12/9/96

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Física

SBI-IFUSP

305M810T2449

ESTUDO DO MOVIMENTO CILIAR DE *Macrostomum tuba* UTILIZANDO MÉTODOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

PEDRO HENRIQUE ARRUDA ARAGÃO

Tese de DOUTORADO

Profa.Dra.Marina Silveira (Presidente)
Prof.Dr.Antonio Sesso (FMUSP)
Prof.Dr.Mario Giambiagi (CBPF)
Prof.Dr. Marcos Farina de Souza (IBUFRJ)
Prof.Dr.Amando S. Ito (IFUSP)

Iberê Luiz Caldas
Prof. Iberê Luiz Caldas
Presidente da Comissão de Pós-Gra

Orientador: Profa.Dra. MARINA SILVEIRA

São Paulo
1996

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ex-1
SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO
2449
INSTITUTO DE FÍSICA

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Aragão, Pedro Henrique Arruda
Estudo do Movimento Ciliar de *Macrostomum tuba* Utilizando Métodos de Microscopia Eletrônica.
São Paulo, 1996.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Departamento de Física Geral
Área de Concentração: Física do Estado Sólido
Orientador: Profa. Dra. Marina Silveira

Unitermos: 1. Microscopia Eletrônica; 2. Movimento Ciliar; 3. Onda Metacrônica; 4. Ablação Ciliar e Ultra Estrutura.

USP/IF/SBI - 26/96

Dedico este trabalho
à memória de minha sogra
Olga

"Na ciência, existem questões ingênuas,
questões entediantes, questões apresentadas de modo inadequado.
Mas cada questão é um grito para entender o mundo.
Não existe pergunta estúpida."

***Carl Sagan* (1934 -**

AGRADECIMENTOS

Em especial, desejo expressar meu profundo agradecimento à minha orientadora Marina Silveira, pela oportunidade de me introduzir ao fascinante mundo da microscopia eletrônica e por sua permanente orientação, que tanto contribuiram à minha formação científica, e ao apoio dado nos bons e maus momentos pelos quais passei ao longo do desenvolvimento dessa tese. Enfim, por sua constante dedicação e empenho, obrigado Marina!

Quero agradecer aos professores do Instituto de Física da USP pelos excelentes cursos ministrados, permitindo ampliar minha visão e conteúdo de Física. Em particular à Dra. Helena de Souza Santos pelo curso de microscopia eletrônica, e ao Dr. Pedro Kiyohara e à Profa. Teresa Wagner Campos pela colaboração prestada sempre que solicitados. A todos do Laboratório de Microscopia, meus sinceros agradecimentos pelas condições materiais, apoio e colaboração em todos os aspectos que tornaram possível o desenvolvimento desse projeto.

Não poderia esquecer o corpo técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica pelo estímulo e interesse no projeto dos Macrostomum: à Maria Tereza das Dores Faustino Silveira, que mesmo aposentada veio me ajudar inumeras vezes na câmara escura, à Simone Perche de Toledo, sempre prestativa e disposta a ajudar, ao Silvio Luiz Ferrrari sempre sorridente e prestativo, meu muito obrigado!

Aos amigos Marta e Carlos, do Instituto Butantã, por terem se encarregado do trabalho de reprografia das pranchas originais deste trabalho, garantindo sua fiel duplicação fotográfica.

Quero agradecer ao Programa Setorial de Microscopia Eletrônica da FINEP, pela aquisição do Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL 840-A, que tornou possível o desenvolvimento do projeto de pesquisa sobre Microturbelários de água doce, assunto desta tese. Uma parte menor da pesquisa fez uso também do Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM-200.

Também não poderia deixar de aqui expressar o apoio dos meus colegas do Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Prof. Dr. Marcos de Castro Falleiros. À Capes (PICD) e à Universidade Estadual de Londrina, por fornecerem recursos financeiros à realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio constante, em especial a meu querido sogro/pai, José Carlos, por acreditar e ter tornado possível minha permanência em São Paulo durante a realização desta tese.

Reservo um agradecimento especial para minha esposa Heliete, meus filhos, Taíssa e Diego, pela força e tranquilidade que passavam a mim a cada dia, pelo apoio quando tivemos que nos mudar para São Paulo e durante o período que ficavamos separados em prol desse trabalho e, ainda, pela insistência para que esta tese fosse empreendida .

ÍNDICE

Agradecimentos

Índice

Resumo..... i

Abstract..... iii

Introdução..... 1

CAPÍTULO I: **DINÂMICA DO MOVIMENTO CILIAR**..... 4

I.1: Propriedades Gerais dos Cílios..... 4

I.2: Onda Metacrônica..... 5

I.3: Estrutura dos Cílios..... 7

I.4: Hidrodinâmica do Movimento Ciliar..... 10

I.4.1: Número de Reynolds..... 10

I.4.2: Movimento de Um Organismo Ciliado..... 12

I.4.3: Estudo do Movimento de um Único Cílio..... 15

I.4.3.1: Trabalho Relativo à Força Efetiva..... 17

I.4.3.2: Trabalho Relativo à Força de Recôbro..... 19

CAPÍTULO II: **MATERIAL E MÉTODOS**..... 21

II.1: Organismo Selecionado..... 21

II.2: Frequência do Batimento Ciliar..... 21

II.3: Velocidade de Translação..... 22

II.4: Microscopia Eletrônica de Transmissão..... 23

II.5: Microscopia Eletrônica de Varredura..... 23

II.6: Preparações de Crio-Fratura..... 24

II.7. Experimentos com Ablação Ciliar..... 25

II.7.1: Ablação in vivo 25

II.7.2: Ablação in vitro com Ultra-Som..... 26

CAPÍTULO III: **RESULTADOS**..... 27

III.1:Frequência do Movimento Ciliar..... 29

III.2:As Fases do Batimento Ciliar..... 34

III.3:A Ultra Estrutura do Cílio de M. tuba..... 34

III.4:O Perfil da Onda Metacrônica..... 35

III.4.1:Criofratura em Etanol..... 36

III.4.2.Hidrocloreto de Dibucaina..... 36

III.4.3:Ultra Som..... 36

III.4.4:Choque Elétrico..... 37

Micrografias Eletrônicas..... 38

CAPÍTULO IV: **DISCUSSÃO**..... 52

REFERÊNCIAS..... 56

RESUMO

Nossa proposta de trabalho visava estudar as propriedades do movimento ciliar, aplicando técnicas de microscopia eletrônica de varredura.. Escolheu-se como material de estudo a espécie Macrostomum tuba (turbelário), bastante comum em ambientes naturais de água doce, e em aquários. Sua superfície é inteiramente revestida por cilios, que o animal usa como meio locomoção suave e rápida.

Cílios são estruturas em forma de projeções delgadas de células, com uma notável organização interna, constante em todas as espécies animais, e são dotados de movimento oscilatório rítmico e autônomo. O batimento ciliar coordenado origina ondas na superfície das células, e por conseguinte, na superfície do organismo, conhecidas como ondas metacrônicas. No caso em estudo, estas ondas são suficientes para promover o deslocamento do organismo no meio.

Estudou-se a estrutura fina destes cílios por microscopia eletrônica de transmissão, e a sua forma durante o batimento, por microscopia eletrônica de varredura. A frequência do batimento ciliar foi determinada por microscopia de luz com fonte estroboscópica, e o movimento do organismo em meio de diferentes viscosidades, foi registrado com câmara de vídeo.

Os métodos utilizados neste trabalho permitiram obter-se as seguintes informações sobre o movimento ciliar de M. tuba:

1. Os cílios têm cerca de 5μm de comprimento, e estruruta interna típica ("9+2").
2. Os cílios em meio aquoso, batem com frequência de 15 Hz, sendo esta reduzida de modo exponencial para os meios de viscosidade maior.
3. Os cilios trabalham de modo coordenado, produzindo ondas "metacrônicas" que apresentam um estágio de batimento efetivo e outro de recôbro, bem distintos. O comprimento de onda é da ordem de 4 a 5 μm e pode ser medido diretamente nas imagens de varredura.
4. Os cílios se distribuem ao longo da face ventral em campos, onde as ondas se orientam de modo conspícuo.

5. A velocidade de propagação da onda é da ordem de 78-80 μm/s. e a velocidade média de deslocamento do animal em meio aquoso é cerca de 4 mm/s, caindo a menos da metade para meios de viscosidades altas.
6. Os cílios podem ser removidos por diferentes métodos experimentais, tornando acessivel a superfície da célula: isto facilitou a observação de perfis de onda com mutio boa resolução, bem assim, permitiu contagens de densidade ciliar (cerca de 200/célula).

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the properties of ciliary motion in the flatworm, Macrostomum tuba, using electron microscopy. This is a quite common species inhabiting freshwater ponds and fish aquaria. Its suface is entirely covered with cilia, that povide a smooth and fast gliding motion for the animal.

The fine structure of the cilia has been studied by use of transmission electron microscopy. The profiles assumed by the organelle during its undulatory motion have been described by use of special scanning microscopy techniques. Frequency of the ciliary beating has been determined with a stroboscope system, and the gliding motion of the animal was recorded with a video camera.

The several approaches used in the present study provide the following conclusions:

1. The cilia are 5 μm long; ultrastructurally they conform to the "9+2" model.
2. The beating frequency in water is 15 Hz. This value is exponentially reduced for higher viscosity media.
3. The coordinated beating of a field of cilia gives rise to "metachronal waves" of about 4 to 5 μm in wavelength. A distinctive effective and another recovery stroke were characterized in the scanning images.
4. Along the ventral surface of the animal, oriented metachronal waves point to the directions of water flow.
5. Calculated metachronal wave velocity is 78-80 μm/s, and the animal speed in water reaches some 4 mm/s; it slows down rapidly for higher viscosity fluids.
6. Experiments with deciliation have allowed a clear cut view of the wavefronts, as well as, the counting of ciliary density (about 200/cell).

INTRODUÇÃO

Projeções celulares filamentosas e vibráteis, conhecidas como *cílios* vem despertando a curiosidade e o interesse de inúmeros investigadores desde tempos remotos. Costuma-se atribuir a Anton van Leeuwenhoek (1675) as primeiras descrições de "projeções incrivelmente finas e pequenas" observadas com lentes rudimentares, confeccionadas por ele próprio (Taylor, 1963).

Deve-se a Sir James Gray (1930) o desenvolvimento de uma técnica refinada que abriu novas perspectivas para o estudo destas organelas móveis. Gray utilizou iluminação estroboscópica e cinematografia associadas à microscopia de luz, conseguindo assim, fotografar e medir o movimento de flagelos isolados e conjuntos de cílios em movimento ondulatório (Gray, 1930).

As informações acumuladas durante os quase 70 anos que se seguiram, constituem um volume impressionante de dados sobre estas organelas. Elas vem sendo estudadas sob diferentes aspectos: mecânica, hidrodinâmica (Blake, 1972, 1974; Gheber e Priel, 1990 a, b; Holwill, 1966, 1982, 1989; Holwill e Satir, 1990; Lighthill, 1976); fisiologia e bioquímica (Gibbons, 1965; Satir e Sleigh, 1990; Stephens, 1974). Em paralelo, um grande avanço para o conhecimento destes elementos foi conseguido com o reconhecimento da estrutura detalhada do cílio e de seus integrantes, ou partes constituintes, obtidas por fracionamento, e estudadas com o microscópio eletrônico.

Os estudos pioneiros usando cortes ultra-finos, por Fawcett e Porter (1954) e por Afzelius (1959), e as observações de Irene Manton (1952), vieram demonstrar nos cílios de animais e vegetais, respectivamente, uma estrutura complexa e altamente organizada, formada basicamente por filamentos proteicos microtubulares, envoltos pela membrana ciliar, e conhecida como "arranjo 9+2". Essa organização se revelou universal em todos os sistemas, com poucas exceções. Uma avaliação retrospectiva das contribuições trazidas pela conjugação de técnicas modernas associadas à microscopia eletrônica, para o estudo de cílios, acha-se bem resumida nos trabalhos de Gibbons (1981) e de Satir (1992).

O arranjo "9+2" revelou-se muito complexo (Warner, 1974); tão complexo que mesmo as modelagens mais atuais, feitas com auxílio do computador ainda parecem incompletas e fazem previsão de futuros acréscimos (Sugrue e outros, 1991).

Hoje se reconhece o cílio como uma entidade móvel, autônoma , capaz de realizar trabalho coordenado e eficiente em meio aquoso, seja deslocando fluidos em ductos internos de vertebrados ou invertebrados, seja deslocando o organismo como um todo no meio aquático. Apesar de toda a informação acumulada sobre estas organelas atualmente, restam ainda muitas questões sem resposta a respeito do movimento de que são dotadas.

Cílios ocorrem em grande número na superficie da célula, na forma de projeções relativamente curtas (5 a 10 μm) e executam trabalho em conjunto; o movimento de um cílio é tipicamente pendular e bi-dimensional . Flagelos ao contrário, tendo comprimento cerca de 10 a 20 vezes maior, ocorrem normalmente isolados ou aos pares, executando movimento ondulatório, planar ou tri-dimensional. Por facilidade de acesso, o movimento flagelar tem sido muito melhor estudado que o ciliar.

Sabe-se hoje que o movimento do cílio é baseado no deslocamento relativo de microtúbulos, demonstrado por Satir (1968) e Summers e Gibbons (1973), de modo análogo ao movimento do músculo estriado (teoria do "sliding filament"). Apesar de todo o avanço nesta área do conhecimento (ex., Satir e outros, 1981; Holwill e Satir, 1990), restam muitos pontos a esclarecer, a respeito do movimento do cílio, e principalmente da coordenação do movimento de conjunto de cílios, que dá origem a ondas tri-dimensionais (Gheber e Priel, 1990a; Machemer, 1974; Sleigh, 1974).

OBJETIVOS

Propusemo-nos a estudar o movimento de organismos aquáticos, multi-ciliados, que fazem uso predominante, senão exclusivo, de cílios, para sua locomoção. É o caso dos turbelários de vida livre, que possuem a superficie inteiramente coberta de cílios. Aqui, cada unidade bate de maneira coordenada com seus vizinhos, pertencentes à mesma célula ou a células adjacentes, mas ligeiramente fora de fase, gerando sobre a superfície do organismo uma série de ondas, denominadas *ondas metacrônicas*. Estas ondas se propagam com certa velocidade na superfície, promovendo o deslocamento de água e indiretamente, o deslocamento do animal no meio.

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar as características deste movimento, usando métodos de microscopia eletrônica. Pressupondo que o movimento

deste conjunto ciliar pudesse ser imobilizado por diferentes agentes químicos, e a imagem tri-dimensional das ondas metacrônicas, registrada e analisada sob o ponto de vista da ultra-estrutura, ter-se-ia um meio bastante objetivo de demonstrar a sua forma, tomar medidas e interpretar o fenômeno, a partir de imagens obtidas com o microscópio eletrônico de varredura (MEV). Esta possibilidade foi demonstrada já há bastante tempo por Horridge e Tamm (1969) e Tamm (1972), no estudo de organismos unicelulares (Protozoários) . Entretanto, de nosso conhecimento, a microscopia eletrônica de varredura tem sido usada apenas de modo incidental por outros autores, com esta finalidade. (Barber e Boyde, 1968; Martin, 1978; Ogura, 1981; Romet e outros, 1991; Sanderson e Sleigh, 1981; Satir, 1992)

A presente abordagem fez uso predominante da microscopia eletrônica de varredura, com a qual se pôde coletar a maior parte dos dados físicos e morfológicos. Usou-se a microscopia de luz para medidas da freqüência do batimento ciliar, um dos parâmetros fundamentais da onda metacrônica.

A título de introdução ao nosso trabalho, incluí-se aqui um capítulo resumindo dados sobre a estrutura típica de um cílio, suas formas de batimento e sobre os parâmetros hidrodinâmicos relacionados ao movimento ciliar.

CAPÍTULO I

DINÂMICA DO MOVIMENTO CILIAR

I.1.PROPRIEDADES GERAIS DOS CÍLIOS

Cílios e flagelos são projeções celulares filamentosas, longas e finas, dotadas de motilidade própria. Os cílios são geralmente curtos e se apresentam em grupos extensos, executando um movimento coordenado de forma a aumentar sua eficiência. O movimento é assimétrico e oscilatório. Os flagelos são normalmente longos e ocorrem isoladamente na célula.

A principal função de cílios e flagelos é a de deslocar fluidos à sua volta, como no caso dos ductos internos dos metazoários; ou a de deslocar a célula ciliada livremente no meio, como no caso de protozoários, espermatozóides, pequenos animais aquáticos, etc.

Nos seres humanos por exemplo encontramos cílios no trato respiratório superior e inferior, nas células epidérmicas, do trato genital masculino e feminino, em células olfativas, etc, os quais desempenham um papel primordial na saúde do homem. As células ciliadas presentes no organismo humano na árvore respiratória e trompa uterina encontram-se associadas a células que secretam muco e têm como consequência o transporte unidirecional de uma camada delgada desse muco. Desta maneira a poeira que atinge a árvore respiratória é captada pelo muco e transportada para a cavidade bucal, enquanto que na trompa ocorre um fluxo de muco para o útero, o que facilita o transporte dos óvulos. Estima-se que em cada cm^2 da superfície dos brônquios existam aproximadamente 10^7 cilios (Junqueira e Carneiro, 1991).

Assim, o estudo de organelas ciliares constitui um importante campo de investigação científica devido à sua importância à saúde humana. Há deficiência de atividade ciliar, por exemplo, relacionadas com doenças respiratórias. Já se demonstrou que um dos efeitos nocivos de alguns componentes do tabaco bem como de alguns gases poluentes é o de reduzir a frequência de batimento ciliar, dificultando o transporte de muco, e assim permitindo um contacto direto das células epiteliais com os agentes cancerígenos.

I.2. ONDA METACRÔNICA

Para que os cílios possam realizar com eficiência suas funções, é necessário que cada cílio se movimente de maneira periódica, apresentando um deslocamento coordenado no tempo e no espaço. O movimento ciliar é bastante complexo quando comparado ao movimento flagelar, já bastante estudado (Holwill, 1966). O movimento sobre uma superfície ciliada, pode ser comparado ao movimento provocado pelo vento, quando este sopra sobre uma plantação de trigo, enquanto o movimento de um só cílio pode ser correlacionado ao movimento do remo em um bote.

O ciclo do movimento ciliar compreende dois estágios; um batimento efetivo e outro de recôbro (recuperação). No movimento efetivo, o cílio se dobra rígido em direção à superfície da célula, enquanto no movimento de recuperação o cílio sofre uma flexão a partir da base, progredindo até a extremidade distal, voltando à sua posição inicial, (Fig. 1). Essas fases ocorrem praticamente no mesmo plano, e com uma ligeira rotação lateral no início do recôbro.

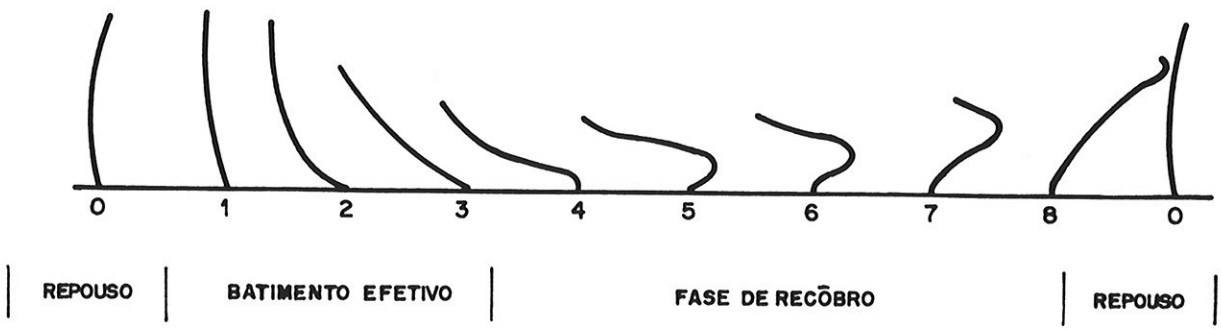


Fig.1. ciclo do batimento ciliar para um único cílio.

O movimento periódico do conjunto dos cílios, gera ondas que se propagam sobre a superfície do animal, propelindo-o através do meio; essas ondas são denominadas metacrônicas. A onda metacrônica apresenta portanto, como o cílio, duas fases, uma fase efetiva e uma fase de recôbro. Distinguem-se diferentes tipos de metacronismo dependendo da orientação relativa entre o sentido do batimento ciliar e da propagação da onda. Isto levou Knight-Jones (Sleigh,1974) a definir dois tipos básicos de coordenação metacrônica, a ortoplética e a diaplética, sendo ainda cada um desses tipos sub-dividido em duas modalidades, conforme o esquema da Figura 2.

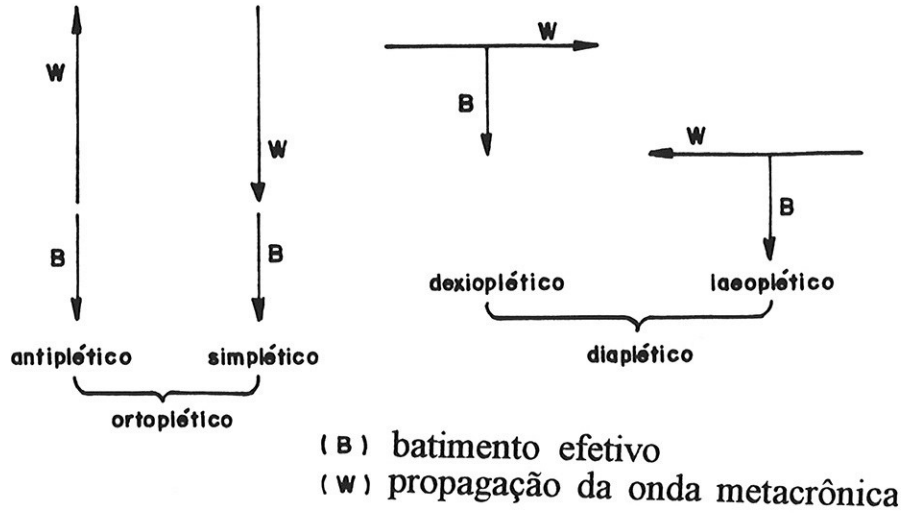


Fig.2. Tipos de coordenação metacrônica.

No metacronismo ortoplético, a propagação da onda metacrônica se dá na mesma direção do batimento efetivo; se a propagação da onda se der em sentido oposto ao batimento efetivo, o metacronismo é chamado de antiplético, caso por exemplo do protozoário Paramecium ; se a propagação da onda for no mesmo sentido do batimento efetivo o metacronismo será dito simplético, como por exemplo em Opalina (Machemer, 1974).

No metacronismo diaplético a propagação da onda metacrônica ocorre numa direção ortogonal com relação ao batimento efetivo. Será chamada de dexioplética quando o batimento efetivo ocorrer para a direita, para um observador olhando na direção do deslocamento da onda, e será chamado de leoplética se o observador vir o batimento ocorrer para a esquerda. Assim, cílios que se movimentam no sentido anti-horário, apresentam metacronismo dexioplético e para aqueles que se movimentam no sentido horário o metacronismo é leoplético (Ovadyahu e Priel,1989).

Admite-se hoje que a natureza da força de recuperação determina o tipo básico do metacronismo diaplético; entretanto, a força de recuperação sozinha não pode explicar a variedade existente nas direções da onda, uma vez que essas são caracterizadas por outros parâmetros físicos como a frequência de batimento ciliar e comprimento de onda (Gheber e Priel, 1990a).

I.3. ESTRUTURA DO CÍLIO

A primeira teoria sobre a coordenação da atividade ciliar foi proposta por Gray em 1930, que sugeriu ser o mecanismo devido a estímulos que cada cílio produziria em seu vizinho. Com o desenvolvimento da microcinematografia de alta velocidade associada à microscopia de luz e outras técnicas, foi possível obter o registro e analisar a coordenação metacrônica. Por outro lado, a microscopia eletrônica e as técnicas especiais de fixação (Parducz, 1967, Tamm e Tamm, 1981) trouxeram uma enorme contribuição ao estudo dessas organelas, revelando a estrutura interna 9+2, também chamada de axonema tipo 9+2, que se apresenta constituida por dois elementos centrais, circundados por nove pares de microtúbulos periféricos, simétricos e equidistantes.

Na Fig. 3, apresentamos um esquema mais completo de um corte transversal de um cílio visto por microscopia eletrônica de transmissão. Há 9 duplas (A e B) de microtúbulos periféricos circundando um par central de microtúbulos simples. De cada membro A, projeções conhecidas como "braços" apontam sempre no sentido horário, para um observador que esteja vendo o cílio de sua base para o seu ápice. Os pares são numerados em sequência de 1 a 9. Assim, o par número 1 será aquele localizado na intersecção de um plano virtual que passa entre os dois microtúbulos centrais, o qual coincide com o plano de batimento ciliar. Os outros são numerados em sequência, no sentido horário apontado pelos braços (Afzelius, 1959). O batimento efetivo é dirigido do par número 1 para os pares 5 e 6. A teoria do movimento ciliar pode ser explicada pelo deslisamento relativo entre os pares periféricos (Satir, 1968).

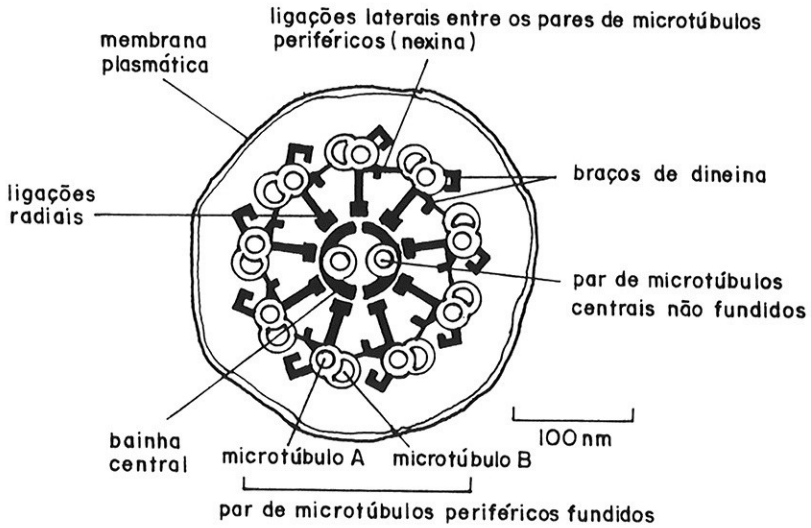


Fig.3. Corte transversal de um cílio visto por microscopia eletrônica de transmissão.

É possível diferenciar tres tipos de microtúbulos, os do tipo A e B que formam os pares periféricos e os do tipo C que formam o par central. O microtúbulo A se apresenta cilindrico, sendo formado por 13 sub-unidades filamentosas longitudinais e paralelas ao eixo do microtúbulo, chamadas de protofilamentos. O microtúbulo B acoplado ao A, é um cilíndro incompleto com cerca de 10 protofilamentos. Cada par A e B possui 3 ou 4 protofilamentos em comum; os microtúbulos centrais (C) apresentam-se formados por 13 protofilamentos.

O diâmetro dos microtúbulos é constante nas várias espécies que já foram estudadas (24 nm). Os microtúbulos centrais são mais curtos que os periféricos. Já o diâmetro dos protofilamentos é da ordem de 4 nm sendo constituidos por duas proteínas, a alfa-tubulina e a beta-tubulina, que funcionam como um dímero. O axonema do cílio compreende mais de 200 proteínas diferentes, várias das quais são imprescindíveis para sua movimentação. Além da tubulina, encontramos outras proteínas estruturais que formam os braços, as ligações periféricas e radiais e a bainha central.

Os braços são constituídos por uma proteína, a dineína, que é ativada por ATP - Mg^{2+}. Ela estabelece contato intermitente com a tubulina do microtúbulo vizinho, gerando forças. Estas forças promovem movimento de deslizamento entre pares de microtúbulos vizinhos, da ordem de 250Å. Este deslizamento é limitado à metade do axonema em cada ciclo, permanecendo a outra metade inativa. O resultado da ação destas forças leva a uma curvatura do cílio no sentido do batimento efetivo; com a excitação da outra metade, o cílio volta à posição de repouso (teoria do "switch point"), de Wais-Steider e Satir (Satir, 1992). Sob o ponto de vista morfológico, os braços são projeções unilaterais dos pares periféricos; os dois braços são assimétricos, sendo o externo mais proeminente, podendo ser esquematizado por uma clava inclinada para a base do axonema.

Na Fig. 4, apresentamos um modelo simplificado do deslizamento, e das interações que se processam entre a dineína de um par A1B1 e a tubulina do par vizinho A2B2. Os braços podem estar na configuração relaxada, na presença de ATP ou tensionados, de maneira a estabelecer pontes fixas com a parede do sub-túbulo B vizinho. É nessa configuração que os braços tracionam o par vizinho, produzindo um deslocamento $\Delta\ell$, dirigido da base para o ápice do axonema.

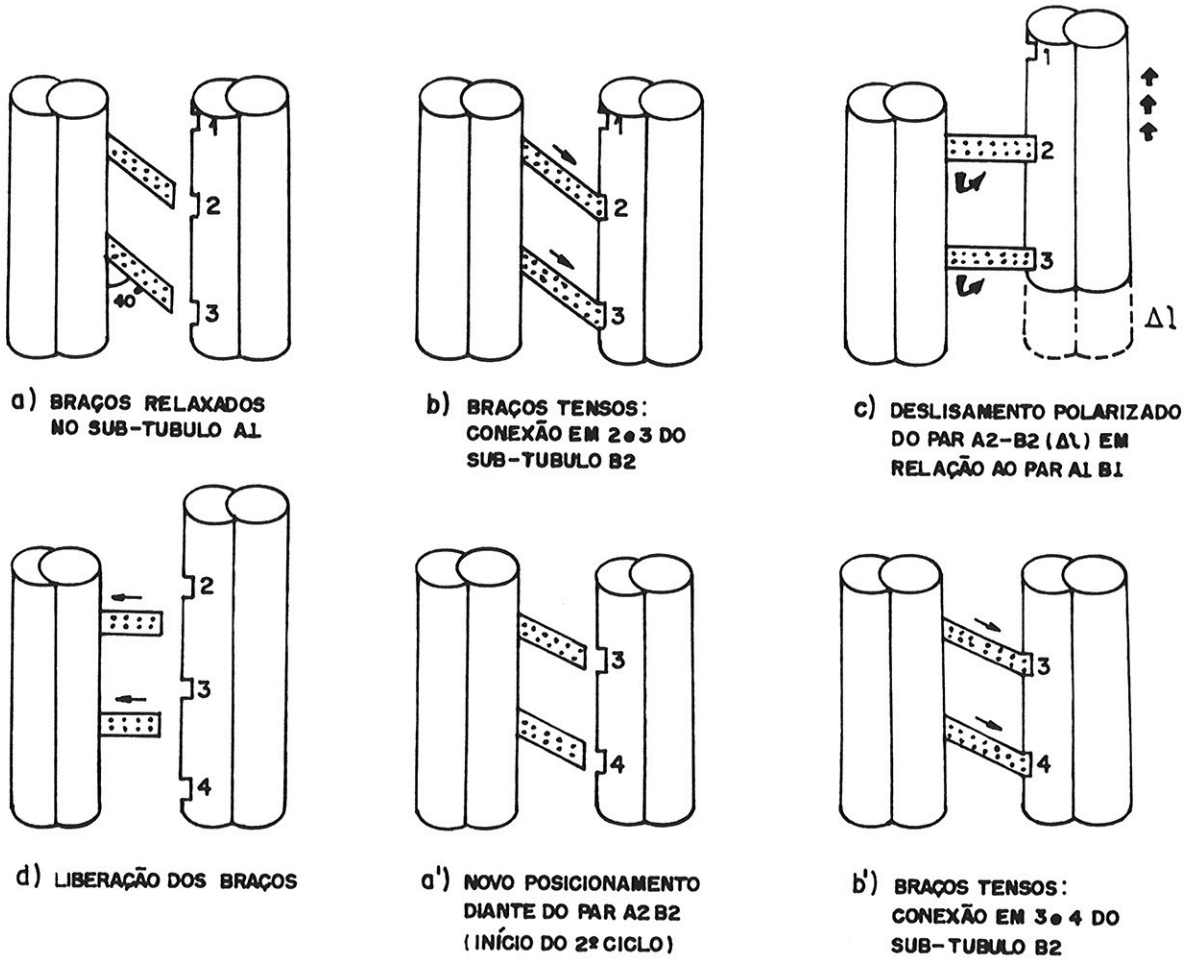


Fig.4. Modelo do deslizamento entre os pares de microtúbulos.

As ligações radiais são projeções filamentosas inseridas no túbulo A e direcionadas ao par central de microtúbulos. Estas são proteínas de peso molecular de 118 K-daltons, tendo um comprimento de 36 nm com uma cabeça de 8 nm, sendo esta sensível à ação da tripsina.

As ligações periféricas são estruturas periódicas que unem os pares periféricos em circunferência pela sua face interna; são constituídas por proteínas de peso molecular de 150 a 165 K-daltons que recebem o nome de nexina, cuja função é puramente estrutural, atuando como um limitador do deslisamento durante o ciclo de batimento ciliar, determinando assim o ângulo do encurvamento ciliar.

A bainha central são projeções lineares periódicas ao longo do par central de microtúbulos, medindo 18 nm de comprimento e espaçadas em intervalos de 14 a 16 nm. Essas projeções são diferentes em cada um dos microtúbulos centrais, o túbulo C1 tem projeções pareadas com periodicidade de 32 nm enquanto o túbulo C2 tem projeções simples com espaçamento de 16 nm. Acredita-se que tais ligações são responsáveis por manter os dois túbulos fixos durante o ciclo de batimento ciliar.

I.4. HIDRODINÂMICA DO MOVIMENTO CILIAR

I.4.1. NÚMERO DE REYNOLDS

Os organismos que fazem uso de movimento ciliar têm a superfície revestida por uma população de cílios, surpreendentemente idênticos, que executam um movimento coordenado no tempo e no espaço, de maneira a permitir o deslocamento do animal através do meio fluído.

Esse movimento é determinado pelas equações de Navier-Stokes, que para número de Reynolds << 1 e parâmetro de frequência $\sigma \cong 1$, (Lighthill, 1976) é dada por:

$$\frac{1}{\rho}\nabla p - \eta \nabla^2 q = 0 \qquad (1)$$

$$\nabla q = 0 \qquad (2)$$

onde p é a pressão, q a velocidade, ρ a densidade e η a viscosidade do meio que devem ser consideradas constantes. Valores típicos da densidade e viscosidade do meio no qual os organismos se movem são $1 g/cm^3$ e 10^{-3} poise, respectivamente.

Antes de apresentarmos as equações relativas ao movimento de organismos aquáticos, é interessante ressaltarmos a importância do número de Reynolds, na análise em questão. O número de Reynolds é uma medida relativa da razão entre as forças inercial e viscosa, isto é:

$$\mathcal{R} = \frac{a.v.\rho}{\eta} = \frac{a.v}{\upsilon} \qquad (3)$$

onde υ é a viscosidade cinemática, que para água é 10^{-2} cm^2/s ; a é a dimensão do organismo que se move através do fluído com velocidade v, que pela relação de Stokes é um corpo esférico; η e ρ são respectivamente, a viscosidade e a densidade do fluído. Se o número de Reynolds é grande a inércia é dominante entretanto, se é pequeno (<<1) a viscosidade é o fator dominante.

Quando estudamos organismos ciliados, devemos levar em consideração dois números de Reynolds, um devido ao organismo (R_b) e outro devido aos cílios (R_c), isto é:

$$\mathcal{R}_b = \frac{\mathcal{L}.v.\rho}{\eta} \approx \frac{\mathcal{L}.v}{\upsilon} \qquad (4)$$

$$\mathcal{R}_c = \frac{r_0.l.\sigma.\rho}{\eta} \approx \frac{r_0.l.\sigma}{\upsilon} \qquad (5)$$

onde L é o comprimento do organismo, v é a velocidade de propulsão , r_0= 0,125 μm é o raio do cílio, uma constante em todos os organismos já estudados, *l* é o comprimento do cílio; $\sigma = 2\pi f$ é a freqüência angular, sendo f a freqüência do batimento ciliar.

Para ciliados em geral o número de Reynolds para o organismo (R_b) é da ordem de 10^{-1} enquanto para o cílio o número de Reynolds (R_c) é da ordem de 10^{-4} (Purcell, 1977).

Isto mostra que o movimento desses organismos e de suas organelas é essencialmente o estudo onde as forças viscosas predominam sobre as forças inerciais, de forma que o termo relacionado à aceleração, pode ser desprezado. Assim, a equação de movimento do organismo será dada por:

$$m\frac{d^2r}{dt^2} = 6\pi\eta a\frac{dr}{dt} + F_c \qquad (6)$$

onde representamos por F_c a força devida aos cílios, quando os efeitos de perturbação com o meio forem desprezados; podemos reescrever a equação 6 como:

$$F_c = -6\pi\eta a\frac{dr}{dt} \qquad (7)$$

Assim a força ciliar é equilibrada pela força viscosa de tal forma que o movimento é retilíneo e uniforme. Por outro lado, o batimento ciliar depende

diretamente da temperatura do meio; como a velocidade de translação do organismo está relacionada com a freqüência do batimento ciliar, a temperatura passa a ser um parâmetro importante, que deve ser levado em consideração.

Se os cílios locomotores param de se movimentar, a equação 6 se reduz a:

$$m\frac{dv}{dt} = -\frac{V}{B} \qquad (8)$$

onde B é a constante de origem viscosa e V a velocidade de translação do organismo através do meio, cuja solução é dada por:

$$V(t) = V(0)\exp.(-t/\xi) \qquad (9)$$

onde V(0) é a velocidade inicial do organismo e $\xi = m / 6\pi\eta a$ ou $2a^2\rho / 9\eta$ para o caso do organismo ser uma esfera ciliada.

Fazendo-se $a = 10^{-2}$ cm , $\rho = 1 g/cm^2$ e $\eta = 10^{-2}$ poise, ξ será da ordem de $2{,}2.10^{-2}$ seg. Logo, a distância que o organismo pode deslizar sem gastar energia quando os cílios locomotores param de bater, é da ordem de:

$$d = \int_0^t V(t)dt = V(o).\xi \cong 2{,}2.10^{-3}\,cm \qquad (10)$$

Isto mostra que não há deslocamento quando os cílios locomotores deixam de se movimentar.

I.4.2. MOVIMENTO DE UM ORGANISMO CILIADO

Para se estudar o movimento de organismos ciliados, utiliza-se o modelo do "envelope" introduzido por Taylor (Taylor, 1951). Nessa aproximação, a individualidade dos cílios é substituída pela ação da onda metacronal. Dessa maneira,

os organismos ciliados são tratados como uma fina lâmina flexivel infinita bi-dimensional, impermeável ao fluído, deslocando-se com velocidade constante em uma direção, apresentando deformações periódicas em torno da posição $y = 0$ (Fig.5). Logo, as coordenadas de um ponto P (X_S , Y_S) sobre a superfície da lâmina serão:

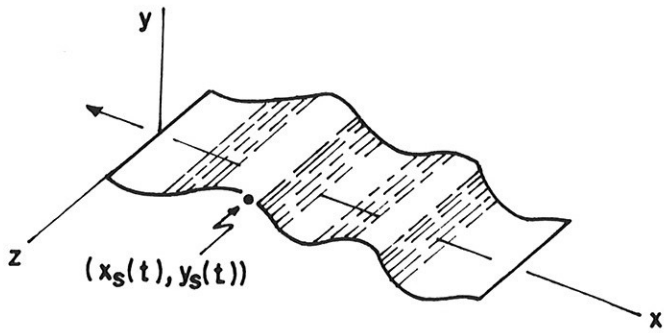


Fig.5. Aproximação para uma superfície ciliada.

$$X_s = X + a.\cos(kx - \omega t - \phi) \qquad (11)$$

$$Y_s = b.\mathrm{sen}(kx - \omega t) \qquad (12)$$

Assim, a lâmina movimenta-se como uma combinação linear de ondas progressivas, com velocidade de fase ϖ / k com k > 0, e movimentos periódicos. Derivando as eq. 11 e 12 com respeito ao tempo, determinaremos a velocidade do ponto P, isto é:

$$u(X_s, Y_s, t) = \dot{X}_s = a\omega\,\mathrm{sen}(kx - \omega t - \phi) \qquad (13)$$

$$v(X_s, Y_s, t) = \dot{Y}_s = -b\omega\cos(kx - \omega t) \qquad (14)$$

De forma que as equações de Navier-Stokes, para duas dimensões, aproximação feita para o organismo ciliado, serão dadas por:

$$\frac{\partial p}{\partial x} - \mu\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} = 0 \qquad (15)$$

$$\frac{\partial p}{\partial y} - \mu\frac{\partial^2 v}{\partial y^2} = 0 \qquad (16)$$

$$\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} = 0 \qquad (17)$$

Para que a equação 17 seja satisfeita, é necessário que exista uma função Ψ tal que $d\Psi = udy - vdx$, isto é,

$$u = \frac{\partial \psi}{\partial y} \quad e \quad v = -\frac{\partial \psi}{\partial x} \qquad (18)$$

Assim, tomando as derivadas cruzadas nas equações 15 e 16 e substituindo a equação 18 obtemos:

$$\nabla_x^2 \nabla_y^2 \psi = \nabla^4 \psi = 0 \qquad (19)$$

Logo, o problema se reduz a determinar uma função bi-harmônica Ψ que satisfaça as eqs. 13 e 14. Como partimos da suposição de que a lâmina movimenta-se uniformemente ao longo do eixo x, logo, em relação ao sistema de referência, temos:

$$\frac{\partial \psi}{\partial y} \rightarrow U = \text{Const.(uniforme)}$$

$$\frac{\partial \psi}{\partial x} \rightarrow 0 \quad \text{quando} \quad y \rightarrow \infty \quad e \quad -\infty \prec x \prec \infty$$

Assim, cada ponto da lâmina executa uma órbita periódica de acordo com as eqs. 11 e 12. A constante U dá a velocidade de nado da lâmina, a ser determinada como uma função dos parâmetros da órbita e do balanço dinâmico implícito nas equações 15, 16 e 17. Para U >0 a lâmina desloca-se para a esquerda. Logo, a solução pode ser escrita como uma série de potência em bk (a e b são considerados da mesma ordem). Isto implica que a inclinação da lâmina é pequena, sendo esta dada por:

$$U \cong \omega k \, (b^2 + 2ab\text{Cos}\phi - a^2) \qquad (20)$$

Assim, a lâmina desloca-se para a esquerda ou para a direita conforme a órbita. Sendo $\phi = 0$ e $b > (\sqrt{2} - 1)a$, $U > 0$, nesse caso a lâmina movimenta-se para a esquerda, oposta ao sentido de propagação da onda metacrônica, portanto, em metacronismo simplético, como no caso da Opalina. Quando $\phi = \pi$ e $a > (\sqrt{2} - 1)b$, $U < 0$: nesse caso a lâmina movimenta-se para a direita em sentido oposto à propagação da onda metacrônica, como no caso do Paramecium, que apresenta metacronismo antiplético (Childress, 1981).

I.4.3.ESTUDO DO MOVIMENTO DE UM ÚNICO CÍLIO

Nesta seção apresentaremos o estudo do movimento de um único cílio durante o ciclo de batimento; algumas aproximações são necessárias para a análise do movimento da organela.

O batimento ciliar pode ser dividido em duas fases: uma efetiva ou batida em forma de remo, na qual o cílio se move aproximadamente como um corpo rígido; a outra é o esforço de recuperação, no qual o cílio se afasta da superfície do organismo com uma ligeira rotação ao redor de sua base. Na fase de recuperação o cílio não oferece resistência ao movimento, conforme observações experimentais realizadas por Holwill (Holwill, 1966).

Fisicamente, podemos idealizar o cílio como sendo um filamento cilíndrico rígido, delgado, de comprimento l e de raio r_0 , que se movimenta com freqüência angular ω pivotada em uma extremidade, formando um ângulo θ com a superfície, em um meio de densidade (ρ) e viscosidade (η) constantes.

Na Fig. 6, mostramos um diagrama de um cílio, contendo os parâmetros para o cálculo da força e do momento.

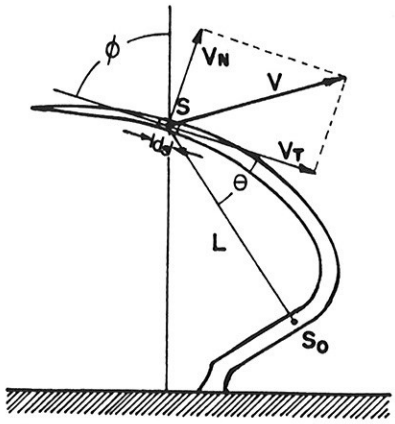


Fig.6. Diagrama de um cílio.

A força que age sobre um elemento infinitesimal do cílio (ponto S na Fig.6) pode ser calculada pelo seu comprimento (ds), sua velocidade (V), a qual pode ser medida por gravação em cinematografia de alta velocidade, e a viscosidade (η) do meio. Assim, as componentes da força na direção normal (F_n) e tangencial (F_t) ao longo do eixo ciliar, exercidas no ponto S do elemento, são dadas por:

$$dF_n = C_n \eta V_n ds \qquad (21)$$

$$dF_t = C_t \eta V_t ds \qquad (22)$$

onde V_n e V_t são as projeções da velocidade no plano normal e tangencial ao elemento ds, C_n e C_t são coeficientes superficiais de resistência devidos à ação de forças viscosas durante o movimento. Gray e Hancock (Baba e Hiramoto,1970) mostraram que para um filamento cilindrico delgado,de comprimento l e raio r_0 , movendo-se num meio de viscosidade η, os coeficientes são dados por:

$$C_t = \frac{4\pi\eta}{\ln\left(\frac{2l}{r_0}\right) + \frac{1}{2}} \qquad (23)$$

$$C_n = \frac{2\pi\eta}{\ln\left(\frac{2l}{r_0}\right)} \qquad (24)$$

A expressão para o torque (τ) na base do cílio, foi calculada por Yoneda (Baba e Hiramoto, 1970), para cílios de Mytilus edulis , como sendo:

$$\tau = \omega\eta\, l^3 F(\mathcal{R}) \qquad (25)$$

onde $F(\mathcal{R})$ é uma função envolvendo o número de Reynolds, sendo dada por:

$$F(\mathcal{R}) = \frac{2}{3} C_t \qquad (26)$$

O momento de inércia (I) ao redor do ponto S_0 do eixo ciliar devido à força exercida no ponto S é dado por:

$$dI = L\,Cos(\theta)\,dF_n + L\,Sen(\theta)\,dF_t \qquad (27)$$

onde L é a distância entre S e S_0 , e θ é o ângulo formado pelo segmento SS_0 e a tangente ao eixo ciliar em S. Integrando a eq.27 ao longo do comprimento do cílio e substituindo as eqs. 21 e 22 obtemos:

$$I = 3{,}3\eta \int_{S_0}^{S} L(V_n \cos\theta + \frac{1}{2} V_t \operatorname{sen}\theta)ds \qquad (28)$$

Da mesma maneira, a força exercida sobre o cílio pelo fluído numa direção paralela à superfície do organismo (F_p) é dada por:

$$F_p = 3{,}3\eta \int_{S_0}^{S} (V_n \cos\phi + \frac{1}{2} V_t \operatorname{sen}\phi)ds \qquad (29)$$

onde ϕ é o ângulo formado pela tangente ao eixo do cilindro e a normal à superfície do organismo (Baba e Hiramoto,1970).

I.4.3.1. TRABALHO RELATIVO À FORÇA EFETIVA

Durante o ciclo do movimento, os cílios apresentam duas forças distintas, a força efetiva e a força de recôbro. A força efetiva (F_E) é a responsável por propelir o organismo no sentido oposto ao sentido de batimento, enquanto a força de recôbro (F_R) é a responsável por afastar o cílio da superfície do animal até à posição inicial, sem oferecer resistência ao movimento do organismo.

Assim, o trabalho realizado pelo cílio contra a força de origem viscosa durante o batimento ciliar, pode ser dividido em duas partes: aquele devido à força efetiva e o outro devido à força de recuperação. Na Fig.7 apresentamos um diagrama

de um cílio durante o esforço efetivo (Fig.7-a) e durante o esforço de recuperação (Fig.7-b) idealizados para análise matemática (Sleigh, 1969).

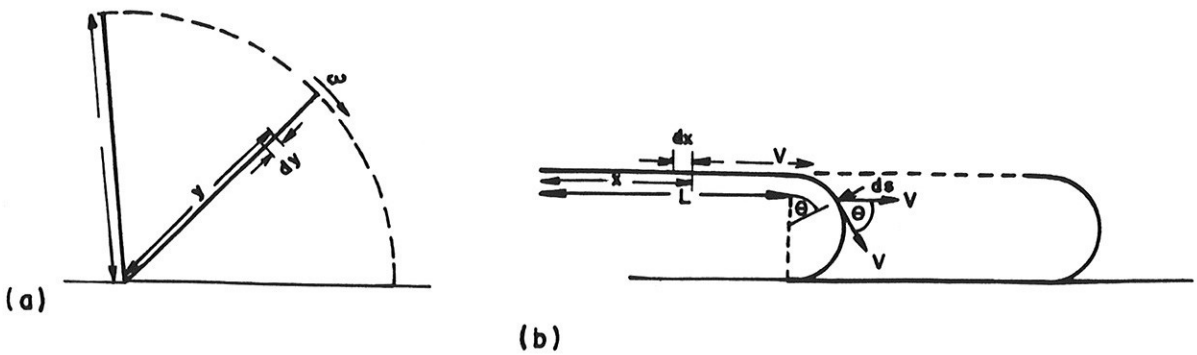


Fig.7. Diagrama de um cílio durante o batimento efetivo (a) e durante o esforço de recuperação (b).

A força exercida sobre um elemento (dy) da organela, (Fig.7-a), girando ao redor de uma das extremidades com velocidade angular (ω) constante, na direção normal é a força efetiva dada pela eq.21, isto é:

$$dF_E = C_n \eta \omega \, y \, dy \qquad (30)$$

onde fizemos a substituição de V_n por ωdy. Multiplicando essa equação pela velocidade, obtemos a potência realizada pelo cílio, durante o esforço efetivo, isto é:

$$dP = C_n \eta (\omega y)^2 \, dy \qquad (31)$$

O trabalho realizado pelo cílio durante o esforço efetivo contra a força viscosa é obtido integrando-se a eq.31, ao longo do comprimento do cílio (l), multiplicado pelo tempo necessário para que o cílio realize o batimento efetivo (t_E), isto é:

$$W_E = \frac{1}{3} C_n \eta \omega^2 l^3 t_E \qquad (32)$$

I.4.3.2. TRABALHO RELATIVO À FORÇA DE RECÔBRO

Durante o esforço de recuperação o cílio sofre curvaturas ao longo de seu comprimento. Assim, devemos considerar o trabalho devido à força de recuperação na região retilínea e na região arqueada (Fig.7-b) durante o recôbro.

Na região retilínea o cílio movimenta-se com velocidade (V_t) paralela ao seu eixo, de forma que em qualquer instante a força (força de recuperação) sobre o elemento dx a uma distância x da extremidade livre do cílio, será dada pela eq.19, onde substituimos dS por dx isto é:

$$dF = C_t \eta V_t \, dx \qquad (33)$$

Logo, multiplicando essa equação pelo tamanho do cílio na região retilinea (L - x), onde L é o comprimento total do cílio, e integrando ao longo de L, teremos o trabalho realizado pela força de recuperação nessa região (W_R), isto é:

$$W_R = \frac{1}{2} C_t \eta V_t L^2 \qquad (34)$$

Para se calcular o trabalho realizado pela força de recuperação na região curva do cílio, Fig.7-b, consideremos o elemento de arco ds, que se move com uma velocidade constante (V). Esta velocidade apresenta duas componentes, uma paralela ao eixo e outra tangencial ao arco em ds; θ é o angulo formado entre o eixo de referência (base ciliar) e o elemento de arco considerado, ds.

Assim, a força dN, normal ao elemento de arco ds é dada por:

$$dN = C_n \eta \, V \, \mathrm{Sen}(\theta) \, ds \qquad (35)$$

sendo a força tangencial dada por:

$$dT = C_t \eta \, V \, (1 + \mathrm{Cos}\, \theta) \, ds \qquad (36)$$

Multiplicando a eq. 33 pela velocidade (V) , e integrando de θ_1 a θ_2 , determinamos a potência da força de recuperação que, multiplicada pelo tempo (t_R)

que o cílio leva para se recuperar durante a fase de recôbro, fornece o trabalho realizado na região curva (W_C) devido a esta força, ou seja:

$$W_C = C_t \eta V^2 r T_r \left[\frac{5}{2}(\theta_2 - \theta_1) - \frac{1}{4}(\text{sen}\,2\theta_2 - \text{sen}\,2\theta_1) + 2(\text{sen}\,\theta_2 - \text{sen}\,\theta_1) \right] \quad (37)$$

Na dedução dessa equação substituimos ds por $rd\theta$ (Sleigh e Holwill, 1969).

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

II.1. O ORGANISMO SELECIONADO

O estudo foi feito com Macrostomum tuba (Platyhelminthes, Turbellaria, Macrostomida) coletados na Cidade Universitária, principalmente nos tanques da casa de vegetação do Instituto de Botânica, sendo mantidos no laboratório à temperatura ambiente, durante algumas semanas, em cubas de vidro. A espécie foi bem descrita no Brasil por E. Marcus (1946).A escolha por tal organismo residiu principalmente no fato de que como todo turbelário, possui uma ciliatura densa, usada na locomoção; além disso, estes animais revelaram-se de manutenção fácil no laboratório.

Os seguintes procedimentos foram aplicados:

1) análise do movimento ciliar e medição da frequência do batimento por microscopia de luz, com fonte estroboscópica.

2) registro do deslocamento do animal por meio de filmagem em video.

3) caracterização das ondas do movimento ciliar e da ultra-estrutura dos cilios em material preservado, através de microsocpia eletrônica de transmissão e de varredura.

II.2. FREQUÊNCIA DO BATIMENTO CILIAR

A frequência do batimento ciliar foi determinada utilizando-se o método estroboscópico de Gray (1930). Uma fonte de luz estroboscópica (Pasco Scientific, modelo SF 9211) com frequência variável de 5 a 160 Hz, foi adaptada a um microscópio de luz Leitz Ortholux. Variamos a frequência da fonte no intervalo de 6 a 17Hz. A ampliação óptica foi fixada em 100 X, durante estas medições.

Os animais eram inicialmente limpos em água do tanque filtrada, e transferidos para uma lâmina escavada com água; usamos algumas fibras de algodão para aprisionar os individuos em observação, minimizando sua movimentação durante o registro da frequência de batimento. Foram tomadas medidas da fraquência dos cílios em diferentes regiões de cada animal analisado.

Após a focalização da borda ciliada, variava-se a frequência da luz estroboscópica de modo decrescente, até se encontrar a frequência para a qual não

mais se observava qualquer movimento ciliar; esse procedimento era repetido dez vezes para melhorar a reprodutibilidade de cada leitura.

Além de água filtrada do meio, foram utilizados meios de diferentes viscosidades, procurando assim avaliar o efeito da viscosidade sobre o movimento ciliar. Utilizzmos duas substâncias orgânicas de origem vegetal, o agar-agar e a metil-celulose, por serem quimicamente inertes. A partir das substâncias em pó, foram feitas diluições de 0,05 até 0,90 % em água filtrada do meio. A viscosidade destas soluções foi determinada com um viscosímetro de Hopper, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Tabelas I e II).

A frequência foi determinada para cerca de 100 animais, sendo 40 em soluções de agar-agar e 30 em metil-celulose; cada medida foi repetida 10 vezes para reduzir o erro da leitura. As medidas da frequência do batimento ciliar, foram realizadas ao longo da região posterior, central e anterior de cada animal.

II.3. VELOCIDADE DE TRANSLAÇÃO

Utilizou-se uma filmadora Panasonic semi-profissional modelo AF-XG, montada sobre um tripé, a uma distância de 3,0 m da tela de projeção. Os animais eram colocados em uma placa de Petri contendo a solução escolhida, e levados a um retro-projetor. Foram filmados mais de 300 animais, considerando apenas aqueles que se deslocavam em linha reta. Para minimizar o efeito de temperatura, a filmagem em cada solução, foi tomada a intervalos de tempo descontinuos, desligando a fonte de iluminação a cada 10 segundos de filmagem, até que o equilíbrio térmico fosse novamente atingido.

Determinamos a velocidade de translação de 160 animais submetidos às várias soluções de agar-agar e de 140 animais nas soluções de metil-celulose. Para cada animal filmado, realizamos dez medidas de tempo de translação, só levando em consideração para efeito do cálculo da velocidade, organismos que se deslocavam no fundo da placa de vidro, ao longo de trajetórias retilíneas e que permaneciam focalizados durante o trajeto.O cálculo da velocidade foi feito em projeções do filme, com uma ampliação de 5X. Estes dados foram usados para levantamento dos graficos I a III.

II.4.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Estudamos os cílios isolados dos Macrostomum tuba através da técnica de "coloração negativa" de rotina, usando uma solução a 1% de acetato de uranil, pH 4,2 ou de 1% de fosfotungstato de potássio em pH 7,0 (Robinson e outros, 1987).

Os cilios de animais previamente banhados em água destilada, foram coletados diretamente em telas próprias para observação em microscopia eletrônica de transmissão, revestidas com filme de nitrocelulose e recobertas com carbono. Acrescentou-se uma gota da solução corante, e depois de 1 a 2 minutos removeu-se o excesso. As amostras ficavam secando ao ar por alguns instantes, sendo levadas à observação no microscópio eletrônico de transmissão (MET) Siemens Elmiskop 101, operando com uma tensão aceleradora de 100 kV.

Não foram feitos cortes ultra-finos especialmente para este trabalho; entretanto, com finalidade comparativa, estamos incluindo imagens já disponiveis de trabalho anterior (Aragão e Silveira, 1995). Este material fora fixado em glutaraldeido e tetróxido de ósmio, emblocado em Polybed e cortado para observação por MET.

II.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para estudo por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os animais foram estabilizados de modo a preservar em tres dimensões a cobertura ciliar superficial original, tornando-a resistente às condições de vácuo do microscópio. A organização dos cílios na superfície desses animais é facilmente destruída, sendo essencial que a fixação seja rapidamente processada.

Selecionamos o fixador de Tamm e Tamm (1981) depois de algumas experiências iniciais com varios outros fixadores convencionais. Este fixador provê uma penetração instantânea no material, preservando assim os cílios superficiais na posição do batimento (Tamm e Tamm, 1981).

A fim de evitar efeitos de carga durante a observação no MEV, o material inicialmente fixado de acordo com Tamm e Tamm (1981), foi em seguida tratado pelo método de impregnação metálica com tetróxido de ósmio (método "OTO", de acordo com Kelley e outros, 1973). A composição destas soluções fixadoras e o roteiro usado consistiram no seguinte:

1. Fixador de Tamm e Tamm (0,5 ml de glutaraldeído a 25% + 5,0 ml de tetróxido de ósmio a 2% + 2,0 ml de tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 + 1,2 mg de cloreto de sódio). Tempo de fixação por 15 min, na geladeira.

2. Lavagem das peças durante 30 min, em solução tampão de cacodilato de sódio, pH 7,4.

3. Pós-fixação com 2,5 % glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio, pH 7,4 durante 24 h.

4. Lavagens prolongadas (usualmente por uma noite), na mesma solução tampão.

5. Impregnação com tio-semi-carbazida a 1% em água destilada, durante 10 min, seguida de nova passagem por tetróxido de ósmio aquoso a 1%.

6. Lavagens cuidadosas em água destilada, seguidas de desidratação com etanol em concentrações crescentes e secagem das amostras pelo método do ponto crítico, usando CO_2.

7. O material seco foi montado nos suportes de MEV com fita adesiva dupla-face, recoberto com carbono em alto vácuo usando um evaporador Kinney KSE-2, e com ouro por "sputtering" no equipamento Edwards S-180.

II.6.PREPARAÇÕES DE CRIO- FRATURA

Com a finalidade de se observar o perfil dos cílios e as ondas metacrônicas, foram feitas preparações de crio-fraturas em etanol (método de Humphreys e outros, 1974), usando peças já preservadas pelo método descrito acima (Tamm e Tamm, seguido de OTO). O roteiro completo consistiu no seguinte:

1. As peças preparadas como acima e desidratadas em etanol a 100% foram encapsuladas em Parafilm e mergulhadas em nitrogênio liquido, aí permanecendo imersas até seu congelamento completo.

2. Em seguida, os bloquinhos congelados foram transferidos para uma superfície metálica, também mantida à temperatura do nitrogênio líquido e fraturados com navalha de aço.

3. Os fragmentos assim obtidos foram descongelados, novamente lavados em etanol 100% e sêcos pelo método do ponto crítico.

O estudo foi realizado com o microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-840 A, sob tensão aceleradora de 5 a 25 kV.

II.7. EXPERIMENTOS DE ABLAÇÃO CILIAR

Um problema com que nos deparamos logo no início de nossas experiências, diz respeito à alta densidade ciliar na superfície dos animais que estamos estudando. Isto dificultava o entendimento das fases de batimento ciliar, tornando difícil a identificação dos detalhes de interesse nas preparações examinadas por microscopia eletrônica de varredura. Assim, passamos a submeter os animais a diferentes processos de ablação ciliar, tanto ***in vitro*** como ***in vivo***, conforme descrito adiante.

II.7.1. ABLAÇÃO in vivo

1) Hidrocloreto de Dibucaina (método de Thompson e outros, ap. Satir e outros, 1976)

Os animais coletados em cubas contendo água filtrada, eram inicialmente lavados para remoção de quaisquer detritos e submetidos ao tratamento com hidrocloreto de dibucaina (Sigma, diluida a 10^{-3} em água filtrada) por tempos máximos de 2 minutos.

Os animais ficavam imóveis dentro deste intervalo, indicando que a dibucaina havia removido os cílios locomotores; essa etapa era monitorada por microscopia de luz. Em seguida, o material era preparado para observação no microscópio eletrônico de varredura de acordo com o seguinte protocolo:

1. Fixação em tetróxido de ósmio a 2% por 2 minutos.
2. Lavagem em tampão cacodilato de sódio por 1 hora.
3. Pós-fixação em glutaraldeído a 25% por 2 horas.
4. Lavagem em tampão cacodilato de sódio por 1 hora.

5. Desidratação e secagem pelo método do ponto crítico como descrito acima.

2) Descarga elétrica

Os animais contidos em uma placa de Petri contendo um filme de água filtrada do meio duas vezes, foram submetidos a uma descarga elétrica, usando uma diferença de potencial variável de 4,7 V a 18,3 V. Esta ddp correspondia à passagem de uma corrente elétrica através do animal de 1,6 mA a 7,4 mA respectivamente, aplicada durante 1 seg. Para tanto, usamos um circuito dotado de um multimetro digital ICEL MD 4500 e de um potenciômetro VARIAC, Sociedade Técnica Paulista, com entrada e saída de 220V e 6,3A.

Durante a passagem da corrente elétrica, os animais ficavam paralisados, sendo imediatamente fixados com o fixador de Tamm e Tamm "modificado" (sem NaCl), conforme já descrevemos para preparações de microscopia eletrônica de varredura.

II.7.2. ABLAÇÃO <u>in vitro</u> COM ULTRA-SOM

Obtivemos remoção mecânica dos cílios, fazendo uso de ondas de ultra-som com potência variável. Os tempos usados foram muito curtos, devido à fragilidade dos organismos, que mesmo estando fixados, mostraram-se muito sensíveis.

Após a fixação com o fixador de Tamm e Tamm, seguida do método OTO e a desidratação até o alcool absoluto, os animais foram submetidos à ação de ondas ultra-sônicas, em um aparelho modêlo T-S 86 da Sonicor Instruments Corporation, utilizado para diluições químicas. Os organismos eram colocados em cubas hermeticamente fechadas e submetidos às ondas de ultra som, durante 1 a 10 segundos. Em seguida, eram secos pelo método do ponto crítico e cobertos com ouro, como se descreveu acima.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Pudemos reconhecer no animal vivente, dois mecanismos de movimentação: a) um movimento de translação ou deslisamento suave e bastante rápido, sobre o substrato, promovido pelo revestimento ciliar, e b) um movimento de deslocamento livre através da água, que denominamos "natação", no qual estão envolvidos tanto os cílios como a musculatura. Apenas a primeira modalidade está sendo considerada neste trabalho.

Macrostomum tuba é inteiramente recoberto por um epitélio ciliado, porém se admite aqui, como hipótese de trabalho, que a maior interação com o meio se deve à ciliatura ventral, que é a mais desenvolvida. Esta superfície ventral, achatada, entra em contacto com o substrato, e os cílios que a revestem dirigem um filme de água no sentido anterior-posterior, executando um trabalho coordenado, que resulta no impulso de trás para diante, do animal. Estas conclusões puderam ser comprovadas por um experimento simples, que consistiu em observar, sob microscopia de luz, o deslocamento de partículas opacas como negro de fumo, dispersas no meio aquoso onde o animal se movimentava.

O movimento de translação do animal, registrado em filme de vídeo, permitiu medir-se a velocidade média de uma população de cerca de 300 indivíduos, em água filtrada do meio, em agar-agar e em metil-celulose. Para o deslocamento em água (viscosidade η = 1,00 cp), obteve-se um valor médio de (4,4 ± 0,3) mm/s. A incerteza (7%) destas medições, deve-se provavelmente ao fator temperatura; apesar dos cuidados tomados durante as filmagens, não foi possivel manter constante em 20°C a temperatura do meio (vide Material e Métodos).

O mesmo movimento de translação, registrado em vídeo para as soluções de metil-celulose e de agar-agar, mostrou uma correlação inversamente proporcional entre a velocidade de deslocamento, e a viscosidade do meio, conforme demonstra o gráfico I.

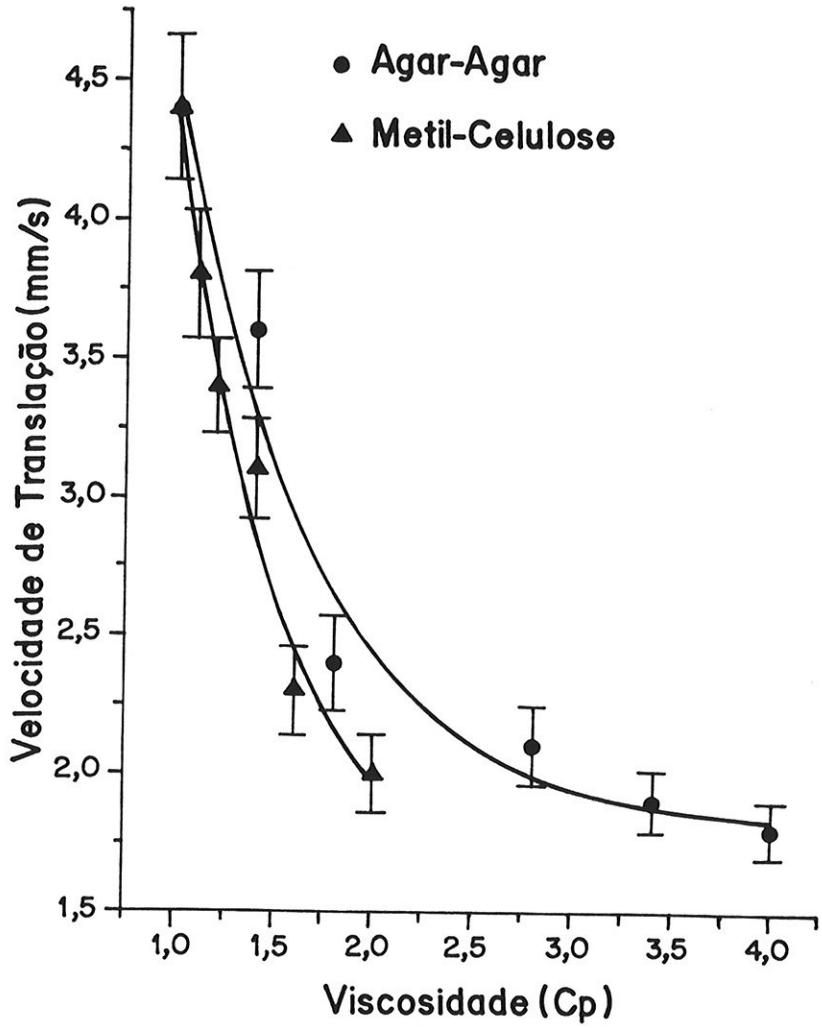


Gráfico I. Velocidade de translação em função da viscosidade.

As duas curvas são bastante semelhantes, porém o efeito da metil-celulose revelou-se mais acentuado. A velocidade máxima de deslocamento obtida a partir da água, foi reduzida exponencialmente até menos da metade quando se mudou o meio para as viscosidades mais altas que puderam ser usadas.

A equação de ajuste indicada abaixo foi utilizada para o traçado das curvas do Gráfico I,

$$V_t = V_o + A \exp.[-(\eta - \eta_o) / B]$$

onde: η_o = 1,02cp; V_o = 1,80 mm/s ; A =2,63 e B = 0,69 para agar agar e η_o = 1,04cp; V_o = 1,55 mm/s ; A = 2,56 e B = 0,53 para a metil celulose, sendo A e B constantes determinadas através do ajuste das curvas.

III.1.FREQUÊNCIA DO MOVIMENTO CILIAR

As ondas promovidas pelo batimento ciliar são perfeitamente discerníveis no organismo vivo, observado sob microscopia de luz estroboscópica, ou sob contraste de fase. Para as medições da frequência das ondas, excluiu-se a superfície dorsal, por ser altamente convexa, inviabilizando o registro.

Assim também no animal fixado e preservado para MEV, levamos em consideração apenas a ciliatura visível ao longo de toda a volta do animal, e aquela da face ventral, plana.

O gráfico II, equaciona os dados obtidos para a frequência do batimento ciliar para a água e para as soluções de metil-celulose e de agar-agar.

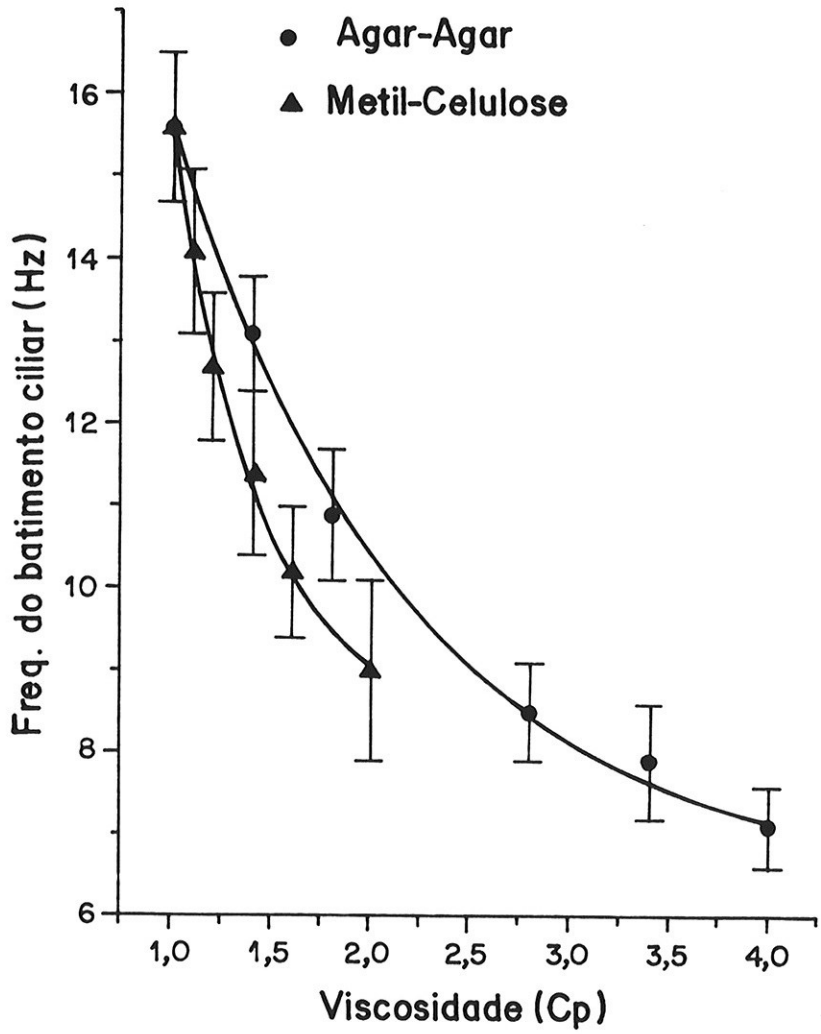


Gráfico II. Frequência do batimento ciliar em função da viscosidade.

O batimento dos cílios, em água do meio, é da ordem de 16 Hz, valor este obtido de um grande número de ensaios, com diferentes organismos. Quando o meio é substituido, ocorre também uma redução acentuada da frequência, em função da viscosidade, conforme mostram as curvas de ajuste dos dados experimentais. Acima de 4 cp para o agar-agar, e de 2 cp para a metil-celulose, o batimento ciliar é insuficiente para promover o deslocamento do animal.

A equação de ajuste para a metil-celulose e agar-agar da frequência do batimento ciliar em função da viscosidade é apresentada abaixo:

$$f = f_o + P \exp.[- (\eta - \eta_o) / Q]$$

onde: $f_o = 6{,}46$Hz; $\eta_o = 1{,}09$ cp; P= 8,45 e Q= 1,19 para agar agar e $f_o = 8{,}35$Hz; $\eta_o = 1{,}03$ cp; P= 6,79 e Q= 0,44 para a metil celulose, sendo P e Q obtidos pelo ajuste dos dados experimentais.

Os fixadores químicos de ação instantânea aqui empregados, imobilizaram as ondas metacrônicas adequadamente, tornando-as acessiveis ao estudo por MEV. As Figs. 8A e 8B mostram em uma vista geral, que os cílios responsáveis pelo deslocamento do animal apresentam-se distribuidos com certa regularidade na superfície ventral, definindo alguns "campos" onde os cilios se movem na mesma orientação, indicadas pelas setas na Fig. 8C. As setas portanto, mostram o sentido do deslocamento da água promovido pelo batimento ciliar.

Em aumentos maiores (Fig.9), nota-se que estes campos são resolvidos em "ondas" correspondentes a conjuntos de cílios que foram imobilizados nas diferentes fases do ciclo de batimento. Em relação à abertura bucal (B), que é a estrutura mais notória da face ventral, observa-se que à frente desta (A), as ondas são menos definidas que atrás (P), embora em ambas regiões, a direção de propagação das ondas coincida com o eixo longitudinal do animal elas se dirigem da extremidade anterior, para a posterior, indicando portanto um deslocamento do fluido do meio, nessa direção. Isto promove então um deslocamento do animal para a frente.

Lateralmente à boca, notam-se ondas mais curtas, dirigidas obliquamente da periferia para o centro (Figs.8 A, 9). Cílios localizados próximos à boca são supostamente transportadores de alimento em suspensão para a cavidade bucal. Nestas regiões é comum observar-se material particulado disperso junto aos cílios (Figs.16, 17, setas). Cílios que revestem a orla bucal, formam ondas radiais, com as cristas dirigidas para o interior da cavidade (Fig.10). Pode-se notar aqui, uma configuração em forma de franjas, bem demarcadas. O espaçamento entre as unidades da franja é de 2,5 μm.

A cauda em forma de espátula, é também ciliada, mas apresenta-se quase sempre dobrada, nos animais fixados, dificultando o exame da superficie ventral (Figs. 8A, 8B, 9); em preparações favoráveis pode-se notar nesta região a distribuição dos cílios entre estruturas adesivas, em forma de papilas . Uma vez acionadas, estas papilas fixam o animal ao substrato e impedem seu deslocamento (Tyler, 1976; Silveira e Aragão, 1993). Por dificuldade de acesso entretanto, a ciliatura desta região não foi considerada no presente estudo.

Como já se definiu no Cap.1, cílios que se encontram na mesma fase do ciclo de batimento definem um sincronismo de ação; cílios em sincronismo podem estar inseridos lado a lado, na mesma fileira, ou em fileiras sucessivas ao longo da direção de propagação da onda. Cílios adjacentes a estes, inseridos em fileiras perpendiculares, estarão em metacronismo, isto é, em fases ligeiramente diferentes do ciclo de batimento. Estas fases são bem definidas por exemplo, nas Figs. 15 e 25.

Com estes conceitos se pôde medir o comprimento de onda (λ) da onda metacrônica, diretamente nas imagens de MEV. O comprimento de onda corresponderá ao intervalo entre cílios que se encontram em sincronismo, em duas frentes de onda sucessivas, ex. Figs. 11, 12, 13. Na Fig. 11 é nítida a posição dos extremos do ciclo do movimento: cílios em fase efetiva (E) são paralelos à superfície da célula, e cílios em recôbro (R) são inclinados quase perpendicularmente à superfície.

Com base em medidas realizadas englobando inúmeras ondas, tomadas de diferentes imagens, de diferentes campos, obteve-se um valor médio para o comprimento de onda, de 4 a 5 μm . Este valor foi usado nos cálculos da velocidade de propagação das ondas metacrônicas na superfície do M. tuba.

O gráfico III, representa o ajuste dos dados experimentais entre a velocidade de propagação da onda metacrônica e a velocidade de translação do organismo através do meio. Observa-se que a velocidade de translação do animal é diretamente proporcional à velocidade de propagação da onda metacrônica.

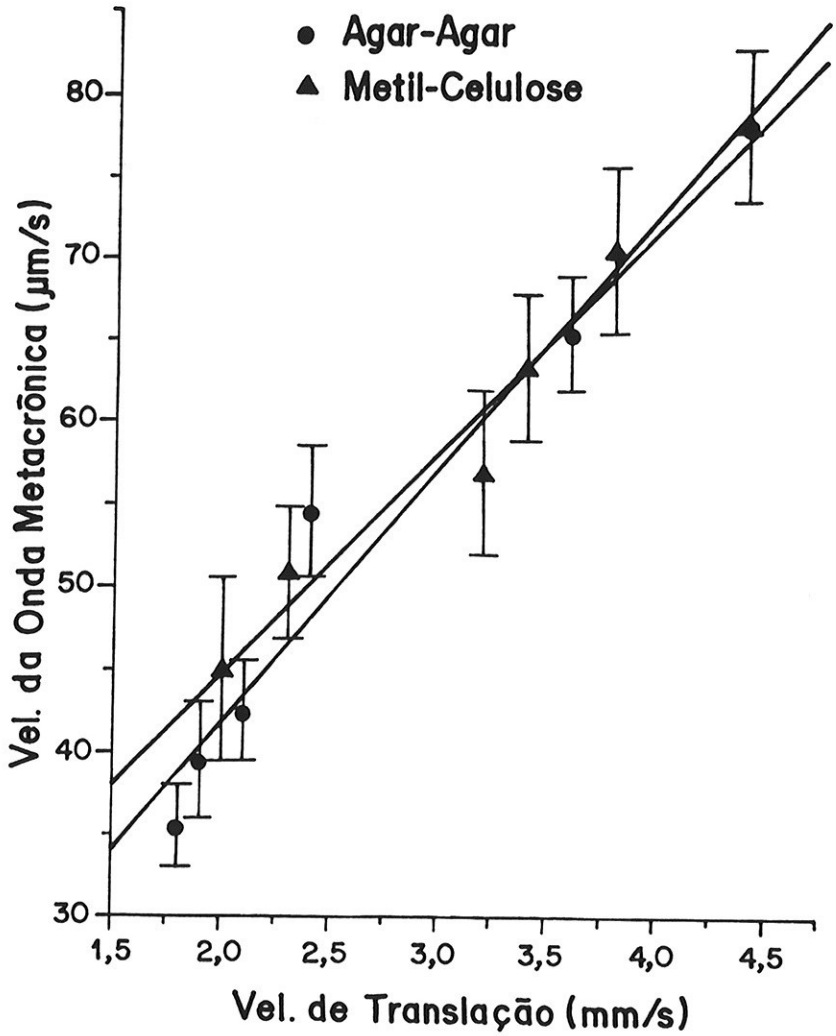


Gráfico III. Velocidade de propagação da onda metacrônica em função da velocidade de translação

Para o ajuste dos dados experimentais utilizou-se uma regressão linear , sendo a equação de ajuste apresentada abaixo.

$$V_w = V_{wo} + kV_t$$

onde: V_{wo}= (11,05 ± 4,53) µm/s e k = (15,38 ± 1,78) para agar-agar e V_{wo} =(18,0 ± 3,9) µm/s e k = (13,44 ± 1,19) para a metil celulose, sendo k o coeficiente angular da reta determinado através do ajuste dos dados experimentais.

Vê-se que quando o animal está se deslocando em água filtrada do meio, com velocidade da ordem de 4,5 mm/s, os cílios estão gerando ondas metacrônicas da

ordem de 78 μm/s, ou seja, as ondas são propagadas com velocidade cerca de 60 vezes maior que a velocidade do animal. Referindo-nos à Tabela I, vemos que esta velocidade de deslocamento corresponde a uma frequência do batimento dos cílios de 16 Hz.

A amplitude da onda é da ordem de 5μm, isto é, equivale ao comprimento do próprio cílio (4 a 5 μm). Para medir este parâmetro, através da MEV, dependemos da observação do perfil de onda completo. Conseguimos apenas algumas medidas, devido às condições pouco favoráveis para se observar esse perfil, ex., Figs. 22 e 23. As frentes de onda mais nítidas foram observadas ao longo do eixo anterior-posterior; ondas de pequena extensão, mas igualmente nítidas, são encontradas lateralmente à boca, nas áreas assinaladas (L) nas Figs. 8A e 9.

As Tabelas I e II resumem os dados numéricos experimentais, a respeito da frequência do batimento ciliar, da velocidade de translação do organismo e da velocidade de propagação das ondas metacrônicas, calculadas em função da viscosidade do meio.

Meio	Água	Agar-Agar				
η (Cp)	1.0	1.4	1.8	2.8	3.4	4.0
f_{bc} (Hz)	15.6±0.9	13.1±0.7	10.9±0.8	8.5±0.6	7.9±0.7	7.1±0.5
V_t (mm/s)	4.4±0.3	3.6±0.2	2.4±0.2	2.1±0.1	1.9±0.1	1.8±0.1
V_w (μm/s)	78.0±4.5	65.5±3.5	54.5±4.0	42.5±3.0	39.5±3.5	35.5±2.5

Tabela I. Dados referentes às soluções de Agar agar.

Meio	Água	Metil-Celulose				
η (Cp)	1.0	1.1	1.2	1.4	1.6	2.0
f_{bc} (Hz)	15.6±0.9	14.1±1.0	12.7±0.9	11.4±1.0	10.2±0.8	9.0±1.1
V_t (mm/s)	4.4±0.3	3.8±0.2	3.4±0.2	3.1±0.2	2.3±0.2	2.0±0.1
V_w (μm/s)	78.0±4.5	70.5±5.0	63.4±4.5	56.9±5.0	50.8±4.0	45.0±5.5

Tabela II. Dados referentes às soluções de Metil Celulose

III.2.AS FASES DO BATIMENTO CILIAR

A alta densidade ciliar na superfície ventral de M. tuba dificultou efetivamente a visualização do perfil ciliar na superfície do animal. Imagens como aquelas das Figs. 11, 12, 13 são suficientemente nítidas para medidas do comprimento de onda, como indicado. Por outro lado, muitas preparações, especialmente de criofraturas em etanol, resultaram favoráveis para caracterizar com clareza as fases do batimento ciliar que estão dando origem às ondas metacrônicas.

A Fig. 14 ilustra uma sucessão de organelas na posição de batimento efetivo, onde cada cílio se encontra em uma posição ligeiramente mais avançada que o precedente, ex. cílios marcados de (1) a (4), e portanto, correspondendo a fileiras de cílios em metacronismo; a onda se desloca da esquerda para a direita, nessa imagem. Nota-se que estes cílios dobram-se quase retilíneos, rigidamente, da posição de repouso (0) para uma posição de máxima inclinação, a quase 30° em relação à superfície celular. É nesta fase portanto, que os cílios executam o trabalho de propulsão da água.

A Fig. 15 ilustra cilios na posição de recôbro do movimento: observa-se uma curvatura acentuada na base, que chega a formar ângulos de 120° com a superfície horizontal. Esta flexão, que se propaga da base para o ápice, faz com que o cílio recupere gradativamente a posição de repouso (que não é necessariamente a 90° com a horizontal). Elementos em sincronismo (S →) estão situados em fileiras perpendiculares ao metacronismo (M ←→). A posição de repouso fica intercalada justamente entre estes dois extremos, exemplificada pelos cílios da Fig 16.

III.3.A ULTRA-ESTRUTURA DO CILIO DE M. tuba

Do ponto de vista da ultra-estrutura, todos os cílios epiteliais de quaisquer regiões do animal, são idênticos. Preparações como aquelas ilustradas nas Figs.16 e 17, obtidas por criofratura, demonstram claramente a forma e as dimensões dos cílios individuais, inseridos na superfície celular. Eles medem cerca de 5 μm de altura, tendo um calibre constante (0,25μm), apenas afilado na extremidade distal.

Cada cílio tem inserção em um "corpúsculo basal", localizado na superfície celular, por sua vez ancorado em raizes ciliares. Esta transição pode ter estrutura complexa, internamente.

Externamente porém, não se distingue a transição axonema/corpúsculo basal; mas quando o cílio é removido, acidental ou intencionalmente, sempre se destaca na mesma altura, ficando apenas o corpúsculo basal inserido na membrana

(Fig.29 e segs.). Isto indicaria a existência de uma zona preferencial de fratura, isto é, de menor resistência física.

Em preparação de coloração negativa (Figs. 19 e 21) os elementos microtubulares do axonema são espalhados em um feixe divergente, a partir de um anel mais ou menos difuso. Aparentemente, este anel corresponde à zona de "transição" acima do corpúsculo basal, nítidas nos cortes ultrafinos.

Nas Figs. 18 e 20 se pode notar claramente a periodicidade transversal correspondendo aos "raios" (seta preta) do axonema. Outras projeções periódicas junto ao par central (bainha central) são indicadas pela seta branca, oblíqua (Fig. 21).

Um corte ultra-fino da região de inserção do cílio na célula mostra além do corpúsculo basal (CB) e axonema (A), um sistema de raizes estriadas (R): uma raiz principal, perpendicular à superfície da célula, e uma raiz que segue curso quase paralelo a esta mesma superfície. Pode-se notar que o corpúsculo basal fica saliente acima da membrana. Cortes transversais destes axonemas, não ilustrados aquí, conformam-se ao modelo esquematizado na Fig. 3.

III.4. O PERFIL DA ONDA METACRÔNICA

As Figs. 22 e 23 mostram em perfil, cílios da borda lateral do animal, correspondendo a regiões de onde foram tomadas medidas da frequência do batimento. Pode-se identificar a forma dos cilios individuais, imobilizados em diferentes fases do ciclo de batimento. Aqueles numerados de (1) a (4) na Fig. 22, estão em fases sucessivas do batimento:efetivo (1) cílios supostamente em repouso (0) e cílios em posição de recôbro (2,3,4). Nem sempre entretanto, estas fases são prontamente identificáveis, devido à alta densidade de cílios presentes. Comparando-se com as imagens obtidas para alguns protozoários, processados simultaneamente com nosso material, tem-se uma idéia do grau de complexidade enfrentado no caso do turbelário que escolhemos para estudar.

Em Paramecium sp. (Figs 24 e 25), onde a ciliatura é comparativamente rala, e as cristas de ondas são oblíquas (setas), se pode medir com bastante facilidade o comprimento de onda (λ = 10 μm); pode-se ainda, identificar os cilios individualmente inseridos na película: Fig. 25 (S→) indica direção de sincronismo e (M→) indica a de metacronismo.

Também na região oral ("citóstoma") de um outro protozoário (Fig. 26) observam-se nitidamente três frentes de onda, em sequência, A,B,C. Na onda A, uma única fileira de cilios exibe todo o ciclo desde a posição efetiva (E), até o

recôbro (R). Cílios da fileira B exibem ainda, rotação na base, durante o recôbro (<). Na fileira C, os cilios estão imobilizados em sincronismo, na fase de repouso.

As ondas metacrônicas de M.tuba, ao contrário, puderam ser melhor analisadas após remoção parcial dos cílios. Os vários tratamentos e agentes usados para esta finalidade, mostraram-se eficazes, dentro de certos limites: criofratura em etanol, ação de anestésico (dibucaina), ultra-som e descarga elétrica.

III.4.1. Crio-fraturas em etanol

Neste método, o material é fraturado à temperatura do nitrogênio líquido, e os planos de fratura não podem ser controlados. Planos favoráveis para a observação do perfil das ondas foram entretanto encontrados, e ofereceram imagens limpas, de ótima resolução dos cílios, cortados em várias orientações. As Figs. 14 e 28 mostram cílios que foram fraturados próximos à base, ao lado de outros íntegros. Com planos de fratura verticais, o perfil das ondas pôde ser reconhecido (ex. Figs.14 e 27); ao contrário, a Fig. 28 mostra em plano de fratura inclinado, a superfície celular com cílios e microvilosidades salientes.

III.4.2. Hidrocloreto de dibucaina

Nas condições usadas, a dibucaina não produziu os efeitos esperados, tal como acontece com protozoários (Satir e outros, 1976). Concentrações baixas do anestésico foram insuficientes para remover quantidade esperada de cílios e assim expor a superfície para estudo. Além de ser um anestésico tópico, o hidrocloreto de dibucaína aparentemente estimulava um excesso de secreção em M. tuba, a ponto de camuflar os cílios (Aragão e Silveira,1993). Doses altas revelaram-se letais, fazendo com que os animais se contraissem e ficassem disformes. Uma preparação bem sucedida é apresentada na Fig. 15, ilustrando remoção parcial de cilios, em uma frente de onda bem fixada (Aragão e Silveira, 1993).

III.4.3. Ultra-som

A remoção dos cílios foi eficaz para tempos curtos de exposição ao ultra - som, de 1 a 10 segundos. O ultra-som aplicado a material préviamente fixado e já imerso em etanol absoluto, removeu quantidade adequada de cilios, expondo dessa

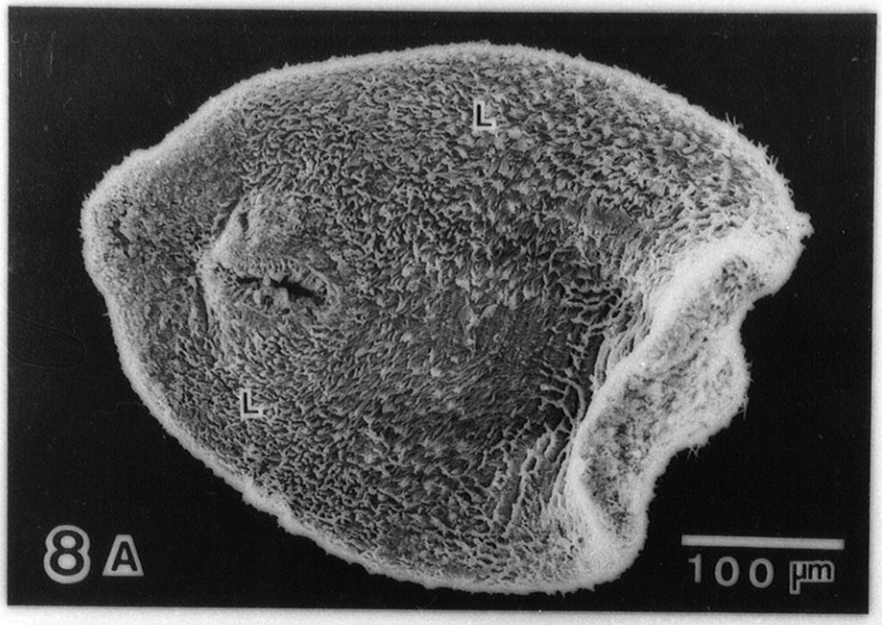
maneira a superfície "limpa". Na Fig. 29 observa-se uma região completamente deciliada, confinada com outra área ainda provida de muitos cílios. Na Fig. 30, onde o ultra-som foi aplicado a uma amostra congelada em nitrogênio liquido, a remoção foi diferenciada: todos os cílios estão fraturados, porém em diferentes alturas. A Fig.31 corresponde à borda lateral de um indivíduo de onde foram tomadas medidas de frequência, com o microscópio de luz. Houve remoção total dos cílios e de grânulos de secreção conhecidos como "rabditos" (aberturas maiores,*) conferindo um aspecto granuloso à superfície. O mesmo resultado foi notado com 10seg de tratamento, na região dorsal (Fig. 32), mostrando o perfil poligonal das células epiteliais. Em aumentos maiores nestas preparações, vê-se detalhes do corpúsculo basal de cada cílio, e respectiva raiz (Fig. 33). Na Fig. 34 pode-se comparar o corpúsculo basal remanescente com as microvilosidades, também salientes. Em superfícies como estas, completamente expostas (Fig. 34), foram feitas contagens da densidade ciliar, obtendo-se o valor de 200 cilios/célula (aproximadamente 16 cílios /μm^2). Imaginando que o animal adulto tem forma aproximada de uma folha elíptica, com eixos de 3,5 x 1,5 cm de dimensões, sua área aproximada seria de 3,3 x 10^9 μm^2. Logo, um organismo destas dimensões teria cerca de 5 x 10^{11} cílios, todos realizando trabalho coordenado.

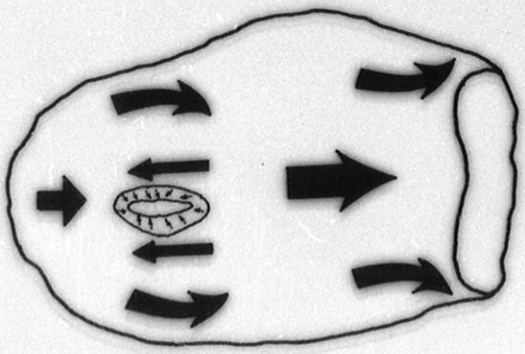
III.4.4. Choque elétrico

A passagem de corrente elétrica de poucos miliamperes através do organismo vivo, provocou efeitos de extensão variável, como mostram as imagens de varredura. Correntes de até 1,6 mA/s revelaram-se inócuas, aparentemente (Fig. 11): os cílios foram imobilizados nas fases de batimento efetivo e de repouso, sem alteração aparente. Acima desse valor, até 3,6 mA/s, o efeito observado foi equivalente ao da dibucaina, ex. Fig. 36: houve alguma redução perceptivel na densidade de ciliatura. Correntes mais altas porém, afetaram de modo pronunciado não apenas a quantidade de cílios removidos, mas tiveram efeito também dissociando as próprias células, descolando-as do tecido subjacente.

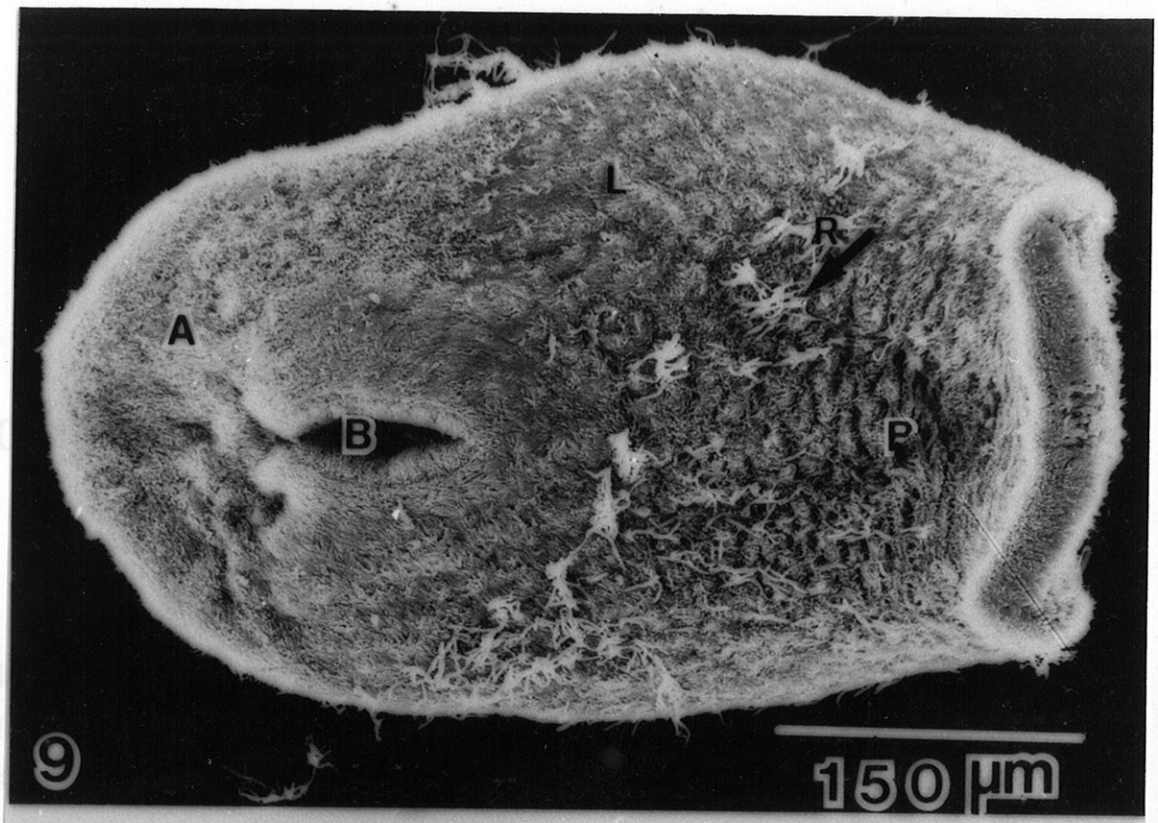
As Figs. 36 e 37 ilustram um descolamento do epitélio (E), da camada fibro-muscular, f (M. tuba não possui lamina basal do epitélio). Algumas células sofreram remoção parcial dos cílios (Fig. 38).

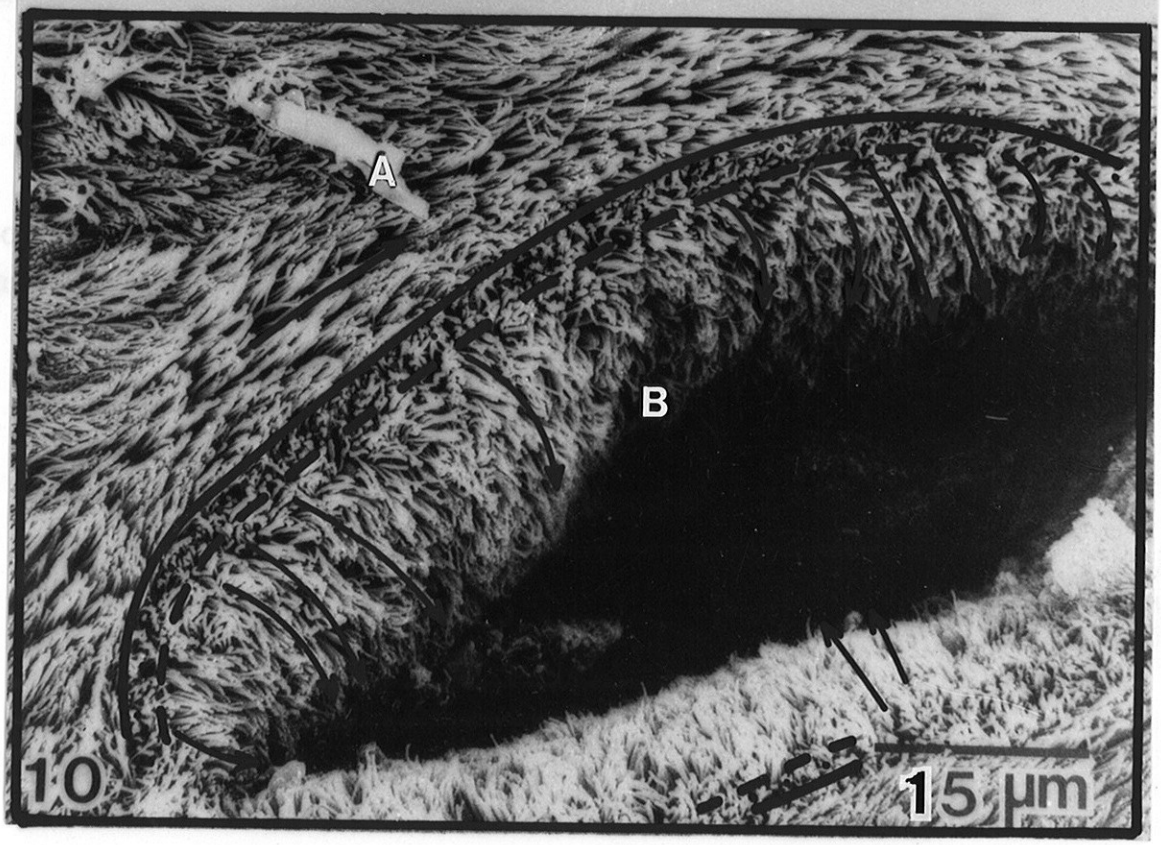
MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS
(Figs. 8 a 38)

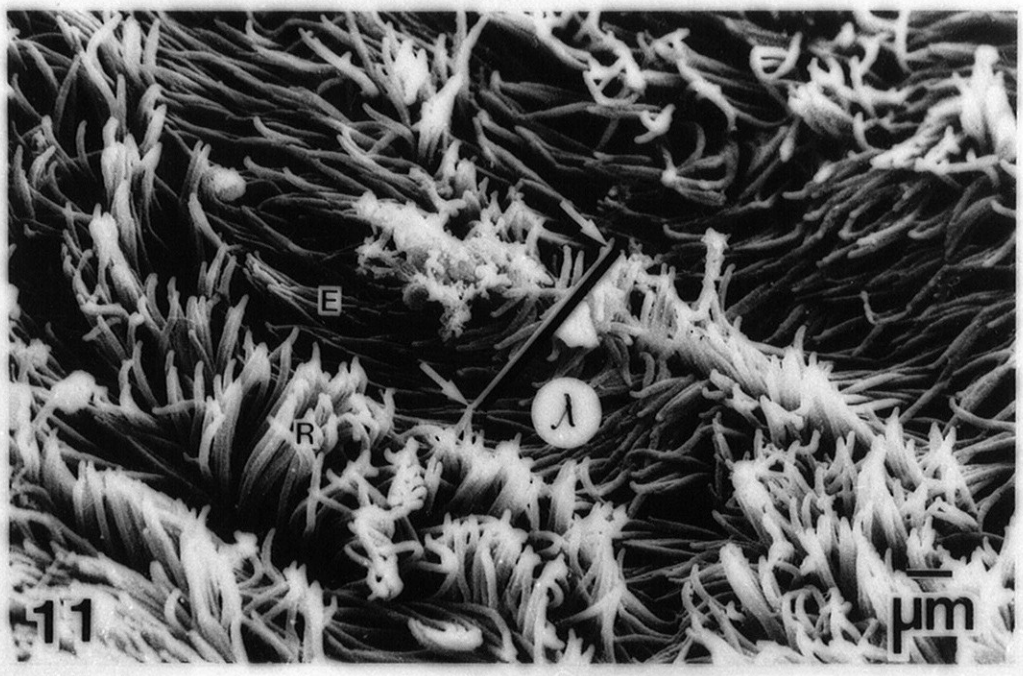


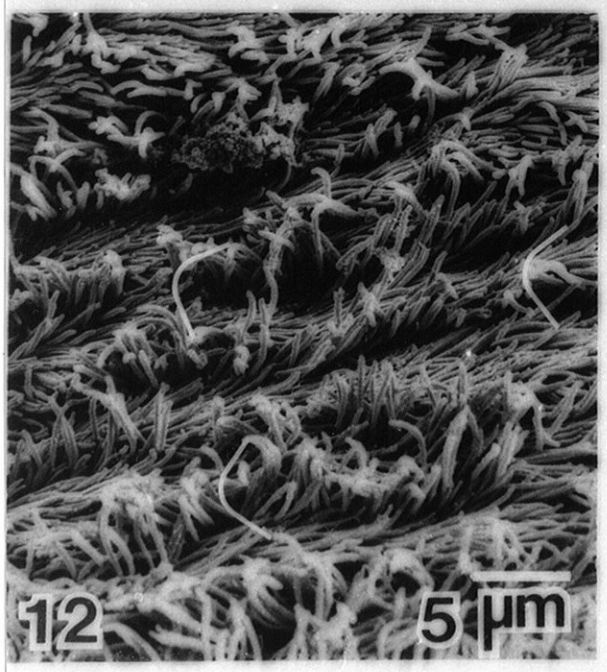


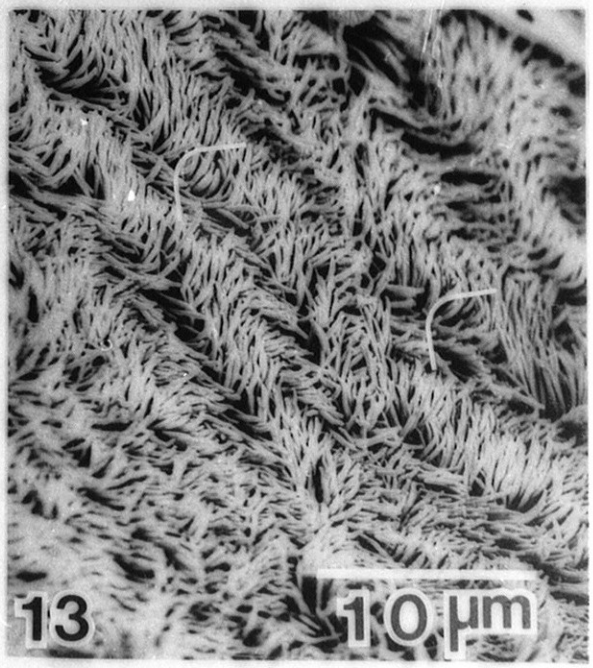
8C

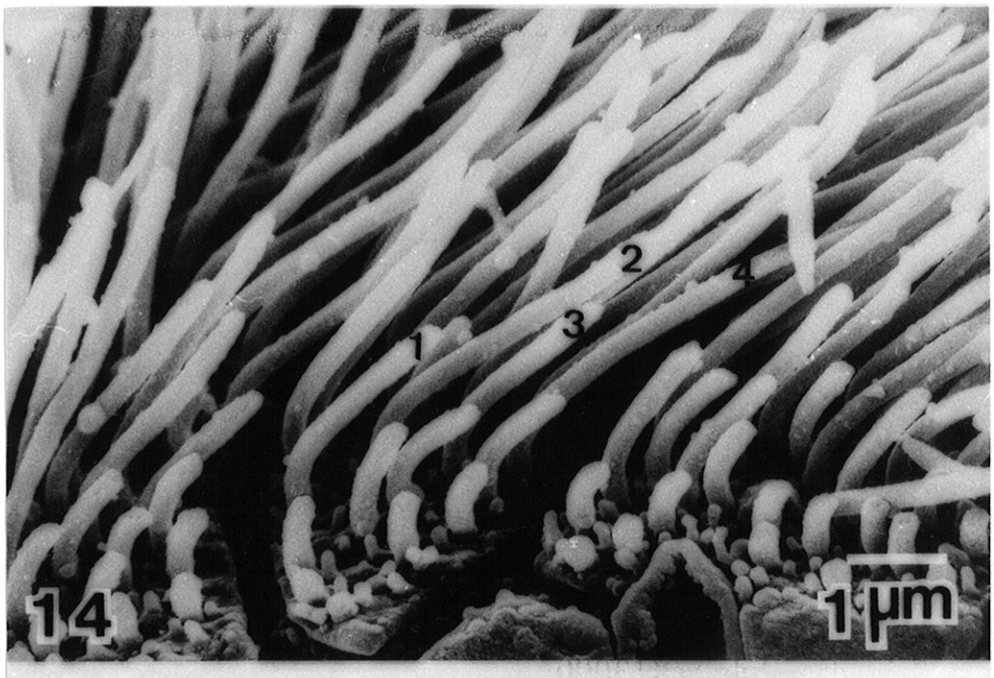

L
R
A
B
P
9
150 µm

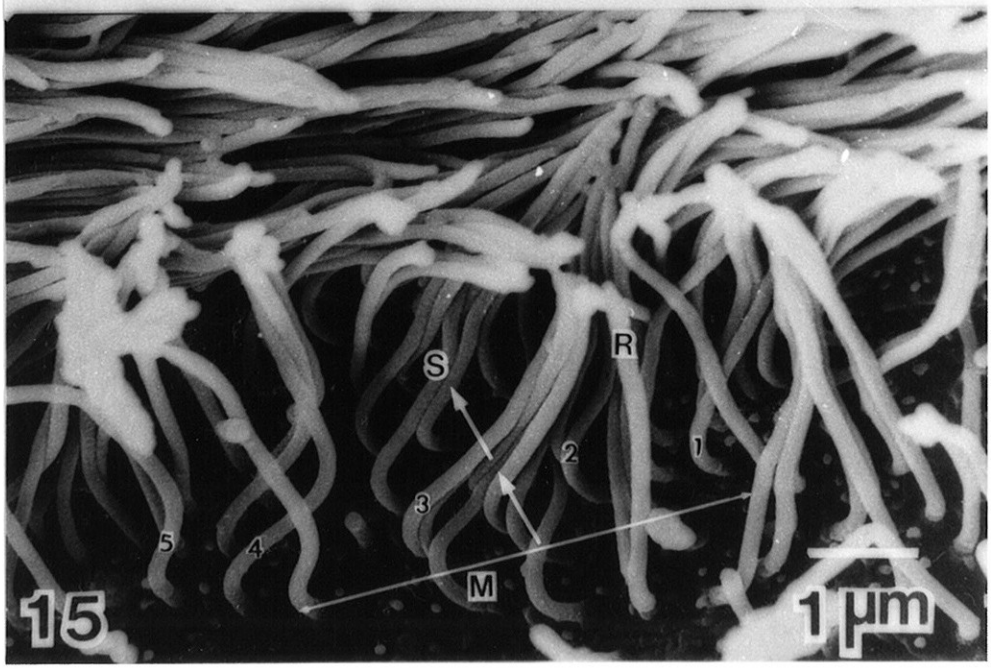

A
B
10
15 µm


E
R
λ
11
μm

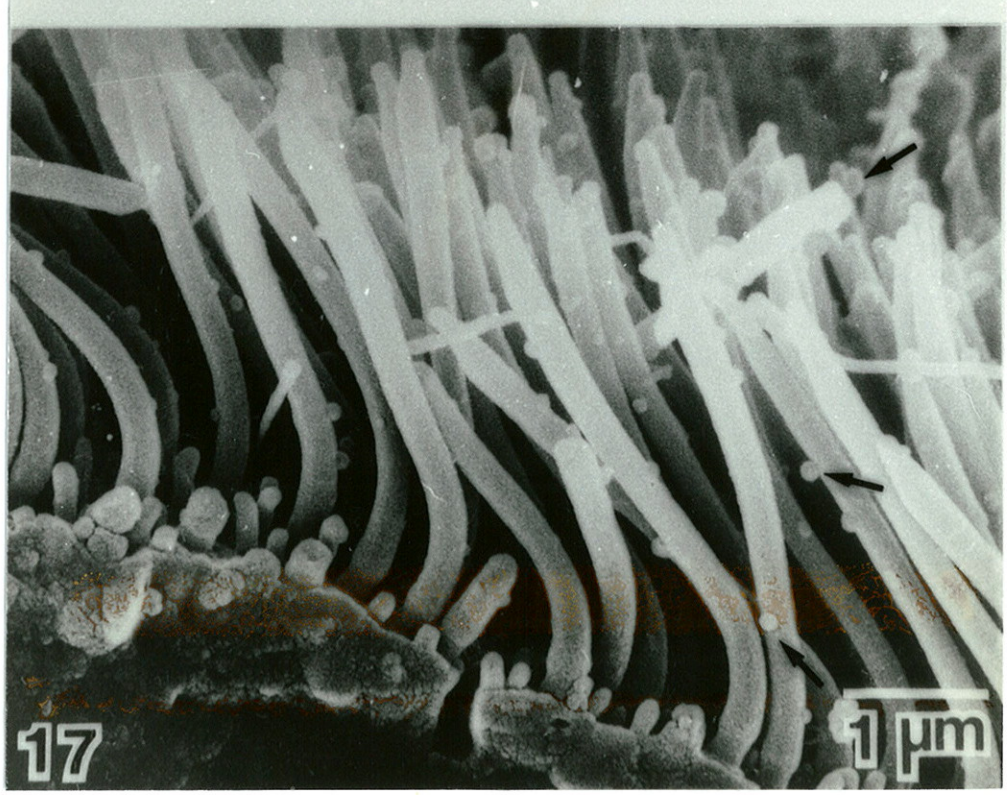

12
5 μm

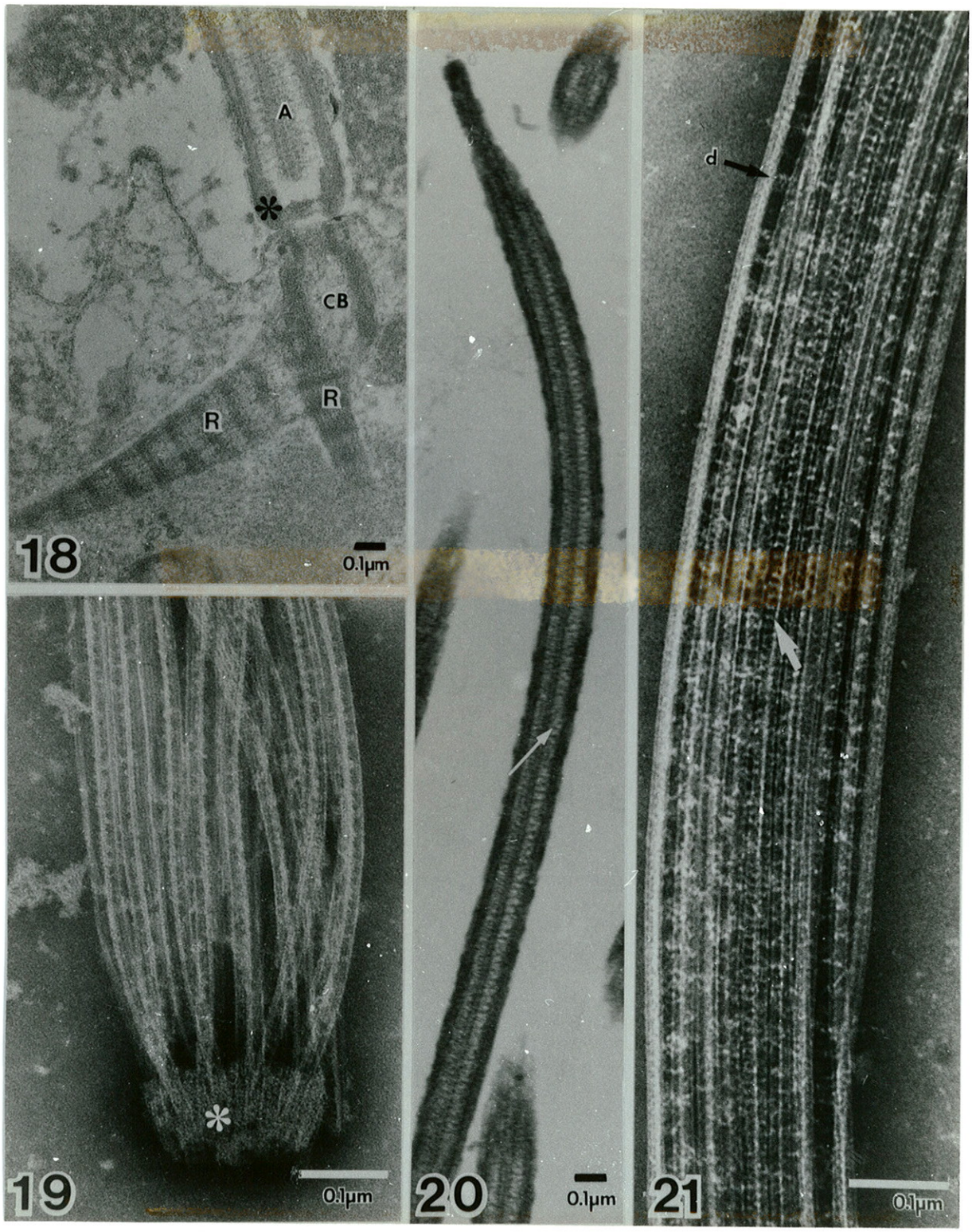

13
10 μm


1
2
3
4
14
1 µm


S
R
1
2
3
4
5
M
15
1 µm

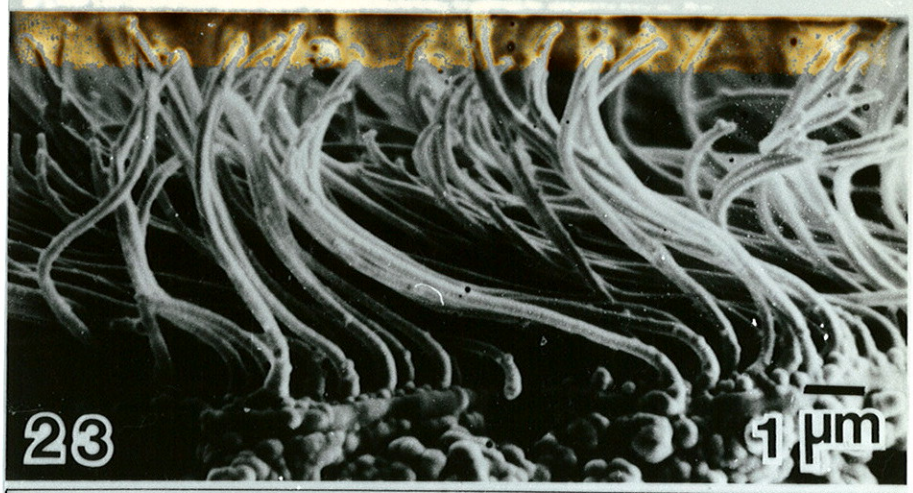
16
1 µm

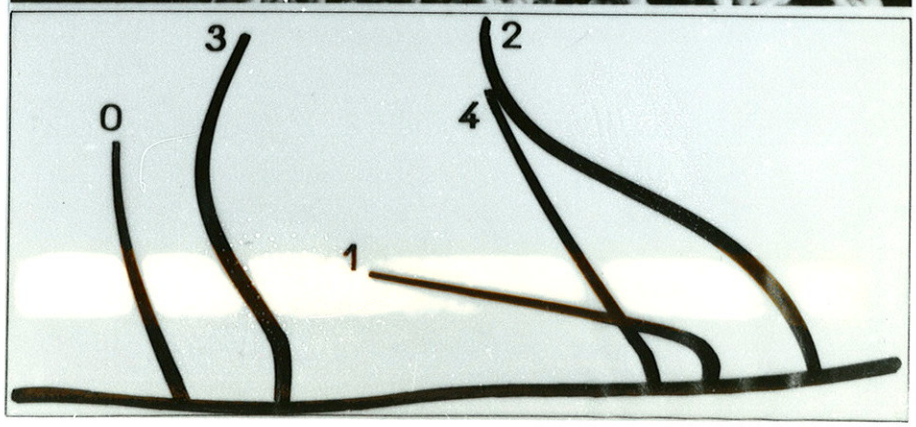

17
1 µm

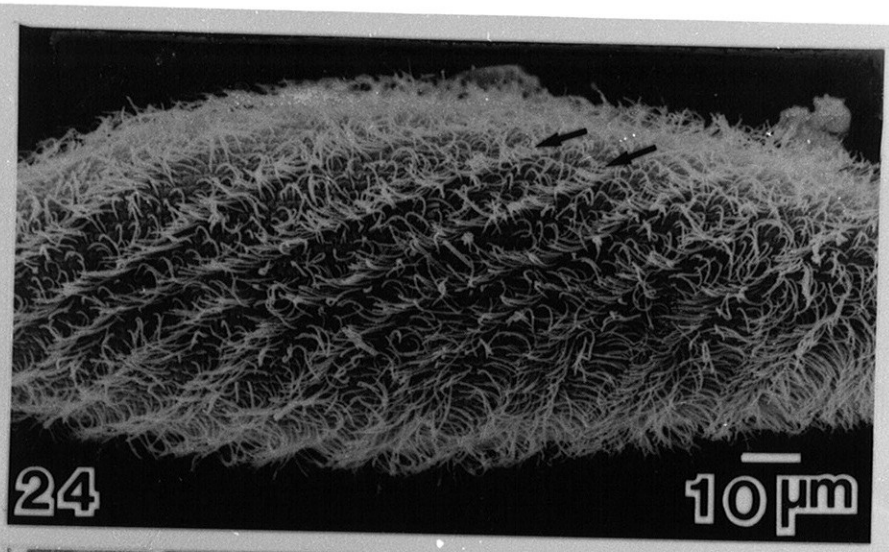

A
CB
R
R
18
0.1μm
19
0.1μm
20
0.1μm
d
21
0.1μm

22
1 µm

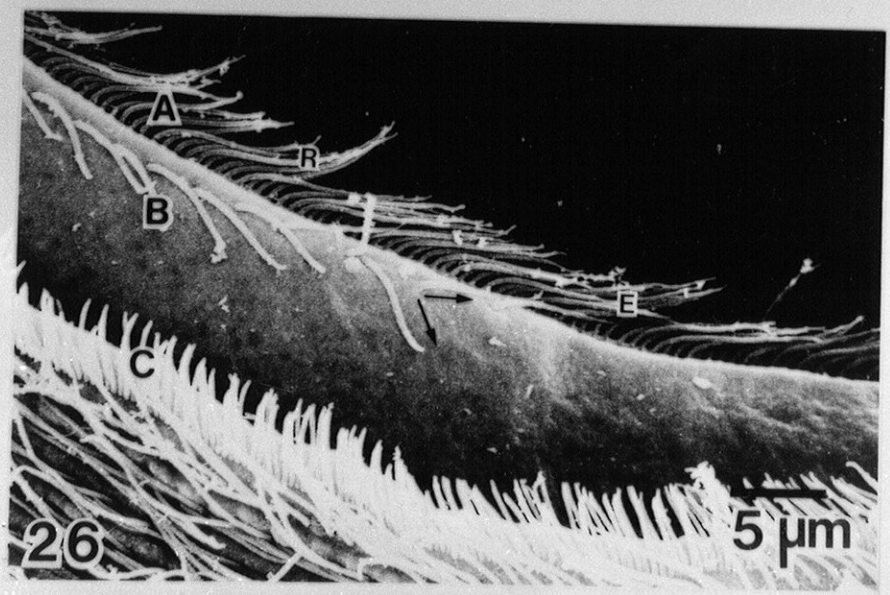
1
2
3
0
4

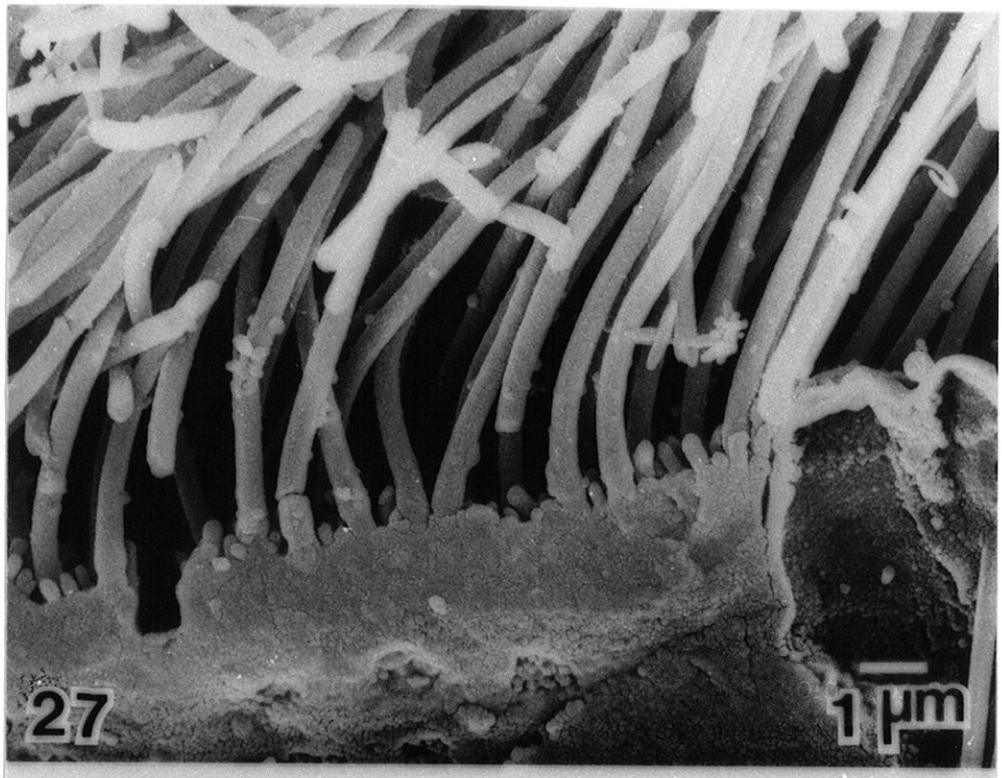

23
1 µm

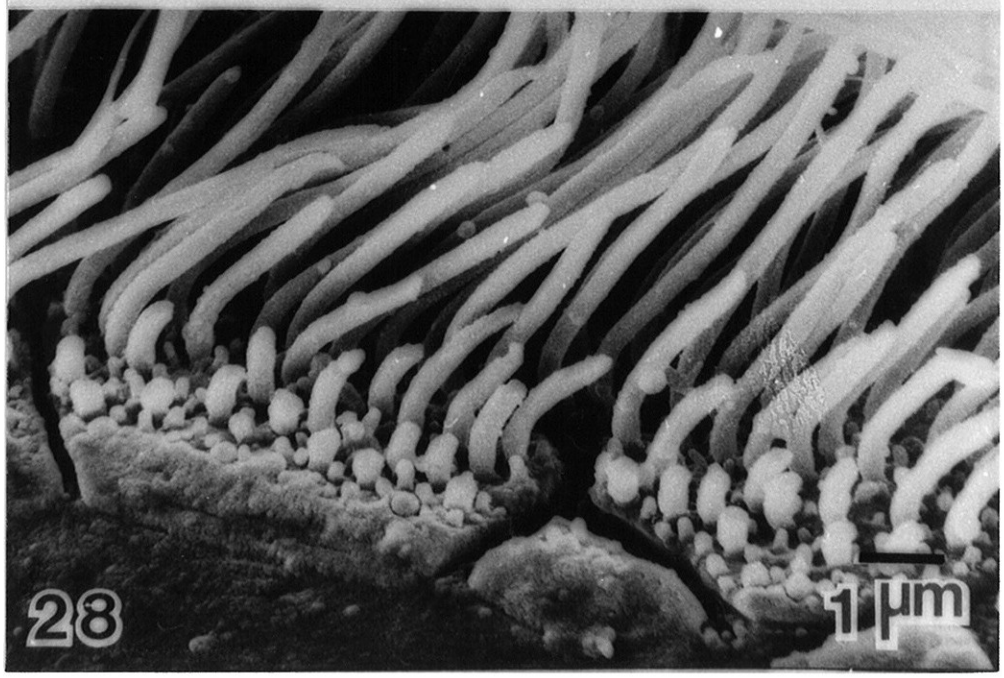

3
2
0
4
1


24
10 µm

M
S
25
1 µm

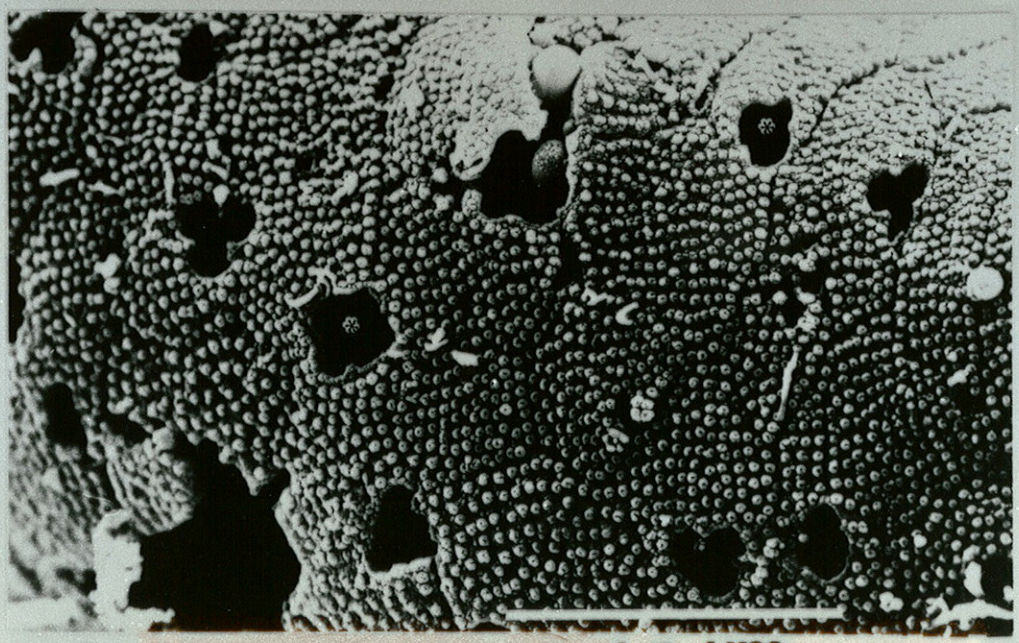

A
R
B
E
C
26
5 µm

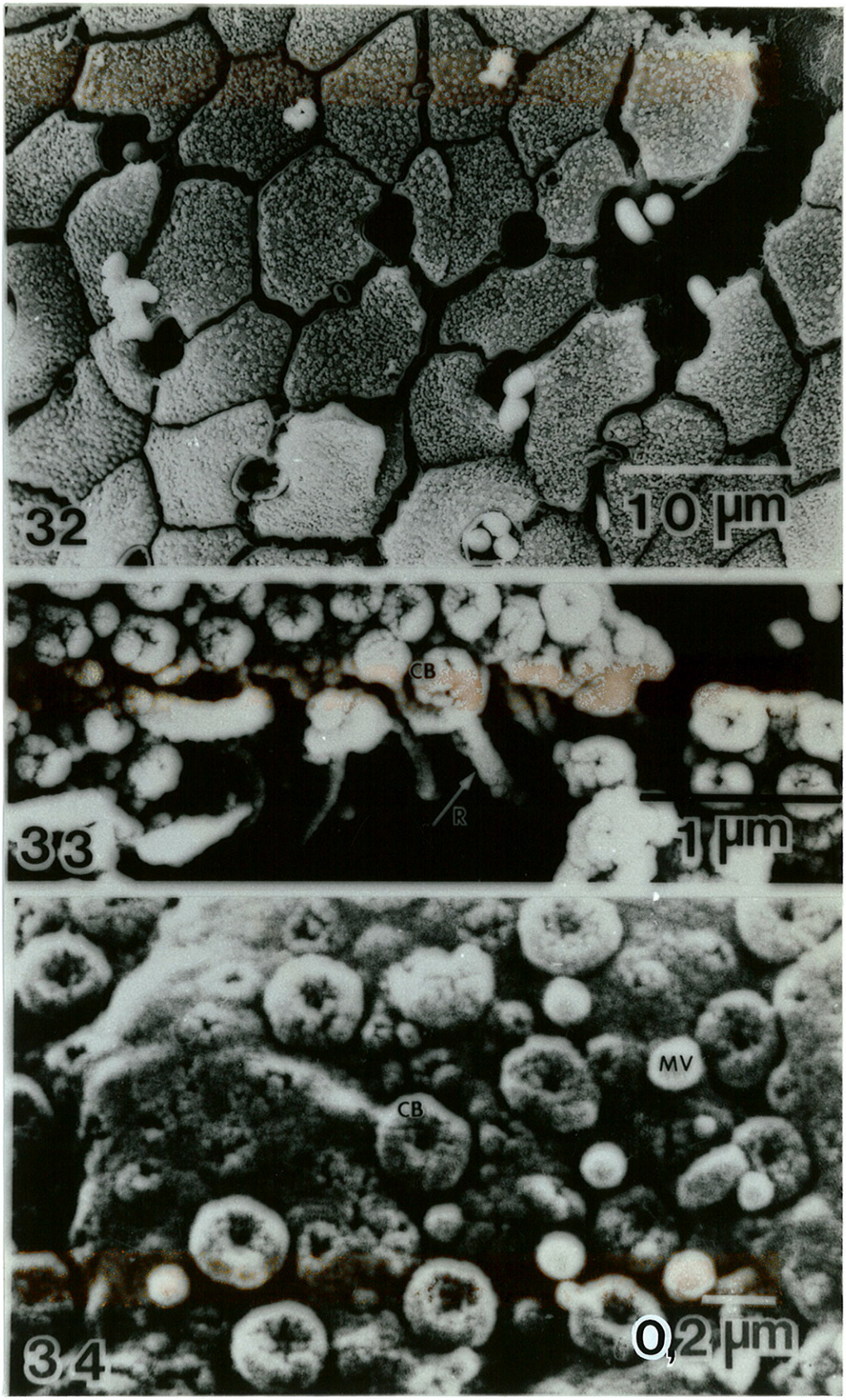

27
1 µm

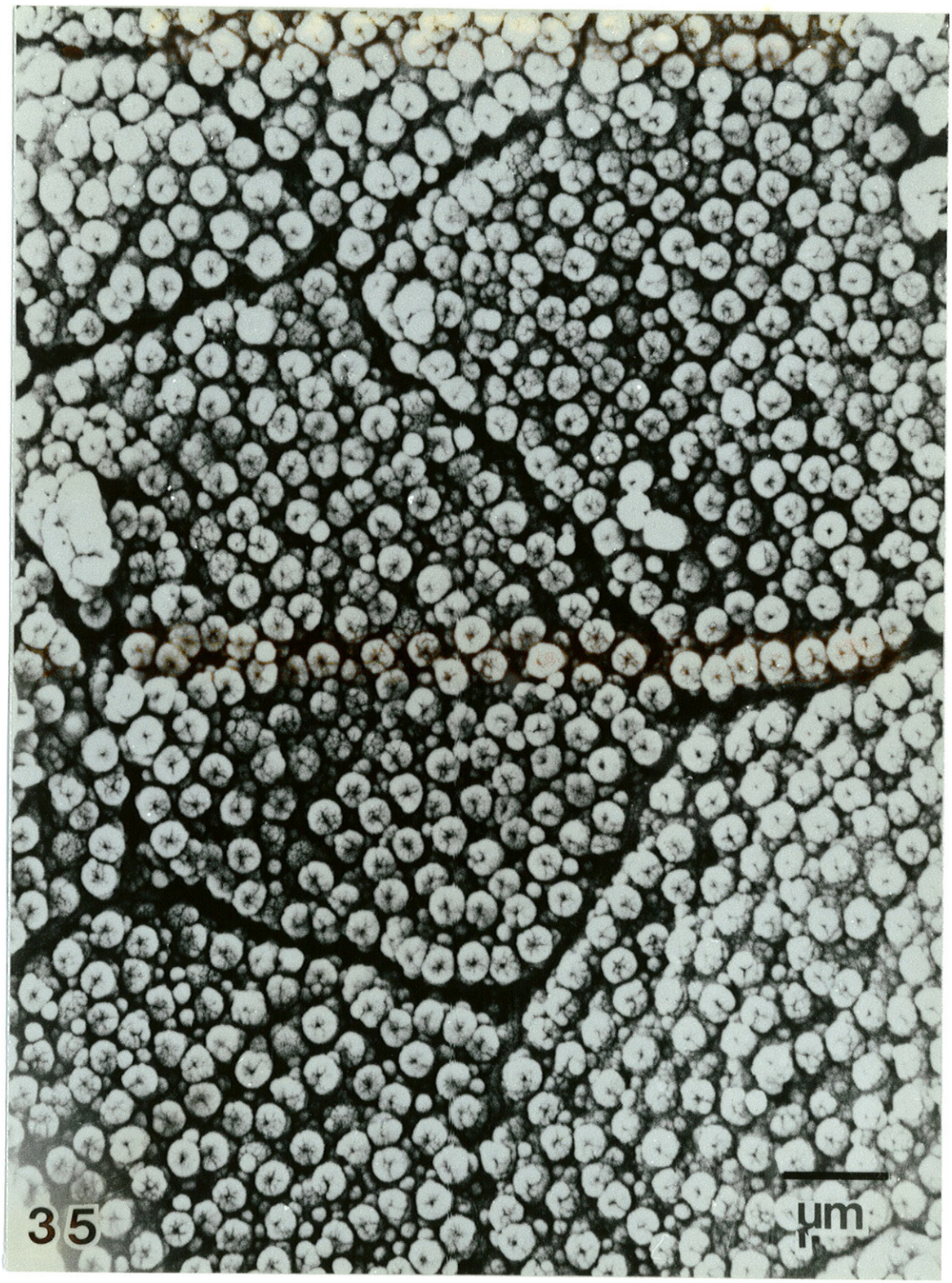

28
1 µm

29
5 µm

30
1 µm

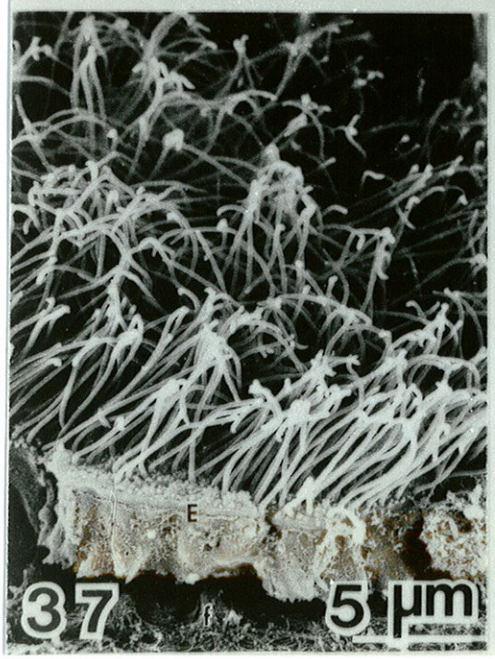

31
10 µm

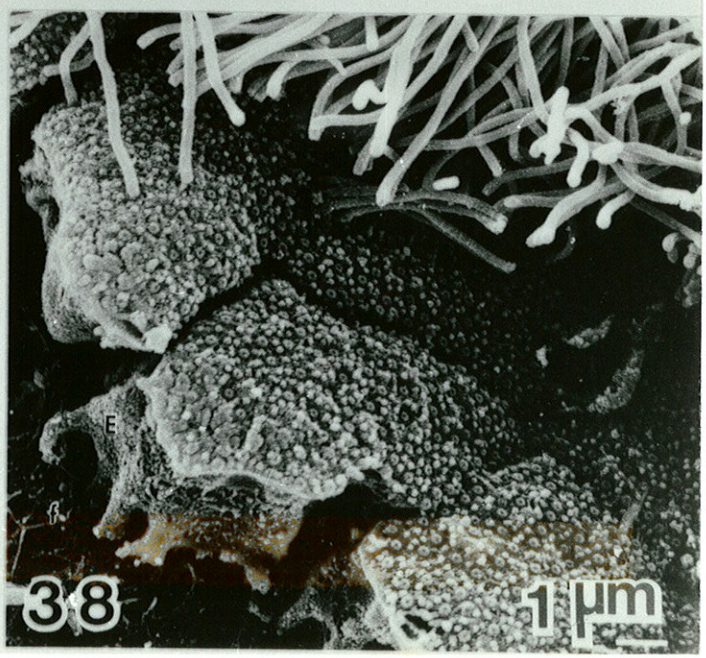

32
10 µm
CB
R
33
1 µm
MV
CB
34
0,2 µm



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ex. 1
SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO
2449
INSTITUTO DE FÍSICA

36
1 µm


E
37
5 µm


E
38
1 µm

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

Procuramos estudar as características dos cílios envolvidos na movimentação do turbelário Macrostomum tuba, fazendo uso da microscopia eletrônica de varredura. Estes cílios revestem toda a superfície do animal, e executam trabalho coordenado, promovendo ondas conhecidas como metacrônicas; a propagação destas ondas na superfície do animal impele a água do meio em diferentes orientações, e assim resulta no seu deslocamento.

Usando métodos especiais de fixação "instantânea", conseguiuram-se preparações com boa preservação morfológica das ondas tri-dimensionais, as quais foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Esta abordagem foi utilizada por outros autores (Satir,1963) especialmente em organismos uni-celulares (Barlow e Sleigh, 1979; Parducz, 1967; Tamm e Horridge, 1970). Sanderson e Sleigh (1981) estudaram o mecanismo de transporte de muco por cílios, também fazendo uso da microscopia eletrônica de varredura e de cinematografia, e assim determinando os parâmetros das ondas metacrônicas.

Na grande maioria porém, o estudo do movimento ciliar é conduzido in vivo e faz uso de metodologia mais elaborada, com equipamentos disponíveis apenas em laboratórios dedicados a estas pesquisas (Barlow e outros, 1993; Gheber e Priel, 1990 a,b ;Ovadyahu e Priel, 1989; Romet e outros, 1991; Thyberg e outros, 1990).

Um tratamento matemático proposto por Gheber e Priel (1990 a,b) equaciona a dependência da direção e extensão da onda metacrônica com o batimento dos cilios individuais. Estes autores verificaram que o comprimento de onda depende não apenas do comprimento do cílio, do ângulo que este faz com a superfície celular durante a fase de recôbro, mas também do grau de assimetria do batimento e do intervalo representado pela "pausa". De acordo com esses estudos, a frequência do batimento teria pequena influência no comprimento de onda.

Na caracterização da onda metacrônica são importantes vários parâmetros, que dependem em última análise, dos parâmetros de seus elementos constituintes, isto é, dos cílios individuais. De acordo com Satir (1992), estudar uma onda metacrônica equivale a examinar o que seria observado para um único cílio, nas diferentes fases do ciclo do batimento. Em outras palavras, as propriedades de um único cílio (estrutura interna, forma, dimensões, ângulo de curvatura, propriedades

elásticas, etc) definem muitas das características da onda. Várias destas propriedades podem ser estimadas por tratamento hidrodinâmico (ex. Holwill, 1966, 1974; Lighthill, 1976). Outras, como as dimensões exatas e a ultra-estrutura, só podem ser diretamente determinadas por microscopia eletrônica (resumos em Satir, 1992; Warner, 1974).

Mesmo o tratamento hidrodinâmico do movimento ciliar só pode ser corretamente interpretado em função da estrutura interna do próprio cílio (Holwill, 1989), uma vez que o movimento do cílio é realizado através de um deslocamento relativo (mensurável), entre microtubulos adjacentes, que constituem o arcabouço "9+2". São estas interações internas à estrutura ciliar que dão origem ao movimento de oscilação do cílio; são elas também que liberam a energia para sua movimentação (Satir e outros, 1981).

Apesar de todo o conhecimento acumulado sobre as características dos cílios individualmente, e sobre as propriedades das ondas metacrônicas, ainda não se sabe exatamente como estas ondas são coordenadas para o trabalho conjunto. Várias evidências tem sido apresentadas a favor de diferentes teorias, seja na coordenação a nível de uma única célula, como é o caso dos Protozoários (Machemer, 1974; Naitoh e Eckert, 1974), seja para organismos multi-ciliados (Gheber e Priel, 1990 a,b; Sleigh, 1974).

Turbelários tem sido pouco estudados sob este aspecto.De nossa parte, consideramos estes animais um excelente material de estudo, pois na maioria das espécies o movimento ciliar predomina sobre o movimento muscular.

Com exceção de um estudo por Martin (1978), a literatura registra, de nosso conhecimento, apenas informações sobre a densa cobertura ciliar em geral (Reuter, 1987 e refs. cit. loc.). O estudo comparativo de Martin entretanto, inclui medidas de velocidade de deslocamento ciliar para o turbelário Polychoerus (1 a 2 mm/s). O autor verificou ainda a direção da onda como sendo dexioplética. Lamentavelmente as imagens de varredura apresentadas no trabalho não permitem identificar os cílios, que se apresentam completamente recobertos de muco.

O estudo que realizamos com o turbelário M. tuba, no presente caso, permitiu-nos definir vários parâmetros do movimento ciliar, demonstrando a viabilidade de nossa proposta. Foi possivel analisar por microscopia eletrônica de varredura, com bastante clareza, a forma assumida por um único cílio durante as fases de batimento efetivo, de repouso e de recôbro. Pudemos também examinar como e quanto o cilio se curva desde a inserção na célula, até a extremidade distal, durante a fase de recuperação (Aragão e Silveira, 1993 e 1995).

O diâmetro do cílio, que é uma constante em todos organismos conhecidos, mostrou-se consistente em nosso material, o que evidencia que os

métodos empregados para preparo das amostras foram confiáveis. Justificamos assim não termos incluido neste trabalho, um estudo mais completo do cílio, por microscopia eletrônica de transmissão. As figuras apresentadas no texto (Figs. 18 a 21), apenas ilustram as características morfológicas mais evidentes. Por outro lado, verificamos uma particularidade nestes cílios, representada por um afilamento da extremidade distal, característica essa comprovada em cortes longitudinais.

O registro da frequência do batimento ciliar representa um parâmetro importante para o cálculo da velocidade de propagação da onda; em que obtivemos um valor médio de 16 Hz, à temperatura ambiente. Cílios de Paramecium batem com frequência maior, 30 Hz, a 20°C (Sleigh, 1974); medições de alta precisão obtidas para cílios de traquéia de coelho deram valor médio de 8 Hz (Romet e outros, 1991).

Neste estudo foi possível analisar ainda, a influência da variação da viscosidade do meio sobre a frequência do batimento ciliar, correlacionando estes dados com a velocidade de propagação da onda. Como se sabe, a interação do cílio com o fluído do meio permite estimar as forças envolvidas, sob o ponto de vista hidrodinâmico No caso de organelas como cílios, que possuem baixo número de Reynolds (da ordem de 10^{-3}), as forças inerciais podem ser desprezadas, de certo modo simplificando cálculos hidrodinâmicos. Mesmo assim, esta abordagem é complexa, e por exemplo, cálculos de velocidade de fluidos transportados por cilios foram determinados em poucos casos (Holwill e Satir, 1987).

Em nosso estudo, limitamo-nos a uma abordagem que incluiu apenas alguns parâmetros do movimento ciliar, suficientes acreditamos , para abrir novas perspectivas de estudos. De acordo com os autores acima citados (Holwill e Satir, 1987), em princípio, as propriedades elásticas de uma organela ciliar podem ser avaliadas a partir do conhecimento da sua forma de onda.

Entre as dificuldades encontradas no presente estudo, como ressaltamos, estava a alta densidade de cílios distribuidos sobre a superfície do animal. Procuramos então, remover parte destes cílios, fazendo uso de métodos tradicionais para protozoários (Blum, 1971; Ogura, 1981; Satir e outros, 1976). Apenas a dibucaina, usada pelos últimos autores citados, forneceu resultados satisfatórios. Foram então desenvolvidos experimentos originais, com métodos físicos (choque elétrico, ultra-som), além do uso da crio-fratura em etanol (Humphreys e outros, 1974). Todos estes ensaios tiveram o mérito de "limpar"a superficie ciliada, em extensão variável, como se descreveu nos Resultados. Uma ação mais extensiva de remoção ciliar, além do previsto, foi vantajosa para avaliarmos o perfil das células epiteliais e calcularmos sua área média, por MEV . Com estes dados, contando número de corpusculos basais por unidade de área, fizemos uma estimativa do número de cílios em um M. tuba de dimensões "médias" (1,5 x 3,5 mm).Obtivemos um valor médio de 5×10^{11} cílios.

Comparando com o número de cílios que haveria em um Paramecium 5×10^3 ,dados de Wichterman, 1953 (em Sleigh, 1969), parece-nos que o revestimento do turbelário é muito mais denso, efetivamente. Células epiteliais do pálato de rã, estudadas por Ovadyahu e Priel (1989) possuem ainda menor número: cerca de 150 cílios/célula. Neste tecido, o comprimento do cílio é de 6 μm e a frequência de batimento de 10 Hz.

Verificamos ainda, com estes experimentos de ablação ciliar, que existe uma região de fratura preferencial, entre axonema e corpúsculo basal. Este fenômeno já havia sido observado por Blum (1971), para diferentes organismos e diferentes agentes; Blum contudo não encontrou nenhuma explicação fisiológica para este fato. Em nosso material, a imagem direta deste fenômeno pode ser avaliada, em função dos diferentes agentes usados. Verificamos ainda, que a extensão da ablação ciliar pode ser controlada.

Quando submetemos o material congelado em nitrogênio líquido,a ondas de ultra som, observamos que os cílios que se encontravam na posição de repouso se mostraram mais resistentes à fratura do que aqueles que se encontravam nas demais fases do ciclo de batimento.

Quando fizemos uso de corrente elétrica passando através do animal verificamos que para valores superiores a 1,5mA o organismo se defende eliminando uma extensa camada de secreção, tornando as preparações para observação em MEV bastente limpas e preservando os cílios em ótimas posições para a determinação do comprimento de onda.

Além do interesse imediato sobre o conhecimento do movimento ciliar em nosso material de estudo, a estrutura interna de cílios e suas propriedades mecânicas são importantes de um ponto de vista mais amplo: cilios em vertebrados estão envolvidos em varias funções, como transporte de muco no sistema respiratório, em funções sensoriais, em movimentação de gametas, etc. Estudos de Afzelius e Eliasson (1979) e de Baccetti e outros (1981) demonstraram uma correlação direta entre a estrutura defectiva de cilios (axonemas imóveis) e uma síndrome patológica de consequências relativamente severas, para o homem, conhecida como "doença de Manes-Kartagener" ou de "discinesia ciliar primária".

REFERÊNCIAS

AFZELIUS, B. A., 1959

Electron microscopy of the sperm tail: results obtained with a new fixative.
J. Biophys.Biochem.Cytol. **5**: 269-278.

AFZELIUS, B.A. e R. ELIASSON., 1979

Flagella mutants in man: On the heterogeneity of the immotile cilia syndrome.
J.Ultrastruct.Res. **68**: 42-52

ARAGÃO, P.H.A. e M. SILVEIRA, 1993

Estudo da atividade ciliar em Macrostomum tuba
XIV Colóquio da SBME, Caxambú, MG., setembro .Resumos **2:** 563-564

ARAGÃO, P.H.A. e M. SILVEIRA, 1995

The ciliary apparatus of Macrostomum tuba (Turbellaria, Macrostomida)
XV Colóquio da SBME/ 3rd. Interamerican Conference of Electron Microscopy. Caxambú, MG
Acta Microscopica **4**, Suppl., p.57

BABA,S. e Y. HIRAMOTO, 1970

A quantitative analysis of ciliary movement by means of high-speed microcinematography.
J.Exp.Biol. **52**: 675-690.

BACCETTI, B.; A.G. BURRINI; V. POLLINI e T. RENIERI ,1981

Human dynein and sperm pathology
J.Cell Biol. **88**: 102-107

BARBER, V.C. e A. BOYDE,. 1968

Scanning electron microscopic studies of cilia.
Z. Zellforsch. **84**: 260-284.

BARLOW, D.I. e M.A. SLEIGH, 1979
Freeze substitution for preservation of ciliated surfaces for scanning electron microscopy.
J. of Microscopy, **115**: 81-95.

BARLOW, D.J., M.A. SLEIGH, 1993
Water flows around the comb-plates of the Ctenophore Pleurobrachia plotted by computer: a model system for studying propulsion by antiplactic metachronism
J.exp.Biol. **183**: 149-163

BARLOW, D.I.;M.A. SLEIGH e R.J. WHITE, 1993
Water flows around the comp plates of the Ctenophore Pleurobrachia plotted by computer: A model system for studying propulsion by antiplectic metachronism.
J.Exp.Biol. **177**: 113-128.

BLAKE, J., 1972
A model for the micro-structure in ciliated organisms.
J.Fluid Mech. **55**: 1-23

BLAKE, J., 1974
Hydrodynamic calculations on the movements of cilia and flagella. I. Paramecium
J.Theor. Biol. **45**: 183-203

BLUM.J.J., 1971
Existence of a breaking point in cilia and flagella.
J.Theor.Biol. **33**: 257-263.

CHILDRESS,S., 1981
Mechanics of swimming and flying.
Cambridge University Press
Cambridge

FAWCETT, D. e K. R. PORTER, 1954
A study of the fine structure of ciliated epithelia.
J.Morphol. **94**: 221-281.

GHEBER, L. e Z. PRIEL, 1990 a
On metachronism in ciliary systems: a model describing the dependence of the metachronal wave properties on the intrinsic ciliary parameters.
Cell Motility and the Cytoskel. **16**: 167-181.

GHEBER, L. e Z. PRIEL, 1990 b
Ciliary activity under normal conditions and under viscous load.
Biorheology **27**: 547-557.

GIBBONS, I.R., 1965
Chemical dissection of cilia
Arch. Biol. (Liège) **76**: 317-352

GIBBONS, I.R., 1981
Cilia and flagella of Eukaryotes
J.Cell Biol. **91**: 107s-124s

GRAY, J., 1930
The mechanism of ciliary movement - VI. Photographic and stroboscopic analysis of ciliary movement.
Proc. Roy. Soc.London **107:** 313-322.

HOLWILL, M.E.J., 1966
Physical aspects of flagellar movement
Physiol. Rev. **46**: 696-785.

HOLWILL, M.E.J., 1974
Hydrodynamic aspects of ciliary and flagellar movement.
Cap. 8 *em* Cilia and Flagella (ed.M.A.Sleigh)
Academic Press, N York, pp. 143-175

HOLWILL, M.E.J., 1982
Dynamics of eukaryotic flagellar movement, *em:* Prokaryotic and Eukaryotic Flagella (AMOS, W.B. e J.G.DUCKETT, eds.)
Symposia of the Society for Experimental Biology No.XXXV, 289-312.
Cambridge University Press

HOLWILL, M.E.J., 1989
Biomechanical properties of the sliding filament mechanism
em: Cell Movement, vol.**1**: The dynein ATP-ases
Alan R. Liss, Inc. New York, pp. 199-208

HOLWILL, M.E.J. e P.SATIR, 1987
Generation of propulsive forces by cilia and flagella
Cytomechanics (J.Bereiter-Hahn, O.R.Anderson and W.E.Reif, eds.).
Cap.II-4:120-130.

HOLWILL, M.E.J. e P. SATIR, 1990
A physical model of microtubule sliding in ciliary axonemes
Biophys. J.**58**: 905-913

HORRIDGE, G.A. e S.L. TAMM, 1969
Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion.
Science **169:** 817-818.

HUMPHREYS, W. J., B.O. SPURLOCK e J.S. JOHNSON, 1974
Critical point drying of ethanol infiltrated, cryofratured biological specimens for scanning electron microscopy.
SEM/1974, Part I, ITT Res. Inst,. Chicago, 275-282

JUNQUEIRA, L.C. e J. CARNEIRO, 1991
Biologia Celular e Molecular
5ª. Edição- Guanabara Koogan

KELLEY, R.O., R.A.F. DECKER e J.G. BLUEMINK, 1973
Ligand-mediated osmium binding: its application in coating biological specimens for scanning electron microscopy
J. Ultrastruct. Res. **45**: 254- 258

LIGHTHILL, J., 1976
Flagellar hydrodynamics.
SIAM Rev. **18**: 161-230.

MACHEMER, H., 1974
Ciliary activity and metachronism in Protozoa
Cap. 10, em: Cilia and Flagella (M.A. Sleigh, ed.)
Acad. Press, N. York, pp. 199-286

MANTON, I., 1952
The fine structure of plant cilia.
Sympos. Soc. Exp. Biol. **6**: 306-319.

MARCUS, E., 1946
Sobre Turbellaria brasileiros.
Boletim Fac. Filosof. Ci. Letras USP, Zoologia nº **11**: 5-187.

MARTIN, G. G., 1978
Ciliary gliding in lower Invertebrates.
Zoomorphologie **91**: 249-261.

NAITOH, Y. e R. ECKERT,1974
The control of ciliary activity in Protozoa, Cap.12 em: Cilia and Flagella (SLEIGH,M.A. , ed.)
Acad. Press, N.York,pp.305-352

OGURA, A., 1981
Deciliation and reciliation in Paramecium after treatment with ethanol
Cell Struct. and Funct. **6**: 43-50

OVADYAHU, D. e Z. PRIEL, 1989
Characterization of metachronal wave in beating cilia: distribution of phases in space.
Biorheology **26:** 677-685.

PÁRDUCZ, B., 1967
Ciliary movement and coordenation in ciliates
Int. Rev. Cytol. **21**: 91-128

PURCELL, E.M., 1977
Life at low Reynolds number
Am. Jour. of Physics **45**: 3-11

REUTER,M., 1987
Scanning and transmission electron microscopic observations on surface structures of three turbellarian species.
Zoologica Scripta.**7**: 5-11.

ROBINSON, D.G., U. EHLERS, R. HERKEN, B. HERRMANN, F. MAYER e F.W. SCHÜRMANN, 1987
Methods of preparation for electron microscopy.
Springer Verlag. Berlim

ROMET, S., D. SCHOEVAERT e F. MARANO, 1991
Dynamic image analysis applied to the study of ciliary beat on cultured ciliated epithelial cells from rabbit trachea.
Biol. Cell. **71**: 183-190.

SANDERSON, M. J. e SLEIGH, M. A., 1981
Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony.
J.Cell Sci. **47**: 331-347.

SATIR, B., W. S. SALE e P. SATIR, 1976
Membrane renewal after dibucaine deciliation of Tetrahymena .
Exp. Cell Res. **97**: 83-91

SATIR,P., 1963
Studies on cilia. The fixation of the metachronal wave.
J.Cell Biol. **18**: 343-365

SATIR, P., 1968
Studies on cilia: III. Further studies on the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility.
J. Cell Biol. **39**: 77- 94.

SATIR, P., 1992
Mechanisms of ciliary movement: contributions from electron microscopy
Scanning Microscopy **6**: 573- 579

SATIR, P., J. WAIS-STEIDER, S. LABDUSKA, A. NASR e J. AVOLIO, 1981
The mechanochemcial cycle of the dynein arm
Cell Motility **1:** 303-327

SATIR, P. e M.A.SLEIGH, 1990
The physiology of cilia and mucociliary interactions.
Ann. Rev.Physiol. **52:** 137-155.

SILVEIRA, M. e P.H.A. ARAGÃO, 1993
Epidermal cells and associated structures of Macrostomum tuba (Turbellaria, Macrostomida)
VII Internatl.Sympos. Biol. Turbellaria, Åbo Akademi, Finlandia
Abstracts, p.43

SLEIGH, M.A., 1969
Coordination of the rhythm of beat in some ciliary systems.
Int.Rev.Cytol. **25**: 31-54
Academic Press Inc., New York

SLEIGH, M.A., 1974
Metachronism of cilia of Metazoa, Cap. 11 *em:* Cilia and Flagella (M.A.Sleigh, ed.)
Acad. Press, N.York, pp. 287-304

SLEIGH, M.A. e D.I. BARLOW, 1982
How are different ciliary beat patterns produced? *em*: Prokaryotic and Eukaryotic Flagella (Amos, W.B. e J.G. Duckett, eds.)
Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp.139-157

SLEIGH, M.A. e M.E.J. HOLWILL, 1969
Energetics of ciliary movement in Sabellaria and Mytilus
J.exp. Biol.**50**: 733-743

STEPHENS, R.E. 1974
Enzymatic and structural proteins of the axoneme, Cap. 3 *em*: Cilia and Flagella (M.A. Sleigh, ed.)
Acad. Press, N. York, pp. 39-76

SUGRUE, P.; J. AVOLIO; P. SATIR e M.E.J .HOLWILL, 1991
Computer modelling of Tetrahymena axonemes at macromolecular resolution.
J.Cell Sci. **98**: 5-16.

SUMMERS, K. E. and I. R. GIBBONS, 1973.
Effects of trypsin digestion on flagellar structures and their relationship to motility.
J.Cell Biol. **58**: 618-629.

TAMM, S.L., 1972
Ciliary motion in Paramecium. A scanning electron microscope study
J. Cell Biol. **55**: 250- 255

TAMM, S.L. e G.A. HORRIDGE, 1969
Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion.
Science **163**: 817-818

TAMM, S.L. e G.A. HORRIDGE, 1970
The relation between the orientation of the central fibrils and the direction of the beat of cilia in Opalina
Proc.Roy.Soc., London (B) **175**:219-233

TAMM, S.L. e S. TAMM, 1981
Ciliary reversal without rotation of axonemal structures in Ctenophore comb plates.
J.Cell Biol. **89:** 495-509.

TAYLOR, G.I., 1951
Analysis of the swimming of microscopic organisms.
Proc.Roy.Soc. **A 209:** 447-461.

TAYLOR, G.R., 1963
Histoire Illustrée de la Biologie
Hachette/Thomas and Hudson Ltd.,LOndon.

THYBERG, P.;R.RIGLER; K. SVARTENGREN e G. WITMAN ,1990
Biophysical models of ciliary activity: Gaussian frequency distributions
Eur. Biophys.J.,**18** : 85-91

TYLER, S., 1976
Comparative ultrastructure of adhesive systems in the Turbellaria
Zoomorphologie **84**: 1-76.

WARNER, F.D., 1972
Macromolecular organization of eukaryotic cilia and flagella
Advances in Cell and Molecular Biology, **2**
Acad. Pres, N. York, pp. 193-235