

Estudo das fases do batimento ciliar por microscopia eletrônica de varredura utilizando técnicas de ablação ciliar

Pedro Henrique Arruda Aragão

Departamento de Física - CCE
Universidade Estadual de Londrina
86051-990 Londrina, PR - Brasil
phtd@netsinai.com ou phtd@uel.br

(Recebido: 11 de dezembro de 2001)

Abstract: *We have studied the profile of the metachronal wave of the multiciliary organisms. We have determined the phases of the ciliary beat and we have estimated the number of cilia in the surface of turbellaria Macrostomum-tuba. The different phases of the ciliary beat were determined through cilia from surface of the cell. We used different techniques of ciliary ablation, applied "in vitro" as well as "in vivo".*

Key words: *ciliary ablation, cilia, metachronal waves*

Resumo: *Estudamos o perfil da onda metacrônica de organismos aquáticos, multiciliados. Determinamos as fases do batimento ciliar e estimamos o número de cílios na superfície do turbelário, Macrostomum-tuba. As diferentes fases do movimento ciliar foram determinadas removendo-se os cílios da superfície da célula por diferentes técnicas de ablação ciliar aplicadas tanto "in vitro" como "in vivo".*

Palavras-chave: *ablação ciliar; cílios; onda metacrônica*

1 Introdução

A principal função de cílios e dos flagelos está relacionada com movimentos, visando a deslocar fluido à sua volta, como no caso dos ductos internos dos metazoários, ou a deslocar a célula ciliada ou flagelada livremente no meio, como no caso de protozoários, espermatozoides, pequenos animais aquáticos, bactérias, etc.

Por meio da técnica de cortes ultrafinos, demonstrou-se a existência de uma estrutura ciliar altamente complexa e organizada, formada por filamentos protéicos microtubulares organizados em arranjo $9 + 2$ [1,2], denominado axonema. O movimento de um cílio é baseado no deslocamento relativo dos microtúbulos, de modo análogo ao movimento do músculo estriado, teoria do “sliding filament” [3].

Apesar de todo o avanço tecnológico pelos quais passaram os microscópios eletrônicos desde a sua invenção, muitas questões sobre o movimento ciliar continuam obscuras, principalmente no que diz respeito ao movimento coordenado de um conjunto de cílios gerando a onda metacronal [4,5].

Nossa contribuição ao conhecimento do movimento ciliar foi estudar as fases do batimento ciliar em microturbelário de água doce, *Macrostomum-tuba*. Para tanto, submetemos esses organismos a diferentes técnicas de ablação ciliar (fratura em etanol, ação de anestésico, ultra-som e diferença de potencial).

2 Onda metacrônica

Denomina-se onda metacrônica as ondas na superfície do organismo geradas pelo movimento coordenado dos cílios de maneira a propelir o animal através do meio.

O movimento ciliar compreende duas fases de batimento: a efetiva e a de recuperação. A fase de batimento efetivo é aquela na qual o cílio cai rígido sobre a superfície da célula, enquanto a fase de recuperação é aquela na qual o cílio sofre uma flexão, a partir de sua base, voltando à posição inicial, o repouso ciliar. Essas fases ocorrem praticamente no mesmo plano, com uma ligeira rotação lateral no início da recuperação à posição inicial, não oferecendo resistência ao movimento do organismo.

Há dois tipos de metacronismo, dependendo da orientação relativa entre o sentido do batimento efetivo e o de propagação da onda metacrônica: o ortoplético e o diaplético [6].

No metacronismo ortoplético, a propagação da onda metacrônica se dá no mesmo sentido do batimento efetivo. Se ela se der em sentido oposto ao batimento efetivo, o metacronismo será chamado de antiplético. Caso ocorra no mesmo sentido do batimento efetivo, o metacronismo será dito simplético.

No metacronismo diaplético, a propagação da onda metacrônica ocorre numa direção ortogonal em relação ao batimento efetivo. Considere um observador olhando na direção do deslocamento da onda, essa será chamada de dexioplética quando o batimento efetivo ocorrer para a direita, e leoplética quando o batimento ocorrer para a esquerda. Assim, cílios que se movimentam no sentido anti-horário apresentam metacronismo dexioplético; o metacronismo será leoplético quando se movimentarem no sentido horário [7].

3 Material e métodos

Nosso estudo foi realizado com o turbelário de água doce, *Macrostomum-tuba*. Esse microorganismo foi escolhido por possuir uma alta densidade ciliar, propiciando uma análise detalhada da onda metacrônica em suas fases de batimento efetivo e de recuperação. Para tanto, fizemos uso da microscopia eletrônica de varredura por possibilitar uma análise tridimensional do organismo.

A microscopia eletrônica, por se tratar de uma técnica destrutiva, requer alguns procedimentos de preparação da amostra antes de sua observação no microscópio. Assim, os organismos foram fixados de modo a preservar, em três dimensões, a cobertura ciliar. Entretanto, esses organismos se mostraram sensíveis à química de fixação, necessária às condições de alto vácuo do microscópio eletrônico. Após uma série de tentativas, mal sucedidas, com vários fixadores indicados na literatura para preservação da onda metacrônica, utilizamos o fixador de Tamm & Tamm [8], que foi o que causou menos dano ao organismo. Resolvemos, ainda, modificar as concentrações desse fixador. Assim, o fixador de Tamm & Tamm “modificado” se mostrou bastante adequado à bioquímica dos *Macrostomum-tuba*. Provavelmente, as alterações de concentração que fizemos tornaram a química de fixação mais instantânea, não dando tempo ao *Macrostomum-tuba* de acionar seu mecanismo de defesa (secreção). Dessa forma, foi possível preservar os cílios na superfície desse organismo em suas várias posições durante o ciclo de batimento ciliar (efetivo, recuperação e repouso). Iremos nos referir a esse fixador ao longo deste trabalho como T&T-modificado.

Para melhorar a qualidade da imagem através do microscópio eletrônico de varredura, o material fixado foi imediatamente submetido a uma impregnação metálica com tetróxido de ósmio, método OTO (Ósmio-Tio-semicarbazida-Ósmio) [9].

Devido à alta densidade ciliar na superfície dos *Macrostomum-tuba*, esses organismos foram, então, submetidos a diferentes processos de deciliatura, tanto *in vitro* como *in vivo*:

in vivo, utilizamos o método clássico de Thompson [10] e o da passagem de corrente elétrica através do organismo [11];

in vitro, após a fixação com T&T-modificado, os organismos foram submetidos a ondas de ultra-som com frequência variável e à fratura em etanol [12].

Nossas observações foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-840A, sob uma tensão aceleradora de 5 a 25kV, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

3.1 Técnicas de ablação ciliar

3.1.1 Ablação *in vivo*

3.1.1.a Hidrocloro de dibucaína

Os *Macrostomum-tuba* eram coletados diretamente de plantas aquáticas, elódias, em geral, transferidos para placa de Petri e submetidos a seguidas lavagens

por centrifugação manual, em água filtrada do próprio meio, para a remoção de detritos sob a sua superfície. Após a quarta lavagem, os organismos eram submetidos ao tratamento com hidrocloreto de dibucaína, um anestésico, (Sigma, diluído a 10^{-3} em água filtrada do meio) por até dois minutos. Durante esse intervalo de tempo, os organismos ficavam imóveis, indicando que o hidrocloreto de dibucaína havia paralisado os cílios locomotores.

Todo esse processo foi monitorado por microscopia de luz. Após o movimento ter cessado, os organismos foram fixados de acordo com o método de T&T-modificado, para observação no microscópio eletrônico de varredura.

3.1.1.b Corrente elétrica

Os organismos foram lavados três vezes em água filtrada do meio, por centrifugação manual, sendo então transferidos para uma placa de Petri contendo água do meio bi-filtrada. Em seguida, os *Macrostomum-tuba* foram submetidos a uma diferença de potencial variável de 4,7V a 18,3V. Essa diferença de potencial corresponde a uma passagem de corrente elétrica através do sistema água/animal da ordem de 1,6 mA a 7,4 mA, respectivamente, a qual foi aplicada durante um segundo. Para tanto, utilizamos um circuito dotado de um multímetro, ICEL MD 4500, e um potenciômetro Variac.

Esse procedimento foi monitorado por microscopia de luz, de maneira a observarmos o efeito da passagem de corrente elétrica através do animal. Durante a passagem da corrente elétrica, os animais não apresentaram mobilidade, indicando a paralisia dos cílios responsáveis pelo deslocamento através do meio, submetendo-os nesse instante, à fixação com o fixador de T&T-modificado.

3.1.2 Ablação *in vitro*

Após fixados e desidratados em etanol, os organismos foram submetidos a dois processos: ação de ondas de ultra-som e crio-fratura em etanol.

O primeiro processo consistiu em colocar os organismos em cubas hermeticamente fechadas sob a ação das ondas de ultra-som, por até 10 segundos. Para tanto, fizemos uso de um aparelho de ultra-som modelo T-S 86 da Sonicor Instrument Corporation, utilizado geralmente para diluições químicas. No segundo processo, crio-fratura em etanol, o material foi encapsulado com parafilme e mergulhado em nitrogênio líquido. Após alguns minutos, o material foi removido e fraturado com auxílio de uma navalha de aço; assim, como o plano de fratura não era controlado, esta seguiu o caminho de menor resistência.

Em seguida, os organismos foram desidratados pelo método do ponto crítico, usando CO_2 , metalizados com ouro e carbono, e observados no microscópio eletrônico de varredura.

4 Resultados e discussão

Apesar de todo o conhecimento acumulado sobre as características dos cílios individualmente, bem como sobre as propriedades das ondas metacrônicas, ainda não se conhece como essas ondas são coordenadas para realização de um esforço conjunto. Algumas teorias relativas à coordenação de uma única célula têm sido defendidas, como no caso dos protozoários [13] e de organismos multiciliados [4,5,6], turbelários. No entanto, não têm sido objeto de estudo sob esse aspecto.

Utilizando métodos especiais de fixação, conseguimos preparações com boa preservação morfológica das ondas metacrônicas em três dimensões e analisamos o perfil dessas ondas por microscopia eletrônica de varredura.

Essa abordagem foi utilizada por outros autores, principalmente com organismos unicelulares, fazendo uso de microscopia eletrônica de varredura e de cinematografia, para determinar os parâmetros das ondas metacrônicas [14,15]. A grande maioria dos estudos sobre movimento ciliar faz uso de metodologias bem mais elaboradas, com equipamentos disponíveis apenas em laboratórios especializados para este tipo de pesquisa [4,16,17,18] e não são conduzidos *in vivo*, conforme realizamos.

Por essa razão, escolhemos como material de estudo o turbelário *Macrostomum-tuba*, pois neles o movimento ciliar predomina sobre o movimento muscular, além de a literatura registrar apenas informações sobre a densa cobertura ciliar desse organismo [19].

Estudamos por microscopia eletrônica de varredura as características dos cílios locomotores, situados na parte ventral, do turbelário *Macrostomum-tuba*. Esses cílios revestem toda a superfície desse organismo, executando um movimento coordenado e gerando sobre a superfície do animal uma série de ondas, denominadas de metacrônicas.

Por microscopia de luz, observamos a propagação das ondas metacrônicas na superfície do organismo impelindo água em diferentes direções de forma a provocar o deslocamento do animal no meio. Observamos que os cílios situados na superfície ventral são os responsáveis por dirigir um filme de água no sentido anterior-posterior, deslocando o organismo para frente. Esse resultado foi comprovado experimentalmente ao observarmos o deslocamento de partículas opacas ao feixe de luz. Nesse trabalho, utilizamos negro de fumo disperso no meio onde os *Macrostomum-tuba* se movimentaram.

A frequência do batimento ciliar desse organismo é da ordem de 16 Hz e o comprimento de onda da onda metacrônica é da ordem de 5 mm [11].

A alta densidade ciliar na superfície ventral desse organismo dificultou a visualização do perfil ciliar durante as fases do batimento efetivo e de recuperação à posição inicial. Por essa razão, passamos a desenvolver técnicas de ablação ciliar. O método de crio-fratura em etanol [12] possibilitou avaliar as fases do batimento ciliar, conforme mostramos nas figuras 1 e 2.

Nessa micrografia, identificamos uma sucessão de cílios na posição de batimento efetivo em metacronismo. A onda metacrônica se desloca da esquerda para a direita. Observamos também que os cílios se dobram quase retilíneos, rigidamente, da posição

de repouso para uma posição de máxima inclinação a aproximadamente 30° em relação à superfície celular.

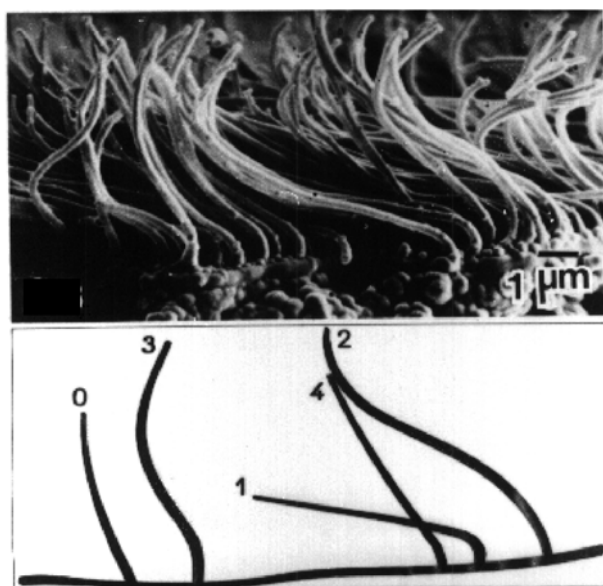


Figura 1. Cílios vistos em preparação de crio-fratura, imobilizados nas várias fases do batimento efetivo e fraturados em diferentes alturas. A onda metacrônica se propaga da esquerda para a direita. A seqüência numérica de um a quatro corresponde a estágios sucessivos do batimento efetivo. É possível observar também microvilosidades (não indicadas na figura) na superfície da célula (X 13000).

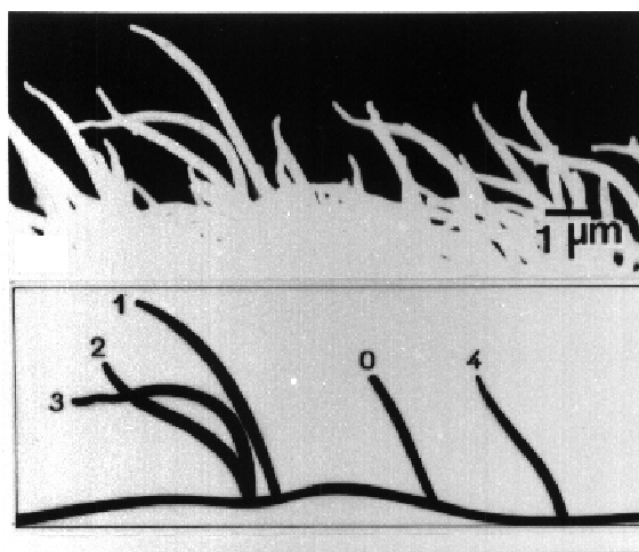


Figura 2. Perfil dos cílios na região periférica do organismo. Identificamos no esquema cílios em repouso [0], batimento efetivo [1] seguidos das várias fases de recuperação [2, 3, 4] (X 1200).

A ablação ciliar com o hidrocloreto de dibucaína não produziu os efeitos que esperávamos, tal como acontece com protozoários em geral [20]. O uso do hidrocloreto de dibucaína estimula o mecanismo de defesa dos *Macrostomum-tuba* por meio da liberação excessiva de secreção sobre a superfície do organismo a tal ponto de recobrir completamente os cílios. Por essa razão, fomos obrigados a alterar a concentração desse anestésico de forma a se produzir algum efeito. Mesmo em baixas concentrações, não obtivemos o efeito desejado para visualizar com clareza o perfil ciliar.

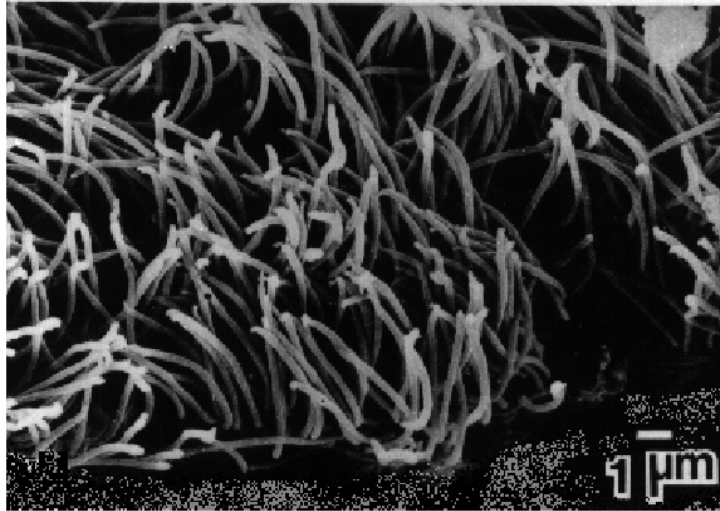


Figura 3A. Organismo submetido à passagem de corrente elétrica de 1,6 mA/s. Observamos uma remoção parcial dos cílios (X 7000).

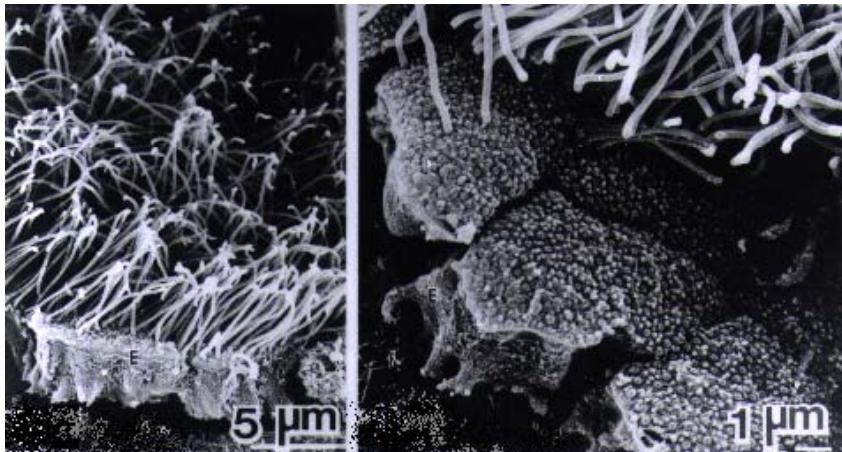


Figura 3B. Organismo submetido à passagem de corrente elétrica de 5,3 mA/s. Observamos cílios fixos à superfície do animal nas várias fases do batimento ciliar bem como parte da parede epitelial, fibras musculares e parte da superfície da célula sem cílios (X 4000 e X 8000, respectivamente.)

A passagem de corrente elétrica de poucos miliamperes através do organismo vivo provocou efeitos de extensão variável. Correntes elétricas de até 1,6 mA/s revelaram-se pouco eficientes. Acima desse valor, o efeito sobre o organismo foi equivalente ao causado pelo hidrocloreto de dibucaína. Apresentamos, na figura 3A, os organismos que foram submetidos a uma corrente elétrica de 1,6 mA/s, sendo possível observar uma redução na densidade ciliar. Na figura 3B, mostramos o efeito causado ao organismo pela passagem de uma corrente elétrica da ordem de 5,3 mA/s. Observamos parte do perfil ciliar nas fases de batimento, bem como a parede epitelial (E), fibras musculares (F) e a própria superfície poligonal da célula ciliada.

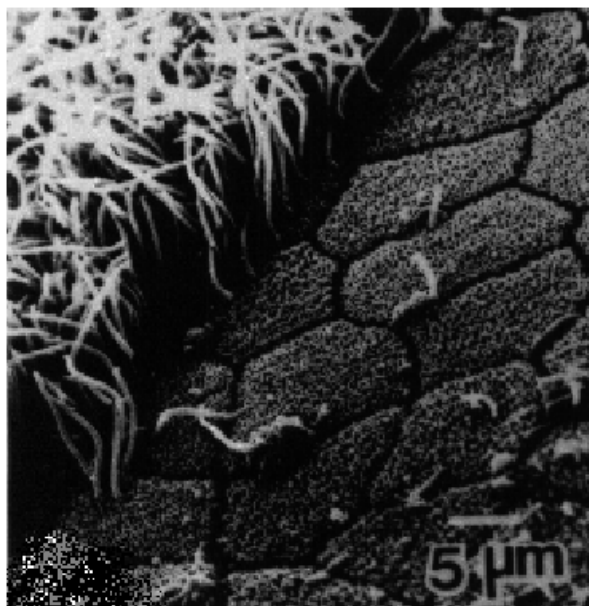


Figura 4. Cílios de um animal submetido ao ultra-som durante 1 segundo em etanol 100%. Parte da superfície ficou sem cílios, deixando à vista o limite poligonal da célula (X 2000).

As melhores observações do perfil celular foram obtidas com o ultra-som. Este removeu uma quantidade suficiente de cílios da superfície do organismo, tornando possível uma análise mais detalhada do perfil ciliar. Na figura 4, observa-se uma região completamente deciliada, confinada em uma área ainda provida de cílios. Os resultados mais significativos dizem respeito à aplicação do ultra-som a uma amostra congelada em nitrogênio líquido. A remoção foi diferenciada devido aos planos de clivagem. Assim, os cílios foram fraturados em diferentes alturas (figura 5). Quando o material foi submetido ao ultra-som durante 10 segundos, os cílios foram removidos da superfície deixando à mostra o perfil poligonal das células epiteliais. Ampliando essa região, observam-se detalhes do corpúsculo basal de cada cílio bem como suas microvilosidades (figura 6). Assim, estimamos a densidade ciliar em aproximadamente 200 cílios/célula poligonal, bem como o número de cílios na superfície de um *Macrostomum-tuba* adulto em aproximadamente $2,1 \times 10^9$ cílios, todos realizando um trabalho coordenado, de forma a gerar a onda metacrônica.



Figura 5. Material submetido a ultra-som em nitrogênio líquido por 10 segundos, apresentando cílios fraturados em diferentes alturas. Os cílios, que estavam no instante da fixação na posição de repouso, apresentaram uma resistência maior à fratura, quando comparados àqueles que estavam nas fases de batimento efetivo e de recuperação (X 9600).

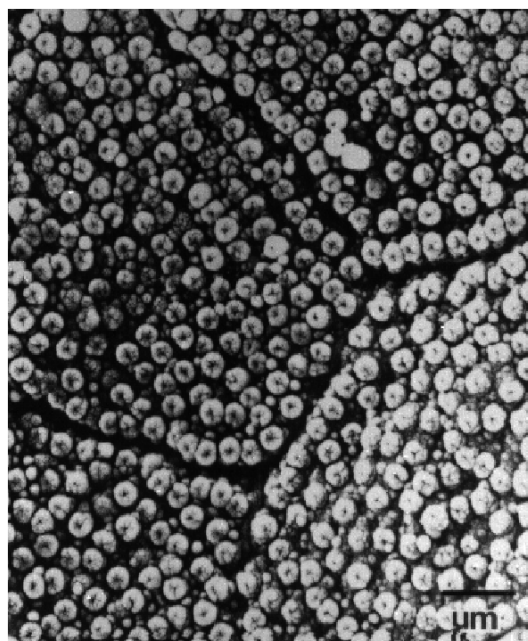


Figura 6. Material submetido ao ultra-som por 36 segundos. Restaram apenas os corpúsculos basais na superfície da célula (aproximadamente 200/célula) (X 20000).

5 Conclusões

O cuidado de remover o muco em nossas preparações permitiu-nos analisar, ao microscópio eletrônico de varredura, com bastante clareza, a forma assumida por um único cílio durante as várias fases do batimento ciliar (a fase efetiva e a fase de recuperação da posição inicial).

A frequência do batimento ciliar, 16 Hz, representou um importante parâmetro para o cálculo da velocidade de propagação da onda metacrônica: a frequência para cílios de *Paramecium* é da ordem de 30 Hz [21], 10 Hz em células epiteliais do palato de rã [7] e 8 Hz para os cílios da traquéia de coelho [14].

Devido à alta densidade ciliar na superfície dos *Macrostomum-tuba*, desenvolvemos uma série de experimentos originais fazendo uso de métodos físicos, tais como: choque elétrico, ultra-sons, além do uso da crio-fratura em etanol. Todos esses experimentos tiveram por mérito a limpeza da superfície ciliada, livre de secreção, em extensão variável, como se pode observar nas micrografias eletrônicas de varredura apresentadas. Tais técnicas se mostraram eficientes para se determinar as fases do batimento efetivo e de recuperação da onda metacrônica, possibilitando uma estimativa da densidade ciliar na superfície desse organismo.

Verificamos, também, a existência de uma região preferencial de fratura entre o axonema e o corpúsculo basal e que a extensão da ablação ciliar pode ser gradativamente controlada.

A necessidade de fazer uso da ablação ciliar para estudar o perfil da onda metacrônica na superfície desse organismo mostrou a importância das técnicas utilizadas e desenvolvidas neste trabalho, pois, foi devido à ação mais extensiva de remoção ciliar que pudemos estimar o número de cílios na superfície dos *Macrostomum-tuba*, 2×10^9 e, principalmente compará-los à superfície de um *Paramecium*: 5×10^3 cílios e, células epiteliais do palato de rã: cerca de 150 cílios/célula.

Agradecimentos

À Dra. Marina Silveira, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IFUSP, por toda a sua dedicação e apoio dado durante a realização deste trabalho, sem o qual nada teria sido possível. À CAPES e à CPG/UEL pelo suporte financeiro dado à realização deste trabalho.

Referências

- [1] D. Fawcett e K. R. Porter. A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morphol.* v. 94, p. 221-281, 1954.
- [2] B. A. Afzelius. Electron microscopy of the sperm tail: Results obtained with a new fixative. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* v. 5, p. 269-278, 1959.
- [3] P. Satir. Mechanisms of ciliary movement: Contributions from electron microscopy. *Scanning Microscopy*, v. 6, p. 573-579, 1992.

- [4] L. Gheber e Z. Priel. On metachronism in ciliary systems: a model describing the dependence of the metachronal wave properties on the intrinsic ciliary parameters. *Cell Motility and Cytoskel.* v. 16, p. 167-181, 1990.
- [5] L. Gheber e Z. Priel. Ciliary activity under normal conditions and under viscous load. *Biorheology* v. 27, p. 547-557, 1990.
- [6] M. A. Sleigh. *Metachronism of cilia of metazoa: Cilia and Flagella* (M. A. Sleigh, ed). New York: Academic Press, N. York, p. 287-304, 1974.
- [7] D. Ovadyhu e Z. Priel. Characterization of metachronal wave in beating cilia: Distribution of phases in space. *Biorheology* v. 26, p. 677-685, 1989.
- [8] S. L. Tamm e S. Tamm. Ciliary reversal without rotation of axonemal structures in ctenophore comb. plates. *J. Cell Biol.* v. 89, p. 495-509, 1981.
- [9] R. O. Kelley, R. A. F. Decker e J. G. Bluemink. Ligand-mediated osmium binding: It's application in coating biological specimens for scanning electron microscopy. *J. Ultrastruct. Rew.* v. 45, p. 254-258, 1973.
- [10] P. Satir. (1963), Studies on Cilia: The fixation of the metachronal wave. *J. Cell Beol.* v. 18, p. 343-365, 1963.
- [11] P. H. A. Aragão e M. Silveira. The ciliary apparatus of *Macrostomum-tuba*. XV Meeting of the Brazilian Society for Electron Microscopy and 3rd Inter-american Conference on Electron Microscopy. *Acta Microscopica.* v. 4, p. 57, 1995.
- [12] A. Ogura. Deciliation and reciliation in paramecium after treatment with ethanol. *Cell Struc. and Funct.* v. 6, p. 43-50, 1981.
- [13] Y. Naitoh e R. Eckert. *The control of ciliary activity in protozoa.* *Cilia and Flagella*, Cap. 12, p. 305-352. New York: Academic Press. 1974.
- [14] S. Romet, D. Schoevaert e F. Marano. Dynamic image analysis applied to the study of ciliary beat on cultured ciliated epithelial cells from rabbit trachea. *Bil. Cell.* v. 71, p. 183-190, 1991.
- [15] D. J. Barlow. e M. A. Sleigh. Freeze substitution for preservation of ciliated surfaces for scanning electron microscopy. *J. Microscopy*, v. 115, p. 81-95, 1979.
- [16] M. J. Sanderson e M.A. Sleigh. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: Beat patten and metachrony. *J. Cell Sci.* v. 47, p. 331-347, 1981.
- [17] P. Thyberg, R. Rigler, K. Svartengren e G. Witman. Biophysical models of ciliary activity: Gaussian frequency distributions. *Eur. Biophys. J.* v. 18, p. 85-91, 1990.
- [18] P. Satir, J. Wais-Steider, S. Labduska, A. Naser e J. Avolio. The mechano-chemical cycle of the dynein arm. *Cell Motility* v. 1, p. 303-327, 1981.

- [19] M. Reuter, Scanning and transmission electron microscopic observations on surface structures of three turbellarian species. *Zool. Scripta* v. 7, p. 5-11, 1978.
- [20] B. Parducz. Ciliary movement and coordination in ciliates. *Int. Ver. Cytol.* v. 21, p. 91-128, 1967.
- [21] B. Baccetti, A. G. Burrini, V. Pollini e T. Reniere. Human dynein and sperm pathology. *J. Cell Biol.* v. 88, p. 102-107, 1981.