

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA
GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM FÍSICA

Experimentos em Dinâmica de Agregados Celulares

Aline Friedrich Lütz Weizenmann

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Física com Ênfase em Pesquisa Básica, do Instituto de Física, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos pré-requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Física.

Orientador: Leonardo Gregory Brunnet

Porto Alegre

2015

Resumo

Entender segregação celular é o primeiro passo para estudar morfogênese e regeneração de tecidos vivos. A hidra, um cnidário de água doce, vem sendo utilizada neste tipo de estudo há bastante tempo, devido a sua simplicidade e grande capacidade de regeneração. Ela é constituída por dois tecidos, a endoderme (tecido interno) e a ectoderme (tecido externo). Experimentos com hidras mostram que se suas células são separadas e misturadas aleatoriamente, voltam a se organizar para formar o animal. As simulações computacionais indicam que a evolução do parâmetro de ordem da segregação segue uma lei de potência que apresenta um expoente característico dependente da proporção entre os tecidos e da dimensão espacial do sistema. Neste trabalho, desenvolvemos um protocolo de separação de tecidos que permite variar a proporção de endoderme e ectoderme. Além disso, encontramos a relação entre o número de células e o número de pixels em uma imagem de agregado, o que permite automatizar a contagem de células nos experimentos. Utilizando este resultado, estimamos a evolução da extensão da interface entre tecidos em um experimento de segregação. O resultado desse experimento é comparado a simulações computacionais.

Abstract

Understanding cellular segregation is the first step in studying morphogenesis and regeneration of living tissue. Hydra, a freshwater cnidarian, has been used in this type of study for a long time due to its simplicity and great capacity of regeneration. Hydras have two main body layers, the endoderm (inner layer) and the ectoderm (outer layer). Experiments with hydras show that when its cells are separated and then randomly mixed, a cell-sorting process begins remaking the animal. According to computational simulations the order parameter evolution follows a power law that has a characteristic exponent dependent on the proportion between tissue and the spatial dimension of the system. Besides, we found the relation between number of cells and number of pixels in a cluster image, what allow us to automate the cells counting in experiments. Using this result, we estimate the evolution of the interface extension between tissues in a segregation experiment. The result of this experiment is compared to computational simulations.

Sumário

Resumo	2
Abstract	3
1 Introdução	5
2 Retrospectiva Histórica	7
3 Objetivos	10
4 Metodologia	12
4.1 Cultura de Hidras	12
4.2 Experimentos	12
4.2.1 Contagem de Células	14
4.2.2 Evolução da Interface entre Tecidos	15
4.3 Tratamento das Imagens e Coleta de Dados	16
4.3.1 Contagem de Células	16
4.3.2 Evolução da Interface entre Tecidos	16
5 Resultados	19
5.1 Contagem de Células	19
5.2 Evolução da Interface entre Tecidos	20
Conclusões	23

Capítulo 1

Introdução

Entender os processos envolvidos na regeneração de tecidos vivos é fundamental no estudo de questões extremamente importantes, como morfogênese e câncer. Na natureza, conseguimos encontrar determinados tipos de animais com um alto grau de regeneração, diferentemente do que se observa em organismos de estrutura muito complexa, cuja capacidade de regeneração é consideravelmente limitada. A hidra (fig.1.1), um cnidário de água doce, vem sendo utilizada neste tipo de estudo há séculos, exatamente por apresentar um grau de regeneração singular, além de possuir uma estrutura muito simples, e ser um animal de fácil obtenção e cultura. Sua estrutura é composta, fundamentalmente, por dois tipos de tecido: a endoderme (tecido interno) e a ectoderme (tecido externo). Essa estrutura, formada por dois tecidos, permite a realização de estudos de segregação para o sistema mais simples possível em que se observa segregação. Experimentos mostram que, ao serem separadas e misturadas aleatoriamente em um agregado, as células de animais deste tipo conseguem se reagrupar para formar novamente a estrutura original do animal. ([1], [2], [3], [4] e [5]).

Dentre os processos que descrevem a segregação, existem processos químicos complexos responsáveis pelas interações entre as células. No entanto, estamos interessados em modelar a segregação a partir das conexões entre as células e das flutuações de membrana. Detalhes bioquímicos responsáveis por estas conexões e flutuações são irrelevantes para a nossa abordagem. Essa

simplificação pode ser feita sem incorrer em grandes erros, pois o fenômeno da segregação é dominado por processos mecânicos. Assim, a utilização de ferramentas da Física parece ser o caminho lógico para a compreensão deste fenômeno, através da elaboração de modelos simples que descrevam os processos nele envolvidos. Este trabalho se insere neste contexto, de caráter interdisciplinar.

O trabalho está dividido em cinco partes. Na primeira parte, é feita uma breve revisão histórica sobre o problema da segregação, com a descrição de hipóteses desenvolvidas para explicar este fenômeno. A segunda parte descreve os objetivos do trabalho, apresentando uma contextualização dos problemas que os motivaram. Na terceira parte, é descrita a metodologia adotada em cada etapa, juntamente com os materiais e ferramentas utilizadas. A quarta parte foi reservada para a apresentação dos resultados. Por fim, a quinta e última parte apresenta a discussão dos resultados, as conclusões e as perspectivas.

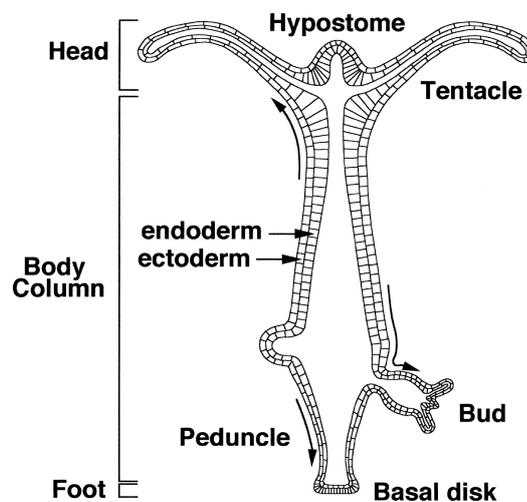


Figura 1.1: Estrutura esquemática de uma hidra [6].

Capítulo 2

Retrospectiva Histórica

A base para os estudos de segregação celular teve sua origem juntamente com o nascimento da biologia experimental, em 1740, através de estudos de regeneração de hidras, realizados por Abraham Trembley [1]. Em suas investigações, Trembley cortou uma hidra ao meio e observou que as duas metades resultantes se regeneravam formando dois indivíduos distintos. Trembley foi um grande contribuidor para os estudos com hidras, desenvolvendo e divulgando diversas técnicas experimentais, além de fornecer espécimes para pesquisadores também interessados nestes estudos. O próximo passo significativo veio um século e meio depois, em 1886, quando Schiefferdecker conseguiu separar dois tecido vivos, ao mergulhá-los em um extrato pancreático [7]. Essa descoberta teve grande importância para o avanço nas pesquisas relacionadas a regeneração, abrindo as portas para que experimentos de dissociação de tecidos pudessem ser realizados.

A primeira observação do processo de segregação celular ocorreu em 1907, por Wilson [2]. Em seus experimentos, ele separou células de esponjas do mar e, após misturá-las, descobriu que elas conseguiam se estruturar de maneira a reconstituir os tecidos originais. A partir deste fenômeno, duas principais hipóteses foram propostas a fim de explicar o ocorrido: transformação citológica e difusão. De acordo com a primeira hipótese, as células receberiam informações do ambiente ao seu redor e sofreriam uma transformação citológica para se adequar ao respectivo local, caso necessário. Na segunda

hipótese, as células passariam por diversos arranjos, trocando de posição umas com as outras, até reconstituírem o formato original do tecido celular.

Posteriormente, os trabalhos de Holtfreter e Townes [3] demonstraram ser verdadeira a segunda hipótese. Assim, em 1944, foi demonstrado pela primeira vez o processo de segregação, através de um experimento realizado com células neurais e epidérmicas de anfíbios. Nesse experimento, os dois tipos de células eram facilmente distinguíveis devido a sua diferença de pigmentação. Essa diferença permitiu que as células pudessem ser observadas e identificadas enquanto se rearranjavam dentro do agregado celular, no processo de segregação.

Diversas hipóteses foram propostas como mecanismos responsáveis para a geração dos padrões de organização observados durante a segregação. Entre eles destacam-se:

- **Quimiotaxia:** Proposta inicialmente por Turing [8], em 1952, e defendida posteriormente por Townes e Holtfreter [9] [10], essa hipótese sugere que a organização das células nos tecidos é guiada por sinais químicos provenientes do ambiente ou delas mesmas.
- **Adesão Temporal:** Essa outra hipótese, sugerida por Curtis [11], em 1961, defendia que o tempo que células de diferentes tecidos levam para se aderir seria o responsável pela diferença nos padrões de segregação observados e, assim, células que se aderissem mais rapidamente formariam um agregado central, sendo envolvidas pelas mais lentas.
- **Adesão Diferenciada:** Segundo essa hipótese, proposta por Steinberg [12], em 1962, células de diferentes tecidos possuem diferentes graus de adesividade. Essa diferença estaria relacionada a alguma substância presente na membrana celular. Assim, durante o processo de segregação celular, células mais adesivas formariam um agregado central envolto por células menos adesivas.
- **Contração Superficial:** Essa hipótese, proposta por Harris [13], em

1976, surgiu como uma crítica a hipótese de Steinberg, da Adesão Diferenciada. Segundo essa hipótese, quanto menos contrativa uma célula em relação a sua superfície exposta, mais interna será a sua posição dentro do agregado de células.

- **Velocidade Diferenciada:** Hipótese proposta por Jones [14], em 1989, sugere que células de diferentes tecidos teriam diferentes motilidades e esse fator contribuiria para a organização das células durante a segregação.

Apesar das hipóteses descritas acima levarem em consideração diferentes mecanismos, é possível que mais de um deles tenha relevância durante processos reais de segregação. Portanto, uma hipótese demonstrada verdadeira para determinado caso não invalida as restantes.

Capítulo 3

Objetivos

Os padrões de segregação observados nos experimentos dependem, fundamentalmente, da densidade total e da proporção entre as diferentes células presentes no agregado. Assim, alterando estes valores, podem-se obter sistemas menos ou mais segregados. A fim de quantificar o nível de organização celular ao longo do tempo, definiu-se um parâmetro de ordem como a medida da extensão total da interface entre os tecidos, ao longo do tempo [15]. Esta medida se mostrou equivalente ao parâmetro utilizado posteriormente nos trabalhos de Belmonte [16] e Beatrici [17], definido da seguinte forma:

$$\gamma = \left\langle \frac{n_1}{n_1 + n_0} \right\rangle \quad (3.1)$$

onde n_0 representa as células vizinhas do mesmo tipo de uma célula central e n_1 as células vizinhas diferentes dela.

Para realizar a medida da extensão da interface, necessitamos distinguir oticamente células de endoderme e de ectoderme. Isso pode ser resolvido utilizando hidras modificadas geneticamente para que as células de seus tecidos fluoresçam em comprimentos de onda diferentes. No entanto, a contagem do número de células nos agregados é um problema um pouco mais complicado, pois esta contagem não pode ser feita manualmente. Uma contagem manual seria inviável, já que experimentos de segregação são feitos com agregados contendo milhares de células. Assim, uma das propostas desse trabalho é

investigar a relação entre o número de células de um agregado e o número de pixels em uma imagem desse agregado, para magnificação e resolução pré-definidos. Isso permite automatizar o cálculo do tamanho dos agregados e de suas interfaces.

Resolvidos estes dois problemas, podemos quantificar a evolução da organização das células nos agregados, através da medida da interface, e comparar este valor com os resultados das simulações utilizando diferentes adesividades entre as células [16], e diferentes motilidades [17].

Capítulo 4

Metodologia

Experimentos, principalmente envolvendo seres vivos, exigem alguns cuidados específicos não triviais. Para este trabalho, boa parte do tempo foi dispensado com o desenvolvimento e aprendizagem/aprimoramento de técnicas experimentais e computacionais, tanto para a cultura de hidras quanto para a realização dos experimentos e posterior tratamento e análise de dados. Este capítulo apresenta uma breve explicação de cada uma dessas etapas.

4.1 Cultura de Hidras

Nosso laboratório possui 3 tipos de hidras - *vulgaris*, *vulgaris* transgênica (Fig:4.1) e *viridissima* - mantidas à 18°C em recipientes de vidro contendo um meio de cultura (HM) preparado de acordo com o método de Loomis e Lenhoff [18]. São alimentadas de uma à duas vezes por semana com artêmias salinas recém-nascidas. As *Hidras vulgaris* são modificadas geneticamente de maneira a fazer seus dois tecidos fluorescerem em comprimentos de onda diferentes. As hidras são deixadas em jejum no período de 24h à 48h anterior aos experimentos, portanto estando com sua cavidade digestiva sem alimento.

4.2 Experimentos

Para cada experimento, foram utilizadas entre 20 e 50 hidras. A dissociação das células de endoderme e ectoderme, e posterior mistura destas, de

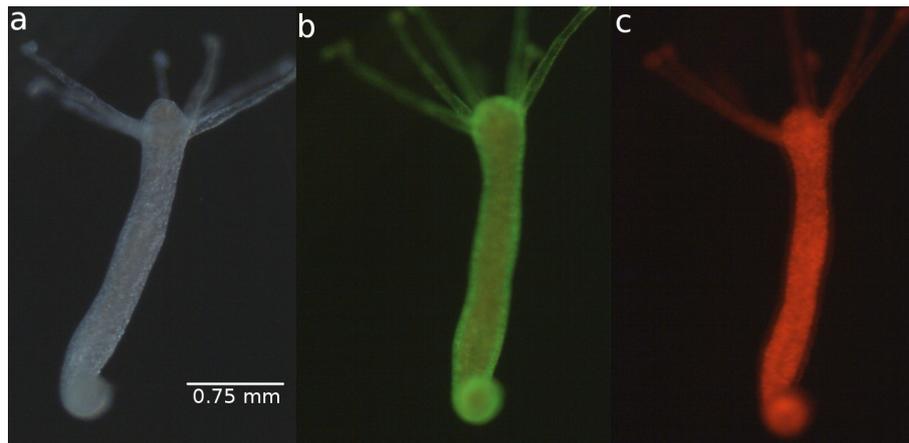


Figura 4.1: Hidra transgênica exposta a luz branca (a), luz azul-fluorescência verde (b) e luz verde-fluorescência vermelha (c). Nesta imagem é possível identificar a diferença na fluorescência entre endoderme (vermelho) e ectoderme (verde).

forma a obter uma distribuição aleatória, seguiu o método descrito em [19]. Os agregados resultantes desse processo foram colocados entre duas lâminas separadas por uma distância de 10 à 20 μm , espessura de uma camada de células.

Foram realizados dois tipos de experimento. O primeiro tinha por objetivo encontrar a relação entre o número de células e o número de pixels nas imagens dos agregados, através da medida do tamanho de uma célula para diferentes tamanhos de agregados. Estas medidas foram obtidas a partir de experimentos com agregados de no máximo 25 células. O segundo tipo de experimento tinha por objetivo estudar a evolução do parâmetro de ordem de segregação, γ . Nestes experimentos, foram utilizados agregados de mais de 1000 células.

Para a captura de imagens, utilizamos uma câmera UI-1490SE-C (resolução 3840×2748 , colorida, CMOS) acoplada a um microscópio IX70, da Olympus, com possibilidade de uso de fluorescência, o que nos permite identificar cada tipo de célula, já que a endoderme e a ectoderme fluorescem em comprimentos de onda diferentes.

Desenvolvemos um programa em python para controlar simultaneamente a câmera e um interruptor mecânico, também desenvolvido em nosso labora-

tório. Isso foi necessário pois, quando trabalhando com células fluorescentes sendo expostas ininterruptamente à luz UV, seu brilho decai em cerca de 1 hora, ao passo que uma segregação tipicamente dura em torno de 12 horas. Este interruptor foi desenvolvido para impedir a passagem de luz pelo microscópio em intervalos definidos de tempo, entre fotos, possibilitando observar a fluorescência das células por mais tempo.

4.2.1 Contagem de Células

Para estes experimentos, os agregados resultantes do processo descrito acima foram divididos em agregados bem pequenos, contendo de 1 à 25 células. Em seguida, imagens com e sem fluorescência foram capturadas, como exemplificado na figura 4.2. As imagens sem fluorescência foram utilizadas para a contagem de células, enquanto que as imagens com fluorescência foram utilizadas para a contagem de pixels, dado o seu alto contraste. Dessa forma, como detalhado na próxima seção, traçamos a relação entre o número de pixels das imagens dos agregados com o seu número de células.

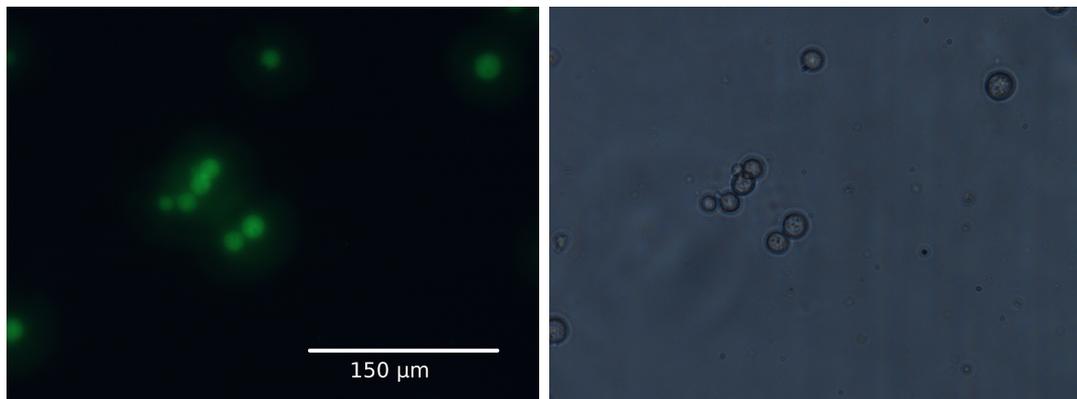


Figura 4.2: Agregados de células de hidras transgênicas com e sem fluorescência.

Apesar da Figura 4.2 conter apenas células de ectoderme, as medidas foram feitas para células de endoderme também.

4.2.2 Evolução da Interface entre Tecidos

Para esse estudo, as hidras separadas para o experimento foram divididas em dois grupos. As células do primeiro grupo passaram pelo processo de dissociação descrito em [19]. As células do segundo grupo foram primeiramente separadas entre endoderme e ectoderme, através do protocolo de dissociação de tecidos, também descrito em [19], e então dissociadas umas das outras da mesma forma que as células do primeiro grupo. Células de ectoderme resultantes do segundo processo foram misturadas às células de endoderme e ectoderme obtidas a partir do primeiro processo. Através deste método, queríamos variar a proporção de células de endoderme e ectoderme, de forma a conseguir uma proporção próxima à 1:3, utilizada nas simulações, e diferente da proporção original 1:1.

As imagens foram capturadas com fluorescência verde e fluorescência vermelha, durante 5 horas. O microscópio utilizado possui dois filtros, um azul e um verde, responsáveis pela fluorescência observada nas hidras transgênicas. Precisamos de imagens com essas duas fluorescências, já que a endoderme é estimulada pela luz verde e a ectoderme pela luz azul. Assim, a cada minuto eram capturas duas fotos, uma com luz verde e outra com luz azul, com um intervalo de poucos segundos entre as duas. A Figura 4.3 mostra o agregado de células no início do experimento e depois de 3 horas. Nesta figura, as duas fluorescências foram computacionalmente sobrepostas.

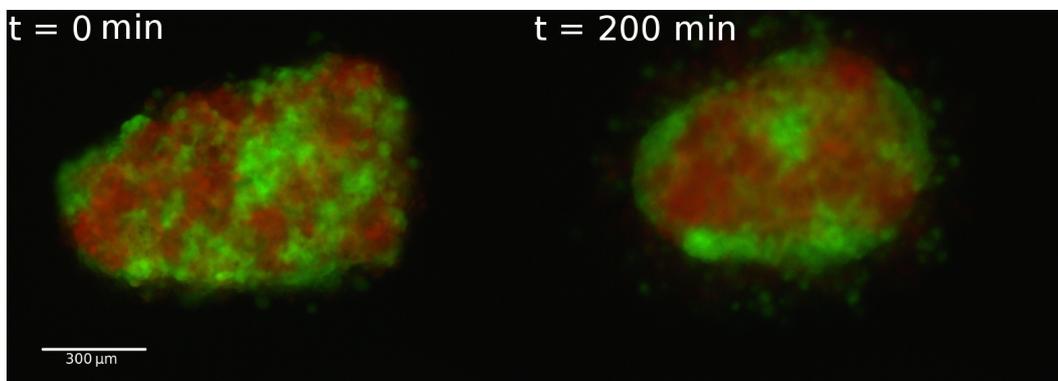


Figura 4.3: Experimento com células de endoderme (vermelhas) e ectoderme (verdes) de hidras transgênicas.

4.3 Tratamento das Imagens e Coleta de Dados

Esta etapa do trabalho foi realizada com auxílio de ferramentas desenvolvidas em octave e python, tanto para o tratamento das imagens dos dois tipos de experimento descritos acima, quanto para a coleta subsequente de dados.

A contagem de pixels foi feita utilizando uma função de octave chamada **bwlabel**, presente no pacote **image**. Essa função trabalha apenas com imagens binárias. Portanto, as imagens dos agregados foram transformadas para preto e branco, sendo representadas por matrizes de 0's e 1's, onde 0 corresponde ao fundo preto e 1 corresponde aos agregados, convertidos para branco. O que a função **bwlabel** faz é percorrer todos os valores da matriz que descreve cada imagem, e atribuir um valor para cada grupo de pixels com valor 1, como exemplificado na Figura 4.4. A fim de preencher pequenas falhas e suavizar as bordas dos agregados, foram aplicados filtros nas imagens em preto e branco. A contagem de pixels, em todos os casos, foi feita somente após a aplicação destes filtros.

Nas subseções a seguir, as etapas para cada tipo de experimento são descritas com maiores detalhes.

4.3.1 Contagem de Células

A Figura 4.4 descreve as 4 etapas seguidas para a contagem de pixels em agregados pequenos. Primeiramente, um ajuste de brilho e contraste foi feito nas imagens com fluorescência. A seguir, as imagens foram convertidas para preto e branco, seguido da aplicação de filtros. Por fim, a varredura de pixels e atribuição de valores para cada grupo foi feita usando **bwlabel**.

4.3.2 Evolução da Interface entre Tecidos

Neste tipo de experimento, as imagens passaram por uma normalização na luminosidade, aplicação de filtros para a diminuição de ruídos e junção de imagens com fluorescência verde e vermelha, todos com auxílio do octave.

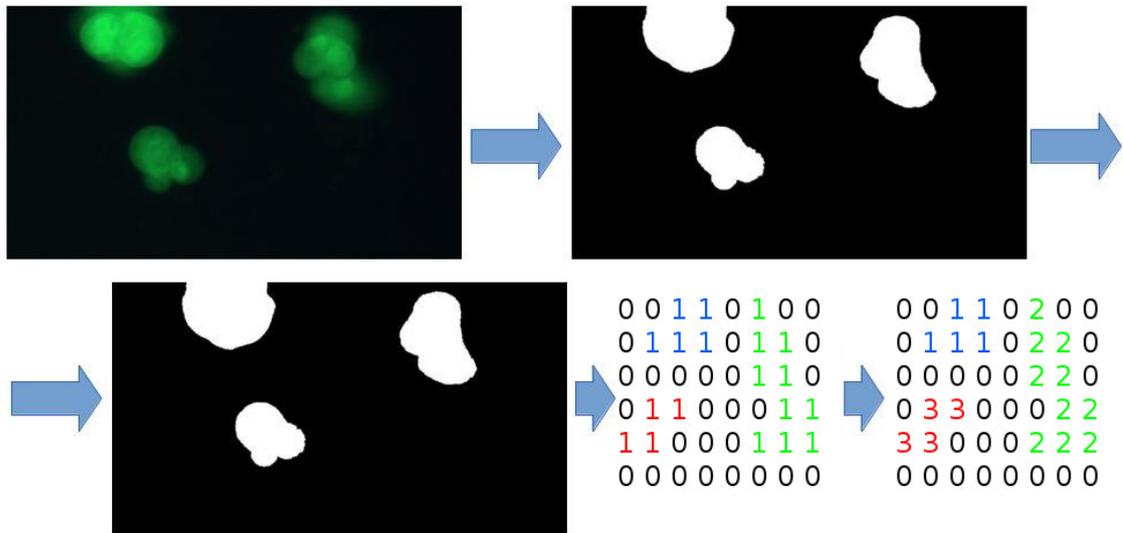


Figura 4.4: Representação ilustrativa do processo de contagem de pixels das imagens dos agregados. No canto superior esquerdo é mostrada uma foto de células fluorescentes de ectoderme. A imagem seguinte mostra essa mesma imagem depois de ser convertida para uma imagem binária-preto e branco. A seguir, no canto inferior esquerdo é mostrada a imagem após ser submetida a filtros de suavização e preenchimento de falhas, e, por fim, há uma matriz ilustrativa representando a matriz resultante da função **bwlabel**. Cada grupo de 1 representa um agregado. Para o primeiro agregado é atribuído valor 1, para o segundo é atribuído valor 2 e, para o terceiro, valor 3.

Além dos filtros mencionados no início da sessão, um outro tipo de filtro foi aplicado às imagens coloridas, de forma independente para o canal verde e o canal vermelho. O resultado desse filtro é tornar mais escuras as partes das imagens que estiverem brilhando abaixo de um certo limite, e mais intensas as partes brilhando acima deste limite, com a intensidade mínima em 0 e a máxima em 255. A Figura: 4.5 mostra a imagem de um agregado antes e depois do tratamento descrito.

Para obter tamanhos de aglomerados de células de endoderme, e a interface entre estes aglomerados e os aglomerados de ectoderme, toda a fluorescência verde das imagens, proveniente de células de ectoderme, foi convertida para preto, restando apenas agregados de endoderme, fluorescendo no vermelho. As imagens foram convertidas para preto e branco e passaram pelo processo descrito no início da seção. A contagem do número de pixels das interfaces entre os tecidos, e do número de pixels dos agregados, foi feita uti-

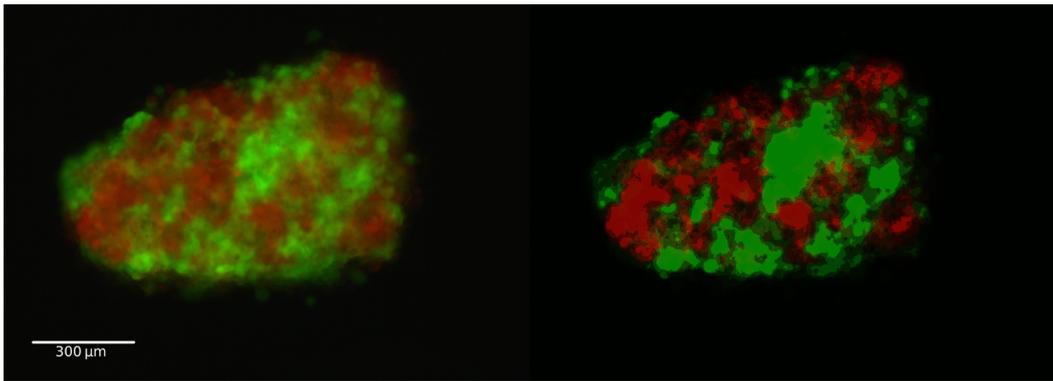


Figura 4.5: Antes e depois da normalização e aplicação do filtro.

lizando python para percorrer pelas matrizes geradas pela função `bwlabel`, e calcular os respectivos valores.

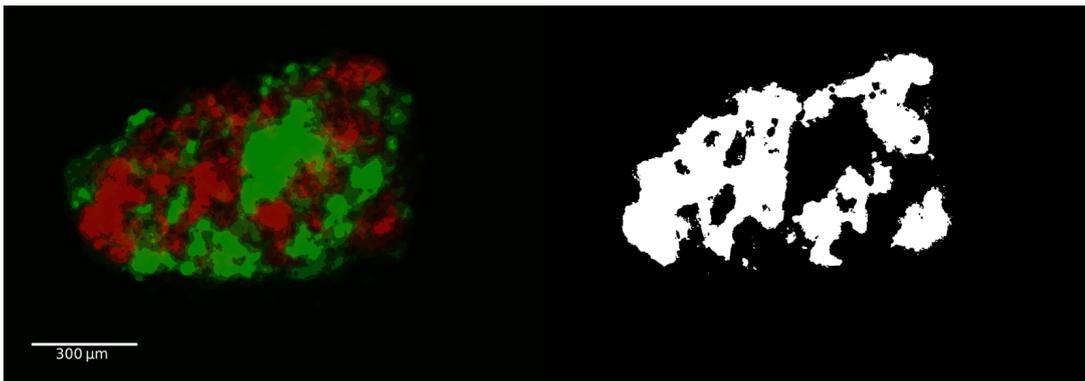


Figura 4.6: Imagem de um agregado, já tratada (à esquerda), e convertida para preto e branco (à direita), onde agregados brilhando em verde foram convertidos para preto.

Capítulo 5

Resultados

5.1 Contagem de Células

A figura 5.1 mostra a relação encontrada entre a área de uma célula, em pixels, e o número de células em cada agregado, com o maior agregado contendo menos de 25 células. No gráfico, é possível perceber uma diminuição da área da célula com o crescimento do número de células nos agregados. Para agregados bem pequenos, menores do que 10 células, há uma variação significativa na área delas. Isso se torna evidente nos altos valores de desvio expressos no gráfico a seguir. Para agregados maiores, a diferença na área das células tende a diminuir, estabilizando-se em um valor em torno de 4300 pixels. A diminuição na área das células, nesses agregados, era um resultado esperado, pois observamos que as células encontram-se mais próximas umas das outras, provavelmente passando por maiores deformações resultantes de interações com células vizinhas.

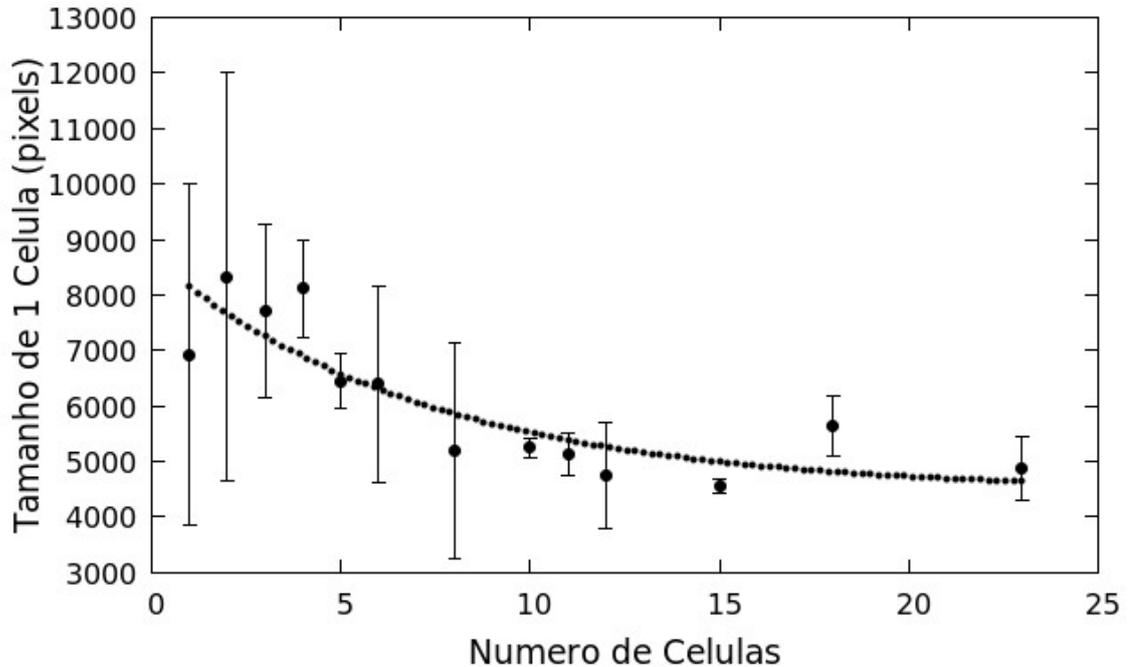


Figura 5.1: Relação entre o tamanho de cada célula, em um agregado, e o número total de células que o constituem. A função $f(x) = ae^{-bx} + c$, representada pela linha pontilhada, indica o comportamento esperado para o tamanho das células com o aumento do tamanho dos agregados, sendo $c = 4272$ a tendência limite para esse valor. As barras verticais representam o desvio padrão do tamanho da célula para os diferentes tamanhos de agregado.

5.2 Evolução da Interface entre Tecidos

Obtida a relação entre o número de pixels e o número de células para agregados pequenos, podemos fazer uma extrapolação para agregados maiores. Assim, utilizando os resultados da seção anterior, estimamos que o agregado analisado neste experimento deva conter em torno de $N=3000$ células. Além disso, também encontramos uma proporção entre células de endoderme e ectoderme de 3:2. Este resultado, apesar de parecer estranho, devido aos nossos esforços por obter uma proporção com mais ectoderme do que endoderme, não é completamente inesperada. Isso porque diversos agregados são obtidos a partir dos protocolos descritos no capítulo 4, alguns com maior quantidade de endoderme e outros com maior quantidade de ectoderme. A escolha do agregado a ser utilizado depende do número de células que o constituem e da forma com que elas estão distribuídas, pois estas duas características inter-

ferem na qualidade das imagens capturadas. A consideração destes fatores resultou na escolha de um agregado contendo maior quantidade de células de endoderme.

Os cálculos do número de células para o início e o fim do experimento, depois de 5 horas, mostram uma perda de 40% de células. Assim, a fim de que a análise da interface entre tecidos seja feita para uma variação de N aproximadamente constante, as últimas 2 horas de experimentos não foram consideradas nos cálculos (Fig.: 5.2).

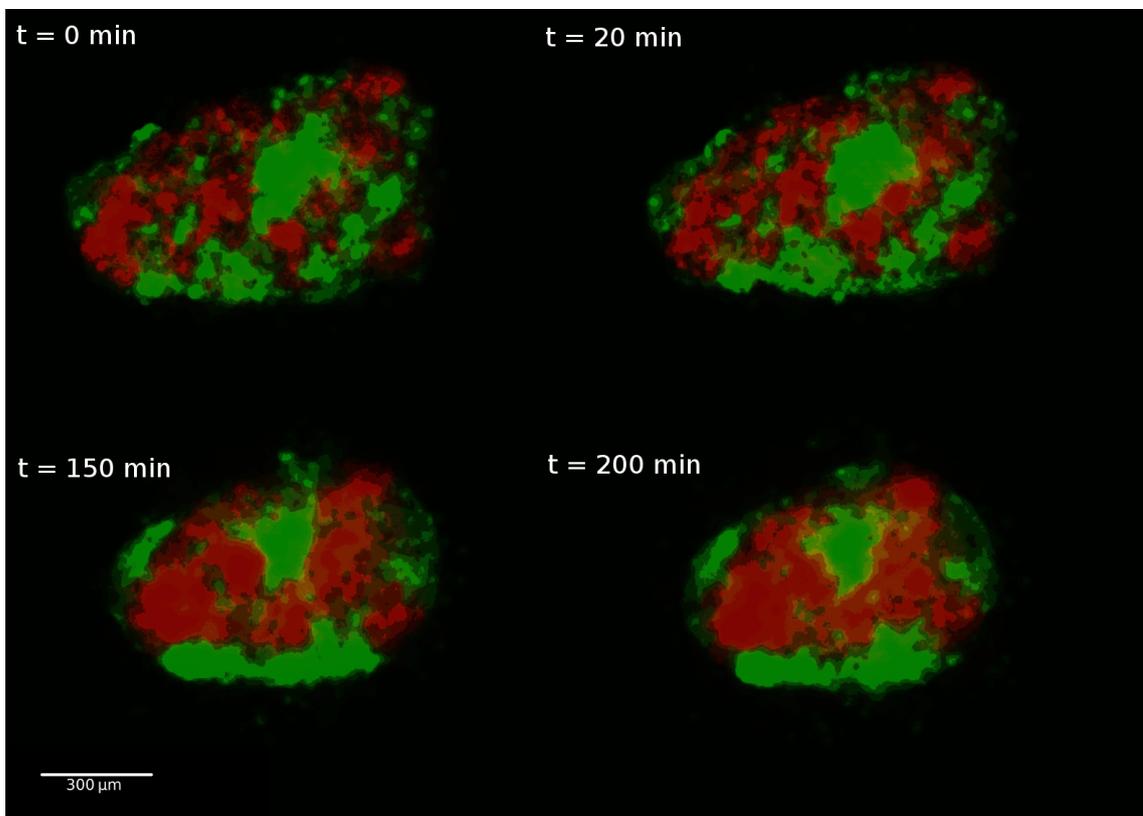


Figura 5.2: Imagens tratadas mostrando a evolução do agregado ao longo de 3h.

A figura 5.3 mostra o decaimento do parâmetro de ordem da segregação (γ) ao longo de 3 horas de experimento, descrito por uma lei de potência. O expoente encontrado para esse decaimento foi $\lambda = -0.22(\pm 0.01)$, concordando com os expoentes obtidos nas simulações em [16] e [17], para agregados contendo em torno de $N=800$ e $N=8000$ células, numa proporção de endoderme e ectoderme de 1:3.

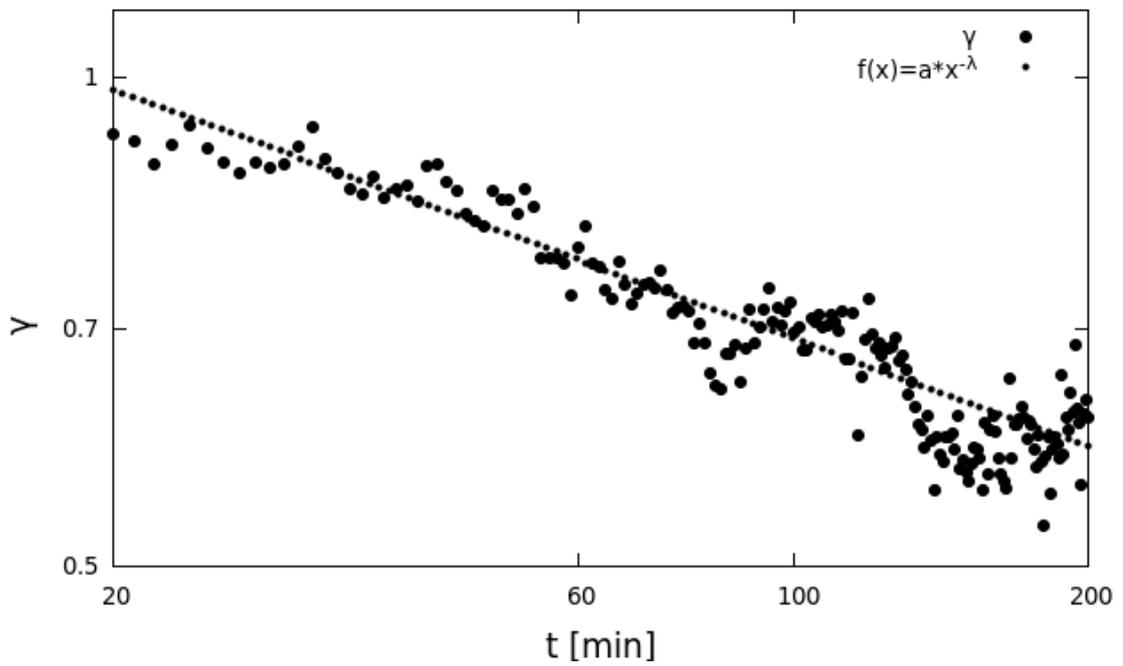


Figura 5.3: Evolução do parâmetro de ordem da segregação, γ . A curva pontilhada indica uma lei de potência, com expoente $\lambda = -0.22(\pm 0.01)$. Os eixos estão em escala logarítmica.

Conclusões

Traçando a relação entre o número de células em um agregado, e seu tamanho em pixels, verificamos que o tamanho da célula decresce com aumento do agregado, e tende a estabilizar-se para valores em torno de 4300 pixels. Os agregados utilizados nessa investigação continham entre 1 e 25 células. Fazendo uma extrapolação desse resultado para agregados contendo da ordem de milhares de células, pudemos estimar o número total de células utilizado nos experimentos de segregação e a proporção entre os tecidos. Assim, podemos comparar os resultados experimentais desenvolvidos obtidos neste trabalho com as simulações.

De posse disso, usamos essa ferramenta para estudar um experimento de segregação contendo 3000 células, com proporção entre e endoderme e ectoderme de 3:2. Verificamos que a redução de γ é bem descrita por uma lei de potências com expoente $\lambda = -0.22(\pm 0.01)$. Este resultado é semelhante ao encontrado nas simulações publicadas por nosso grupo [16, 17], onde os valores para o expoente estão entre $-0.18 \leq \lambda \leq -0.22$.

Em sua tese, Beatrice [20] desenvolveu um modelo para a evolução de um agregado médio em sistemas com alta diluição de endoderme, obtendo expoente $\lambda = -0.25$. A discrepância desse resultado com os obtidos no experimento e nas simulações deve-se, provavelmente, à distância ao limite de alta diluição.

Essa mesma discrepância abre as perspectivas de evolução desse trabalho: realizar experimentos com diluições de endoderme sucessivamente maiores com intuito de explorar o limite de alta diluição.

Referências Bibliográficas

- [1] S. G. Lenhoff, *Hydra and the Birth of Experimental Biology-1744*, Boxwood Press, Pacific Grove, 1986.
- [2] H. V. Wilson, *J. Exp. Zool.* 5 (1907) 245.
- [3] J. Holtfreter, *Rev. Can. Biol.* 3 (220).
- [4] A. Moscona, *Exp. Cell Res.* 3 (535).
- [5] J. P. Trinkaus, P. W. Groves, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 41 (787).
- [6] Esquema de uma hidra, web.
- [7] P. Schiefferdecker, *Methode zur isolierung von epithelzellen*, *Z. Wiss. Mikr.* 3 (1886) 483–484.
- [8] A. M. Turing, *The chemical basis of morphogenesis*, *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* (237) (1952) 37–72.
- [9] P. L. Townes, J. Holtfreter, *J. directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells*, *J. Exp. Zool.* 128 (1955) 53–120.
- [10] J. Holtfreter, *J. cellular affinity* 3 (1966) 143.
- [11] A. S. G. Curtis, *Timing mechanism in the specific adhesion of cells*, *J. Cel. Res.* 8 (1961) 107–122.
- [12] M. S. Steinberg, *Hydra regeneration from recombined ectodermal and endodermal tissue*, *Science* 141 (1963) 401.

- [13] A. K. Harris, Is cell sorting by differences in the work of intercellular adhesion? a critique of the steinberg hypothesis, *J. Theor. Biol.* 61 (1976) 267–285.
- [14] B. M. Jones, Relation between the rate of cell movement under agarose and the positioning of cells in heterotypic aggregates, *J. Cel. Res.* 180 (1989) 287–296.
- [15] F. Graner, J. A. Glazier, *Physical Review Letters* 69 (13) (1992) 2013.
- [16] J. M. Belmonte, G. L. Thomas, L. G. Brunnet, R. M. de Almeida, H. Chaté, Self-propelled particle model for cell-sorting phenomena, *Physical Review Letters* 100 (248702) (2008) 1–4.
- [17] C. P. Beatrici, L. G. Brunnet, Cell sorting based on motility differences, *Physical Review E* 84 (031927) (2011) 1–5.
- [18] W. F. Loomis, H. M. Lenhoff, Environmental factors controlling growth in hydra, *J. Exp. Zool.* 126.
- [19] Y. Kishimoto, M. Murate, T. Sugiyama, Hydra regeneration from recombined ectodermal and endodermal tissue, *Journal of Cell Science* 109 (4081) (1996) 763–772.
- [20] C. P. Beatrici, Análise da segregação celular: Modelos estatísticos e simulações, Tese - IF-UFRGS (2014) 127.