

Aline Friedrich Lütz Weizenmann

Difusão de Agregados Celulares de *Hidra vulgaris*

Porto Alegre/RS - Brasil

2022

Aline Friedrich Lütz Weizenmann

Difusão de Agregados Celulares de *Hidra vulgaris*

Dissertação realizada sob a orientação do Prof. Dr. Lívio Amaral com coorientação do Prof. Dr. Leonardo Brunnet e apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Ciência de Material, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais

Orientador: Lívio Amaral

Coorientador: Leonardo Brunnet

Porto Alegre/RS - Brasil

2022

Dedicatória

Gostaria de dedicar este trabalho à minha querida vó, que sempre foi um exemplo de perseverança e vem lutando há meses para se recuperar de diversos problemas de saúde.

Além disso, também gostaria de dedicar esse trabalho ao meu querido amigo e colega Cássio Kirch, falecido em 2019. Um colega sempre prestativo e atencioso, muito inteligente e querido, que infelizmente foi cedo demais.

Agradecimentos

Eu tenho uma lista significativamente grandes de pessoas que eu gostaria de agradecer por tornarem esse trabalho possível, apesar dos revezes que enfrentamos para concluí-lo. Gostaria, é claro de fazer um agradecimento especial aos meus orientadores, pela tremenda paciência e incentivo que permitiram, com todas as dificuldades, que eu não desistisse. Não tenho palavras para dizer o quão fundamental isso foi pra mim. Além disso, recebi muito apoio de toda a minha família, meus queridos pais, marido, irmãs, prima, tias, avós e de todos os amigos que me apoiaram no que eu precisava, em especial a Nicole de March, o Nicolas Mallmann e a Dorcas Casagrande, além da ajuda profissional do meu psicólogo, Leo Azevedo e meu psiquiatra, Guilherme Barbisan, responsáveis por me ajudar a cuidar da minha saúde mental.

Gostaria de agradecer as contribuições diretas e indiretas dos colegas Carine Beatrici, Bernardo Boatini, Emanuel Teixeira e Cássio Kirch (falecido em janeiro de 2019). E ainda as contribuições do professor Olivier Cochet-Escartin, do Institut Lumière Matière, cedendo espécimes de hidras e seu conhecimento na área. Ainda agradeço a Dentista Mirela Starhan por ceder material para que pudéssemos construir parte dos aparatos usados. em nosso estudo

Por fim, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade que tive de entrar em contato com tantas pessoas incríveis que me apoiaram, ensinaram e gastaram seu tempo comigo.

*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento.
(Bíblia, Provérbios 3:13)*

Resumo

A organização das células em organismos multicelulares é um processo presente em fenômenos importantes, como a estruturação de tecidos durante a morfogênese, a cicatrização de feridas, ou ainda a formação de metástases como ocorre em certos tipos de câncer. Alguns animais são conhecidos por exibirem uma grande capacidade de regeneração de células e de reconstrução de tecidos. Desde a metade do século passado várias técnicas experimentais tem sido otimizadas permitindo que a reconstrução de tecidos nestes animais seja observada com microscopia ótica. As hidras de água doce, que são cnidários diploblásticos (dois tecidos embrionários), têm sido crescentemente tomadas como um bom modelo animal para estudos de regeneração de células. Neste trabalho utilizamos hidras geneticamente alteradas que exibem diferente cor de fluorescência para cada tipo de tecido. Após a separação por meios químicos e físicos, foram realizados experimentos de segregação celular. Com aquisição e processamento de imagens foi possível observar o movimento de agregados de diferentes tamanhos. Mediu-se a evolução do desvio quadrático médio dos centros de massa dos agregados de endoderme, que é o tecido que forma a parte interna de uma hidra. A análise dos resultados mostram um desvio quadrático médio constante a tempos curtos, da ordem de 1 min, e um comportamento tipo lei de potência para tempos mais longos. O ajuste desses dados de tempo longo mostra um comportamento levemente subdifusivo para os agregados de tamanhos variando entre 5 e 250 células. Esse ajuste mostra também que a constante de difusão permanece praticamente no mesmo valor para os diferentes tamanhos de agregados observados, em contraste com o que se observaria se os agregados fossem compostos por matéria inativa. Concluímos que essa independência da constante de difusão dos agregados com a massa mostra uma contribuição importante do comportamento coletivo celular, reduzindo as escalas de tempo do fenômeno de segregação.

Abstract

The organization of cells in multicellular organisms is a process present in important phenomena such as the structuring of tissues during morphogenesis, wound healing, or even the formation of metastases as occurs in certain types of cancer. It is known that some animals have a great capacity for tissue regeneration and reconstruction. Since the middle of the last century several experimental techniques have been optimized allowing tissue reconstruction in these animals to be observed with optical microscopy. Freshwater hydras, which are diploblastic (two embryonic tissues) cnidarians, have increasingly been taken as a good animal model for cell regeneration studies. In this work we use genetically altered hydras that exhibit different fluorescence color for each tissue type. After separation by chemical and physical means, cell segregation experiments were performed. With image acquisition and processing it was possible to observe the movement of clusters of different sizes. We measured the evolution of the mean square deviation of the centers of mass of endoderm clusters, which is the tissue that forms the inner part of a hydra. The analysis of the results shows a constant mean quadratic deviation at short times, of the order of 1 min, and a behavior similar to a power law for longer times. The fit of these long time data shows a slightly sub-diffusive behavior for aggregate sizes ranging from 5 to 250 cells. This fit also shows that the diffusion constant remains at about the same value for the different observed cluster sizes, in contrast to what would be observed if the aggregates were composed of inactive matter. We conclude that this independence of the diffusion constant of aggregates with mass shows an important contribution of cellular collective behavior, reducing the time scales of the segregation phenomenon.

Lista de ilustrações

- Figura 1 – Esquema da estrutura de tecidos de uma hidra. Trata-se de um animal diploblástico, ou seja, com duas camadas epiteliais embrionárias. Destas resultam as demais células especializadas responsáveis pelas estruturas detalhadas da cabeça, da base e mesmo das redes neuronais responsáveis pelos movimentos dos tentáculos e do corpo. 11
- Figura 2 – Exemplos de grupos de indivíduos em movimento coletivo. a) Cardumes de lucianos (*Lutjanos kasmira*) do oceano Índico. b) Suspensões de *E. Choli*, linha circular vermelha mostrando o movimento médio do grupo, demais linhas mostrando trajetórias individuais (1). c) Bando de aves marinhas (auklets - *Aethia pusilla* do mar do norte. d) Grupo de estorninhos (*Acridotheres tristis*) no céu de Roma. 15
- Figura 3 – Ordenamento de fase gas-líquido e segregação celular. Parte superior da imagem: Ordenamento de fase no SF6 em baixa gravidade, depois de um resfriamento rápido de 0.7mC abaixo do ponto crítico (45,564 C). Ao final do processo gás e líquido se ordenam, com o líquido molhando as paredes do recipiente e envolvendo a fase gasosa. a, b e c correspondem a 120 s, 275 s e 3960 s após o resfriamento brusco. Na parte inferior: Segregação entre células embrionárias epiteliais pigmentadas (escuras) de aves e células embrionárias neurais da retina de aves (claras). O tamanho médio dos agregados é de 200 μ m. Ao final do processo, células da retina preferencialmente molham o meio de cultura externo que envolve o agregado. a, b e c correspondem a 17 h, 42 h e 73 h após o início da segregação. A imagem original encontra-se no trabalho de Mombach (??) e no trabalho de Beyes e companhia (2). 17
- Figura 4 – Simulação da evolução de segregação por diferença de velocidades (3). Pontos vermelhos representam células mais lentas e pontos azul-esverdeados representam células mais rápidas. Os números indicam a ordem temporal na simulação. Note que o tamanho médio dos agregados é bem definido em cada imagem e cresce ao longo da evolução. 18
- Figura 5 – Imagens de microscópio (10x) de Hidra *vulgaris*. a) Exposição à luz branca. b) Exposição à luz azul (fluorescência na cor verde). c) Exposição à luz verde (fluorescência na cor vermelha). Note a escala na figura. 21

Figura 6 – Configuração do experimento. a) Imagem indicando os poços de diferentes profundidades P_1 ($25 \mu\text{m}$), P_2 ($35\mu\text{m}$), P_3 ($45 \mu\text{m}$) e P_4 ($55 \mu\text{m}$), onde são colodas as amostras de células. b) Uma lâmina é colocada por cima da lâmina contendo os agregados, e fixada usando 2 pedaços finos de fita veda-rosca. Esta configuração evita que os agregados deslizem livremente para fora dos poços. c) As lâminas são colocadas dentro de um petri. Posteriormente esse petri é preenchido com HM. d) Por fim, o petri é colocado no microscópio. Na imagem, é possível ver um feixe de luz azul passando por um dos poços.	23
Figura 7 – Imagens de fluorescência no início de um experimento de segregação celular. À esquerda: imagem diretamente captada pela câmera. À direita: imagem tratada para realce do vermelho.	24
Figura 8 – Experimento de segregação celular em tempos distintos. A imagem à esquerda foi capturada no início do experimento, em $t = 0s$, e a imagem à direita foi capturada em $t = 43min$. As imagens aqui mostradas já passaram pelo tratamento de realce do canal vermelho. Note o acúmulo de células de ecto (verde) junto à borda e no centro, enquanto as células de endo (vermelhas) encontram-se entre as de ecto.	25
Figura 9 – a) Imagem original. b) Imagem tratada para realçar o vermelho e normalizar a luminosidade média segundo uma imagem padrão do mesmo experimento. c) Versão preto e branco (0 ou 1) da imagem superior direita. d) Imagem após aplicação dos filtros <i>dilate</i> e <i>erode</i> sobre a imagem inferior esquerda. Veja texto para detalhes.	26
Figura 10 – a) Imagem original. a) Imagem tratada para aumentar o ganho da imagem. c) Imagem transformada para preto e branco. d) Imagem tratada com filtro para diminuir o ruído na imagem. e) Ilustração de da imagem d) em forma de matriz. f) Nessa imagem cada agregado de valor 1 recebe um índice para podermos identificar diferentes agregados	27
Figura 11 – Deslocamento do centro de massa de um agregado de a) 5, b) 46, c) 82 e e) 217 células em um experimento típico.	29
Figura 12 – Curvas de DQM (em μm^2) versus Δt (em s) em escala logarítmica nos dois eixos. As diferentes curvas representam agregados de diferentes massas. Note a tendência a uma inclinação bem definida para $\Delta t > \sim 30s$. As flutuações ao final das curvas (longo Δt) devem-se ao método de janelamento utilizado.	30

Figura 13 – Expoente (α) ajustado para o DQM como função do número de células (massa) dos agregados. Os pontos mostrados correspondem a médias sobre intervalos de massas: [5:23], [23:40], [40:250] e [250:1000]. A curva laranja corresponde ao valor médio do expoente α , com o último conjunto de pontos excluído. 31

Figura 14 – Constante de difusão ajustada como função das massas dos aglomerados. Como na figura anterior, os pontos mostrados correspondem a médias sobre intervalos de massas: [5:23], [23:40], [40:250] e [250:1000]. A curva laranja é um ajuste linear dos pontos experimentais (em azul) e a curva verde representa o caso $D \sim m^{-1}$, supondo-se que as difusões fossem iguais para a menor massa de agregado medida ($m = 7$). 32

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Motivação	11
2	REVISÃO TEÓRICA	14
2.1	Conceitos Básicos	14
2.2	Revisão Histórica	14
2.2.1	Modelo de Agregado médio (MAM)	17
3	METODOLOGIA	21
3.1	Métodos Experimentais	21
3.2	Experimentos	22
3.3	Tratamento Computacional	23
3.3.1	Desvio Quadrático Médio	27
4	ANÁLISE DE DADOS E DISCUSSÕES	29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	35

1 Introdução

1.1 Motivação

Os mecanismos responsáveis pela forma como as células migram e se organizam em meios biológicos multicelulares envolvem uma série de fenômenos dos quais apenas parte se conhece. Esses mecanismos tem papel central na estruturação dos tecidos durante o processo de morfogênese, na cicatrização de feridas ou ainda na proliferação de células tumorais através do organismo no processo de metástase. Esse sistema tem múltiplas escalas se realimentando: as forças entre células disparam mecanismos genéticos que por sua vez mudam parâmetros macroscópicos, tais como viscosidades e tensões, que voltam a alterar a dinâmica na escala celular (4).

Existem animais conhecidos por sua grande capacidade de regeneração, conseguindo se reconstruir depois de terem suas células completamente separadas. Essa habilidade, além de sua estrutura extremamente simples, faz das hidras uma excelente escolha para o estudo de estruturas celulares, em particular, na formação dos padrões com que se organizam e na sua difusão em agregados de células de diferentes tipos (5). As hidras (veja esquema na Figura 1), cnidários de água doce, tem apenas dois tipos de tecidos embrionários que dão origem a todas as demais células especializadas, a endoderme (tecido interno) e a ectoderme (tecido externo). A partir dos anos 1970, foram desenvolvidos protocolos *in vitro*(6) permitindo que experimentos das fases iniciais da regeneração, a segregação dos tecidos, fossem realizados(7). Isto abriu a perspectiva de se medir o crescimento de

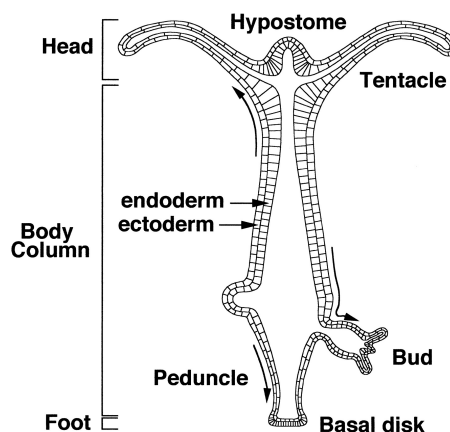


Figura 1 – Esquema da estrutura de tecidos de uma hidra. Trata-se de um animal diploblástico, ou seja, com duas camadas epiteliais embrionárias. Destas resultam as demais células especializadas responsáveis pelas estruturas detalhadas da cabeça, da base e mesmo das redes neuronais responsáveis pelos movimentos dos tentáculos e do corpo.

agregados celulares via microscopia ótica.

A primeira perspectiva teórica para a descrição do processo de separação de tecidos, concebida por Steinberg(8), compara esse fenômeno à coalescência de óleo em água, atribuindo a separação essencialmente a efeitos de fusão de agregados (gotas), minimizando a tensão superficial, com sua fusão posterior difusão, nova fusão e assim sucessivamente. Entretanto, trabalhos experimentais do início da década passada(9) indicam que a evolução temporal do tamanho característico de agregados celulares escala com expoentes superiores ao esperado para a coalescência de óleo em água. Na mesma linha, um trabalho experimental recente de O. Escartin(10) indica que a tensão entre os diferentes tipos de tecido seria suficiente para explicar os padrões de organização em agregados de células de hidra, como proposto por Steinberg, mas insuficiente para explicar as taxas de crescimento de agregados.

No quadro gerado pela descrição de Steinberg está implícita a ideia da difusão térmica de agregados. Para óleo e água o motor da difusão seriam as flutuações térmicas, para os agregados celulares seriam as flutuações de membrana (11). No primeiro caso a difusão de agregados escala com o inverso de sua massa, dada a ausência de correlações entre essas flutuações(12), mas no segundo isso não é tão claro. De fato, essa visão muda com a introdução do conceito de partículas auto-propelentes por Vicsek(13). Ele mostra que introduzindo uma tendência de alinhamento entre as partículas, o sistema passa de uma fase gasosa para uma fase de movimento coletivo, com grandes grupos se deslocando coordenadamente.

Essa ideia foi aplicada com sucesso para a descrição de bandos de pássaros, cardumes de peixes e para aglomerados celulares(14). O comportamento coletivo observado na difusão de agregados em simulações de matéria ativa (15) sugere que o mesmo pode ocorrer com agregados celulares. A possibilidade de que os processos celulares relacionados à embriogênese, câncer e cicatrização sejam naturalmente acelerados por movimento coletivo é uma hipótese tornada plausível por simulações, mas sem comprovação experimental direta. Esse trabalho, portanto, se propõe a estudar essa possibilidade observando a difusão de agregados celulares em experimentos de segregação com hidras.

Neste capítulo, 1, passamos por alguns pontos importantes que motivam nosso estudo, citando rapidamente alguns conceitos importantes que serão explicados com mais detalhes no próximo capítulo, 2. No capítulo 2 abordaremos, então, uma contextualização do tema na qual mostramos conceitos básicos, definições, nomenclaturas e faremos uma retrospectiva de alguns modelos de difusão de agregados celulares tratados na literatura da área. No capítulo 3, são descritos detalhadamente os protocolos para cultura de hidras e preparação das amostras; as características e procedimentos experimentais para captura de imagens; as ferramentas computacionais para tratamentos de imagens e geração de dados a serem usados nas análises, além de descrever os equipamentos utilizados e ferramentas

computacionais para a captura de imagens e tratamento de dados.

No capítulo 4, são apresentados os resultados experimentais, as análises dos mesmos, as simulações dos modelos para difusão, agregação e reconstrução dos tecidos de endoderme e ectoderme. Por fim, no capítulo 5, são apresentadas as sínteses dos resultados e as conclusões.

2 Revisão Teórica

Inicialmente definiremos alguns conceitos que utilizaremos neste trabalho. Posteriormente, vamos contextualizar historicamente o problema da segregação celular e, finalmente, vamos introduzir a abordagem teórica da dinâmica de segregação de agregado médio. Avanços teóricos relativamente recentes usando a abordagem de mecânica estatística para sistemas ativos (biológicos ou não) definiram a linha de Matéria Ativa, com ideias próximas a outros sistemas fora do equilíbrio como Vidros e Meios Granulares. Uma revisão das ideias fundamentais pode ser encontrado na referência (16).

2.1 Conceitos Básicos

Segregação celular: É o processo através do qual tipos específicos de células pertencentes a diferentes tecidos se separam espacialmente.

Partículas ativas: São partículas que se movimentam em uma direção (polarização) com gasto de energia. A direção dessa polarização pode variar randomicamente de forma que a dinâmica de uma partícula isolada é assintoticamente browniana. Partículas ativas apresentam interação de alinhamento, que é a tendência de suas velocidades convergirem quando as partículas estão próximas. Exemplos: células, indivíduos se movimentando em grupo como aves migratórias, cardumes de peixes, etc.

Movimento coletivo: Dependendo das intensidades relativas dos termos browniano e de alinhamento, um agregado de partículas ativas pode espontaneamente alinhar-se para mover-se em um grupo. A emergência desse movimento é uma transição de fases dinâmica (13), com características de a uma transição de fases da termodinâmica de equilíbrio, tendo expoentes críticos com classe de universalidade bem definida nas transições de segunda ordem e clara coexistência de fases nas transições de primeira ordem. A figura 2 mostra quatro exemplos da fase de movimento coletivo.

2.2 Revisão Histórica

Estudos de regeneração celular são bastante antigos, tendo como um de seus precursores Abraham Trembeley(17), que em 1740 consegue registrar em laboratório a regeneração de uma hidra após ser dividida em duas metades, formando em seguida dois indivíduos distintos. Além desse experimento, Trembeley realizou diversos outros estudos com hidras, desenvolvendo e divulgando protocolos experimentais, além de fornecer espécimes para outros pesquisadores. Já em 1886, mais um passo importante é dado

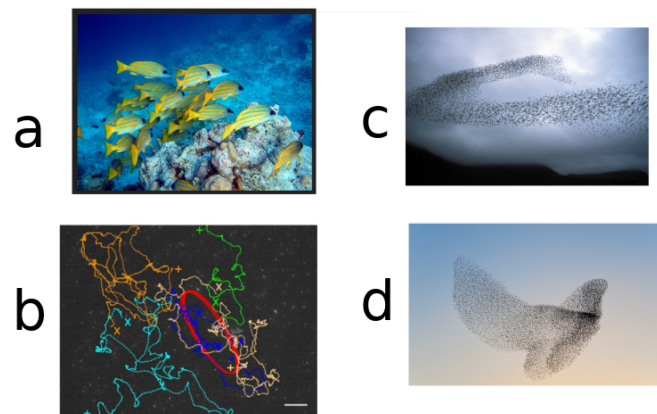


Figura 2 – Exemplos de grupos de indivíduos em movimento coletivo. a) Cardumes de lucianos (*Lutjanos kasmira*) do oceano índico. b) Suspensões de *E. Choli*, linha circular vermelha mostrando o movimento médio do grupo, demais linhas mostrando trajetórias individuais (1). c) Bando de aves marinhas (auklets - *Aethia pusilla* do mar do norte. d) Grupo de estorninhos (*Acridotheres tristis*) no céu de Roma.

quando Schiefferdecker (18) consegue separar tecidos vivos, ao mergulhá-los em um extrato pancreático. Seu trabalho possibilitou a criação de protocolos de dissociação celular, usados nos estudos de segregação celular com hidras. Mais tarde, em 1907, é registrada pela primeira vez o fenômeno de segregação celular, através de um experimento(19) onde as células de esponjas do mar são separadas e misturadas, conseguindo em seguida se reorganizar e formar a estrutura original de uma esponja. Esse experimento tinha a dificuldade de não ser possível se distinguir os tipos de células umas das outras. Por isso, duas hipóteses foram formuladas para explicar a reconstrução da esponja. Uma delas era a *transformação citológica*. Segundo essa hipótese, as células seriam modificadas de acordo com a sua localização dentro do organismo da esponja, assumindo as funções correspondentes. A segunda hipótese era de que ocorreria *difusão* diferenciada das células, dependendo do seu tipo, e assim células de diferentes tipos se reorganizariam dentro da estrutura da esponja, de acordo com suas funções. Essa hipótese foi confirmada com o experimento de Holtfreter e Townes em 1944, (20), num experimento com células de anfíbios. Nesse experimento era possível distinguir as células de diferentes tecidos, por uma diferença na pigmentação. Assim, conseguiram observar as células se difundindo durante a segregação celular, mas ainda não sabiam qual mecanismo era responsável por separar os tecidos.

A partir desse ponto, diversas hipóteses foram sugeridas para explicar a difusão diferenciada, dentre elas:

- Quimiotaxia:

Essa hipótese, formulada em 1952, sugere que células de diferentes tipos se reorganizam de acordo com sinais químicos do meio em torno das células, ou delas próprias.

- Adesão Diferenciada:

Proposta por Steinberg (8) em 1962, essa hipótese considera que células de diferentes tecidos possuem diferentes graus de adesividade. Dessa forma, durante um processo de segregação, células mais adesivas formariam um agregado central envolto por células menos adesivas.

- Contração Superficial

Em contrapartida, Harris propõe uma hipótese em 1976 (21) como forma de crítica à Adesão Diferenciada de Jones. Segundo ele, o poder de contração da membrana das células precisa ser levado em consideração, tendo um papel significativo na segregação celular. Segundo essa hipótese, quanto mais contrativa uma célula em relação à sua superfície exposta, mais interna será sua posição no agregados de células

- Velocidade Diferenciada

Células de diferentes tipos possuem diferentes velocidades. Introduzido por Jones (22) (1989) em decorrência de experimentos onde misturou células de diferentes órgãos de embrião de aves.

Embora tendo sido apresentadas como competindo para explicar os mecanismos de segregação, essas hipóteses podem, de fato, agir em conjunto. Harris (21) havia proposto, em 1976, que a contratilidade diferencial de células seria uma causa mais provável de adesão entre elas do que a hipótese de adesão diferencial de Steinberg(8). Os primeiros trabalhos de simulação com modelo de Potts(23) indicaram que as diferenças nas energias de interação entre as membranas celulares bem como suas flutuações seriam essenciais no fenômeno de segregação. Logo após, Mombach e colaboradores(24) mostraram experimentalmente e em simulações que o movimento de células isoladas era compatível com um movimento browniano(25) e que as flutuações de membrana desempenhavam um papel equivalente ao da temperatura(11). Segundo Winklbauer (26), essas descobertas experimentais, bem como simulações e considerações teóricas posteriores de Brodland (27, 28), reabilitaram a proposta de Harris com uma modificação: ao invés da contratilidade ser um mecanismo alternativo, ela atuaria conjuntamente com a adesão para determinar a ligação entre as células (29, 30).

É importante salientar nesse ponto que nenhuma dessas hipóteses considera a segregação celular de um ponto de vista de matéria ativa, como veremos a seguir, a diferença ocorre nas escalas de tempo do processo. Para tanto, vamos construir um novo referencial teórico.

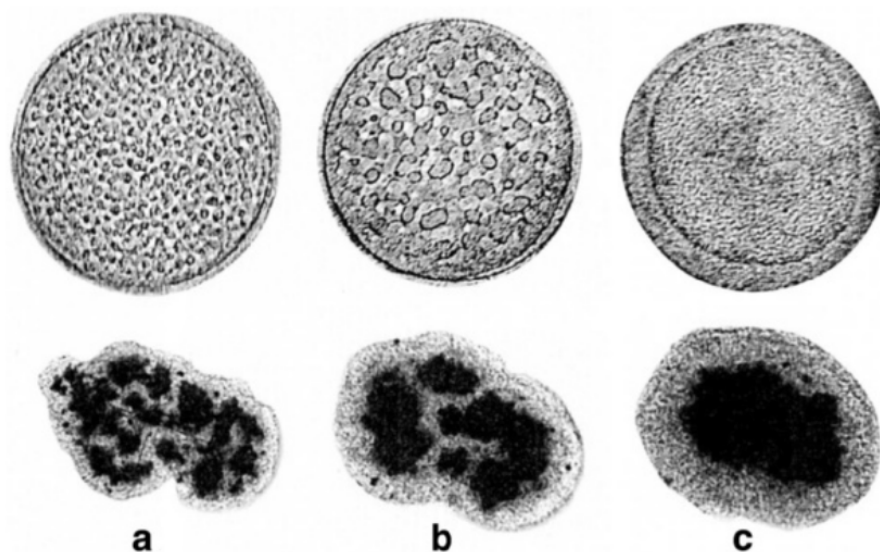


Figura 3 – Ordenamento de fase gás-líquido e segregação celular. Parte superior da imagem: Ordenamento de fase no SF₆ em baixa gravidade, depois de um resfriamento rápido de 0.7mC abaixo do ponto crítico (45,564 C). Ao final do processo gás e líquido se ordenam, com o líquido molhando as paredes do recipiente e envolvendo a fase gasosa. a, b e c correspondem a 120 s, 275 s e 3960 s após o resfriamento brusco. Na parte inferior: Segregação entre células embrionárias epiteliais pigmentadas (escuras) de aves e células embrionárias neurais da retina de aves (claras). O tamanho médio dos agregados é de 200 μ m. Ao final do processo, células da retina preferencialmente molham o meio de cultura externo que envolve o agregado. a, b e c correspondem a 17 h, 42 h e 73 h após o início da segregação. A imagem original encontra-se no trabalho de Mombach (??) e no trabalho de Beyes e companhia (2).

2.2.1 Modelo de Agregado médio (MAM)

A figura 3 compara os fenômenos de ordenamento de fase (parte superior) gás-líquido no composto SF₆ e segregação de células de diferentes tecidos de aves. Na figura 4 são mostradas imagens de uma simulação de segregação por diferença de velocidades em partículas ativas. Independente de detalhes (veja as legendas correspondentes), em todos esses processos o crescimento dos agregados pode ser idealizado como um processo de difusão e fusão. Ou seja, os agregados se difundem, se unem tornando-se irreversivelmente maiores e voltam a se difundir, formando um único agregado ao final. É importante notar que ao longo do processo pode-se atribuir um tamanho característico para os agregados.

No modelo de agregado médio (MAM) as células de ectoderme serão tratadas como um meio em que as células de endoderme se difundem e se unem com outras semelhantes formando aglomerados sucessivamente maiores, com um tamanho característico a cada tempo. Assim, a ideia da aproximação é de que a taxa de crescimento dos agregados de

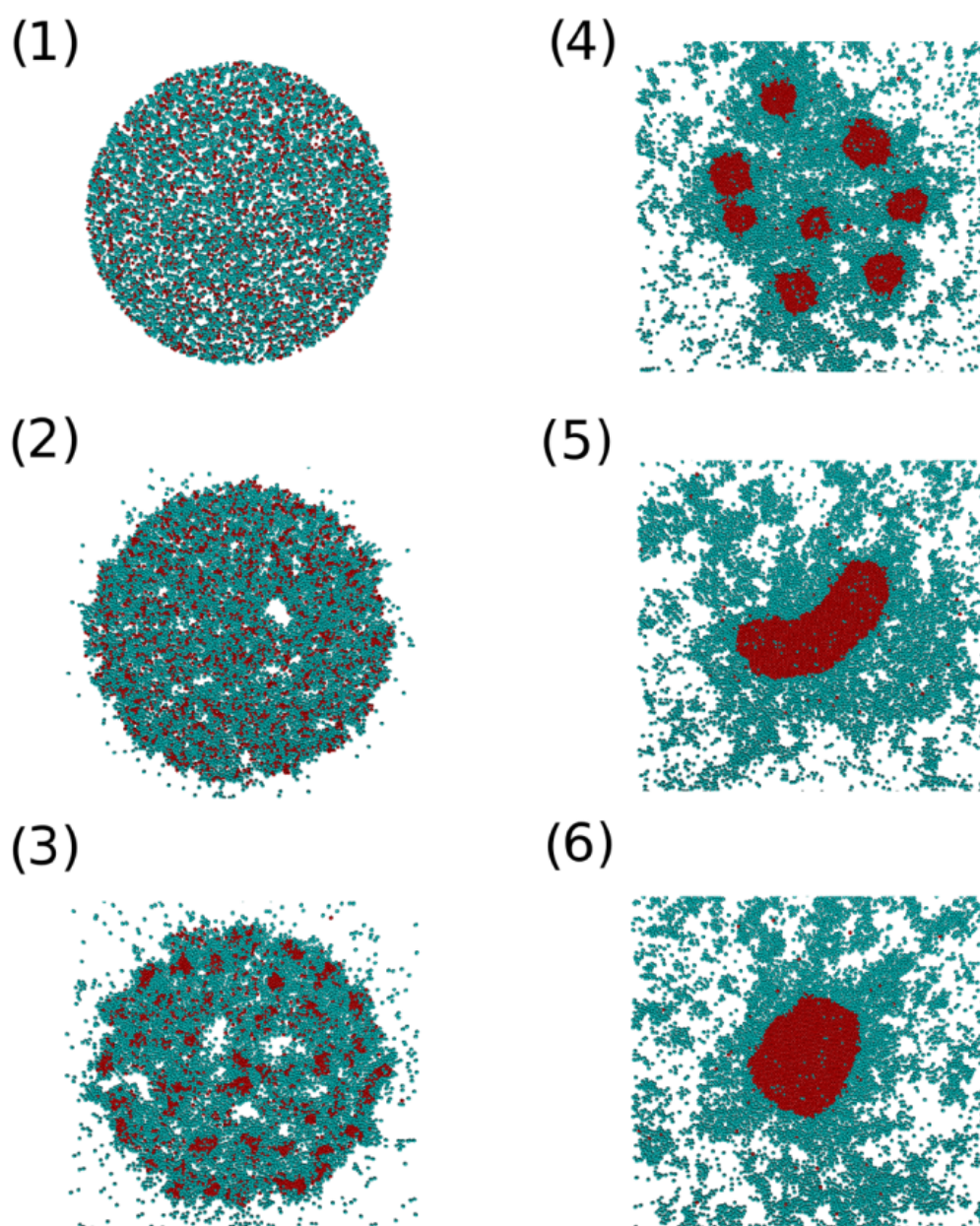


Figura 4 – Simulação da evolução de segregação por diferença de velocidades (3). Pontos vermelhos representam células mais lentas e pontos azul-esverdeados representam células mais rápidas. Os números indicam a ordem temporal na simulação. Note que o tamanho médio dos agregados é bem definido em cada imagem e cresce ao longo da evolução.

endoderme seja proporcional ao tamanho dos mesmos (31). Isto é,

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m}{\tau} \quad (2.1)$$

onde m é o número de células no agregado médio e τ é um tempo característico para o encontro de agregados. Por tratar-se de um processo difusivo, esse tempo, τ , depende do quadrado das distâncias típicas entre agregados e da constante de difusão,

$$\tau \propto \frac{L^2}{D(m)} \quad (2.2)$$

sendo a constante de difusão usualmente uma função do número de células, m , do agregado. Genericamente, pode-se escrever a relação:

$$D(m) \propto m^\beta \quad (2.3)$$

onde, o parâmetro β é o expoente associado à difusão de um agregado de massa m . Na ausência de movimento coletivo, ou seja, para agregados de partículas inativas espera-se $\beta = -1$ (32), ou seja, que a constante de difusão seja inversamente proporcional ao número de células do agregado (portanto, inversamente proporcional à massa). Mas, para o caso de matéria ativa, esta relação pode ser diferente, pois agregar um ou mais elementos ativos a um grupo em movimento coletivo não necessariamente diminui sua constante de difusão, podendo mesmo aumentá-la (33).

Usando a relação 2.3 e a distância característica entre agregados pode-se estimar o tempo τ como função do número de células do agregado. A distância média, L , entre agregados está relacionada com sua fração volumétrica, n/V , onde n é o número de agregados e V o volume do sistema. Como o número de células é suposto constante no processo, a distância L média entre agregados pode ser obtida da densidade de células,

$$\rho = \frac{N}{V}$$

onde N é o número total de células de ectoderme no sistema, que está relacionado com o número de agregados pela relação, $N = nm$, ou seja,

$$L = \left(\frac{V}{n}\right)^{1/d} = \left(\frac{m}{\rho}\right)^{1/d}$$

sendo d a dimensão do espaço considerado.

Pode-se, então, obter o tempo característico entre colisões, τ , a partir da expressão acima e da relação 2.2:

$$\tau \propto \frac{L^2}{D} = m^{\frac{2}{d}-\beta} \rho^{-\frac{2}{d}}$$

substituindo-se na equação 2.1 pode-se integrá-la, resultando na relação

$$m(t) \sim t^{d/(2-d\beta)} \quad (2.4)$$

indicando que o crescimento do agregado é dado por uma lei de potência, que depende da dimensão do sistema e do expoente β . Segundo essa relação, no caso de um sistema tridimensional (bidimensional) com partículas inativas ($\beta = -1$), a massa escalaria com o tempo com um expoente $3/5$ ($1/2$ em 2d), enquanto que, em um caso onde a difusão não dependesse da massa, este expoente seria $3/2$ (1 em 2d).

Assim, o parâmetro β que relaciona difusão de agregado e sua massa, determina diretamente o expoente de crescimento temporal desses agregados e, portanto, a velocidade com que ocorre a segregação. É este expoente que nos propomos a medir experimentalmente neste trabalho.

Uma hipótese básica do modelo de MAM é de que os agregados de endoderme estão bem diluídos em um meio e que as escalas de tempo de arredondamento são menores do que as de encontro de dois agregados. Mesmo que as proporções entre ectoderme e endoderme não estejam no limite de alta diluição, isto pode ser confirmado para os tempos iniciais de segregação, quando temos muitos pequenos agregados. Em um trabalho publicado em 2002(34), J.P. Rieu mostra que o processo inicial de segregação efetivamente é por fusão/difusão e que no processo final, quando restam poucos agregados grandes, as escalas de tempo de arredondamento são mais lentas. Ele mostra que o arredondamento ocorre exponencialmente e que o tempo característico depende diretamente do raio do agregado. Para grandes agregados (da ordem de 3000 células) o tempo característico é da ordem de horas e para pequenos agregados (5 a 50 células) esse tempo é da ordem de minutos. Esse resultado é fundamental para podermos estabelecer limites temporais para os quais consideraremos dominantes os processo de difusão ou de arredondamento no experimento.

No próximo capítulo vamos descrever a metodologia utilizada para os experimentos de segregação e as medidas realizadas.

3 Metodologia

3.1 Métodos Experimentais

Este capítulo descreve os métodos usados para preparar os experimentos de regeneração de hidras, bem como o processo de obtenção e tratamento de imagens desenvolvidos para análise de dados do presente trabalho.

As hidras utilizadas neste estudo são da espécie *vulgaris*, geneticamente modificadas para exprimir proteínas que fluorescem nas cores verde e vermelho (na sigla em inglês, Green Fluorescent Protein - GFP e Red Fluorescent Protein - RFP). As células de endoderme fluorescem na faixa do vermelho quando expostas à luz verde e as células de ectoderme fluorescem na faixa do verde ao serem expostas à luz azul (veja Figura 5). Essas hidras foram gentilmente cedidas por colaboradores do Instituto Lumière Matière da Universidade Claude Bernard Lyon 1.

Seguimos o protocolo de Lommis e Lenhof (17), mantendo as hidras à 18°C em recipientes de vidro contendo o meio de cultura, Hydra Medium, (HM). Esse meio é composto de uma solução concentrada de NaHCO₃ (18,92%), MgCl₂.6H₂O (9,156%), MgSO₄ (4,339%), KNO₃ (1,366%), CaCl₂.2H₂O (66,22%). Posteriormente, para uso, a solução é diluída na proporção 20ml para cada 20L de água destilada, com pH ajustado para 7 (neutro). As hidras são alimentadas de uma a duas vezes por semana com artêmias salinas recém eclodidas.

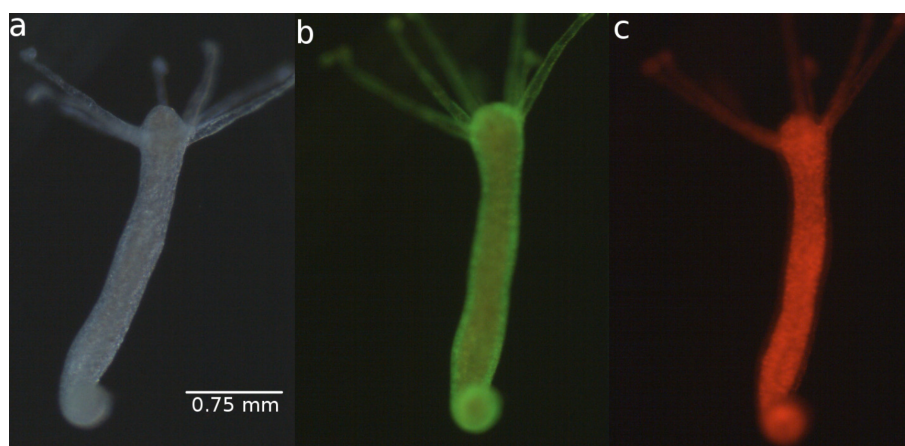


Figura 5 – Imagens de microscópio (10x) de *Hydra vulgaris*. a) Exposição à luz branca. b) Exposição à luz azul (fluorescência na cor verde). c) Exposição à luz verde (fluorescência na cor vermelha). Note a escala na figura.

3.2 Experimentos

Para estarem prontas para iniciar o processo de regeneração, todas as células do tronco da hidra são separadas, misturadas, centrifugadas e incubadas. Para isto são usados dois meios: HM e um meio de dissociação(6) (na sigla em inglês, DM). No experimento usamos entre 20 e 50 hidras, deixadas em jejum nas 24h a 48 horas anteriores.¹ Detalhamos abaixo o procedimento realizado ao longo de um experimento típico:

- Com bisturi, separa-se o tronco da cabeça e do pé de cada hidra. Coloca-se apenas os troncos em uma placa de Petri.
- Com uma pipeta colocam-se os troncos em um tubo de ensaio que contém 5ml de HM a 4°C.
- Espera-se decantar e lava-se por 3 vezes com HM a 4°C para limpeza. Esse procedimento é feito com uma pipeta com volume suficiente para esvaziar o tubo de ensaio.
- Após a terceira lavagem, esvazia-se e coloca-se DM a 4°C. Posteriormente, lava-se mais duas vezes com 5ml de DM a 4°C cada vez. Finalmente, preenche-se o recipiente com 5ml de DM 4°C.
- Incuba-se o tubo de ensaio com os troncos à temperatura de 4°C por 20 min em DM.
- Retalham-se os troncos com bisturi em uma placa de Petri.
- Troca-se o meio de dissociação (DM) inserindo um novo à temperatura de 4°C.
- O meio deve começar a ficar turvo devido ao início da dissociação. Então, repetidamente, sugamos e expelimos o líquido com as células provocando um fluxo cisalhante para desmanchar as ligações entre as células. Deve-se tomar cuidado para não introduzir bolhas de ar nesse processo.
- O líquido é passado por um filtro de 40 micrômetros de diâmetro e, então, centrifugado por 7 min.
- Incubação à temperatura de 4°C por 30 min.
- Agregado resultante é retirado do fundo do tubo da centrífuga, colocado em uma placa de Petri e retalhado.
- Os pequenos agregados são sugados com uma agulha hipodérmica (0,35mm de diâmetro) e depositado em poços de 1mm de largura de uma lâmina de vidro.

¹ Isto é feito para que a cavidade responsável pela digestão esteja vazia no momento do animal ser cortado.

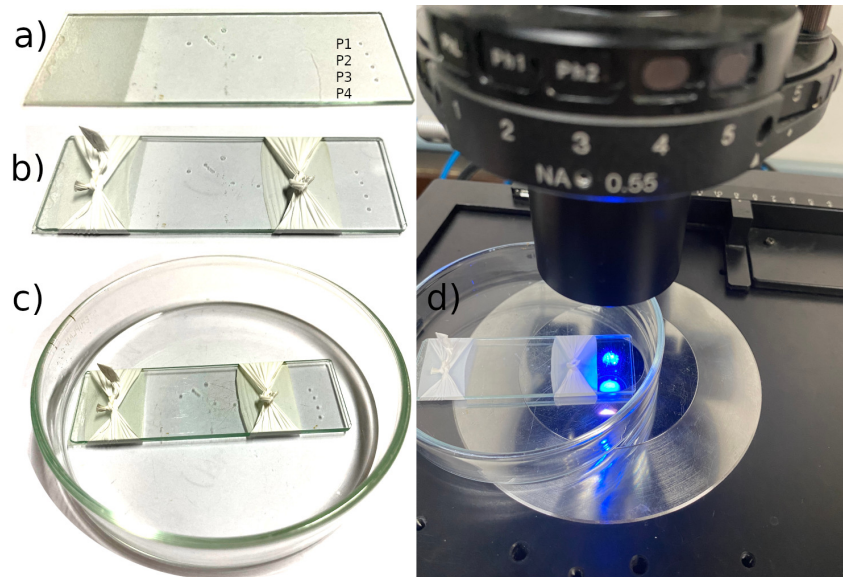


Figura 6 – Configuração do experimento. **a)** Imagem indicando os poços de diferentes profundidades P_1 ($25 \mu\text{m}$), P_2 ($35 \mu\text{m}$), P_3 ($45 \mu\text{m}$) e P_4 ($55 \mu\text{m}$), onde são colodas as amostras de células. **b)** Uma lâmina é colocada por cima da lâmina contendo os agregados, e fixada usando 2 pedaços finos de fita veda-rosca. Esta configuração evita que os agregados deslizem livremente para fora dos poços. **c)** As lâminas são colocadas dentro de um petri. Posteriormente esse petri é preenchido com HM. **d)** Por fim, o petri é colocado no microscópio. Na imagem, é possível ver um feixe de luz azul passando por um dos poços.

- A lâmina com os poços é recoberta com outra lâmina de mesmo tamanho.
- As duas lâminas são presas entre si com fita de vedação hidráulica (Poli-Tetra-Fluor-Etileno).
- Para levar ao microscópio, as lâminas são colocadas dentro de um placa de Petri e imersas em HM.
- A captura de imagens é feita com uma câmera UI-1490SE-C da IDS-ImagingTM (resolução 3840×2748 , colorida, CMOS) acoplada a um microscópio invertido IX70 da OlympusTM.

Foram realizados 6 experimentos para fazer as análises de difusão. Nesses experimentos, observamos agregados com tamanhos variando entre 5 e 1000 células. Descrevemos a seguir como tratamos as imagens para identificar esses agregados.

3.3 Tratamento Computacional

Para o tratamento das imagens e análise de dados, diversos programas foram desenvolvidos de forma a permitir o reconhecimento automático de grupos celulares e o

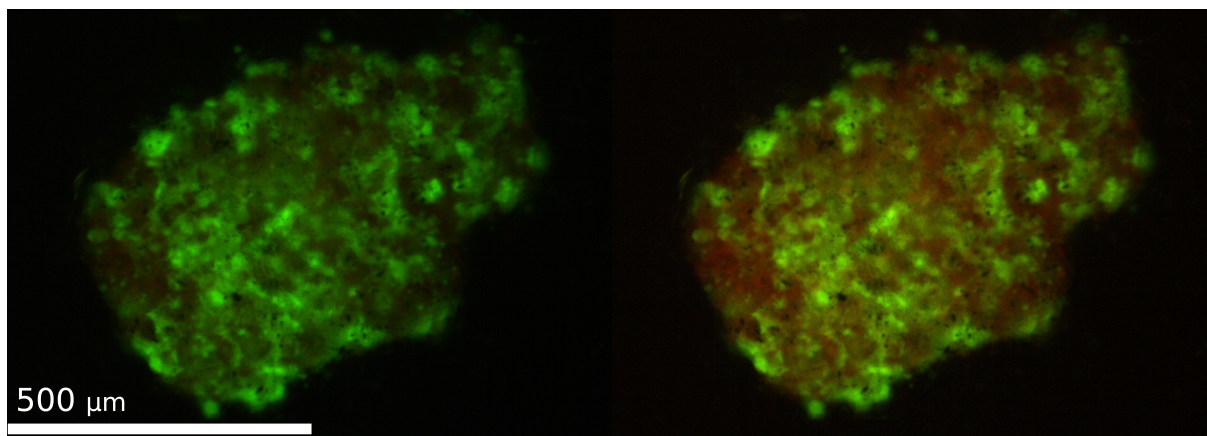


Figura 7 – Imagens de fluorescência no início de um experimento de segregação celular. À esquerda: imagem diretamente captada pela câmera. À direita: imagem tratada para realce do vermelho.

seu deslocamento dentro do conjunto de células. Esses programas foram escritos dentro de dois ambientes de trabalho: Octave e Python. Ambos são ambientes de acesso aberto. Todos os programas utilizados neste trabalho podem ser acessados no repositório público Gitlab do Laboratório de Estruturas Celulares².

As imagens são projetadas sobre a grade de fotossensores da câmera do microscópio em 3 canais de cores (vermelho, verde e azul) com uma resolução de 3840x2748 para cada cor. Cada ponto da imagem é chamado pixel. Assim, cada pixel tem 3 canais de cores. Na câmera utilizada nos experimentos, cada canal discretiza a intensidade de cor em 256 níveis. A cada nível é associado um número inteiro entre 0 e 255. Os valores dos canais de cores de cada pixel são varridos sequencialmente (isto é, linha a linha) na grade de fotossensores da câmera e enviados para o computador que os guarda em um arquivo. Ao abrir este arquivo nos ambientes Octave ou Python, carregam-se os dados sobre três matrizes de 3840x2748, uma para cada cor.

A primeira etapa do processo de tratamento das imagens é a normalização da luminosidade das fotos. A luminosidade média de cada imagem é calculada e corrigida para o valor de referência obtido no início do experimento. Esse ajuste é importante, pois existe uma variação significativa de luminosidade ao longo dos experimentos devido à redução da fluorescência ao longo do processo (desbotamento). O algoritmo para a correção é o seguinte:

- Leitura do primeiro arquivo em ambiente Octave e atribuição dos dados a três matrizes, uma para cada cor, com a resolução da imagem.
- Cálculo do valor médio de intensidade de cada cor.

² <https://gitlab.com/labcel/hidras/experimentos>

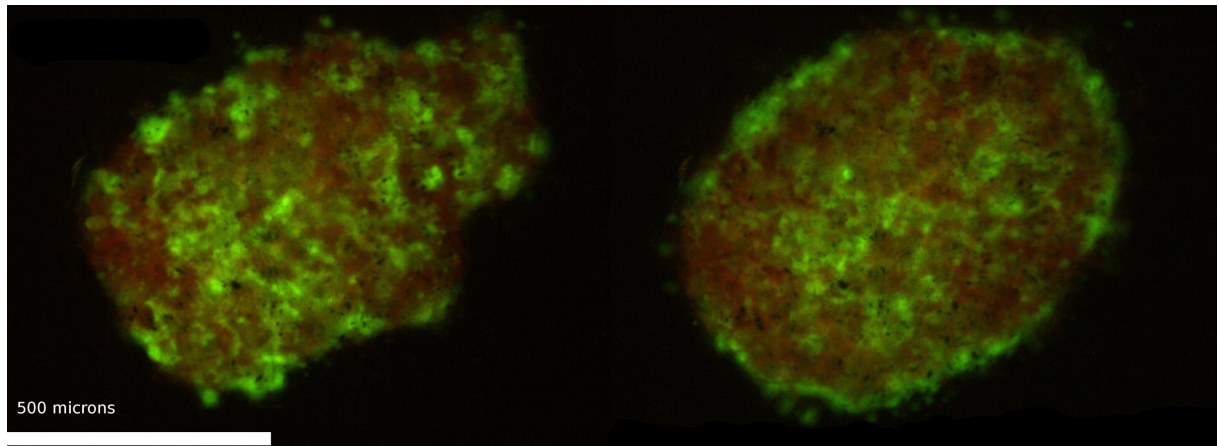


Figura 8 – Experimento de segregação celular em tempos distintos. A imagem à esquerda foi capturada no início do experimento, em $t = 0s$, e a imagem à direita foi capturada em $t = 43min$. As imagens aqui mostradas já passaram pelo tratamento de realce do canal vermelho. Note o acúmulo de células de ecto (verde) junto à borda e no centro, enquanto as células de endo (vermelhas) encontram-se entre as de ecto.

- Leitura das imagens subsequentes e multiplicação de cada matriz por um fator constante de forma a obter a mesma intensidade média por cor da imagem original.
- A cor vermelha é tratada separadamente usando-se um fator de correção maior do que nos outros canais. (veja a figura 9b)

O passo seguinte consiste em destacar a endoderme, pois se quer medir a evolução do tamanho dos agregados deste tipo de célula. ectoderme e desconsiderar a interface entre ectoderme e o meio, por isso as medidas são feitas com agregados de endoderme.

Para destacar a endoderme (canal vermelho), zeramos os canais verde azul e, posteriormente, escolhemos um limiar para obter uma imagem binária (apenas preto e branco). Para essa escolha, utilizamos a função *graythresh* do Octave ³, que otimiza a escolha do limiar de binarização, de forma que, tudo que esteja acima do limiar terá valor 1 (branco) e abaixo, 0 (preto). Assim, agora temos para cada imagem apenas uma matriz de resolução 3840x2748 pixels, onde cada elemento vale 0 ou 1.

Como resultado do processo de binarização, surgem falhas de continuidade e superfícies rugosas nas imagens dos agregados. Para suavizar as bordas e preencher essas falhas, é aplicado o filtro *dilate*⁴ do Octave. Para minimizar o ruído, ou seja, eliminar pontos isolados, é aplicado o filtro *erode*⁵ também do Octave. Esse procedimento é realizado em uma imagem típica do experimento e iterado até que a imagem obtida seja compatível

³ octave.sourceforge.io/image/function/graythresh.html

⁴ octave.sourceforge.io/image/function/imdilate.html

⁵ octave.sourceforge.io/image/function/imerode.html

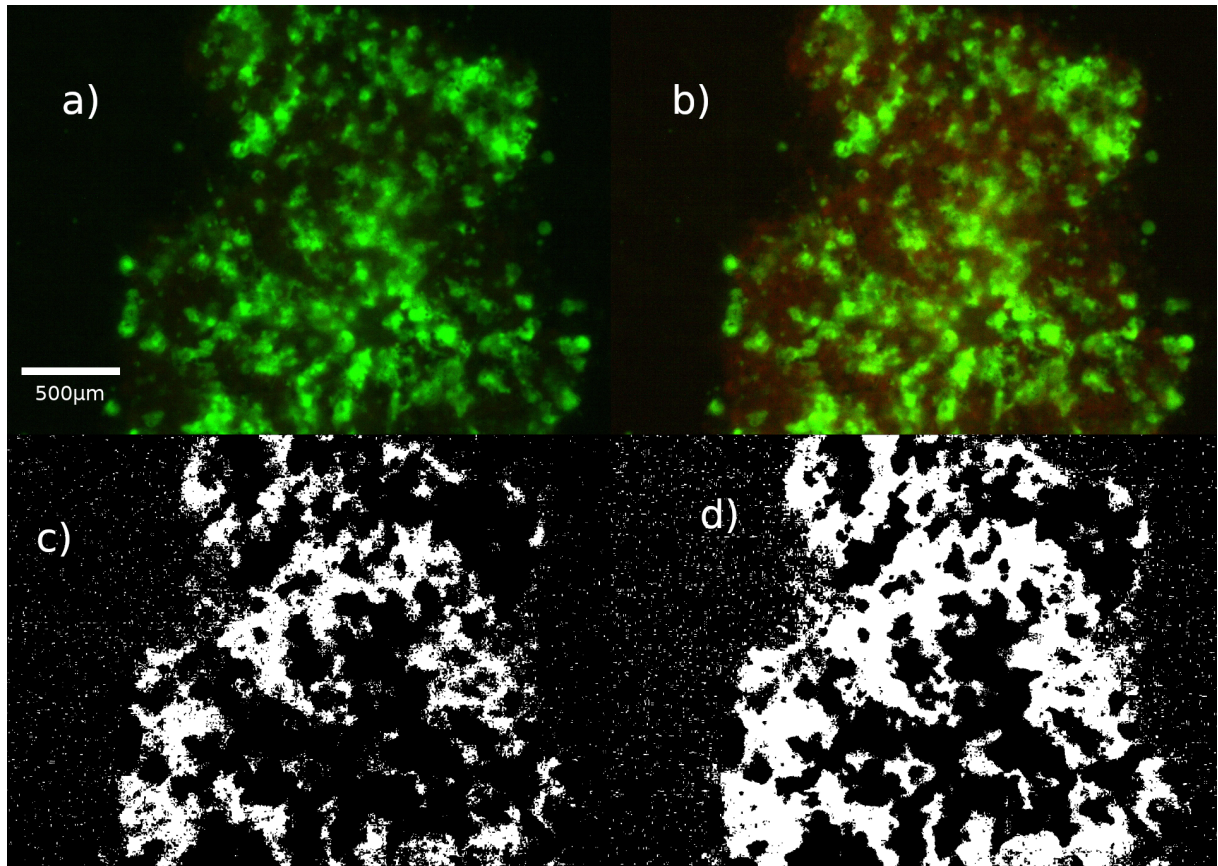


Figura 9 – a) Imagem original. b) Imagem tratada para realçar o vermelho e normalizar a luminosidade média segundo uma imagem padrão do mesmo experimento. c) Versão preto e branco (0 ou 1) da imagem superior direita. d) Imagem após aplicação dos filtros *dilate* e *erode* sobre a imagem inferior esquerda. Veja texto para detalhes.

com a imagem vermelha original. Posteriormente, o mesmo procedimento é repetido para todas as imagens.

A seguir passamos à identificação dos diferentes agregados na imagem. O algoritmo para tal consiste em:

- Varrer a matriz binária, atribuindo índices inteiros em ordem crescente a cada pixel não nulo encontrado.
- Varrer novamente a matriz, verificando os vizinhos de cada pixel não nulo e atribuindo a todos esses o menor índice entre os presentes.
- Repetir esse procedimento até que não haja mais mudanças na matriz.

A matriz obtida ao final desse processo chamamos Matriz de Agregados (MA). A sequência descrita acima está ilustrada na figura 10d. A biblioteca *bwlabel*⁶ do Octave usa o algoritmo

⁶ octave.sourceforge.io/image/function/bwlabel.html

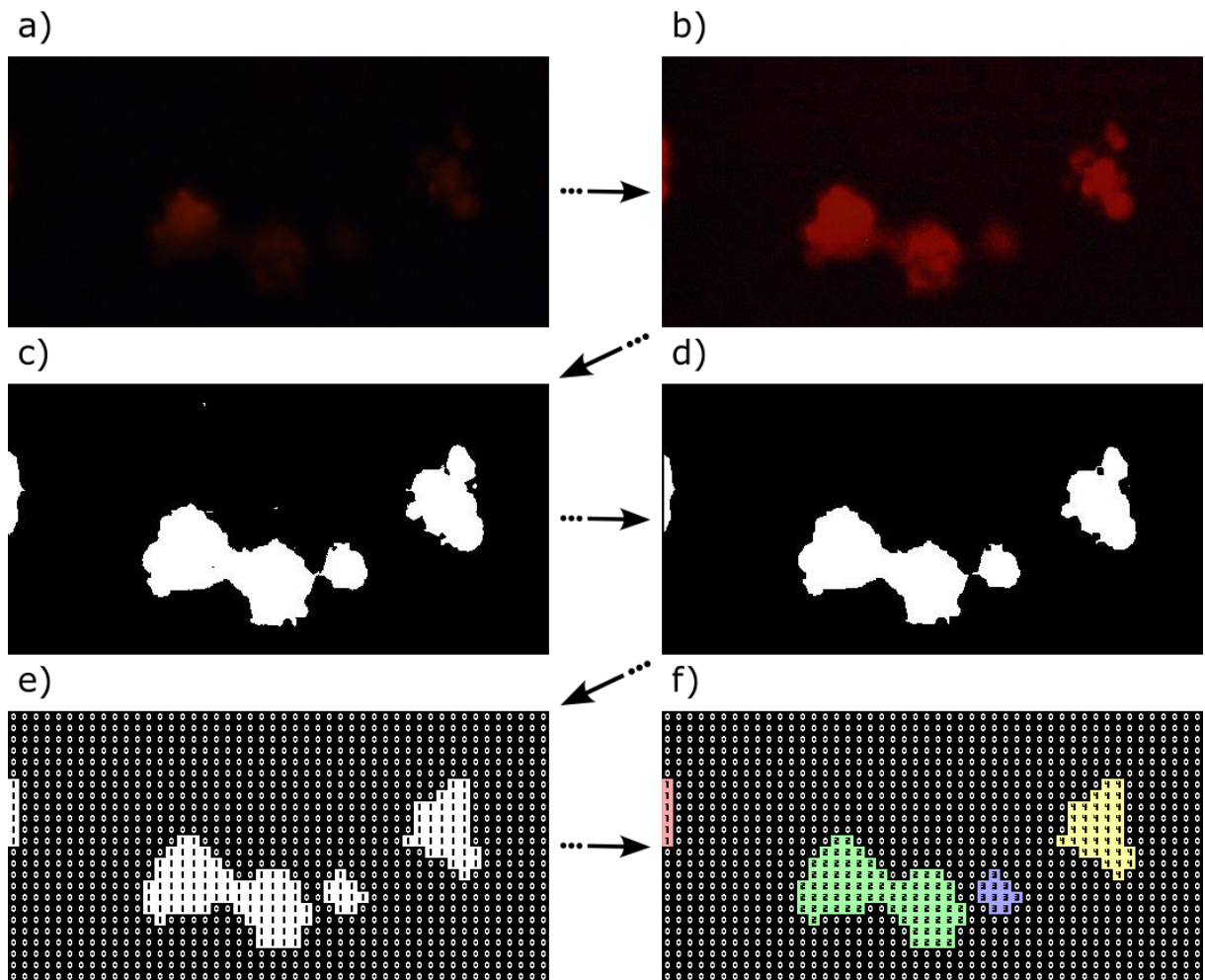


Figura 10 – a) Imagem original. a) Imagem tratada para aumentar o ganho da imagem. c) Imagem transformada para preto e branco. d) Imagem tratada com filtro para diminuir o ruído na imagem. e) Ilustração de da imagem d) em forma de matriz. f) Nessa imagem cada agregado de valor 1 recebe um índice para podermos identificar diferentes agregados

descrito acima. A figura 10d ilustra essa etapa.

3.3.1 Desvio Quadrático Médio

As matrizes (MA) obtidas após o tratamento descrito na seção anterior fornecem as informações relevantes para a medida da evolução temporal do desvio quadrático médio (DQM) do centro de massa dos agregados de endoderme. O maior índice em uma dada matriz indica o número de agregados encontrados. O número de índices de um dado valor indica o tamanho do agregado. A posição de cada pixel na matriz está diretamente relacionada com sua posição na imagem. A cada $20 \mu\text{m}$ de distância sobre a lâmina correspondem 1000 pixels. Dessa forma, pode-se obter o centro de massa de cada agregado em pixels e convertê-lo em micra, se necessário.

Os cálculos da evolução do DQM para agregados de diferentes tamanhos ao longo da sequência de imagens de cada experimento foram feitos usando o ambiente de programação Python (35). O algoritmo utilizado para identificar os agregados nas diferentes imagens e rastrear a posição de seu centro de massa foi o seguinte:

- Identificar cada agregado em imagens diferentes usando a posição do centro de massa e o tamanho dentro de uma certa tolerância.
- Anotam-se as posições dos centros de massa, o tempo (número da imagem) e a massa do agregado.
- No caso de haver fusão de agregados, inicia-se um novo rastreamento.

Uma vez definida a trajetória do centro de massa de um agregado, utiliza-se um método de janelamento para determinar a evolução temporal do seu desvio quadrático médio. A ideia por trás dessa técnica é considerar cada ponto da trajetória $r(t)$ como um possível ponto inicial para a medida e calcular o desvio quadrático com relação a essa posição um tempo Δt após, ou seja, $(r(t + \Delta t) - r(t))^2$. Repete-se o procedimento para o próximo intervalo Δt , $(r(t + 2\Delta t) - r(t + \Delta t))^2$ e assim sucessivamente. Dessa forma, se o tempo total de difusão desse agregado for T , teremos $n \equiv T/\Delta t$ medidas do desvio quadrático para este intervalo de tempo. Podemos, então, calcular o DQM para o intervalo Δt como a média definida por:

$$\Delta r^2(\Delta t) = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n-1} (r((i+1)\Delta t) - r(i\Delta t))^2 .$$

Nesse método a amostragem estatística para o cálculo do DQM é grande quando $\Delta t \ll T$. Com o aumento do intervalo Δt , essa amostragem diminui. Portanto, esperam-se mais flutuações no DQM para valores de Δt da ordem da extensão temporal da trajetória, T .

No próximo capítulo mostraremos as curvas obtidas para o desvio quadrático médio para os diferentes tamanhos de agregados e analisaremos os comportamentos obtidos.

4 Análise de Dados e Discussões

Apresentaremos neste capítulo a evolução temporal do centro de massa dos diferentes agregados de endoderme observados no experimento. Mostraremos as curvas do desvio quadrático médio (DQM), interpretando os dados no contexto do modelo do agregado médio (31).

Um caso típico de difusão do centro de massa de um agregado é apresentado na figura 11. O gráfico mostra as coordenadas em micrômetros de um grupo que possui 82 células (diâmetro $\sim 180\mu m$). Para se ter uma noção das dimensões envolvidas nesse caso, o conjunto de células de endo e ectoderme em uma monocamada do experimento tem extensões no intervalo $[700 - 1000] \mu m$ (vide Fig. 7). Na imagem mostrada, o centro de massa desloca-se em até $40\mu m$ ao longo dos ~ 15 min em que o agregado manteve-se com a mesma massa.

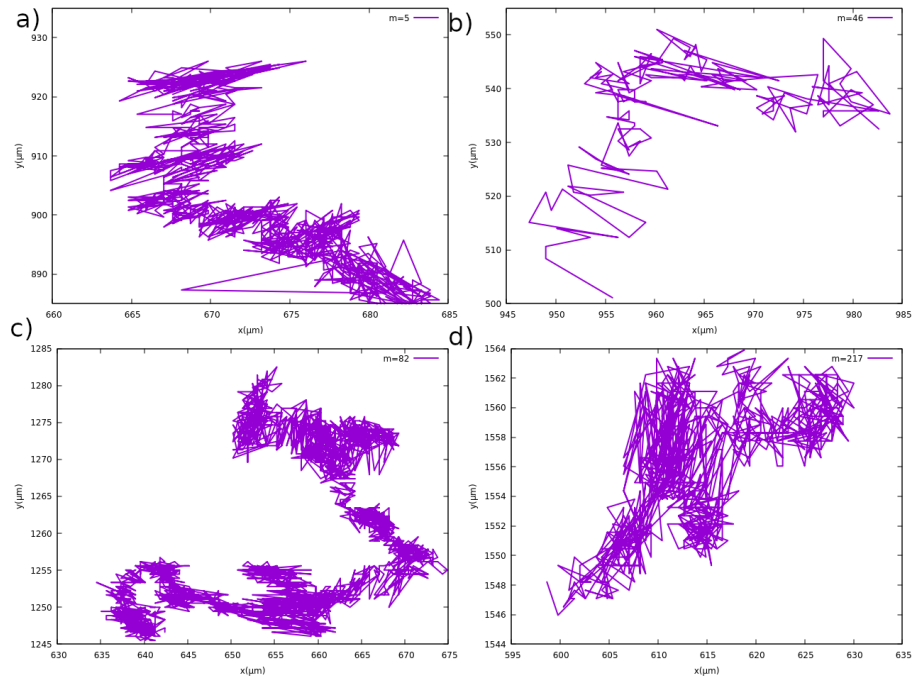


Figura 11 – Deslocamento do centro de massa de um agregado de a) 5, b) 46, c) 82 e e) 217 células em um experimento típico.

A figura 12 mostra algumas curvas de DQM (em μm^2) para agregados de diferentes tamanhos como função do intervalo de janelamento Δt (em s). O gráfico está em escala logarítmica nos dois eixos. Para tempo curto, as curvas apresentam-se quase horizontais. Atribuímos duas hipóteses para esse comportamento: i) os agregados tem um tempo característico de aprisionamento (*caging*, em inglês); ii) erro na determinação dos contornos do cluster com conseqüente flutuação na posição do centro de massa. Por não ser o foco

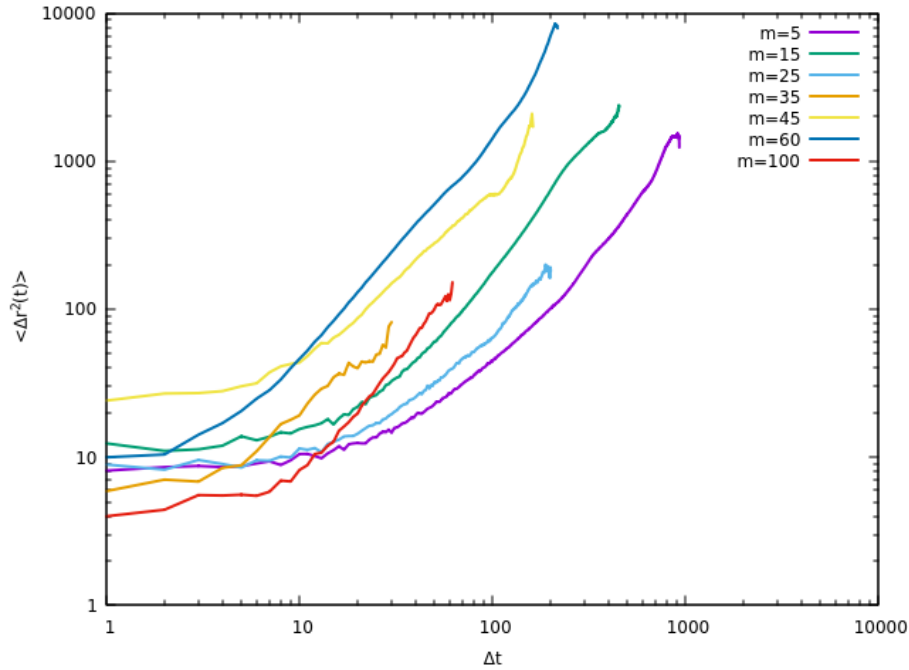


Figura 12 – Curvas de DQM (em μm^2) versus Δt (em s) em escala logarítmica nos dois eixos. As diferentes curvas representam agregados de diferentes massas. Note a tendência a uma inclinação bem definida para $\Delta t > \sim 30s$. As flutuações ao final das curvas (longo Δt) devem-se ao método de janelamento utilizado.

deste trabalho, deixaremos em aberto essa questão para ser explorada em trabalhos futuros. Para intervalos mais longos ($\Delta t > \sim 30s$) há um claro crescimento do desvio quadrático com uma inclinação razoavelmente bem definida, sugerindo uma descrição por leis de potência. As flutuações ao final dessas curvas são devidas à redução da amostragem decorrente do método de janelamento, como foi observado ao final do capítulo anterior.

A seguir, desprezando a parte horizontal das curvas, ajustamos o deslocamento quadrático médio usando leis de potência do tipo:

$$\Delta r^2 = D\Delta t^\alpha \quad (4.1)$$

onde o expoente α indica se o processo é difusivo (caso $\alpha = 1$), subdifusivo (caso $\alpha < 1$) ou superdifusivo (caso $\alpha > 1$). D é o coeficiente de difusão associado.

A figura 13 mostra os valores obtidos para o expoente α . O ajuste usando a equação 4.1 sobre os dados experimentais mostra uma grande flutuação nos parâmetros. Para reduzir as flutuações encontradas no ajuste usando a equação 4.1 fizemos médias desses valores sobre intervalos de massas: [5:23], [23:40], [40:250] e [250:1000]. Esses intervalos foram escolhidos em tamanhos sucessivamente maiores pois o número de agregados disponíveis diminui com o tamanho. Com essa escolha os desvios obtidos no ajuste são semelhantes. O último grupo de agregados foi excluído do ajuste, pois tratam-se de agregados grandes que ocorrem cerca de 1h após o início da segregação e onde os efeitos de arredondamento

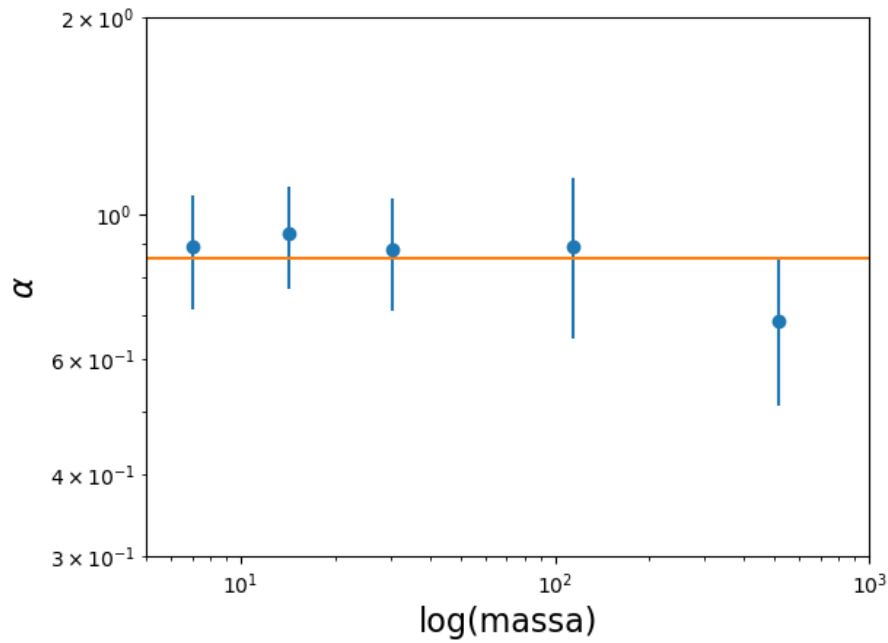


Figura 13 – Expoente (α) ajustado para o DQM como função do número de células (massa) dos agregados. Os pontos mostrados correspondem a médias sobre intervalos de massas: [5:23], [23:40], [40:250] e [250:1000]. A curva laranja corresponde ao valor médio do expoente α , com o último conjunto de pontos excluído.

passam a ser importantes(34). A reta de ajuste mostrado em laranja na figura indica um regime ligeiramente subdifusivo ($\alpha \sim 0.9 \pm 0.1$).

Finalmente, na figura 14 mostramos a constante de difusão, ou seja, o coeficiente ajustado por lei de potência nas curvas de DQM como função do número de células dos agregados. Também nesse caso, os valores correspondem a médias sobre intervalos de massa de [5:23], [23:40], [40:250] e excluído o último intervalo [250:1000]. A curva laranja na figura mostra o ajuste linear ao tomar-se o logaritmo nos dois eixos. Note a inclinação praticamente nula ($\sim 3 \times 10^{-4}$). Para comparação, a curva verde representa o caso onde o coeficiente de difusão decai com o inverso da massa, atribuindo-se valores idênticos da constante D para agregados de $m = 7$.

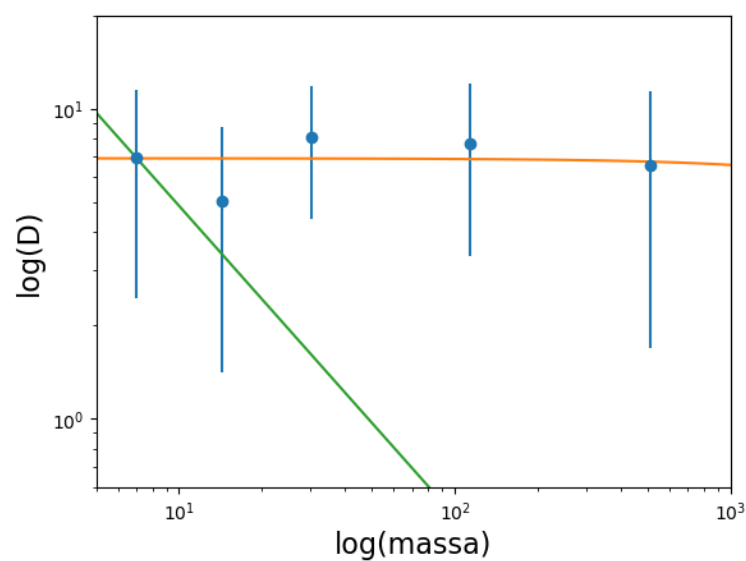


Figura 14 – Constante de difusão ajustada como função das massas dos aglomerados. Como na figura anterior, os pontos mostrados correspondem a médias sobre intervalos de massas: [5:23], [23:40], [40:250] e [250:1000]. A curva laranja é um ajuste linear dos pontos experimentais (em azul) e a curva verde representa o caso $D \sim m^{-1}$, supondo-se que as difusões fossem iguais para a menor massa de agregado medida ($m = 7$).

5 Considerações Finais

Neste trabalho apresentamos resultados de experimentos de segregação de células de ectoderme e endoderme de hidra *vulgaris*. A partir dos resultados de seis experimentos independentes, aplicamos métodos de análise de imagem para separar os agregados de endoderme dos agregados de ectoderme. Acompanhamos a evolução temporal do centro de massa dos agregados de endoderme, separando-os conforme seu tamanho.

A evolução do desvio quadrático médio (DQM) dos agregados de endoderme mostra dois regimes: para tempos curtos (da ordem de dezenas de segundos), onde o DQM é praticamente constante, e para tempos longos (da ordem de minutos até 1 hora), que segue uma lei de potência, seja qual for o tamanho do agregado. A análise detalhada do comportamento a tempos curtos envolveria ainda outros experimentos para podemos decidir entre as hipóteses de aprisionamento dos agregados e limite superior do erro no experimento. A motivação principal deste trabalho foi verificar a relação entre a difusão de agregados e sua massa, essa última aferida pelo número de células nos agregados. Há também uma terceira escala de tempo acima de uma hora, ou para agregados maiores que ~ 400 células, dominada por processos de arredondamento(34). Usamos esses valores limites de tempo e/ou tamanho como limite superior na análise de dados.

Devido a grande flutuação encontrada para os parâmetros de ajuste, dividimos os agregados por tamanho em quatro grupos, com número de células nos intervalos [5:23], [23:40], [40:250] e [250:1000] e fizemos médias dos parâmetros dentro desses intervalos, com o último excluído. O DQM de tempos longos mostra um comportamento tipo lei de potência com expoentes um pouco abaixo de 1 e uma dependência muito pequena desses com a massa. Ou seja, dentro do erro experimental, tanto agregados pequenos quanto grandes mostram comportamento difusivo.

A constante de difusão associada aos quatro diferentes agrupamentos de agregados diminui muito pouco com o tamanho dos agregados. Levando-se em conta o tamanho médio dos grupos encontra-se que a constante de difusão decai com a massa com um expoente ($\sim -4 \times 10^{-4}$, que é bem maior que o esperado para a difusão de agregados não ativos (que seria -1).

Nos experimentos realizados há uma grande perda de células de ectoderme devido ao processo de separação de tecidos imposto, com isso muitas vezes há excesso de endoderme. Mas, como verificamos, em todos os casos foi possível identificar agregados isolados de diferentes tamanhos se difundindo, o que tornou possível medir a dependência de sua difusão com a massa. As difusões encontradas confirmam a hipótese de que o comportamento coletivo altera a dependência da constante de difusão com a massa do agregado para

valores maiores do que o esperado para partículas não ativas.

A objeção ao uso da interpretação via agregado médio é a de que o suposto processo ideal de difusão e fusão de agregados ocorreria apenas no limite de alta diluição de endoderme na ectoderme, quando as escalas de tempo de arredondamento dos agregados fossem muito menores que as escalas de tempo de difusão de agregados. Por outro lado, é conhecido de trabalhos do final dos anos 90(36) que as leis de evolução temporal para o arredondamento de agregados são exponenciais, com tempo característico da ordem de $\tau = \nu R/\gamma$, onde ν , γ , R são a viscosidade, a tensão superficial e o raio do agregado. Assim, pequenos agregados arredondam rapidamente enquanto grandes agregados poderiam levar até 7h, como mostrado no trabalho de J.P. Rieu(34). Isto justifica o uso da aproximação de agregado médio pelo menos para as primeiras etapas do processo de segregação, ou seja, no intervalo de minutos até 1 hora. A partir desse ponto o problema teria de ser tratado como de arredondamento, e não de difusão/fusão de agregados.

Os originais resultados desse trabalho abrem perspectivas para várias questões, entre elas: medida direta da taxa de crescimento do agregado médio com o tempo; a medida do tempo característico de arredondamento de agregados. Essas medidas são possíveis se, além das técnicas de segregação celular e de análises de imagens que aperfeiçoamos ao longo deste mestrado, também se avance nas técnicas de separação de tecidos.

Referências

- 1 CHEN, C. et al. Weak synchronization and large-scale collective oscillation in dense bacterial suspensions. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 542, n. 7640, p. 210–214, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 15.
- 2 BEYSENS, D. A.; FORGACS, G.; GLAZIER, J. A. Cell sorting is analogous to phase ordering in fluids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 17, p. 9467–9471, 2000. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.97.17.9467>>. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 17.
- 3 BEATRICI, C. P.; BRUNET, L. G. Cell sorting based on motility differences. *Physical Review E*, v. 84, n. 031927, p. 1–5, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 18.
- 4 HANNEZO, E.; HEISENBERG, C.-P. Mechanochemical feedback loops in development and disease. *Cell*, v. 178, n. 1, p. 12–25, 2019. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867419306233>>. Citado na página 11.
- 5 CERAME-VIVAS, M. J. Separation of cell layers in hydra. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org.*, v. 153, p. 031927, May 1961. Citado na página 11.
- 6 GIERER, A. et al. Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature New Biology*, v. 239, n. 91, p. 98–101, Sep 1972. ISSN 2058-1092. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/newbio239098a0>>. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 22.
- 7 TAKAKU, Y.; HARIYAMA, T.; FUJISAWA, T. Motility of endodermal epithelial cells plays a major role in reorganizing the two epithelial layers in hydra. *Mechanisms of Development*, v. 122, n. 1, p. 109–122, 2005. ISSN 0925-4773. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477304002096>>. Citado na página 11.
- 8 STEINBERG, M. S. Hydra regeneration from recombined ectodermal and endodermal tissue. *Science*, v. 141, p. 401, 1963. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 16.
- 9 MÉHES, E.; MONES, E.; VICSEK, T. Collective motion of cells mediates segregation and pattern formation in co-cultures. *PLoS ONE*, v. 7, n. e0031711, p. 1–12, 2012. Citado na página 12.
- 10 EVANS and P. M.; LEE, D. A. Relation between the rate of cell movement under agarose and the positioning of cells in heterotypic aggregates. *Exp. Cel. Res.*, v. 180, n. 287, p. 1–4, 1989. Citado na página 12.
- 11 MOMBACH, J. C. et al. Quantitative comparison between differential adhesion models and cell sorting in the presence and absence of fluctuations. *Physical Review Letters*, APS, v. 75, n. 11, p. 2244, 1995. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 16.
- 12 HUANG, K. *Statistical Mechanics*. New York: John Wiley & Sons, 1963. Citado na página 12.

- 13 COCHET-ESCARTION, O. et al. Physical mechanisms driving cell sorting in hydra. *Biophysical Journal*, v. 113, n. 12, p. 2827–2841, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 14.
- 14 SZABO, B. et al. Phase transition in the collective migration of tissue cells: experiment and model. *Physical Review E*, APS, v. 74, n. 6, p. 061908, 2006. Citado na página 12.
- 15 BEATRICI, C. P.; BRUNET, L. G. Cell sorting based on motility differences. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 84, p. 031927, Sep 2011. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.84.031927>>. Citado na página 12.
- 16 MARCHETTI, M. C. et al. Hydrodynamics of soft active matter. *Rev. Mod. Phys.*, American Physical Society, v. 85, p. 1143–1189, Jul 2013. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.85.1143>>. Citado na página 14.
- 17 LENHOFF, S. G. *Hydra and the Birth of Experimental Biology-1744*. Pacific Grove: Boxwood Press, 1986. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 21.
- 18 SCHIEFFERDECKER, P. Methode zur isolierung von epithelzellen. *Z. Wiss Mikr.*, v. 3, p. 483–484, 1886. Citado na página 15.
- 19 WILSON, H. V. *J. Exp. Zool.*, v. 5, p. 245, 1907. Citado na página 15.
- 20 HOLTFRETER, J. *Rev. Can. Biol.*, v. 3, n. 220, 1944. Citado na página 15.
- 21 HARRIS, A. K. Is cell sorting caused by differences in the work of intercellular adhesion? a critique of the steinberg hypothesis. *J. Theor. Biol.*, v. 61, p. 267–285, 1976. Citado na página 16.
- 22 JONES, B. M.; EVANS, P. M.; LEE, D. A. Relation between the rate of cell movement under agarose and the positioning of cells in heterotypic aggregates. *Exp. Cel. Res.*, v. 180, n. 287, p. 1–4, 1989. Citado na página 16.
- 23 GRANER, F. m. c.; GLAZIER, J. A. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 69, p. 2013–2016, Sep 1992. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.69.2013>>. Citado na página 16.
- 24 MOMBACH, J. C. M.; GLAZIER, J. A. Single cell motion in aggregates of embryonic cells. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 76, p. 3032–3035, Apr 1996. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.76.3032>>. Citado na página 16.
- 25 BROWN, R. A brief account of microscopical observations made on the particles contained in the pollen of plants. *London and Edinburgh philosophical magazine and journal of science*, v. 4, p. 161–173, 1828. Citado na página 16.
- 26 WINKLBAUER, R. Cell adhesion strength from cortical tension – an integration of concepts. *J. of Cell Science*, v. 128, p. 3687–3693, 2015. Citado na página 16.
- 27 BRODLAND, G. W.; CHEN, H. The mechanics of cell sorting and envelopment. *Journal of biomechanics*, v. 33, n. 7, p. 845–851, July 2000. ISSN 0021-9290. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(00\)00011-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(00)00011-7)>. Citado na página 16.

- 28 BRODLAND, G. W. The Differential Interfacial Tension Hypothesis (DITH): A Comprehensive Theory for the Self-Rearrangement of Embryonic Cells and Tissues . *Journal of Biomechanical Engineering*, v. 124, n. 2, p. 188–197, 03 2002. ISSN 0148-0731. Disponível em: <<https://doi.org/10.1115/1.1449491>>. Citado na página 16.
- 29 KRIEG, M. et al. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nature cell biology*, Nature Publishing Group, v. 10, n. 4, p. 429–436, 2008. Citado na página 16.
- 30 MANNING, M. L. et al. Coaction of intercellular adhesion and cortical tension specifies tissue surface tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 28, p. 12517–12522, 2010. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1003743107>>. Citado na página 16.
- 31 BEATRICI, C. P.; ALMEIDA, R. M. C. de; BRUNET, L. G. Mean-cluster approach indicates cell sorting time scales are determined by collective dynamics. *Physical Review E*, v. 95, n. 032402, p. 1–8, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 29.
- 32 KUBO, R.; TODA, M.; HASHITSUME, M. *Statistical Physics II*. [S.l.]: Springer-Verlag, 1978. 6 p. Citado na página 19.
- 33 TEIXEIRA, E. F.; FERNANDES, H. C. M.; G, B. L. A single active ring model with velocity self-alignment. *Soft Matter - The Royal Society of Chemistry*, v. 17, n. 8, p. 5991–6000, 2021. Citado na página 19.
- 34 RIEU, J.-P.; SAWADA, Y. Hydrodynamics and cell motion during the rounding of two dimensional hydra cell aggregates. *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems*, v. 27, n. 1, p. 167–172, May 2002. ISSN 1434-6036. Disponível em: <<https://doi.org/10.1140/epjb/e20020142>>. Citado 4 vezes nas páginas 20, 31, 33 e 34.
- 35 [HTTPS://GITLAB.COM/LABCEL/HIDRAS/EXPERIMENTOS](https://gitlab.com/labcel/hidras/experimentos). Web. Citado na página 28.
- 36 MANN, E. K. et al. Hydrodynamics of domain relaxation in a polymer monolayer. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 51, p. 5708–5720, Jun 1995. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.51.5708>>. Citado na página 34.