos considerar os componentes δF_x , δF_y , δF_z da força $\delta\vec{F}$ agindo no ponto C sobre os componentes δA_x , δA_y , δA_z da área $\delta\vec{A}$ no ponto C . Podemos, então, representar tensão neste elemento de área como o conjunto de nove componentes.

Assim, a tensão atuando neste elemento de área pode ser representado por uma notação que permite delinear os planos nos quais a tensão está agindo e a direção na qual a tensão está atuando (fig. 3.8). Usando esta notação, podemos expressar a definição de tensão em termos de componentes:

$$T_{ij} \equiv \lim_{\delta A_i \rightarrow 0} \frac{\delta F_j}{\delta A_i}$$

A equação acima representa nove equações escalares, já que os subscritos i j podem assumir os valores de x , y ou z . Por exemplo:

$$T_{xy} \equiv \lim_{\delta A_x \rightarrow 0} \frac{\delta F_y}{\delta A_x}$$

Também podemos representar tensão na forma matricial:

$$T \equiv \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{yx} & \sigma_{yy} & \tau_{yz} \\ \tau_{zx} & \tau_{zy} & \sigma_{zz} \end{bmatrix}$$

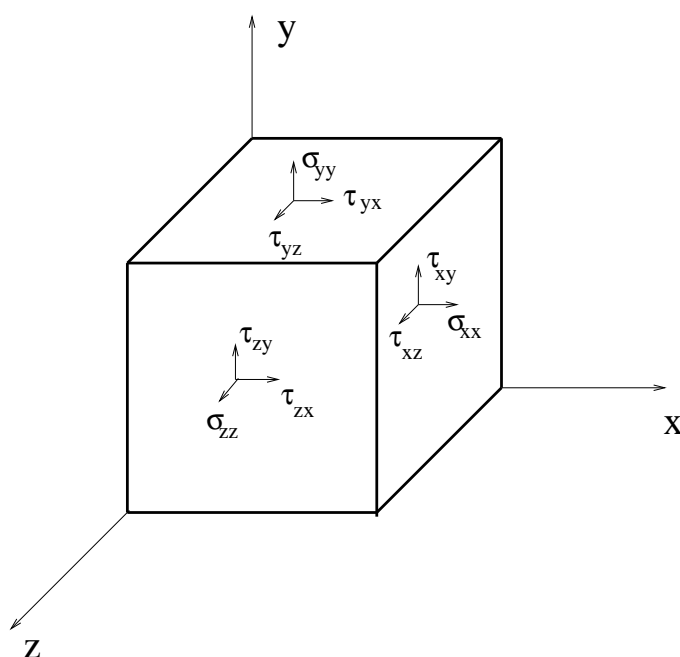


Fig. 3.8: Representação de um tensor de forças

A representação matricial da tensão também pode ser chamada de tensor de tensões. Onde σ foi usado para denotar tensões compressivas ou expansivas e τ foi denotado para tensões cisalhantes também chamada de forças tangenciais ou de corte. Lembrando que o primeiro índice de cada elemento da matriz representa o plano em que é aplicada a tensão e o segundo índice refere-se a direção de propagação.

Tensor deformação

Queremos descrever a deformação causada por tensões. Analisando a deformação causada em um pedaço de um corpo, obedecendo a lei de Hooke, podemos determinar as deformações causadas pela ação destas tensões.

As componentes do tensor deformação são definidas como as correspondentes tensões T_{ii} , em relação ao seu respectivo comprimento original [32]. Para deformações compressivas ou expansivas temos:

$$\varepsilon_{ii} = \frac{\Delta L_i}{L_i}$$

A deformação causada pela tensão cisalhante τ_{ij} é então definida como:

$$\gamma_{ij} \equiv \frac{\Delta L_i}{L_j}$$

Portanto, similar ao tensor de tensões a deformação causada por tensões também pode ser representada na forma matricial como tensor de deformação:

$$D \equiv \begin{bmatrix} \varepsilon_{xx} & \gamma_{xy} & \gamma_{xz} \\ \gamma_{yx} & \varepsilon_{yy} & \gamma_{yz} \\ \gamma_{zx} & \gamma_{zy} & \varepsilon_{zz} \end{bmatrix}$$

A representação matricial da deformação causada por tensões também pode ser chamada de tensor de deformação.

3.3 Comportamento viscoso

Quando estudamos o movimento de fluidos reais, observamos dois tipos de comportamento. O primeiro comportamento observado quando movimentamos a superfície na qual as partículas que constituem o fluido se localizam, elas parecem deslizar umas sobre as outras, como camadas ou lâminas. Este movimento é chamado de escoamento laminar. O segundo comportamento observado é o movimento desordenado de partículas individuais chamado de movimento turbulento.

No escoamento laminar o movimento entre as camadas adjacentes só é possível se houver forças de cisalhamento, ou seja, forças paralelas às superfícies sobre as quais atuam. Entretanto, por menor que seja a tensão de cisalhamento, o resultado desta contínua aplicação causa uma deformação infinita. Diferentemente do que ocorre em sólidos elásticos, a tensão não se relaciona com a quantidade de deformação, mas com a taxa de deformação [33].

A deformação viscosa é geralmente expressa em função da taxa de cisalhamento, obtida pela relação entre variação da velocidade de escoamento e a distância entre camadas ou partículas discretas de fluido. A resistência de um fluido contra qualquer mudança posicional de seu elemento volumétrico é conhecida por viscosidade.

A energia mecânica aplicada em corpos sólidos elásticos ideais é recuperável, pois o material apresenta propriedades elásticas. No escoamento viscoso a energia mecânica é dissipada na forma de calor devido ao atrito entre as camadas líquidas.

Tomemos o exemplo do modelo de duas placas planas paralelas de área A afastadas uma da outra pela distância d . O espaçamento entre elas está preenchido com um fluido viscoso (fig. 3.9).

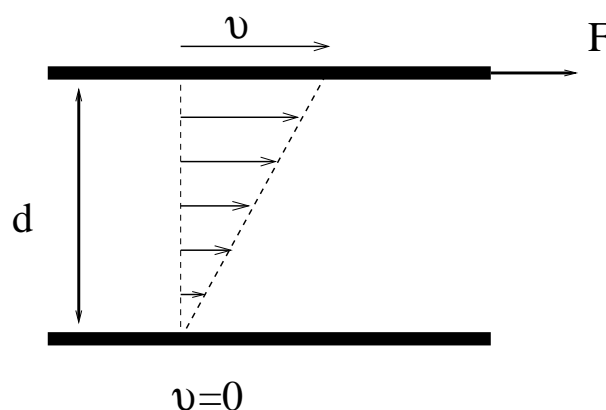


Fig. 3.9: *Comportamento de (a) sólido e (b) fluido, sob a força de cisalhamento constante aplicada pela placa superior*

A placa inferior está fixa, enquanto que a superior desloca-se com velocidade constante, provocando um regime de escoamento laminar do fluido confinado no interior das placas. A camada de fluido próxima a placa inferior está parada, enquanto que a camada próxima da placa se move com a mesma velocidade da placa.

No caso de um fluido real em contato com um sólido, o mesmo permanecerá em repouso em relação à superfície de contato de modo que é arrastado juntamente com a mesma. Este tipo de escoamento chama-se laminar, porque o fluido se desloca em camadas planas e paralelas ou lâminas, que deslizam umas sobre as outras.

A tensão tangencial $\frac{F}{A}$ (força por unidade de área) necessária para manter o deslocamento da placa superior com velocidade v_0 é dada pela lei de Newton da viscosidade:

$$\frac{F}{A} = \mu \frac{v_0}{d} = \mu \frac{dv}{dy}$$

isto é, a tensão é proporcional à taxa de variação espacial da velocidade.

A constante de proporcionalidade μ chama-se coeficiente de viscosidade do fluido. A unidade SI de μ é o $N \cdot \frac{s}{m^2}$, ou seja, Newton *versus* segundo por metro quadrado. A unidade mais usual é o *centipoise* (*cp*) dado por:

$$1cp = 10^{-2}poise = 10^{-3}N \frac{s}{m^2}$$

Um material que se comporte como descrito acima, é conhecido por fluido Newtoniano.

A viscosidade apresentada não depende da taxa ou da quantidade de deformação, mas é uma constante de proporcionalidade entre tensão e a taxa de deformação característica de cada material.

Em um fluido o coeficiente de viscosidade (μ) irá determinar a viscosidade do mesmo, ou seja, quanto maior o coeficiente de viscosidade mais viscoso (espesso) é o fluido, e geralmente a viscosidade diminui quando a temperatura aumenta. No entanto, em suspensões, emulsões e polímeros em fase líquida, a relação entre tensão e taxa de deformação não é linear, ou seja, não existe uma proporcionalidade direta entre taxa de deformação e tensão de cisalhamento ou deformação. Assim a viscosidade não pode ser descrita como uma constante, devendo ser uma função da taxa de cisalhamento. Neste caso, os fluidos são conhecidos por não Newtonianos (dilatantes, pseudoplásticos e plásticos).

3.4 Comportamento viscoelástico

Vários materiais apresentam comportamento intermediário entre os regimes anteriormente mencionados, ou seja, apresentam comportamento misto. Isto é, resistência viscosa à deformação, elasticidade, coeficiente de viscosidade dependente da temperatura e tempo. Esta forma de resposta que combina aspectos de líquido viscoso e sólido elástico é denominada de viscoelasticidade.

O comportamento viscoelástico pode ser entendido como um desvio do comportamento ideal elástico de deformação. Neste tipo de comportamento a resposta a tensão não depende apenas do módulo elástico, mas de vários fatores como magnitude e tipo da tensão aplicada, taxa de deformação, temperatura e tempo.

Os corpos são caracterizados de forma geral devido ao tipo de comportamento apresentado quando submetidos a tensões como:

- **Sólido Hookeano:** caracterizado por comportamento elástico, sob tensão, produzindo uma deformação como resposta. A deformação é proporcional a tensão aplicada e a constante de proporcionalidade é chamado de módulo de elasticidade.
- **Líquido Newtoniano:** aplicando-se uma tensão produz um fluxo constante proporcional a mesma. A taxa de deformação é proporcional a tensão.

Corpos viscoelásticos quando aplicamos uma tensão sobre o mesmo a primeira resposta é elástica. Após um certo tempo τ , chamado de tempo de relaxação, o corpo começa a ter comportamento semelhante a de um fluido viscoso.

Em geral, equações diferenciais de primeira ordem chamadas equações constitutivas descrevem efeitos em sistemas que combinam viscosidade e elasticidade. As equações constitutivas são composta por três termos básicos:

- **Elástico:** envolvendo deformação;
- **Viscoso:** envolvendo taxa de deformação;
- **Inercial:** envolvendo aceleração.

O comportamento viscoelástico pode ser modelado por associações de molas e amortecedores, como proposto por Maxwell e por Kelvin - Voight[27].

O modelo cinético desenvolvido por Kelvin-Voigt combina a associação de mola e amortecedor associados em paralelo (fig. 3.10). A mola representa a porção elástica da deformação do corpo e o amortecedor representa a deformação do meio viscoso (escoamento irreversível):

Quando submetido a uma força a resposta do sistema é (fig.3.12):

O modelo de Kelvin-Voigt descreve o comportamento viscoelástico do sistema acima. O gráfico 3.12 representa a resposta do sistema quando submetido a uma força constante.

Em $t = 0$ não existe força sobre o sistema e a mola está relaxada. Quando aplicamos uma força constante no sistema a mola responde instantaneamente, mas seu movimento é freado pelo amortecedor devido suas propriedades viscosas.

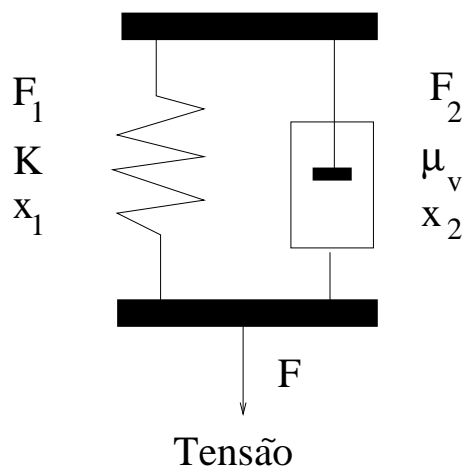


Fig. 3.10: Modelo de Kelvin

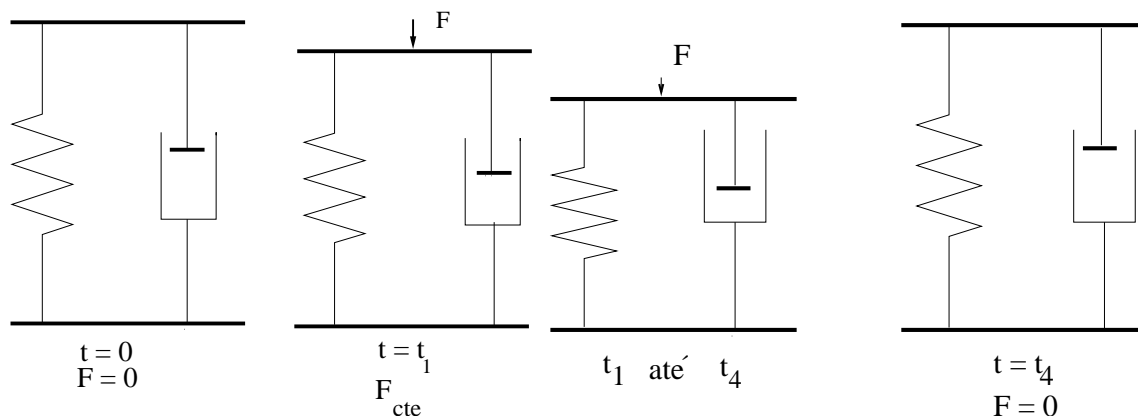


Fig. 3.11: Modelo de Kelvin quando submetido a uma força constante

Este comportamento se repete de t_1 até t_4 . A resposta do sistema a força de compressão é lenta. Em $t = t_4$ a força aplicada sobre o sistema é retirada. A mola se estica e puxa o êmbolo e o sistema volta a atingir a mesma altura inicial.

A força externa aplicada ao sistema pode ser escrita em termos das componentes do sistema através da equação:

$$F = K \cdot x + \mu_v \cdot \frac{dx}{dt}$$

onde K é o modelo de elasticidade da mola e μ a viscosidade do líquido.

Outro modelo também formado pela associação de mola e amortecedor, associados em

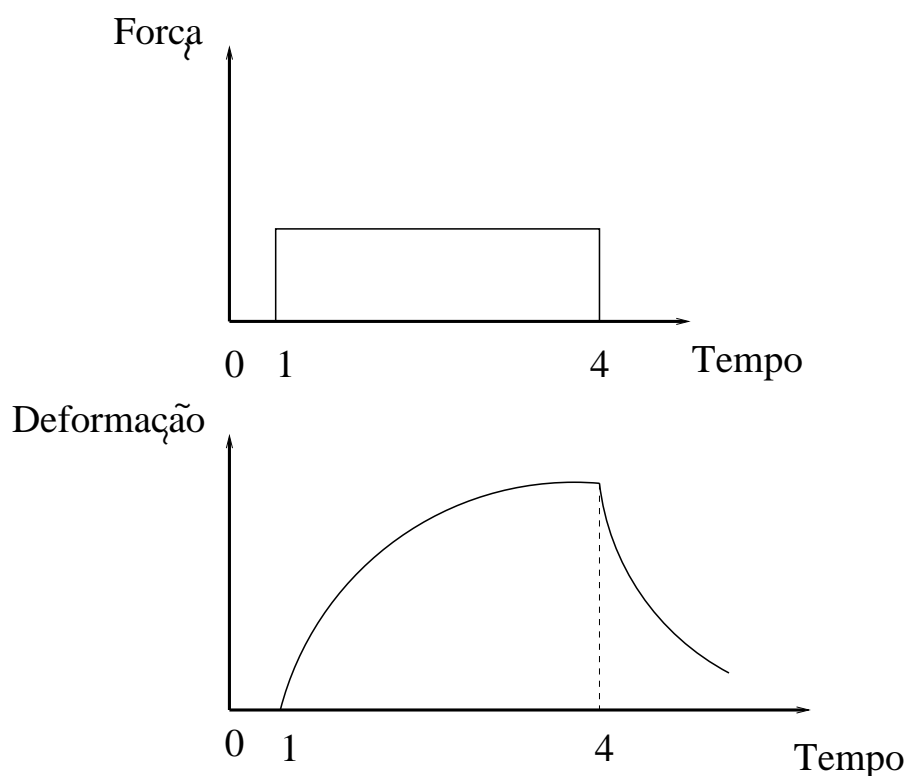


Fig. 3.12: Resposta do modelo de Kelvin-Voight quando submetido a uma força constante.

série que descreve o comportamento viscoelástico é chamado de modelo cinético de Maxwell (fig. 3.13).

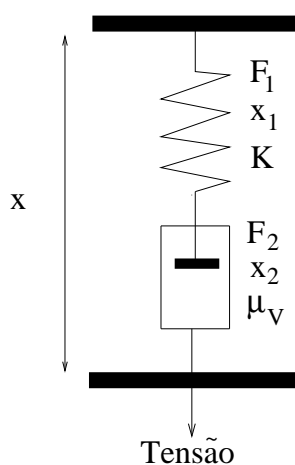


Fig. 3.13: Modelo de Maxwell

Quando submetido a uma força a resposta do sistema é (fig. 3.14):

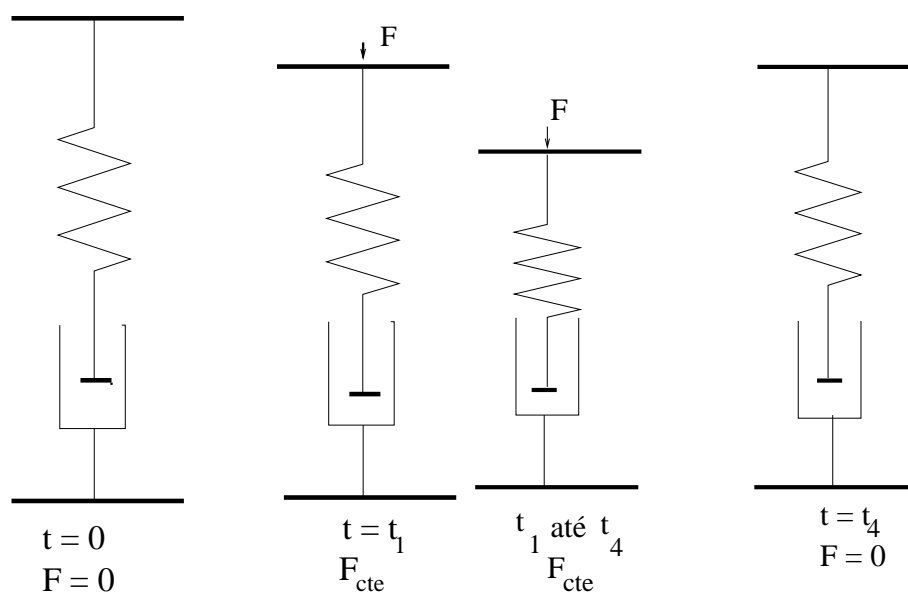


Fig. 3.14: Modelo de Maxwell quando submetido a uma força constante.

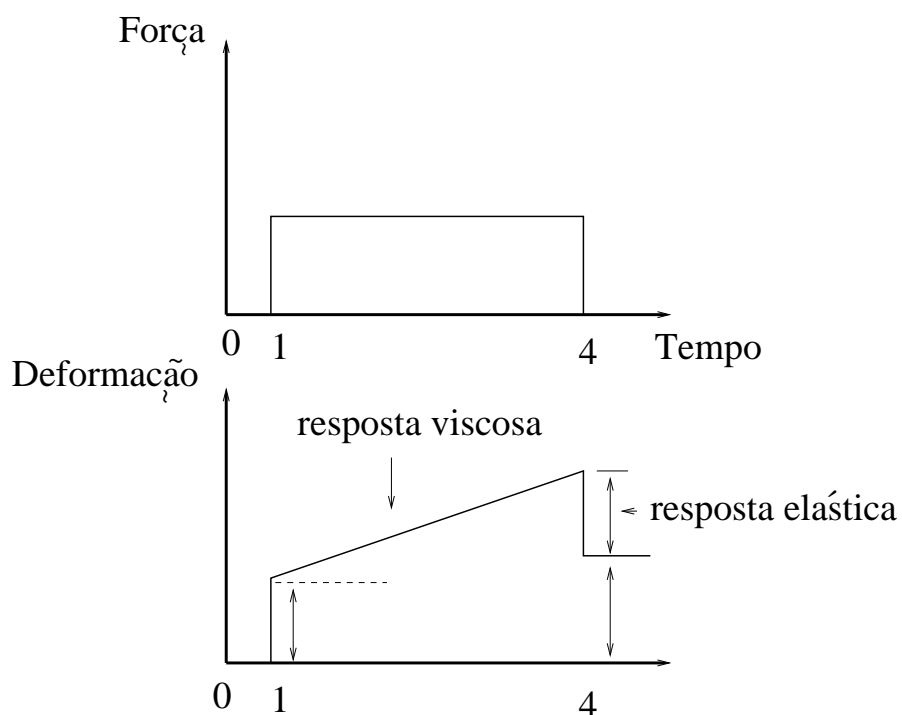


Fig. 3.15: Resposta do modelo de Maxwell quando submetido a uma força constante.

O gráfico 3.15 acima representa a resposta do sistema quando submetido a uma força constante.

Em $t = 0$, não temos força aplicada no sistema e a mola está relaxada. Quando aplicamos uma força F no sistema a mola responde instantaneamente a força aplicada e se contraí empurrando o êmbolo do amortecedor.

Devido as propriedades viscosas do amortecedor ele não responde instantaneamente a força aplicada. Por este motivo, o comportamento de t_1 até t_4 é uma rampa. A resposta do sistema é amortecida.

Quando a força é liberada em $t = t_4$ a mola novamente responde instantaneamente e se estende. Mas o sistema não atinge a mesma altura inicial, devido ao amortecedor. Parte da força para movimentar o êmbolo é dissipada.

Para o modelo de Maxwell a equação descrevendo a relação entre a deformação x e a força externa F é:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{K} \cdot \frac{dF}{dt} + \frac{F}{\mu_V}$$

3.4.1 Modelo cinético para agregados celulares

A compressão do agregado pode ser esquematizada pela associação de amortecedores e molas [34], num arranjo mais complexo que o modelo de Kelvin-Voight ou o modelo de Maxwell (fig. 3.16).

Os amortecedores representam o rearranjo que as células do agregado demonstram quando pressionadas. As molas e a tensão superficial representam a resposta elástica que o agregado demonstra quando pressionado.

Em $t = 0$, o deslocamento das molas representado por u_1 e u_2 e o elemento que representa a tensão superficial u_0 estão relaxados. Então:

$$u_0(0) = u_1(0) = u_2(0)$$

e

$$S_1(0) = S_2(0) = 0$$

Quando submetido a uma rápida compressão as molas e o elemento que representa a

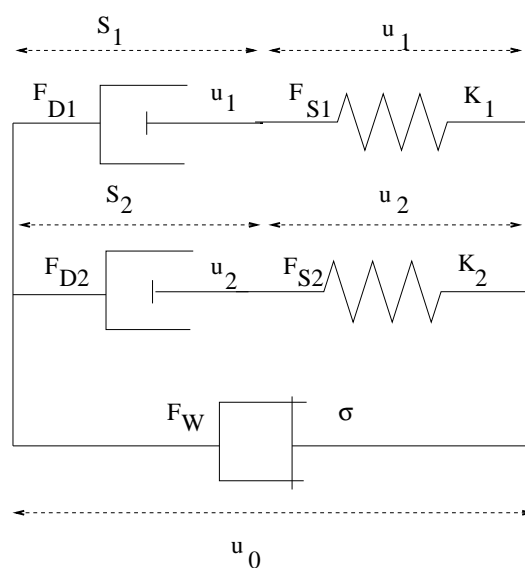


Fig. 3.16: Modelo usado para representar o processo de relaxação em agregados celulares.

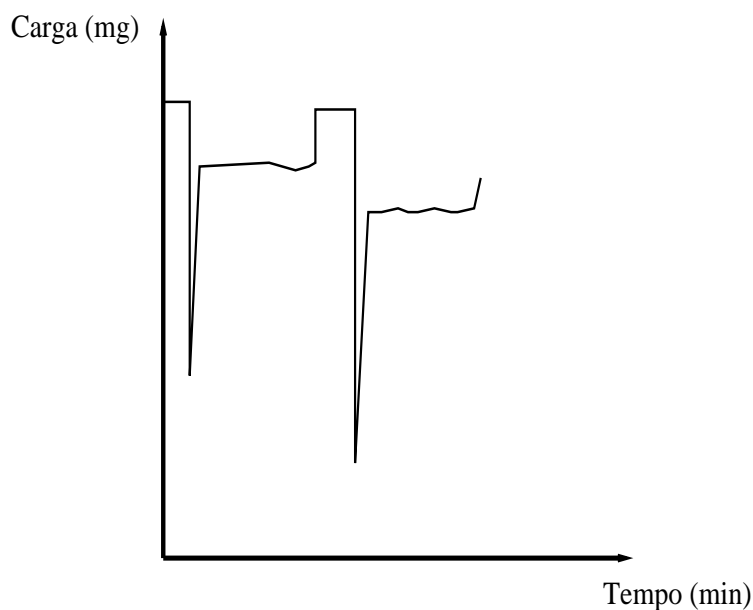


Fig. 3.17: Gráfico da força de compressão exercida sobre um agregado para duas compressões sucessivas. Sendo a primeira menor que a segunda [34].

tensão superficial são instantaneamente deformadas, mas o deslocamento do êmbolo dos amortecedores é zero. Isto demonstra que o agregado quando submetido a forças repentinas irá se comportar como um sólido elástico. Suas propriedades viscosas são originadas devido

a ação dos amortecedores. Quando produzimos uma força repentina e liberamos o sistema rapidamente os amortecedores não tem tempo de funcionar.

Se aplicamos uma força por um tempo maior que o tempo de relaxação os amortecedores irão representar o escoamento das camadas celulares sobre as outras. Assim demonstrando as propriedades viscosas do sistema.

Então as forças atuando nos elementos individuais são:

$$F_{S_1}(t) = K_1\mu_1(t) = F_{D_1}(t) = \mu_1\dot{S}_1(t)$$

$$F_{S_2}(t) = K_2\mu_2(t) = F_{D_2}(t) = \mu_2\dot{S}_2(t)$$

$$F_w(t) = \sigma\mu_0(t)$$

Sendo que F_{S_1} , F_{S_2} , F_{D_1} , F_{D_2} e F_w são as forças atuando respectivamente nas molas, amortecedores e no elemento que representa a tensão superficial. A deformação total do corpo de Kelvin e a força correspondente pode ser escrita na forma:

$$\mu_t = \mu_1 + S_1 = \mu_2 + S_2 = \mu_0$$

$$F_t = F_{S_1} + F_{S_2} + F_w = F_{D_1} + F_{D_2} + F_w$$

A equação que governa a relaxação de F é:

$$F_t + \left(\frac{\mu_1}{K_1} + \frac{\mu_2}{K_2} \right) \dot{F}_t + \frac{\mu_1\mu_2}{K_1K_2} \ddot{F}_t = \sigma\mu_0$$

Usando as relações acima achamos as constantes e relações. Então a solução geral da equação fica:

$$F_t(t) = \left(\mu + K_1e^{\frac{-t}{\tau}} + K_2e^{\frac{-t}{\tau}} \right) \mu_0$$

Este tipo de modelo descreve bem a resposta dos agregados celulares estudados na referência. Neste trabalho não será possível fazer o mesmo tipo de análise, pois nosso

equipamento ainda não permite medir dinamicamente a resposta do agregado a tensão aplicada. Mesmo assim é importante estabelecer as bases teóricas para este estudo que será realizado futuramente.

Capítulo 4

Dinâmica de organização celular dos tecidos

4.1 Introdução

Neste capítulo mostraremos de forma introdutória os mecanismos atuantes na morfogênese, estudo biológico do desenvolvimento dos seres vivos desde o período embrionário até a fase adulta. Estudaremos qual é o tipo de força que une as células. Explicaremos de forma introdutória como esta força mantém as células nas suas localizações apropriadas.

Primeiramente temos que ter clara a noção de que as células de um organismo são pequenas, deformáveis e freqüentemente móveis, preenchidas por um meio aquoso e circundadas pela membrana plasmática. As células podem unir-se em uma estrutura coesa, forte e extremamente ordenada formando tecidos e órgãos. Mas para que tudo isto ocorra as células têm que comunicar-se de alguma forma [35].

As células podem comunicar-se através de substâncias difusivas produzidas por um certo tipo de célula, as quais, mudam o comportamento das outras células. Outro tipo de comunicação pode ser através de interações de superfície. Durante o processo de organização as células devem se reconhecer seletivamente aderindo umas às outras e algumas migrando para longe de outras.

Nos tecidos cada célula é reunida e ligada de maneiras diferentes. No processo de formação de tecidos a matriz extracelular tem um papel fundamental. Ela é formada por uma

rede de macromoléculas extracelulares secretadas e desempenha várias funções, mas a mais importante é a sustentação. Através da matriz extracelular os tecidos são mantidos unidos e organizados para que as células migratórias possam mover-se e interagir umas com as outras de forma ordenada. As células que constituem um tecido são ligadas mecanicamente por junções celulares. Existem junções célula-célula e célula-matriz[11].

O processo de reconhecimento e ligação celular ocorre quando as células isoladas migram e se agrupam. Por adesão as células se unem para formar tecidos e órgãos.

Neste trabalho estamos particularmente interessados em estudar como funciona a adesão célula-célula *in vitro*, isto é, em estruturas artificiais obtidas em laboratório.

Steinberg[12] tentou explicar de forma simples usando apenas leis físicas fundamentais como células *in vitro* se reorganizam para formar tecidos. Supôs um processo de agrupamento onde as células preferem associar-se a outras células que possuem maior afinidade. Este comportamento é totalmente mecânico e depende apenas da diferença na adesividade das células. Por este motivo Steinberg o chamou de adesão diferenciada e postulou este comportamento como hipótese da adesão diferenciada (HAD). A HAD explica como funciona o processo de agrupamento celular na formação de agregados celulares.

4.2 Junções celulares

Muitas células são ligadas uma às outras e à matriz extracelular por contatos especializados chamados junções celulares. As junções celulares ocorrem em pontos de contato em todos os tecidos. As junções celulares são classificadas como[35]:

- **Junções bloqueadoras:** desempenham a função de barreira de permeabilidade seletiva, separando os fluidos com composição química diferente. Selam as células em um epitélio para impedir que pequenas moléculas vazem de um lado para o outro na camada de células epiteliais.
- **Junções de ancoramento:** conectam mecanicamente as células às células vizinhas ou à matriz extracelular. As junções de ancoramento formam uma forte estrutura através da membrana celular conectando os filamentos do citoesqueleto, responsável

pela capacidade de movimento direcionado e polarização de cada célula.

As junções de ancoramento ocorrem de duas formas:

a) As junções aderentes mantêm as células unidas e são formadas por proteínas de adesão transmembrana. Estas proteínas pertencem a família das caderinas. b) As adesões focais unem as células à matriz extracelular e são formadas por proteínas de adesão transmembrana da família das integrinas.

- **Junções comunicantes:** quase todas as células dos vertebrados se comunicam por junções tipo fenda ou comunicantes. Elas mediam a passagem de sinais elétricos ou químicos de uma célula à outra. A fenda é repleta de canais que permitem que íons inorgânicos e pequenas moléculas passem diretamente a outra célula. As células ficam ligadas eletricamente e metabolicamente.

As células nervosas entre outras, por exemplo, são ligadas eletricamente por junções tipo fenda. Permitindo que os potenciais de ação espalhem-se rapidamente de uma célula à outra. Isto é vantajoso no caso que se necessite de uma resposta rápida.

4.3 Adesão Celular

Para entendermos o que acontece no sistema biológico que estamos estudando é fundamental compreendermos como ocorre o processo de migração e adesão celular. Pois, nosso agregado celular é formado por células que entram em rota de migração, depois de dissociados, com o objetivo de se reorganizar e manter a estrutura que formavam anteriormente.

Nos estágios iniciais do desenvolvimento de uma junção celular, antes que o citoesqueleto tenha sido unido, as células aderem uma às outras. A adesão celular atua quando as células migram e se agrupam. Ela é uma interação entre superfícies celulares. Depois deste processo, irão ocorrer as junções de ancoramento.

A arquitetura do tecido que formavam antes da dissociação em células isoladas é mantida devido a adesão seletiva ou diferenciada. O objetivo é manter uma estrutura organizada. Então a adesão diferenciada é fundamental para formação de tecidos e órgãos[35].

Em tecidos em formação, uma população de células invade a outra e liga-se a elas, e

também liga-se a outras células migratórias. Este processo de migração e adesão requer algum mecanismo para direcionar as células ao seu destino final[36]. Isto pode envolver:

- **Quimiotaxia:** as células se locomovem na direção de um gradiente de concentração de uma substância química em solução. As células respondem a esta substância química e migram na direção de maior concentração, desta substância, até atingirem a fonte secretora;
- **Haptotaxia:** se as moléculas de adesão estão em quantidade crescente sobre a matriz extracelular e uma célula está constantemente fazendo e desfazendo conexões, com estas moléculas ela, recebe uma força líquida que a move na direção de maior concentração destas moléculas de adesão;
- **Direcionamento por contato:** neste processo não existe a ação de substâncias químicas. As células sofrem a ação do terreno físico pelo qual estão passando e são levadas a um dado lugar direcionadas pelo contato;
- **Galvanotaxia:** existem diferenças de potencial elétrico entre diferentes regiões de um embrião que guiam o movimento celular;
- **Inibição de movimento por contato:** as células se movem usando elongações de membrana. Ao tocar a superfície de outra célula ela é paralisada, contrai-se e adere;
- **Hipótese da adesão diferenciada:** as células se arranjam em num estado que minimiza a sua energia livre de adesão. As diferenças de adesão entre as células direciona o processo de migração.

Ao misturarmos aleatoriamente, *in vitro*, células de tecidos embrionários ou células isoladas, as mesmas freqüentemente recuperam seu arranjo normal, demonstrado antes de ocorrer a dissociação. Este processo de dissociação celular é obtido pelo tratamento dos tecidos em baixas concentrações de enzimas proteolíticas tais como tripsina, algumas vezes combinadas com a remoção de Ca^{2+} e Mg^{2+} . As caderinas, proteínas responsáveis pela junção célula-célula, são removidas neste processo. Então as interações proteína-proteína são rompidas.

As proteínas de superfície são responsáveis pelas células aderirem uma às outras e à matriz extracelular. Estas proteínas são chamadas de moléculas de adesão celular (CAMs). As CAMs dependentes de caderinas são responsáveis pelas adesões célula-célula que ocorre em embrião de vertebrados e tecidos de hidras. Outras CAMs dependentes de caderinas são as integrinas, que mediam a ligação do citoesqueleto à membrana extracelular e as selectinas. As independentes de caderinas são responsáveis pela adesão intercelular e pertencem a família das imunoglobinas (Ig). São moléculas responsáveis pela adesão de células neurais.

As moléculas de adesão, como as caderinas, ligam as células por:

- **Ligações homofílicas:** as moléculas de uma célula ligam-se a moléculas de outras células do mesmo tipo;
- **Ligações heterofílicas:** as moléculas de uma célula ligam-se as moléculas de uma célula de tipo diferente;
- **Ligações por meio de uma matriz extracelular.**

As proteínas caderinas podem se ligar diretamente uma com a outra, por exemplo, se as células expressam diferentes caderinas e são misturadas, agregam e separam-se, mostrando que diferentes caderinas se unem a caderinas de mesmo tipo. Isto mostra que existem diferenças qualitativas e quantitativas entre as caderinas que atuam na organização dos tecidos.

Um único tipo de célula utiliza múltiplos mecanismos moleculares na adesão a outras células. Alguns desses mecanismos envolvem junções celulares organizadas. Em um animal multicelular cada célula contém uma grande variedade de receptores de superfície celular que permeiam a célula possibilitando que a mesma responda especificamente a outras moléculas que permeiam outras células.

Da mesma forma, cada célula em um tecido tem uma determinada concentração (e combinação) de moléculas de adesão de superfície celular. Isto permite uma ligação característica com outras células e com a matriz extracelular, ou seja, as moléculas de adesão alteram o comportamento das células. Mas todos estes mecanismos ainda não são totalmente conhecidos.

Para estudarmos como funciona o processo de migração e adesão celular são realizados experimentos de dissociação celular em tecidos de vertebrados adultos, mas a obtenção de células isoladas, neste caso, é difícil. Já tecidos embrionários de vertebrados e de hidras são facilmente dissociáveis.

As células dissociadas *in vitro* entram em rota de migração e se agregam. Este processo é chamado de segregação celular. Este comportamento revela que o arranjo tecidual não ocorre por acaso, mas sim é mantido e estabelecido pela afinidade das células umas com as outras, ou com a matriz extracelular.

4.4 Hipótese da adesão diferenciada

Para explicar o comportamento de estruturas celulares artificiais Steinberg propôs a hipótese da adesão diferenciada. A hipótese da adesão diferenciada considera que diferenças de adesão entre diferentes tipos celulares direciona o processo de segregação. O estudo da migração de células isoladas e sua organização é a base da hipótese da adesão diferenciada para a embriogênese de Steinberg[12], que será foco deste trabalho.

Townes e Holtfreter[14] propuseram que os diferentes tipos de células primeiro migrariam centripetamente ou centrifugamente ao longo de um gradiente de concentração radial estabelecido dentro do agregado celular. Então, ocorria uma seleção pela adesividade das células, ou seja, as células aderiam fortemente ou fracamente dependendo do seu tipo de célula. Então, as diferenças de adesividade entre as células contribui para o ordenamento e localização seletiva. Fator que irá definir a posição da célula dentro do agregado celular.

Holtfreter propôs o termo afinidade seletiva. Segundo ele a superfície interna da ectoderme tem uma afinidade positiva para células de mesoderme e negativa para células de endoderme. Concluiu também que, as afinidades mudam durante o desenvolvimento, pois para o desenvolvimento ocorrer as células devem interagir diretamente com outros tipos celulares em determinados momentos.

Steinberg[12] testou esta hipótese para agregados compostos de células em suspensões constituídas por dois tipos diferentes de células misturadas em várias proporções. Estas células foram caracterizadas como “segregação interna” e “segregação externa” devido a sua

posição relativa assumida no tecido embrionário do qual elas se originam. Steinberg queria testar se a direção de migração ocorre somente devido ao gradiente de químico, mesmo em poucas células do tipo de “segregação interna”, incorporada em uma agregado composto principalmente de células do tipo de “segregação externa”.

O comportamento esperado seria que as células de “segregação interna” migrassem para a região central do agregado. Mantendo desta forma sua topologia (posição) original. Entretanto, notou-se que as mesmas ficaram paradas na mesma posição e não formaram um grupo de células. Portanto, se a migração celular ocorre somente devido ao gradiente químico, então mesmo a célula estando solitária deveria migrar em direção a célula do mesmo tipo. Sua conclusão foi que a migração não ocorre somente devido a gradiente químico. Mas existe outro fator que pode influenciar no processo de agrupamento celular. Como foi demonstrado pelo agregado composto de células de “segregação interna” e “segregação externa”. Neste caso, a migração, ocorre devido a adesão diferenciada ou afinidade de celular. Então Steinberg propôs a hipótese da adesão diferenciada (HAD) para explicar como ocorre a migração celular, organização e segregação celular.

Neste processo de morfogenese, as células se unem e formam tecidos que se espalham um sobre a superfície do outro comportando-se de forma semelhante a líquidos imiscíveis. Este movimento é comumente e espontaneamente iniciado quando dois tecidos embrionários diferentes estão em contato[24]. Quando tecidos embrionários são separados, codispersados e espalhados, um sobre a superfície do outro, após segregado, adotam uma forma esférica que é uma manifestação clara de seu comportamento líquido. Mas além de apresentar esta característica, o sistema celular deve: ser constituído por muitas subunidades que possuem coesão e ser composto por células móveis[34].

Os determinantes do comportamento dos líquidos são sua tensão superficial e interfacial, da qual, são reflexos da intensidade da força de coesão e adesão entre suas moléculas. Comparando tecidos celulares com moléculas de um líquido, sabemos que moléculas de um líquido, movem-se termodinamicamente, enquanto em tecidos embrionários as células vão se reagrupando, ou seja, o movimento se dá de maneira mais complicada chamado de movimento é amebal (extensões e contrações).

Recentes experimentos mostram que 1) tensão superficial é um parâmetro físico que de-

fine bem as características da forma de equilíbrio de certos agregados multicelulares[24] e 2) o valor medido destas tensões esclarece o comportamento de envelopamento dos tecidos[25].

De acordo com a HAD as populações celulares se comportam como líquidos ordinários. Por possuírem tensão superficial e interfacial, geradas pela interação da adesão, e coesão entre suas componentes[37, 4, 5, 23].

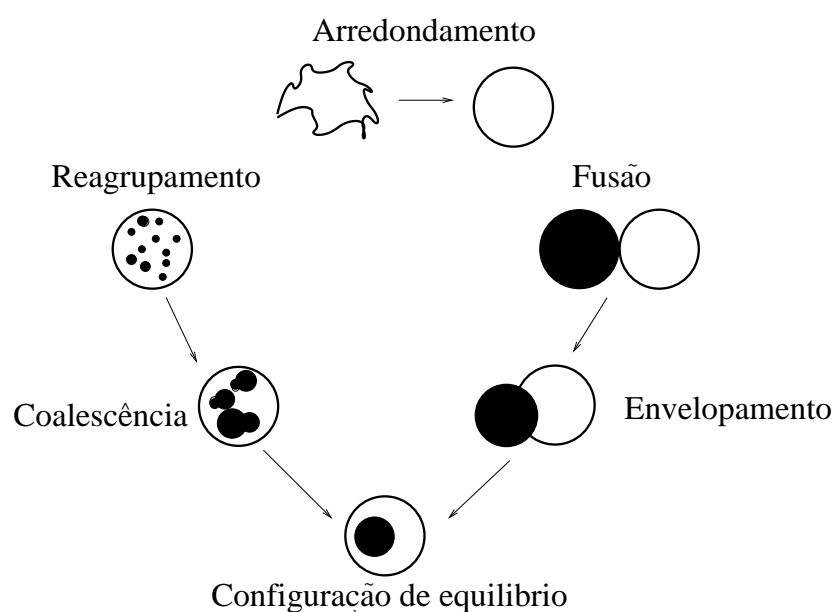


Fig. 4.1: *Comportamento apresentado por muitas células embriônicas e por líquidos ordinários ou pares de líquidos imiscíveis*

O comportamento apresentado pela população celular embriônica, possui certas características que mimetizam líquidos imiscíveis[12, 2, 4] (fig. 4.1):

- 1) Arredondamento de fragmentos de tecidos irregulares para uma forma esférica;
- 2) O espalhamento de tecido sobre a superfície de outro;
- 3) Reagrupamento (segregação) de células heterotípicas para formar uma configuração específica;
- 4) Coalescência de pequenos aglomerados celulares em aglomerados maiores até a formação de agregados;
- 5) Classificação hierárquica associativa, mostrando a tendência que os tecidos possuem em envelopar um ao outro;

6) A correspondência perfeita entre a seqüência deste potencial de envoltura aos valores de tensão superficial medidos para cada tecido celular. Isto significa que através da medida da tensão superficial saberemos qual será a configuração final.

Este comportamento reflete a capacidade que células embrionárias têm em tomar forma e reconstruir órgãos funcionais. A HAD é uma explicação satisfatória ao comportamento morfogenético, também denominada pelo termo afinidade celular, organização própria, reconstrução de tecidos e conjunto multicelular[37] (fig. 4.2).

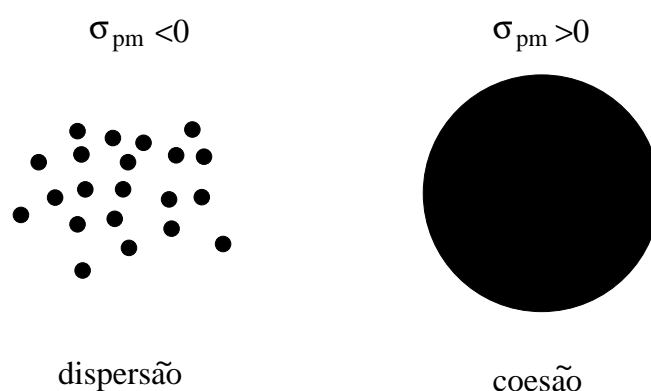


Fig. 4.2: *Efeito da tensão superficial em agregados celulares. Se a tensão da interface entre as células pretas e o meio σ_{pm} é negativa temos o estado de dispersão. Quando a tensão na interface entre as células pretas e o meio (σ_{pm} é positiva temos o estado de coesão.*

Os tecidos celulares se comportam como líquidos imiscíveis quando a tensão superficial de sua interface comum tem um valor positivo, ou seja, as células iguais coalescem e não se misturam com as células diferentes, formando camadas de separação.

Se as tensões interfaciais entre as células de dois tecidos diferentes e o meio σ_{pm} e σ_{bm} for negativa temos a situação de células isoladas, ou seja, as células estão em suspensão e não se agregam e mesclam. Isto significa que as mesmas não são mutualmente adesivas. Esta configuração é chamada de topologia xadrez, observada em diversos sistemas experimentais (fig. 4.3).

Em cada caso, o tecido de tensão superficial menor irá se espalhar sobre a superfície do tecido de maior tensão superficial. Isto significa que se uma série de tecidos celulares

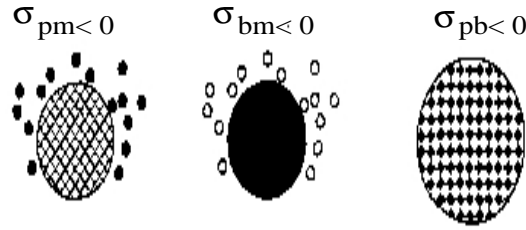


Fig. 4.3: Efeito da tensão superficial em agregados celulares compostos por tecidos diferentes. Tensão da interface entre as células pretas e o meio σ_{pm} , tensão da interface entre as células brancas e o meio σ_{bm} e tensão da interface entre as células pretas e brancas σ_{pb} .

combinados em pares, seu comportamento de espalhamento revelará uma relação de transitividade, ou seja, mostrará uma hierarquia de preferência de espalhamento mútuo (fig 4.4).

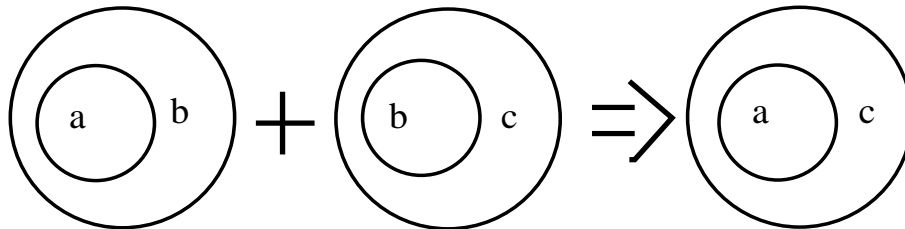


Fig. 4.4: Hierarquia de envelopamento

Então se o tecido celular B se espalha (envelopa) o tecido A , e se o tecido C envelopa B , então o tecido C envelopará o tecido A . Concluimos então que se B envelopa A então $\sigma_{am} > \sigma_{bm}$, se C envelopa B , então $\sigma_{bm} > \sigma_{cm}$. Logo como a tensão superficial de C é a menor tensão superficial dos três tecidos envolvidos, então com certeza se colocado em contato com A o envelopará. Mostrando desta forma uma hierarquia de espalhamento ou envelopamento[24].

Este tipo de comportamento é o mesmo observado na maioria dos agregados celulares. A segregação possui todas as tensões superficiais positivas. O tecido celular que possui menor

tensão superficial, em relação ao meio, irá envolver o tecido de maior tensão superficial.

$$\sigma_{envolvido} > \sigma_{envolvedor}$$

A adesão entre células é um processo seletivo, isto é, uma célula só irá aderir a outras de tipo específico [5].

Capítulo 5

Trabalhos relacionados

5.1 Medida de tensão superficial de tecido embrionário de vertebrado

As primeiras medidas de tensão superficial em agregados celulares foi realizado por Steinberg [3]. Utilizando o método de compressão dos agregados celulares. Este experimento foi realizado por Steinberg [2, 1], Foty [24], Forgacs et al.[34], com o objetivo de medir a tensão superficial de células embriônicas de vertebrado (galinha).

Para analisar o processo de segregação e organização celular e posteriormente medidas de tensão superficial foi construído um aparato de compressão de placas paralelas. Este instrumento foi usado para medir as propriedades viscoelásticas de tecido embrionário vivo. Representado esquematicamente na figura 5.1.

Os tecidos vivos usados para a medida foram obtidos de embriões de galinha de 5 a 6 dias de vida. Quando cultivados em um banho térmico por aproximadamente 1 dia, estes agregados sempre adotaram a forma esférica.

Para iniciar as medidas, a parte interna da câmara foi enchida com meio de cultura de tecidos pré-aquecido. A água que circula entre as câmaras (OC e IC) mantém a temperatura constante em $37^{\circ}C$.

Os agregados multicelulares de embriões de galinha, medindo de 200 a $600\mu m$ de diâmetro, sofreram compressões entre as placas paralelas deste aparelho. O agregado é posicionado na placa inferior de compressão (LCP) dentro da câmara (IC), na qual contém uma solução

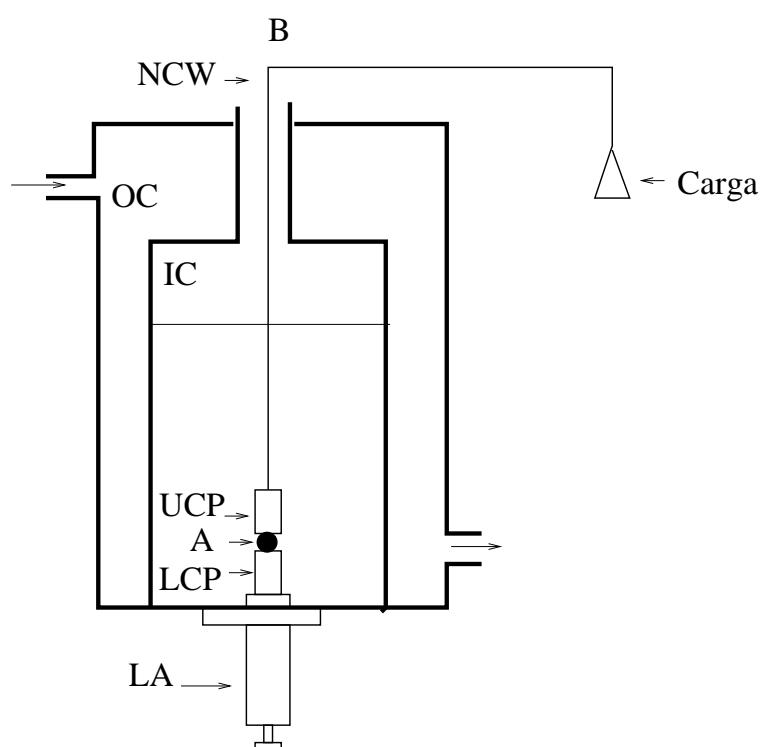


Fig. 5.1: Representação esquemática do aparato compressão de placas planas paralelas. A câmara externa (OC) está conectada a uma bomba de água que mantém a temperatura da câmara interna (IC) com meio de cultura constante. Na parte inferior (LA) o núcleo central está aparafusado na câmara inferior e serve para ajustar a altura da plataforma inferior de compressão (LCP). Um agregado (A) é colocado sobre LCP e comprimido entre esta e a plataforma superior (UCP) que é sustentada por uma balança. A compressão reduz a carga medida pela balança por uma quantidade igual à força atuando no agregado.

balanceada. As placas de compressão foram encapadas com polímero [38], para minimizar a aderência do agregado as placas. A placa de compressão superior (UCP) é suspensa através de um fio de níquel-cromo (NCW). Ao girar o conjunto inferior (LA) ocorre a compressão do agregado.

A forma de equilíbrio completa é atingido em menos de 30 minutos ou em várias horas, dependendo do tipo de tecido (fig. 5.2).

As mudanças na força exercidas no agregado pela placa superior e inferior de compressão

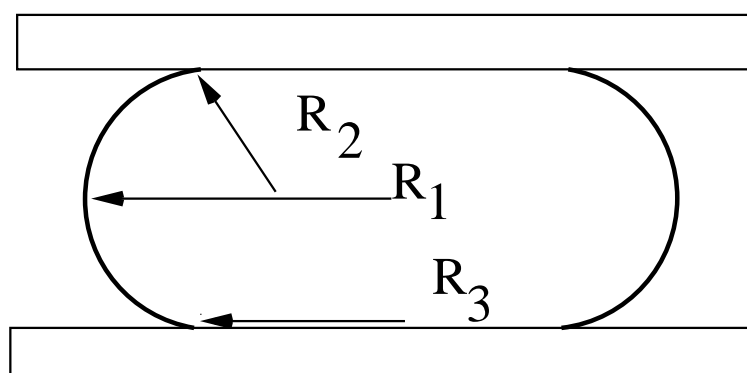


Fig. 5.2: *Parâmetros de deformação do agregado*

Tecido	σ_1 compressão	σ_2 compressão
mesoderme (<i>limb bud</i>)	19.96 ± 1.56	19.26 ± 2.45
pele (<i>pigment ephelium</i>)	11.67 ± 1.92	12.97 ± 2.40
coração	9.03 ± 0.78	8.98 ± 0.57
fígado	4.47 ± 0.34	4.43 ± 0.44
retina	1.61 ± 0.59	1.70 ± 0.52

Tab. 5.1: *Comparação estatística da tensão superficial medida em duas compressões sucessivas (dyna/cm)*

são continuamente registradas em um gráfico. Em alguns casos o perfil do agregado e o tempo foram continuamente gravados por um videocassete ligado a uma câmara de vídeo conectada a um stereomicroscópio horizontal, a altura e largura do agregado foram medidos ao final de cada intervalo de compressão. Foram usados 62 agregados no experimento. Cada agregado foi submetido a duas compressões e foram comparadas os valores de tensões superficiais medidos.

A tensão superficial foi estimada através da relação de Laplace (capítulo 3). Após aplicar um teste para avaliação de significância estatística nas comparações de medida, mostrou-se que não existem diferenças entre as medidas obtidas, ou seja, a tensão superficial independe da força aplicada (tab. 5.1).

OBS: O valor da força aplicada no agregado não foi informado no artigo, mas pela a

análise de gráficos apresentados acreditamos que a força é da ordem de μN .

A medida da tensão superficial mostrou sua independência com a área superficial dos agregados. Isso implica que diferentes conjuntos das quantidades F , R_1 , R_2 e R_3 quando medidas para o mesmo agregado à diferentes graus de compressão devem reproduzir o mesmo valor de tensão superficial. Isso foi verificado submetendo os agregados a duas compressões sucessivas. Os valores da tabela acima confirmam que o potencial de envelopamento de uma população celular depende do valor da sua tensão superficial (capítulo 4).

5.2 Experimento com *Rana pipies*

Este experimento foi realizado por Devis [39], utilizando células embrionárias de anfíbios. O objetivo foi a medida da tensão superficial de quatro tipos celulares e verificação da hipótese da adesão diferenciada para agregados de *Rana pipies* (rã).

Os tecidos da ectoderme, mesoderme e endoderme foram operacionalmente definidos pela posição, tamanho celular relativo e pigmentação. As células ectodermais são pequenas e possuem pigmentação escura, células da mesoderme são grandes e com menor pigmentação e células endodermicas são bem maiores e não possuem pigmentação.

O aparelho experimental consiste em uma câmara de placas de compressão paralelas (fig. 5.3):

- (1) suporte onde o conjunto haste-fibra está preso;
- (2) regulador do ângulo de ajuste;
- (3) parafuso onde a força é aplicada;
- (4) conjunto que possibilita o ajuste do nível do clipe;
- (5) parafuso de ajuste do movimento da plataforma;
- (6) elevador de travamento da plataforma, responsável por prender o agregado;
- (7) suporte para a placa de vidro;
- (8) placa de vidro onde o agregado é pressionado;
- (9) objetiva do microscópio que possibilita a visualização superior do agregado;
- (10) espelho posicionado a 45° em frente do agregado, possibilitando a visão lateral do mesmo e visualização da variação na posição da haste de tungstênio;

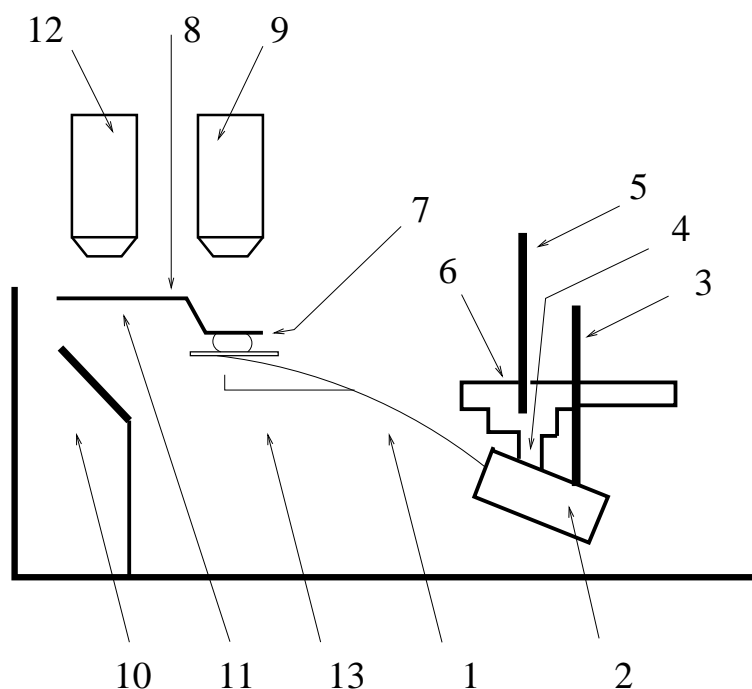


Fig. 5.3: *Aparato experimental*

- (11) placa de vidro;
- (12) objetiva do microscópio para a visualização lateral;
- (13) meio de cultura.

Os agregados de ectoderme, mesoderme e endoderme foram comprimidos no meio de cultura, um por vez, entre placas paralelas em um quadrado de vidro que permitia a medida da força aplicada na compressão. A haste de fibra de quartzo flexível possuem aproximadamente $100\mu\text{m}$ de diâmetro de 6cm de comprimento, sendo preso a sua extremidade final um quadrado de vidro com 2mm de comprimento. Ambas a haste de quartzo flexível e a haste rígida de tungstênio, de aproximadamente $250\mu\text{m}$ de diâmetro e 7cm de comprimento, foram pressas uma a outra dentro de um tubo de vidro com cimento epoxy. A haste livre teve sua ponta afinada e dobrada em direção ao quadrado de vidro. Este conjunto é chamado de haste-fibra (FRA).

O conjunto haste-fibra (FRA) é como mostrado na figura 5.4. Ao aplicar-se uma força vertical na ponta da haste curva a fibra sai de sua posição de repouso e movimentar-se em direção a haste inferior. A deflexão da fibra de quartzo é igual a carga aplicada, ou seja,

igual a distância percorrida da haste em relação a posição inicial.

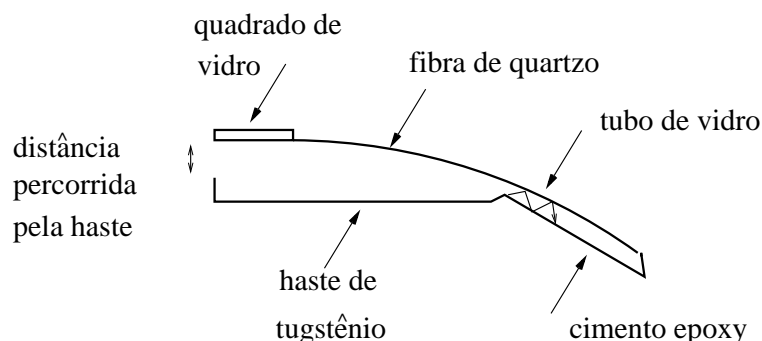


Fig. 5.4: *Conjunto haste-fibra*

A constante elástica (K) foi determinada empiricamente para cada haste colocando pedaços de folha alumínio, pré-pesados e medindo a distância da haste-fibra com um microscópio. A deflexão observada da haste foi sempre diretamente proporcional a força aplicada.

Logo:

$$F = KY$$

sendo

- F = força aplicada;
- K = constante de proporcionalidade (constante de Hooke);
- Y = deflexão.

Esta relação linear indica que a fibra de quartzo obedece a Lei de Hooke.

Quando pedaços de forma irregulares de ectoderme, mesoderme e endoderme são cultivadas no meio de cultura, eles se arredondam, ou seja, apresentam um comportamento característico de gotas líquidas. Os tecidos da ectoderme e mesoderme levam aproximadamente $3h$ para arredondar-se, endoderme leva aproximadamente $4h$.

Depois do arredondamento, cerca de 3 a 12h na cultura, o agregado esférico foi gentilmente pipetado e colocado sobre o conjunto haste-fibra. O agregado foi então comprimido

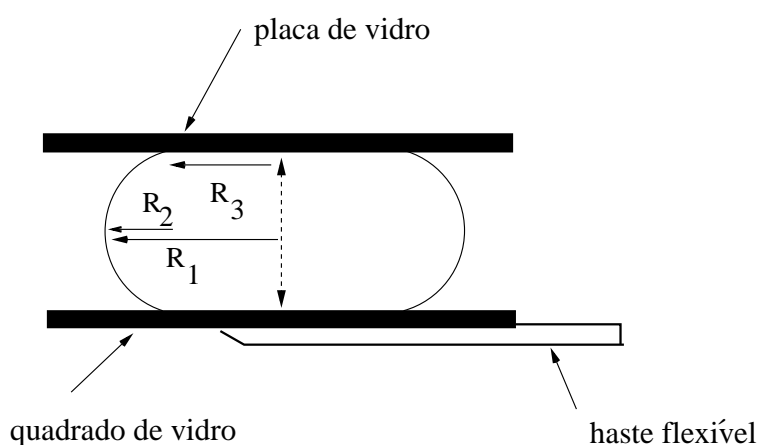


Fig. 5.5: Agregado comprimido entre duas placas paralelas

pelo levantamento do conjunto até a deformação ser percebida (fig. 5.5). Para a ectoderme e a mesoderme, três compressões sucessivas foram feitas para cada agregado. No caso do agregado da endoderme, somente duas compressões puderam ser feitas devido a sua fragilidade.

Medidas dos parâmetros da forma do agregado e a distância entre a haste e o quadrado de vidro foram calculados através do traçado das fotografias tomadas pela objetiva do microscópio. Para determinar a força e forma de equilíbrio, o raio de curvatura do lados direito e esquerdo do perfil do agregado foram avaliados pela comparação com uma série de arcos circulares de raio conhecido desenhado sobre as fotografias em um plástico transparente.

Para determinar a precisão do aparato experimental, o mesmo foi calibrado através da compressão de bolhas de ar. Uma pequena bolha de ar (1.0mm a 1.5mm de diâmetro) ar saturado em água destilada.

A câmera foi enchida com ar-saturado em água destilada e uma bolha de ar foi pipetada na superfície da placa inferior. Todas as bolhas comprimidas possuíam alturas diferentes, fornecendo medidas da força aplicada e a forma resultante como descrito para compressões em agregados celulares.

A medida da tensão superficial e desvio padrão para estes tecidos, são mostrados na tabela 5.2. Os valores das forças aplicadas para pressionar os agregados não são mencionadas no artigo.

Tecido	Tensão superficial
endoderme	$0.36 \pm 0.03 \text{dyna/cm}$
mesoderme	$0.56 \pm 0.06 \text{dyna/cm}$
ectoderme(bcr)	$0.80 \pm 0.07 \text{dyna/cm}$
ectoderme(underlain)	$1.60 \pm 0.25 \text{dyna/cm}$

Tab. 5.2: Medida da tensão superficial da subsuperfície do germ Layer . $1 \text{dyna} = 10 \text{mN}$.

Segundo o autor, as medidas de tensão superficial dos diferentes tecidos embrionários de rã confirmam a hipótese da adesão diferenciada de Steinberg. As medidas de tensão superficial correspondem ao potencial de envelopamento conforma mostra a tabela 5.1.

Capítulo 6

Procedimento experimental e Resultados

O objetivo central deste trabalho é a medida da tensão superficial em agregados mistos de hidras. Para isto, desenvolvemos um equipamento totalmente original.

A metodologia utilizada, neste trabalho, para a realização de medidas reológicas consiste em aplicar uma força em um agregado celular, esperar que o mesmo alcance o equilíbrio na resposta e posteriormente medir seus raios de curvatura locais. Estimamos o valor da tensão superficial através da relação de Laplace.

6.1 Preparação do agregado celular

Devemos seguir um protocolo de obtenção de agregados aleatórios de células de hidra. O qual consiste de forma geral em[40]:

- 1) Obter células isoladas de hidras em suspensão e em condições sadias.
- 2) Reagrupá-las de forma aleatória através de centrifugação.
- 3) Observar o ordenamento e regeneração do agregado obtido.

As técnicas utilizadas para isolar as células consistem em uma intervenção mecânica, onde as hidras são picadas com o auxílio de um bisturi (*ver apêndice C*) em métodos químicos (*ver apêndice B*), que rompem as moléculas de adesão da membrana.

As hidras selecionadas para formar o agregado devem ser mantidas em jejum, por um período de dois dias, e em condições de absoluta limpeza. Não devem possuir brotamentos. A cabeça e o pé devem ser extraídos para impedir que estas células diferenciadas influenciem na dinâmica de reagrupamento celular, pois queremos obter um agregado formado unicamente de células de ectoderme e endoderme[40].

Os cilindros corporais resultantes devem ser cuidadosamente lavados e depois picados (*ver apêndice C*). Após colocamos estes pedaços em suspensão em um tubo contendo meio de dissociação celular (DM). Este processo é indispensável para rompermos todas as moléculas de adesão entre as células. Para ajudar neste processo, usamos a própria viscosidade do líquido para aplicar forças de cisalhamento nos microagregados restantes e assim isolarmos mais células.

Após os procedimentos anteriores, esperamos ter uma suspensão formada por uma grande percentagem de células individuais. Outro passo importante para a obtenção exclusiva de células isoladas é a filtração. Então, filtramos esta suspensão usando uma rede de $50\mu m$ de abertura, na qual excluimos os pequenos aglomerados e reduzimos em grande parte a concentração de pares de células aderidas.

A suspensão de células obtida deve ser centrifugada ($1200rpm$) por um tempo médio de 10 minutos afim de obtermos a agregação aleatória. Então devemos esperar que o agregado evolua e alcance a forma de equilíbrio, ou seja, devemos esperar que o mesmo se arredonde.

6.2 Desenvolvimento do agregado

Ao retirarmos o agregado da centrífuga as células de ectoderme e endoderme estão agregadas aleatoriamente. A partir deste momento, começamos a analisar todo o processo de segregação e ordenamento celular (fig.6.1 (a)).

No processo de arredondamento o tecido da ectoderme irá envolver o tecido da endoderme. O tempo que o agregado leva para readquirir sua topologia original é de 6 a 10 horas.

Doze horas depois da centrifugação a forma do agregado é aproximadamente esférica, com uma camada mais clara e menos adesiva (ectoderme) ao redor da endoderme (fig. 6.1 (b)).

Após 15-16h depois da centrifugação o agregado incha, há um aumento de volume devido a formação e expansão da cavidade interna[41]. Depois de 17-20h as camadas ectoderme estão completamente separadas do restante das células do interior, mas ainda existem células flutuando na cavidade interna.

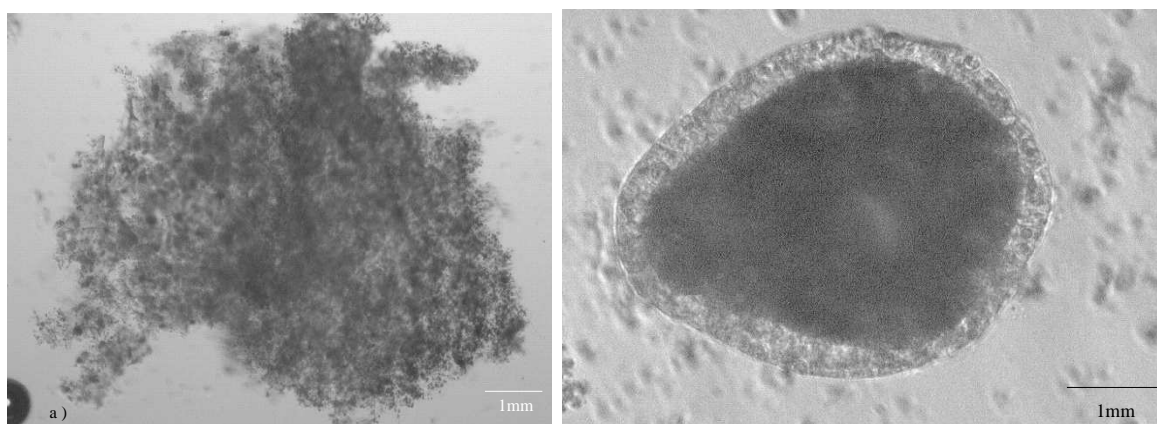


Fig. 6.1: (a) Agregado após a centrifugação. (b) Agregado com 6-12 horas de vida

O aumento do volume é uma consequência da pressão interna ser ligeiramente maior que a pressão externa, gerada devido a processos passivos como osmose ou por bombeamento ativo de água através das células[41]. As camadas celulares continuam se reorganizando até se separarem completamente. Entre as camadas se forma a mesoglêia.

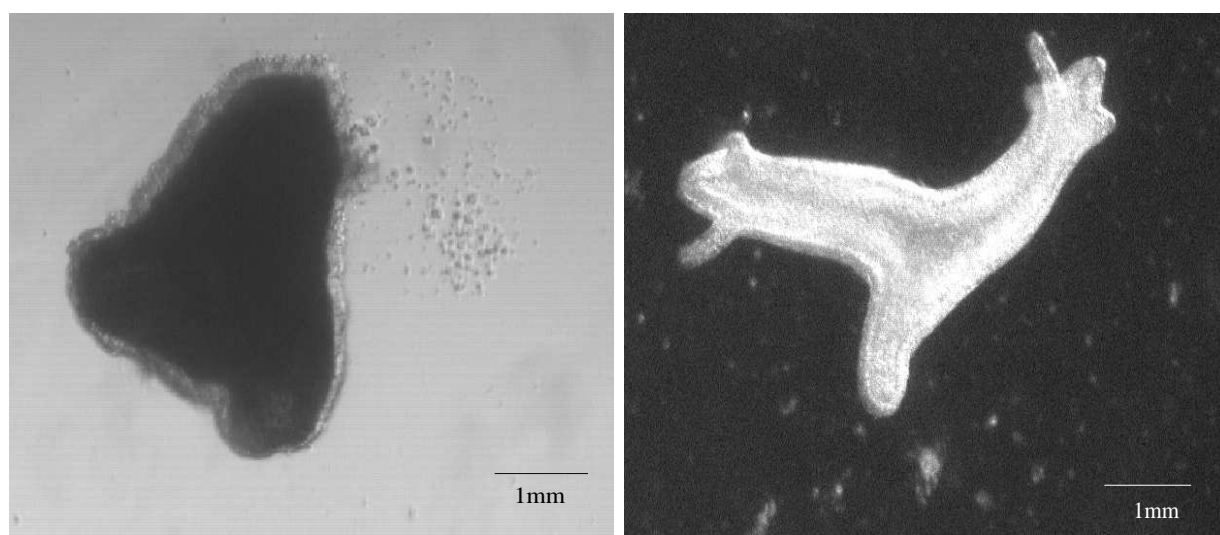


Fig. 6.2: (a) Formação de protuberâncias. Indicando a formação de cabeças. (b) Depois de algumas horas.

No processo de formação da mesoglêia, começa a ocorrer a polarização, ou seja o agregado se alonga e surgem protuberâncias que indicam a formação de cabeças (fig. 6.2 (a)).

Até o término da polarização o volume do agregado continua aumentando, ocorrendo ocasionalmente, a expulsão violenta do líquido interno e células isoladas. Este processo recebe o nome de *burst*. O *burst* ocorre em agregados com tempos de vida de 14 a 20 horas (fig. 6.3)[40].

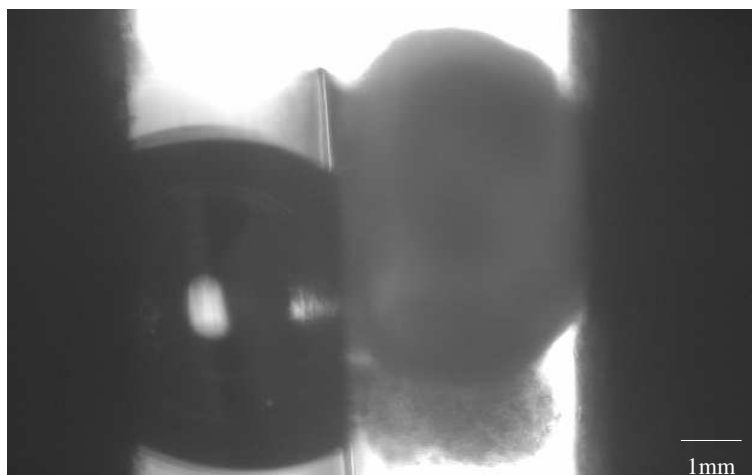


Fig. 6.3: Agregado com mais de 20 horas de vida com burst.

6.3 Materiais e métodos

O equipamento utilizado, para a medida de tensão superficial, foi projetado e produzido no Instituto de Física (fig. 6.4).

O aparato é formado por:

- (1) Parafuso micrométrico;
- (2) Suporte acrílico;
- (3) Suporte teflon;
- (4) Haste alumínio;
- (5) Base teflon;
- (6) Lâmina de alumínio.

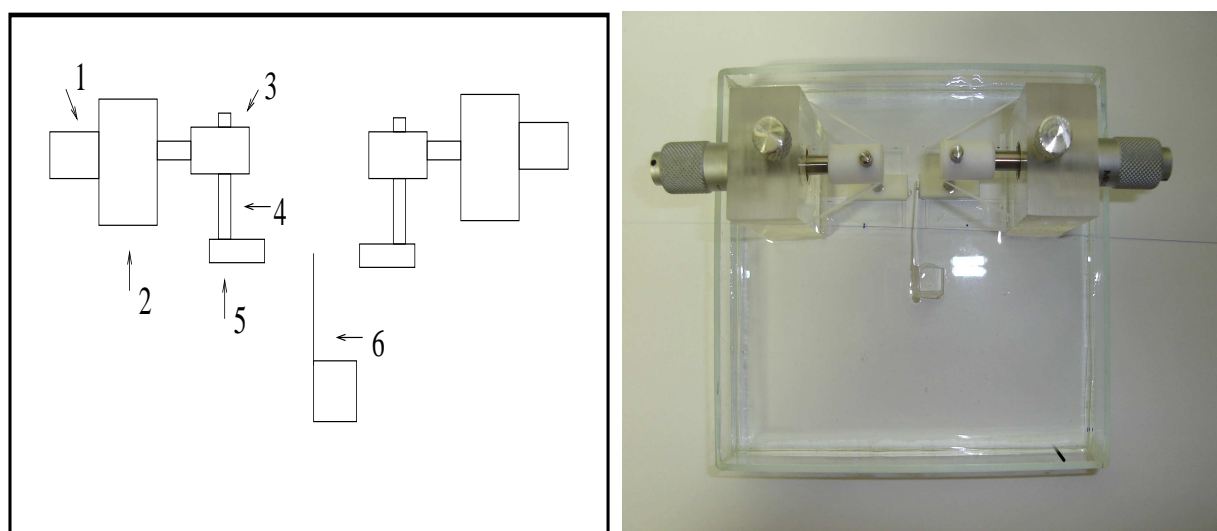


Fig. 6.4: (a) *Diagrama esquemático*; (b) *Foto*

A grande vantagem do nosso equipamento em relação aos outros encontrados na literatura (ver capítulo 5) é a fácil calibração. Utilizamos uma bolha de ar para calibrar nosso aparelho. Também utilizamos a bolha de ar como dinamômetro. Outra vantagem em utilizar a bolha de ar como instrumento de medida e o fato de sua tensão superficial ser um valor tabelado.

Para o estudo da segregação e ordenamento celular usamos o microscópio Olympus IX50. A medida dos raios de curvatura local, necessários para a medida da tensão superficial, são obtidos pela análise das imagens capturadas pela câmera monocromática Cohu RS-170. Estas imagens são analisadas com o auxílio do programa *Scion Image*.

O primeiro passo foi a calibrar o aparelho experimental. Então, colocamos o aparato experimental, sobre o microscópio, utilizamos a objetiva 4X.

A cuba de vidro é cheia de água destilada. Com o auxílio de uma seringa, obtemos duas bolhas de ar. Após, posicionamos as mesmas entre as bases do polímero (teflon) e a lâmina de alumínio. A lâmina de alumínio serve de meio separador entre as bolhas, transmitindo integralmente a força aplicada em ambos os lados (fig.6.6). Devemos manter a lâmina na posição de equilíbrio para nos certificarmos que ela não influencia no valor das medidas. Com o auxílio dos parafusos micrométricos aproximamos as bolhas.

Pressionamos uma bolha contra a outra e medimos os raios de curvatura locais. Para

calibrar a medida dos raios utilizamos a Câmara de Neubauer espelhada (fig. 6.6).

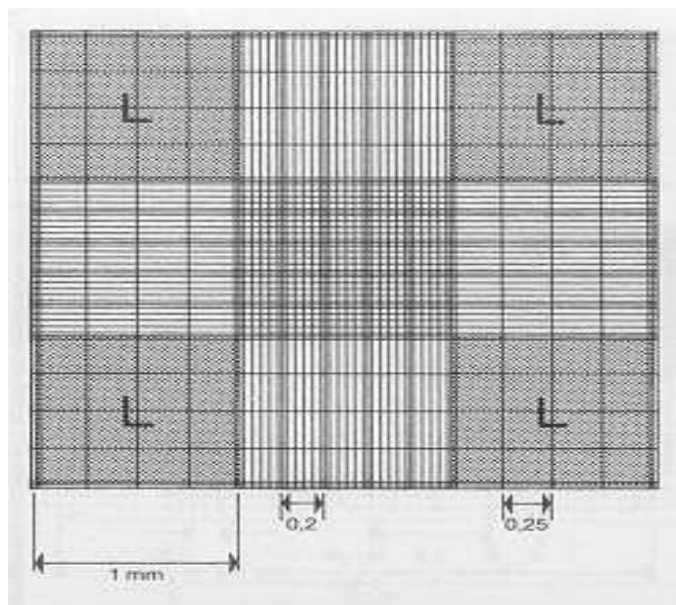


Fig. 6.5: Câmara de Neubauer

A Câmara de Neubauer pode ser pensada como um *slide* de vidro. É composta por 9 quadrados, cada qual mede 1mm de lado. Utilizando objetiva de $4X$, como mencionado anteriormente, observamos um quadrado de 1mm . Através da análise desta imagem, sabemos que um 1mm equivale a 400 pixels , então calibramos o programa *Scion Image* utilizado para a medida dos raios.

Os raios R_1 e R_2 foram medidos diretamente, sendo que, R_2 foi medido através da curvatura média das bordas da bolha. O raio R_3 foi calculado, pois sua medida direta é muito difícil devido à difração.

A idéia fundamental do equipamento é: aplicando uma força na primeira bolha ela reage e a mesma força é transferida à outra bolha. Então nosso equipamento é uma aplicação da terceira lei de Newton.

Colocamos os valores do raios (R_1 , R_2 e R_3) na equação de Laplace. Usando o valor da tensão superficial de uma bolha de ar dentro de um líquido a uma temperatura de 20°C é tabelada em $7,52 \cdot 10^{-2} \frac{\text{N}}{\text{m}}$. Calculamos assim a força aplicada na primeira bolha.

Medimos os raios da segunda bolha de ar e usamos novamente a equação de Laplace.

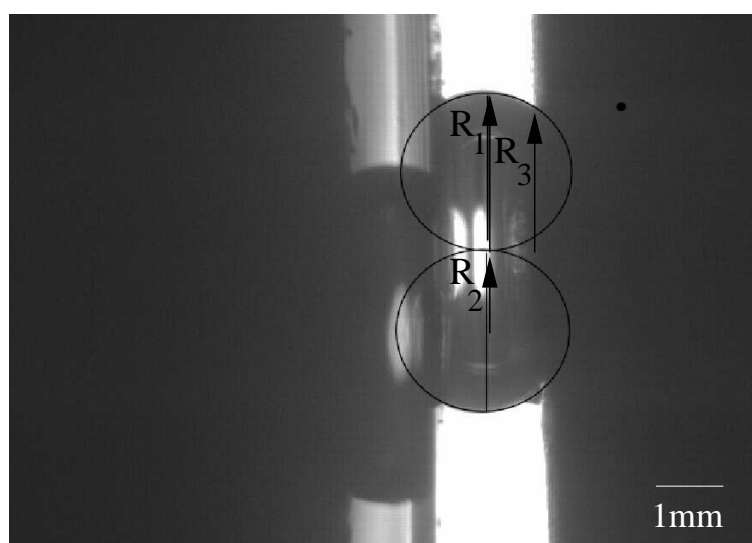


Fig. 6.6: Medida dos raios das bolhas

Como já sabemos a força aplicada calculamos a tensão de bolha de ar. O valor médio de tensão superficial medido para quatro compressões sucessivas foi de $7,17 \cdot 10^{-2} \pm 9,5 \cdot 10^{-5} \frac{N}{m}$, nossa margem de erro foi de 5%, em relação ao valor tabelado.

6.4 Procedimento geral

A cuba de vidro é cheia com meio de culturas de hidras - HM (*ver apêndice A*). Fazemos uma bolha de ar com o auxílio de uma seringa. A seringa deve possuir uma agulha pequena, pois temos que obter bolhas muito pequenas, para a captura integral da imagem pelo microscópio.

Posicionamos a bolha de ar entre a base do polímero (teflon) e a lâmina de alumínio, em seguida colocamos o agregado na outra base. Posicionamos o agregado cuidadosamente em frente a bolha de ar (fig. 6.8). Temos que ter o máximo de atenção neste momento, porque devemos deixar a bolha e o agregado no mesmo plano. Desta forma asseguramos a boa captura da imagem. Após ajustar o microscópio podemos começar a filmagem.

Com o auxílio dos parafusos micrométricos começamos a aproximar a bolha de ar e o agregado. A lâmina de alumínio impede que o agregado escorregue para baixo da bolha de

ar. Ela transmite integralmente a força aplicada pela bolha de ar no agregado.

Outro fator importante que devemos cuidar é a posição da lâmina de alumínio. Quando pressionamos a bolha de ar devemos também pressionar com a mesma força o agregado. Então devemos manter a lâmina na posição de equilíbrio, que é indicada no monitor do computador antes da colocação da bolha e do agregado.

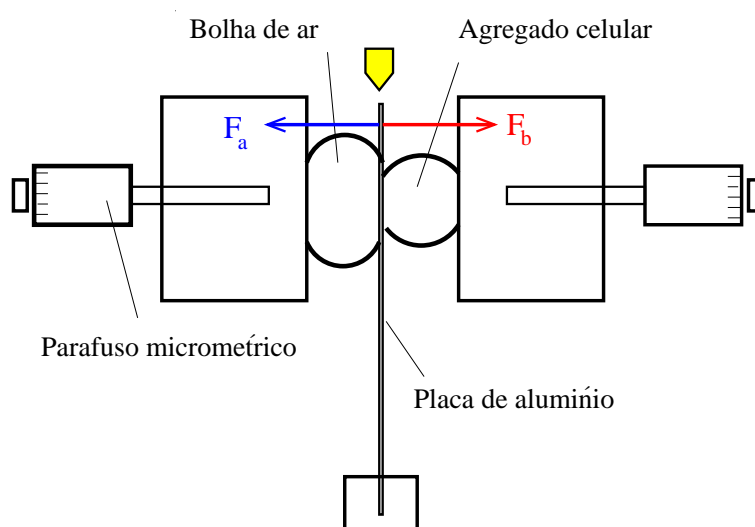


Fig. 6.7: Representação das forças atuando na bolha de ar e no agregado quando pressionados.

O tempo de relaxação é outro fator importante. Se o tempo de compressão for pequeno em relação ao tempo de relaxação o comportamento observado é de um sólido elástico. Mas se o tempo de compressão for maior que o tempo de relaxação o comportamento apresentado será de um fluido viscoso. Outro fator que influencia o comportamento é o tempo de formação do agregado. Tempo de formação é o tempo contado desde quando ele sai da centrífuga.

A reação do agregado a uma breve compressão é de um sólido elástico, ou seja, o mesmo se comporta como uma mola, obedecendo o comportamento Hookiano, e volta a sua forma original após liberada a força de compressão (fig. 6.9).

Quando diminuimos a força aplicada ele recupera a sua forma original. Mas se mantivermos o agregado pressionado por um tempo superior a cinco minutos o agregado relaxa e ocorre um novo rearranjo celular, provocado pela força de cisalhamento. As camadas celula-

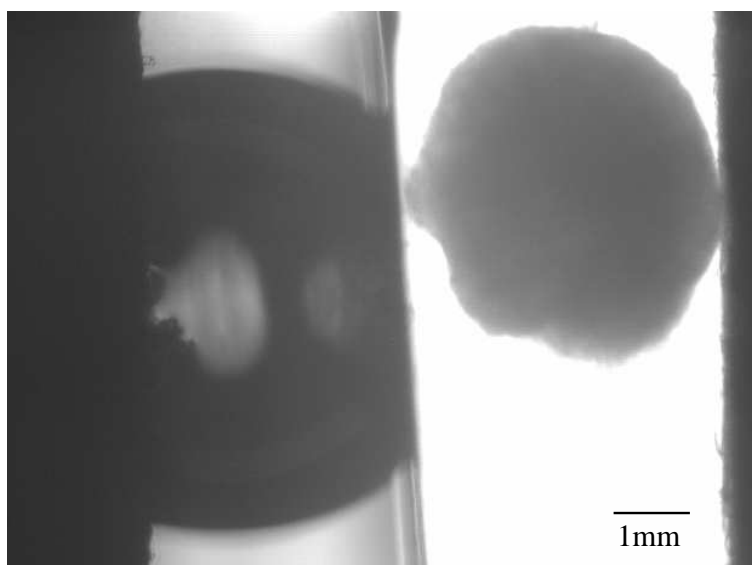


Fig. 6.8: *Bolha de ar e agregado antes da tomada de medidas.*

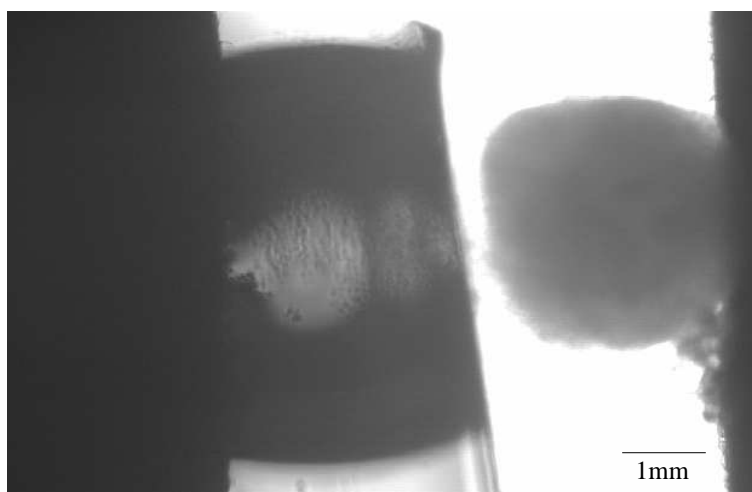


Fig. 6.9: *Bolha e agregado depois de uma rápida compressão*

res se espalham sobre as outras continuamente até a força de compressão atuante aumentar a sua área superficial (fig. 6.7). Então a força de coesão entre as células reagem e equilibra a força de compressão.

A força de compressão tenta aplainar o agregado e é equilibrada pela força de coesão intercelular que tenta arredondar o agregado. Após retirada a força o agregado permanece deformado com suas extremidades superiores completamente planas. Depois de um deter-

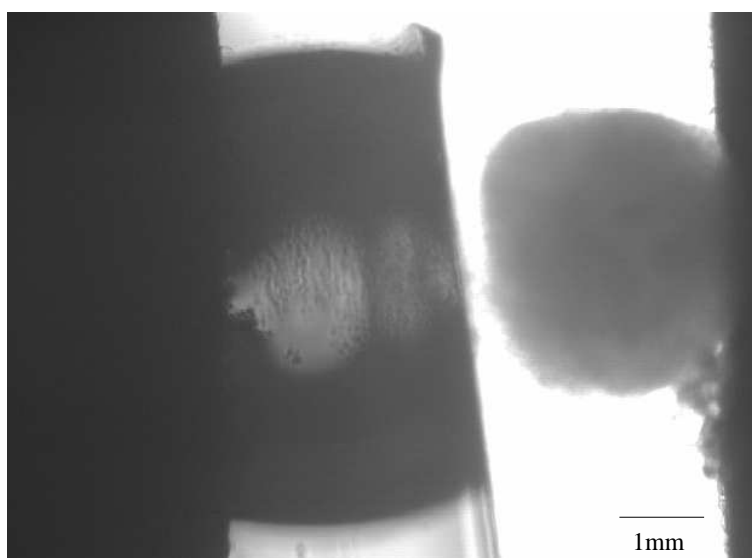


Fig. 6.10: *Bolha e agregado depois de uma longa compressão*

minado tempo ele retorna a forma esférica. Assim o agregado demonstra suas propriedades viscoelásticas.

Em resumo:

- **Sem aplicar força sobre o agregado:** o agregado se arredonda afim de minimizar a superfície livre (área) de contato, desta forma minimiza a sua energia.
- **Aplicando força sobre o agregado:** o agregado se deforma. Se a força for aplicada, em um tempo menor que seu tempo de relaxação, irá comportar-se como um sólido elástico. Se a força aplicada ultrapassar, o tempo de relaxação, o agregado apresentará o comportamento de um fluido viscoso.

A tensão superficial é uma propriedade intrínseca do agregado celular, dependendo apenas do tipo de células analisadas. Independe do volume e da área, ou seja, indpene das dimensões físicas do agregado.

6.5 Calculo da tensão superficial

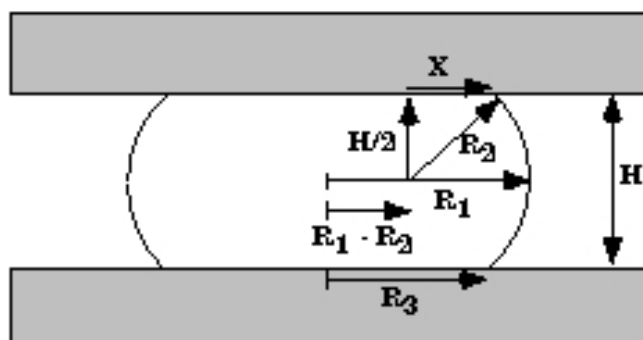


Fig. 6.11: Representação da variação dos raios do agregado quando pressionado contra bolha de ar

Considere o agregado pressionado conforme a figura 6.11.

Lembrando que pressão em um bolha é dada por:

$$P = \frac{F}{A}$$

onde F é a força aplicada pela placa e a área da circunferência de contato entre o agregado e a placa é

$$A = \pi R_3^2$$

e a pressão no agregado é dada pela relação de Laplace:

$$P = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

onde R_1 e R_2 são os raios de curvatura local; σ é a tensão superficial e P é a pressão interna;

Substituindo a relação de Laplace e a área na equação da pressão chegamos em uma relação que nos possibilita estimar a tensão superficial:

$$\sigma = \frac{F}{\pi R_3^2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^{-1}$$

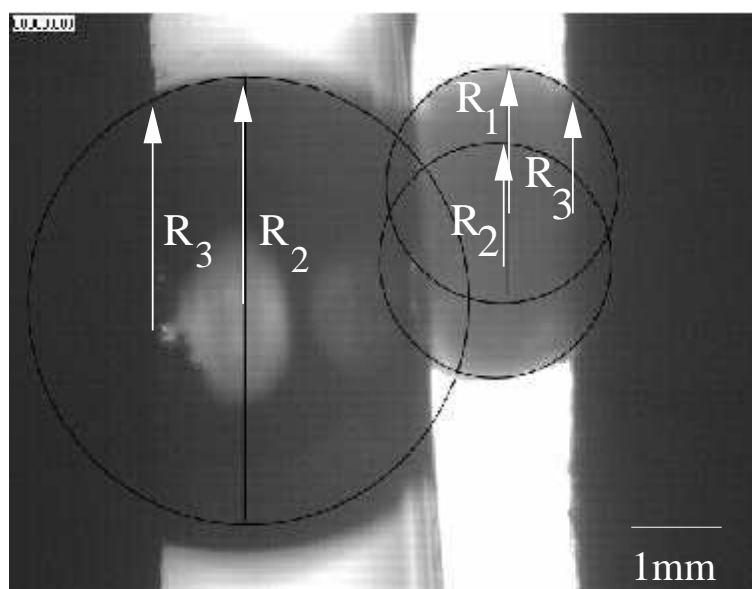


Fig. 6.12: Bolha de ar pressionado contra agregado.

Para uma melhor exatidão nas medidas devemos calcular R_3 através da medida geométrica de R_1 , R_2 e $\frac{H}{2}$. Pois a imagem fica borrada no ângulo de contato entre as placas de compressão, devido à difração[24].

Quando comprimido entre as placas paralelas, um agregado inicialmente esférico, irá assumir uma configuração de equilíbrio na qual suas bordas serão aproximadamente semi-círculos. Neste caso, R_1 , R_2 e H podem ser medidos com melhor exatidão que R_3 .

Então, por Pitágoras, temos que:

$$R_2^2 = \left(\frac{H}{2}\right)^2 + x^2$$

onde a distância x é dada por

$$x = \sqrt{R_2^2 - \left(\frac{H}{2}\right)^2}$$

e pela figura vemos que

$$R_3 = x + (R_1 - R_2)$$

o que resulta, finalmente, na seguinte expressão para R_3 , usada neste trabalho.

$$R_3 = \sqrt{R_2^2 - \left(\frac{H}{2}\right)^2} + (R_1 - R_2)$$

6.6 Resultados

Obtemos 18 medidas de tensão superficial em agregados mistos de hidra, com diâmetros e tempos de formação diferentes.

Nome do agregado	Diâmetro(mm)	Horas de vida	Número de Compressões	Tensão superficial($\frac{N}{m}$)
1) A_1	0,75	16	1	$1,31 \cdot 10^{-1}$
2) A_2	0,75	18,5	2	$1,56 \cdot 10^{-1}$
3) A_3	0,89	20	1	$1,10 \cdot 10^{-1}$
4) A_4	0,62	14	1	$1,55 \cdot 10^{-1}$
5) A_4	0,63	14	2	$1,67 \cdot 10^{-1}$
6) A_4	0,73	14	3	$2,10 \cdot 10^{-2}$
7) A_5	0,62	16	2	$1,41 \cdot 10^{-1}$
8) A_6	0,83	19	1	$1,55 \cdot 10^{-1}$
9) A_7	0,71	19	2	$1,42 \cdot 10^{-1}$
10) A_7	0,72	19	3	$1,59 \cdot 10^{-1}$
11) A_7	0,79	19	4	$9,2 \cdot 10^{-2}$
12) A_8	0,53	14,5	1	$1,05 \cdot 10^{-1}$
13) A_8	0,57	15	2	$7,35 \cdot 10^{-2}$
14) A_9	0,53	15,5	1	$7,05 \cdot 10^{-2}$
15) A_{10}	0,50	17	1	$1,91 \cdot 10^{-1}$
16) A_{11}	0,63	12	1	$1,047 \cdot 10^{-1}$
17) A_{12}	0,66	18	1	$1,05 \cdot 10^{-1}$
18) A_{13}	0,75	20	1	$2,19 \cdot 10^{-2}$

Tab. 6.1: Valores medidos. Sendo A representa o agregado utilizado na medida.

O valor médio da tensão superficial foi de $13,25 \cdot 10^{-2} \pm 5,77 \cdot 10^{-5} \frac{N}{m}$. O diâmetro médio dos agregados foi de $0,678mm$.

Usamos o teste t de *Student* para analisar nossas medidas. Usamos o teste t para amostras de tamanhos diferentes:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_a \cdot \sqrt{\frac{1}{n_m} + \frac{1}{n_r}}}$$

onde:

- \bar{x}_1 = média da amostra 1; \bar{x}_2 = média da amostra 2; S_a = desvio padrão agregado (raiz quadrada da variância agregada);

sendo

$$S_a^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{gl}$$

- n_1 = tamanho da amostra 1; n_2 = tamanho da amostra 2; S_1^2 = variância da amostra 1; S_2^2 = variância da amostra 2; $gl = n_1 + n_2 - 2$ = números de graus de liberdade das duas amostras agregadas.

Sendo que destas 18 medidas, 13 foram aproveitadas (ver tabela 6.1). As outras 5 medidas discrepantes foram descartadas (linha 6, 13, 14, 15 e 18). Então, existe uma probabilidade razoável, superior a 95%, de que as diferenças observadas não são devido a variabilidade estatística. Todos apresentaram uma média de três compressões sucessivas em um intervalo de tempo muito pequeno. Acreditamos que estes agregados não tiveram tempo suficiente para se reestruturarem.

6.7 Análise das medidas

Tentamos fazer medidas em agregados jovens, com tempo de formação de 6 a 10 horas, e foi constatado conforme experimentos similares [25] que a tensão superficial é muito pequena sendo impossível sua medida com nosso aparato. Nos experimentos da referência [25] observou-se um aumento da tensão superficial com o tempo de incubação e sua estabilização por um período de tempo diferente para cada tipo de tecido. O mesmo se verifica aqui com agregados de hidra. Porém, existe uma diferença fundamental entre agregados de hidra e embriões de vertebrados. Naqueles experimentos os agregados são homogêneos e acredita-se

que o aumento da tensão é devido ao aparecimento gradual de uma matriz extracelular homogênea.

Aqui, como temos dois tipos celulares, o amadurecimento leva à segregação celular e conseqüente aparecimento de uma cavidade. Assim, os agregados de hidras maduros, estão longe de serem homogêneos. São bem mais estruturados e provavelmente o aumento da tensão se deve ao aparecimento de uma estrutura extracelular bem especializada que é a mesoglêia.

Os valores de tensão superficial para agregados mistos de hidra, se comparados aos valores obtidos para outros agregados são bem maiores (ver capítulo 5). Acreditamos que o fator que influencia nossas medidas é a estrutura de nosso agregado. Os agregados de anfíbios e embriões de vertebrados podem ser considerados como um sólido elástico formado por apenas um tipo celular. Os agregados de hidras são constituídos por dois tipos celulares diferentes e possuem uma cavidade interna. Outro fator que pode influenciar nossas medidas é a formação de mesoglêia.

Concluimos conforme o gráfico 6.13, observamos que o diâmetro dos agregados não influencia no valor médio da tensão superficial.

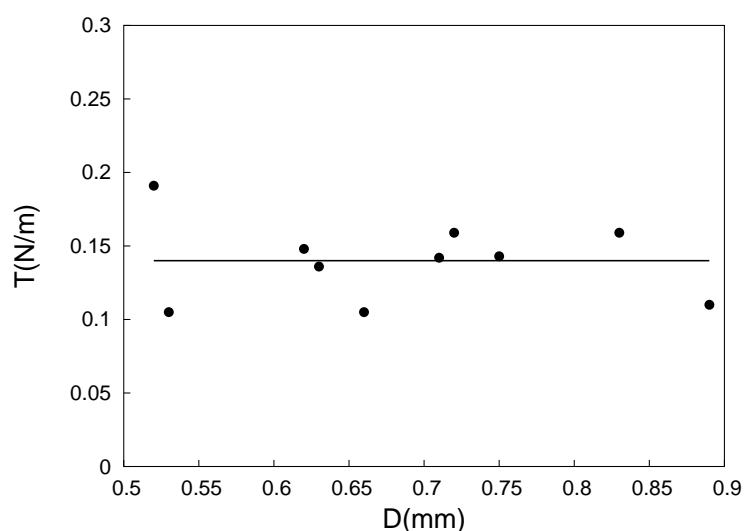


Fig. 6.13: Sendo T tensão superficial média de $1,40 \cdot 10^{-1} \frac{N}{m}$ e D diâmetro dos agregados.

Devido ao apresentado anteriormente, futuramente, pretendemos obter agregados de hidra formados por apenas um tipo celular. Desta forma iremos obter agregados sólidos e

sem a formação de cavidade. Então, iremos comparar os valores de tensão superficial de agregados de células únicas com o valor de tensão superficial de agregados mistos.

Capítulo 7

Conclusões

O assunto central desta dissertação é a influência da adesividade celular na organização de tecidos durante o desenvolvimento embriogênico dos organismos. Para este estudo usamos como animal modelo a hidra, um cnidário de água doce, com alto poder de regeneração. Este organismo pode ter seus tecidos completamente dissociados em um suspensão de células individuais, que após reagregadas aleatoriamente por centrifugação, dão origem a um organismo sadio novamente.

Este fenômeno extraordinário se dá pela combinação de diversos fatores. O primeiro deles, e o mais importante nas primeiras horas de incubação do agregado, é a segregação dos dois tipos celulares predominantes na suspensão, as células de ectoderme (que cobrem a parte externa do organismo, que está em contato com o meio ambiente) e as células de endoderme (que cobre a parte interna da cavidade gástrica). Acredita-se que tal segregação seja resultado da combinação do movimento intrínseco das células devido a vibrações do seu citoesqueleto e das suas afinidades de adesão, maiores para células de mesmo tipo. Após segregado o agregado sofre uma série de transformações de natureza ainda não inteiramente compreendidas, como a formação de uma cavidade e pulsações com eventos de rompimento da parede dupla de ectoderme-endoderme (os chamados burst) com conseqüente expulsão do conteúdo da cavidade, basicamente células soltas, ou mortas.

Neste período, usualmente após 17-20 horas, acredita-se que fenômenos mais biológicos estejam em ação, entre eles a formação de uma mesoglêia conectando a endoderme à ectoderme, o bombeamento ativo de água para dentro da cavidade, o aparecimento de neurônios e de um gradiente químico que começa a polarizar o organismo para o posterior

aparecimento dos tentáculos em um extremo e do pé em outro extremo.

Ao longo deste trabalho diversas preparações foram feitas, onde agregados aleatórios de endoderme e ectoderme foram obtidos e posteriormente evoluíram para um indivíduo adulto com capacidade de alimentar-se e reproduzir-se, mostrando assim que o protocolo usado estava correto.

Como foi dito o foco deste trabalho, na primeira fase, é o estudo da formação do agregado onde o mecanismo dominante é a adesividade entre células. A escolha deste foco se deve ao fato que a hipótese da adesão diferenciada de Steinberg propõe que este mecanismo seja comum a todos os processos de embriogênese, não somente a regeneração de organismo simples como as hidras. Em particular esta teoria tem como hipótese que, devido a adesão, os tecidos celulares se comportariam como líquidos. Assim misturas de dois tecidos apresentariam propriedades de líquidos imiscíveis com propriedades como segregação e envelopamento de um tecido sobre o outro.

Isto é observado no caso da hidra, onde agregados de células endodermicas e ectodermicas misturadas aleatoriamente, segregam completamente com as células ectodermicas envelopando completamente as endodermicas.

De acordo com a proposta de Steinberg o processo de segregação é um processo de minimização de energia de superfície, onde as interfaces com maior tensão superficial tendem a diminuir sua área. Como consequência disto um tecido com maior tensão superficial é envelopado por um tecido de menor tensão superficial.

O objetivo principal deste trabalho, foi portanto, desenvolver um método para medida da tensão superficial de agregados de hidra. Como já foi mencionado, no texto, outras medidas foram feitas em embriões de vertebrados e anfíbios com o mesmo objetivo. Para isto, desenvolvemos um sistema original, diferente dos previamente utilizados na literatura.

A medida da tensão superficial de um agregado é uma medida reológica onde devemos aplicar uma força e medir a deformação causada por ela. A deformação é medida opticamente com o auxílio de um microscópio. O agregado lembra uma gota líquida pressionada entre duas placas, apresentando curvaturas nas suas paredes livres. O ponto crítico deste sistema é como medir as tensões aplicadas que devem ser da ordem de μN que é a ordem das forças suportadas elasticamente pelos agregados.

A novidade do equipamento desenvolvido neste trabalho é o uso de uma bolha de ar para estimar a força que pressiona o agregado. Pressiona-se uma bolha de ar contra o agregado e óticamente mede-se a deformação da bolha. Usando o valor tabelado da tensão superficial do ar na água estimamos a força que esta faz sobre o agregado. Para validar nossas medidas aferimos nosso equipamento ao pressionar uma bolha de ar contra uma outra bolha de ar. Usando a primeira bolha como medidor de tensão e a segunda como sistema cuja tensão superficial queríamos determinar. O valor medido da tensão superficial foi de $7,17 \cdot 10^{-2} \frac{N}{m}$ sendo que o valor tabelado para uma temperatura de $20^{\circ}C$ (usado para a primeira bolha) é $7,52 \cdot 10^{-2} \frac{N}{m}$. Este erro em torno de 5% é da ordem do erro de outros métodos de medida de foram utilizados na literatura.

O valor médio da tensão superficial para agregado misto, formado de células endodermicas e ectodermicas, de hidra foi de $14,02 \cdot 10^{-2} \frac{N}{m}$. Ao compararmos o valor da tensão superficial de hidras com agregados embrionários de vertebrados e anfíbios notamos que seu valor é bem maior, da ordem de cinco a dez vezes maior. Uma possível explicação para isto é o tempo de incubação das medidas e o fato do agregado ser misto. Para o tempo de incubação que usamos o agregado já estava completamente segregado, apresentando cavidade e possivelmente com alguns dos mecanismos biológicos descritos anteriormente atuando.

Medidas com agregados com tempo de vida inferior a 12 horas de vida, foram tentadas mas com nenhum sucesso, aparentemente a adesividade entre as células era muito baixa. Quando pressionados estes agregados apresentavam somente uma resposta viscosa.

Antes da coleta dos dados fotográficos o seguinte procedimento é adotado: o agregado é pressionado e liberado rapidamente. Se sua resposta é elástica a medida é tomada. Ao pressionarmos por um tempo mais longo, ou seja, maior do que o tempo de relaxação a resposta é viscosa. Quando liberado o agregado está com as bordas superiores achatadas. Depois de um determinado tempo o agregado se arredonda novamente. Mostrando seu comportamento viscoelástico.

Não temos como precisar, no período de tempo de 6 a 12 horas de vida, se as células do agregado estão unidas apenas devido a adesividade. Supomos que no decorrer do tempo a adesividade entre as células vai aumentando em um período de tempo maior do que 12 horas. É provável que a mesogléia já esteja sendo formada (capítulo 2). Agregados com mais

de 20 horas de vida certamente estão com a mesogléia formada e apresentam protuberâncias que caracterizam a polarização, indicando completa regeneração e formação de cabeça e pé. Acreditamos que a formação da mesogléia pode influenciar nas medidas.

Futuramente pretendemos fazer agregados formados somente de por único tipo celular. Para isto, um protocolo de separação de tecidos deve ser elaborado, bem como um protocolo para obtenção de agregados sadios de somente um tipo celular. Isto não é completamente óbvio, visto que, as células de endoderme não se adaptão facilmente no meio externo.

No que se refere ao equipamento de medida muito tem que ser ainda desenvolvido. Primeiramente devemos ter mais cuidados com as superfícies de contato do equipamento com a bolha e agregado. Atualmente existem contatos com teflon nas extremidades externas e alumínio entre a bolha e agregado. Não sabemos o tipo de interação existente entre estes materiais e o bolha de ar. Possivelmente tenhamos que cobrir estas superfícies com materiais cujas afinidades com material biológico sejam mais conhecidas. Devemos também introduzir uma forma de seguir temporalmente a resposta mecânica do agregado. Assim podemos avaliar se sua resposta é realmente bem descrita pela equação constitutiva (apresentada no capítulo 3).

O objetivo final será determinar o valor da tensão superficial dos tecidos de ectoderme e endoderme e comparar com o valor do agregado misto. Através da medida destas tensões superficial será possível prever qual será o comportameto de envelopamento e validar a hipótese da adesão diferenciada para agregados celulares de hidras.

Capítulo 8

Trabalhos futuros

Futuramente pretendemos obter medidas de tensão superficial em agregados de células isoladas. Pois, estas medidas são essenciais para melhor entender os dados obtidos. Então poderemos comparar os valores de tensão medidos para agregados de célula única e mistos. Pretendemos, desta forma, analisar a correspondência de envelopamento e tensão superficial. Então, poderemos validar a hipótese da adesão diferenciada para agregados de hidra.

Para isto, um protocolo de separação de tecidos deve ser elaborado, bem como um protocolo para a obtenção de agregados sadios formados de apenas um único tipo celular. Isto não é completamente óbvio, visto que, células de endoderme não se adaptam no meio de cultura.

No que se refere ao equipamento de medida de tensão superficial, muito tem que ser aprimorado. Primeiramente devemos ter mais cuidado com as superfícies de contato do equipamento com a bolha e o agregado. Não sabemos o tipo de interação existente entre este material e a bolha de ar. Possivelmente, tenhamos que cobrir estas superfícies com materiais cujas afinidades sejam mais conhecidas.

Devemos também introduzir uma forma de seguir temporalmente a resposta mecânica do agregado. Assim, podemos avaliar se sua resposta é realmente bem descrita por uma equação constitutiva típica de sistemas viscoelásticos. Este trabalho será desenvolvido no Laboratório de caracterização de Estruturas Celulares do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Apêndice A

Protocolo de preparação de meio de cultura de hidras (Hydra Medium):

A HM é obtida pela mistura de 5 soluções que devem ser cuidadosamente preparadas:

- **Solução A:**

$NaHCO_3$ 8.4g diluída em 200ml de água destilada

- **Solução B:**

$MgCl_2$ 4.07g diluída em 200ml de água destilada

- **Solução C:**

$MgSO_4$ 1.98g diluída em 200ml de água destilada

- **Solução D:**

KNO_3 0.41g diluída em 200ml de água destilada

- **Solução E:**

$CaCl_2O$ 22.2g diluída em 200ml de água destilada

Em 10l de água destilada misturamos:

- 30ml da solução A
- 10ml da solução B

Apêndice A. Protocolo de preparação de meio de cultura de hidras (Hydra Medium): 78

- 10ml da solução C
- 10ml da solução D
- 10ml da solução E

O pH da HM deve ajustado em 7.0 - 7.4.

Apêndice B

Protocolo de preparação de meio de dissociação (DM):

O meio de dissociação (DM) é composto pela mistura de quatro soluções, que devem ser medidas cuidadosamente:

- **Solução A:**

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnésio) = 0.49g

KCl (cloreto de potássio) = 0.42g

$TES\ buffer = 4.95g$

Tudo diluído em 100ml de água destilada

- **Solução B:**

$NaHPO_4$ (sulfato de sódio) = 0.19g

KH_2PO_4 (fosfato de potássio) = 0.12g

Tudo diluído em 100ml de água destilada

- **Solução C:**

$NaPyruvate = 1.10g$

$Na_3Citrate$ (citrato de sódio) = 2.94g

Tudo diluído em 100ml de água destilada

- Solução D:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (cloreto de calcio) = 0.882g

Diluido em 1020ml de água destilada

Misturar nas seguintes proporções:

- 5% ou 25ml da solução A
- 5% ou 25ml da solução B
- 5% ou 25ml da solução C
- 58% ou 425ml da solução D

O pH da DM deve ser ajustado em 7.0.

Apêndice C

Protocolo para a realização da experiência de dissociação celular:

1. Utilizar hidras que estão em jejum por dois dias, sendo que as mesmas devem ser limpas periodicamente (mesmo nos dias em que não foram alimentadas). Com a pipeta colocar as hidras no prato petry);
2. Cortar pés e cabeças, ir colocando os troncos num tubo de ensaio contendo HM;
3. Quando tiver a quantidade necessária de troncos, trocar aproximadamente 3 vezes a HM;
4. Substituir HM por 5 ml de DM e enxaguar 3 vezes;
5. Colocar os troncos sobre uma superfície de vidro na qual começamos a picá-las. Os pedaços devem ser pequenos, porém não ao ponto de danificar o tecido, ou seja, não devem ficar indistinguíveis, mas com aspecto granular;
6. Colocar a mistura em um tubo de ensaio e adicionar 5 ml de DM gelado ($4^{\circ}C$) e deixar descansar por 30 minutos;
7. Pipetar o líquido para que as forças de cisalhamento ajudem a dissociar as células. Procedimento realizado em aproximadamente 10 minutos. Isto deve ser feito com força, mas sem produção de bolhas. A pipeta deve ter uma pequena abertura;
8. Remover parte do líquido da superfície (fragmentos de células) e ressuspender (pipetar) todo o líquido deixando no fundo aproximadamente 1 ml;
9. Complete com 4 ml de DM no tubo onde deixamos o resto da mistura;
10. Colocar filtro em um novo tubo de ensaio e filtrar o líquido;

Apêndice C. Protocolo para a realização da experiência de dissociação celular: 82

11. Completar o tubo do líquido filtrado com 8 ml de DM, dependendo de quantas hidras utilizamos, podemos fazer vários tubos desta suspensão, tomando cuidado para manter a densidade celular igual para todas;

12. Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos;

13. Devemos ter como resultado um agregado por tubo de ensaio. Deixar descansar no gelo por 30 minutos;

14. É possível cortar os agregados em sub-agregados. Desaconselhamos isto, preferindo fazer mais tubos com concentrações de células menores.

15. 6-8h após o agregado estar pronto, fazer uma troca de todo o DM por HM.

Apêndice D

Cálculo do volume e da área do agregado:

D.1 Cálculo da área do agregado

A área do agregado pode ser calculada como:

$$A = \int 2\pi f(x) \sqrt{1 + [f'(x)]^2} dx$$

lembrando

$$f(x) = \delta + \sqrt{R^2 - x^2}$$

a sua derivada fica

$$f'(x) = \frac{-x}{\sqrt{R^2 - x^2}}$$

então

$$\begin{aligned} f(x) \sqrt{1 + [f'(x)]^2} &= \sqrt{1 + \frac{x^2}{R^2 - x^2}} f \\ &= \sqrt{\frac{R^2}{R^2 - x^2}} f = R \frac{1}{\sqrt{R^2 - x^2}} \left(\delta + \sqrt{R^2 - x^2} \right) = \frac{\delta r}{\sqrt{R^2 - x^2}} + R \end{aligned}$$

substituindo na integral

$$A = 2\pi R_3^2 + 2(2\pi R_2) \int_0^{\frac{l}{2}} dx \left[\frac{\delta}{\sqrt{R^2 - x^2}} + 1 \right]$$

lembrando que

$$R_3 = \delta + \sqrt{R_2^2 - \left(\frac{l}{2}\right)^2}$$

e

$$\delta = (R_1 - R_2)$$

a área finalmente é:

$$A = 2\pi R_3^2 + 2(2\pi R_2) \left[\frac{l}{2} + \delta \arcsin\left(\frac{l}{2R_2}\right) \right]$$

D.2 Cálculo do volume do agregado

Vamos calcular o volume do sólido de revolução

O volume do agregado, representado pelo sólido de revolução acima, pode ser calculado pela integral:

$$V = \int dv = \int r dr d\theta dz$$

Resolvendo a integral em coordenadas esféricas

$$V = \int_0^{2\pi} d\theta \int_{-\frac{l}{2}}^{\frac{l}{2}} dz \int_0^{f(z)} r dr$$

sendo a integral de um ângulo

$$\int_0^{2\pi} d\theta = 2\pi$$

e

$$\int_0^{f(z)} r dr = \frac{f^2(z)}{2}$$

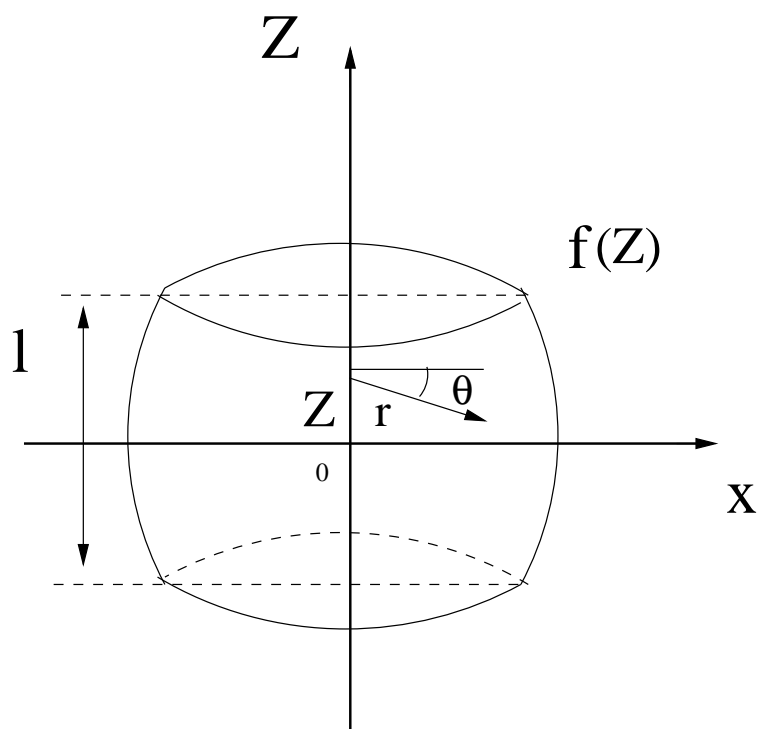


Fig. D.1: *Sólido de revolução*

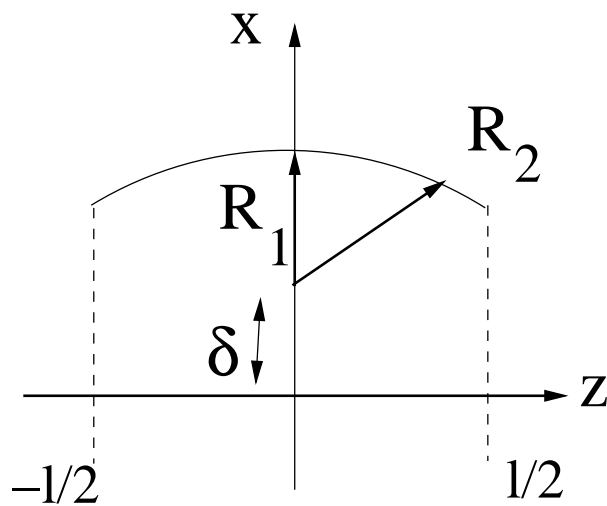


Fig. D.2: *Lateral do sólido de revolução*

analisando a curvatura do sólido

$$R_2^2 = x^2 + z^2$$

$$x = \sqrt{R_2^2 - z_2^2}$$

$$f(z) = \sqrt{R_2^2 - z^2}$$

$$f_t(z) = R_1 - R_2 + \sqrt{R_2^2 - z^2}$$

sendo

$$\delta = (R_1 - R_2)$$

substituindo na integral do volume

$$V = \pi \int_{-\frac{l}{2}}^{\frac{l}{2}} dz (\delta + \sqrt{(R_2^2 - Z^2)^2})$$

como esta função é par, então:

$$V = \pi \int_0^{\frac{l}{2}} dz \left(\delta^2 + 2\delta\sqrt{R_2^2 - Z^2} + R_2^2 - Z^2 \right)$$

$$V = 2\pi \left[(\delta^2 + R_2^2) \int_0^{\frac{l}{2}} dz - \int_0^{\frac{l}{2}} dz Z^2 + 2\delta \int_0^{\frac{l}{2}} dz \sqrt{R_2^2 - Z^2} \right]$$

$$V = 2\pi \left[(\delta^2 + R_2^2) z \Big|_0^{\frac{l}{2}} - \frac{z^3}{3} \Big|_0^{\frac{l}{2}} + 2\delta \int_0^{\frac{l}{2}} dz \sqrt{R_2^2 - z_2^2} \right]$$

$$V = 2\pi \left[(\delta^2 + R_2^2) \frac{l}{2} - \frac{1}{3} \left(\frac{l}{2} \right)^3 + 2\delta \int_0^{\frac{l}{2} R_2} \frac{dz}{R_2} R_2^2 \sqrt{\left(1 - \frac{Z^2}{R_2^2} \right)} \right]$$

Então fazendo algumas substituições a integral fica:

$$V = 2\pi \left[(\delta^2 + R_2^2) \frac{l}{2} - \frac{1}{3} \left(\frac{l}{2} \right)^3 \right] + \delta R_2^2 \left(\frac{l}{2R_2} \sqrt{1 - \frac{l^2}{(2R_2)^2}} + \arcsin \left(\frac{l}{2R_2} \right) \right)$$

Referências Bibliográficas

- [1] STEINBERG M. S. Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. ii. time course of events. *Science*, 131:762–763, 401–408, 1962.
- [2] STEINBERG M. S. On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells, iii. free energy relations and the reorganization of fused, heteronomic tissue fragments. *J. Exp. Zoology*, 48:1769–1776, 1962.
- [3] STEINBERG M. S. Reconstruction of tissues by dissociated cell. *Science*, 141:401–408, 1963.
- [4] STEINBERG M.S. The problem of adhesive selectivity in cellular interactions. In *Cellular Membranes in Development*, 22, pages 321–366. Symp. Soc. Study Dev. Growth, 1964.
- [5] STEINBERG M. S. Does differential adhesion govern self-assembly process in histogenesis? equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cell. *J. Exp. Zoology*, 173:395–434, 1970.
- [6] SCHIEFFERDECKER P.. Methode zur Isolierung von Epithelzellen. *Wiss. Miskr.*, 3:483–484, 1886.
- [7] GRAY J. The properties of an intercellular matrix and its relation to electrolytes. *Br. J. Biol.*, 3:167–187, 1926.
- [8] MOSCONA A. and MOSCONA H. Dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Exp. Cell. Res.*, 3:535–539, 1952.

- [9] RINALDINI L.M. The isolation of from animal tissues. *Int. Rev. Cytol.*, 7:587–647, 1958.
- [10] MOSCONA A. Patterns and mechanisms of tissues reconstruction from dissociated cells. In *Developing cell systems and their control*, pages 45–70. Ronald Press, 1960.
- [11] ALBERTS B., BRAY D, JONHSON A., LEWIS J. RAFF M., ROBERTS K., and WALTER P. *Fundamentos da biologia celular*. Editora Artmed, Porto Alegre, R.S, 3 edition, 1999.
- [12] STEINBERG M. S. On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. population kinetics, differential adhesiveness, and the absence of directed migration. *J. Exp. Zoology*, 48:1577–1582, 1962.
- [13] HOLTFRETER J. Gewebeaffinitat, ein mittel der embryonal formbildung. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 23:169–209, 1939.
- [14] TOWNES P.L. and HOLTFRETER J. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cell. *J. Exp. Zool.*, 128:58–120, 1955.
- [15] HOLTFRETER J. Experimental studies on the development of the pronephros. *Rev. Can. Biol.*, 3:220–250, 1944.
- [16] HARRIS A.K. Is cell sorting caused by differences in the work of intercellular adhesion? a critique of steinberg hypothesis. *J. Theor. Biol.*, 61:267–285, 1976.
- [17] JONES B.M, EVANS P.M, and LEE D.A. Relation between the rate of cell movement under agarose and the positioning of cells in heterotypic aggregates. *Exp. Cell. Res.*, 180:287–296, 1989.
- [18] FRIENDLANDER D.R, MEGE R.M, and ELDELMAN G.M. Cell sorting-out is modulated by both the specificity and amount of different cell adhesion molecules (cam) expressed on cell surfaces. *Proc. Nath. Acad. Sci.*, 86:7043–7047, 1989.

- [19] PHILLIPS H.M and STEINBERG M.S. Equilibrium measurements of embryonic cell chick cell adhesiveness: Shape equilibrium in centrifugal fields. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 64:121–127, 1969.
- [20] PHILLIPS H.M and DAVIS G.S. Embryonic tissues as elasticoviscous liquids ii. direct morphological evidence for slippage in centrifuged aggregates. *Dev. Biol.*, 59:124–134, 1977.
- [21] PHILLIPS H.M and STEINBERG M.S. Embryonic tissues as elasticoviscous liquids i. rapid and show shape changes in centrifuged cell aggregates. *J. Cell. Sci.*, 30:1–20, 1978.
- [22] PHILLIPS H.M and DAVIS G.S. Liquid-tissues mechanics in amphibian gastrulation: germ layer assembly in *Rana pipiens*. *Am. Zool.*, 18:81–93, 1978.
- [23] STEINBERG M.S. and POOLE T.J. Liquid behavior of embryonic tissues. In *Cell behavior*, pages 583–607. Cambridge Univ. Press, 1982.
- [24] FOTY A.R., FORGACS G., PFLEGER C.M., and STEINBERG M.S. Liquid properties of embryonic tissues: measurement of interface tensions. *Physical Review Letters*, 72(14):2298–2301, 1994.
- [25] FOTY A.R., FORGACS G., PFLEGER C.M., and STEINBERG M.S. Surface tensions of embryonic tissues predict mutual envelopment behavior. *Development, Cambridge*, 122(5):1611–1620, 1996.
- [26] RUPPERT E. and BARNER R.D. *Zoologia dos invertebrados*. Guanabara Dois, São Paulo, S.P, 6 edition, 1996.
- [27] TANNER R.I. *Engineering rheology*. Oxford University, New York, N.Y, 1985.
- [28] VERNARD J.K and STREET R.L. *Elementos de mecânica dos fluidos*. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, R.J, 5 edition, 1978.
- [29] MASSEY B.S. *Mecânica dos fluidos*. Fundação Calouste Gulberkian, Lisboa, 6 edition, 2002.

- [30] FEYMANN P.R, LEIGHTON B.R, and MATTHEW B. *The Feymann lectures on physics*, volume 2. Addison-Wesley Publishing Company, de Janeiro, R.J, 1977.
- [31] HALLIDAY D., RESNICK.R, and JEARL W. *Fundamentals of physics*. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, R.J, 6 edition, 2001.
- [32] BASSALO J.M. *Introdução à mecânica dos meios contínuos*. Universidade Federal do Pará, Pará, B.R, 1973.
- [33] NUSSENZVEIG H.M. *Curso de física básica*. Edgard Blucher LTDA, Rio de Janeiro, R.J, 4 edition, 2002.
- [34] FORGACS G., FOTY A.R, SHAFRIR Y., and STEINBERG M.S. Viscoelastic properties of living embryonic tissues:a quantitative study. *Biophysical Journal*, 74:2227–2234, 1998.
- [35] ALBERTS B., JONHSON A., and LEWIS J. *Biologia molecular da célula*. Editora Artmed, Porto Alegre, R.S, 2004.
- [36] MOMBACH J.C.M. *Estudo da formação de padrões celulares biológicos*. PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, novembro 1996.
- [37] STEINBERG M. S. Tissue reconstruction by dissociated cells. *Science, N. Y.*, 141:401–408, 1963.
- [38] FOLKMAN J. and MOSCONA A. Role of cell shape in growth control. *Nature*, 273:345–349, 1978.
- [39] GRAYSON D., PHILLIPS H., and STEINBERG M. Germ-layer surface tensions and tissue affinities in *Rana pipiens* gastrulae quantitative measurements. *Developmental Biology*, 192:630–644, 1997.
- [40] GRIENEISEN V.A. *Estudo do estabelecimento de configurações em estruturas celulares*. PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, novembro 2004.

-
- [41] MOMBACH J.C.M., ALMEIDA R.M.C, THOMAS G.L, UPADHYAYA A., and GLAZIER J.A. Burst and cavity formation in hydra cells aggregates: experiments and simulations. *Exp. Cell. Res.*, 3:535–539, 1952.