

TATIANE DE SOUZA VILELA PODESTÁ

**ESTUDO DA DINÂMICA DE MIGRAÇÃO, DA FORMA E
DA EXTRAÇÃO DE NANOTUBOS DE MEMBRANA EM
CÉLULAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Física Aplicada, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Podestá, Tatiane de Souza Vilela, 1984-
P742e Estudo da dinâmica de migração, da forma e da extração de
2017 nanotubos de membrana em células / Tatiane de Souza Vilela
Podestá. – Viçosa, MG, 2017.
 xv, 114f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Marcelo Lobato Martins.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.110-114.

1. Nanotubos. 2. Migração celular. 3. Cultura de células.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-graduação em Física. II. Título.

CDD 22 ed. 620.5

TATIANE DE SOUZA VILELA PODESTÁ

**ESTUDO DA DINÂMICA DE MIGRAÇÃO, DA FORMA E
DA EXTRAÇÃO DE NANOTUBOS DE MEMBRANA EM
CÉLULAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Física Aplicada, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de junho de 2017.

Eduardo Nery Duarte de Araújo

José Écio Bessa Ramos Junior

Sílvio da Costa Ferreira Junior

Ubirajara Agero Batista

Nathan Bessa Viana

Marcelo Lobato Martins

(Coorientador)

(Orientador)

Dedico à minha família, especialmente à minha mãe Maria Inês, com todo amor e gratidão.

“Das alturas, o Eterno enxerga as profundezas. Não importa a distância, Ele sabe tudo sobre nós. (Salmo 138:6) ”

Agradecimentos

É com o coração repleto de alegria que venho agradecer este tão esperado momento. Agradeço à Deus por colocar em minha vida a oportunidade de fazer uma pós-graduação e por me dar força para vencer tantos obstáculos.

À minha família pelo apoio, amor incondicional e por compreenderem minha ausência.

Ao meu marido, Guilherme, pelo incentivo, amor, companheirismo e compreensão com relação à minha ausência em momentos tão difíceis de adaptação.

Ao Frejat, que para mim é como um filho, pela companhia de todos os dias e por tornar meus dias muito mais felizes.

Ao meu orientador, professor Marcelo Lobato Martins, pelo exemplo de pesquisador, pelo apoio nos momentos mais difíceis deste trabalho, pelas discussões e por compreender os meus limites me orientando sempre ao melhor caminho à seguir.

Aos meus coorientadores: professor Hallan Silva pela paciência, ensinamentos e discussões, serei eternamente grata; à professora Anésia A. Santos pela paciência em ensinar conceitos biológicos e pelo aprendizado no laboratório que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Todos são exemplos de pesquisadores os quais sempre vou me espelhar.

Ao laboratório de Pinças Óticas da UFRJ por me acolherem com tanto carinho. Em especial, ao professor Nathan B. Viana e ao doutor Bruno Pontes pelos ensinamentos, paciência e discussões. Não tenho palavras para descrever tudo o que fizeram por mim.

À todos os meus colegas de laboratório, em especial Tiago, Viktor e Fernanda por todas as discussões e amizade.

Aos colegas do grupo de Física- Biológica pela amizade e aprendizado com os seminários. E ao professor Márcio S. Rocha pelo apoio, paciência e ensinamentos.

Aos colegas Tiago, Ismael, Paulo e Sylvestre pelas discussões e paciência em me ensinarem conceitos de linguagem de programação extremamente essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas tão queridas que levarei para sempre no meu coração: Josiane, Marielle, Angélica e Aline. Em especial à Aline pela companhia de todos os dias desses últimos quatro anos.

Aos colegas : Aline, Josiane, Ismael, Carlos, Sylvestre, Paulo, Hamilton, Marlon, Eduardo, Victória, Rose, Tiago e Raniella, pela companhia durante os almoços e por fazerem parte de um dos momentos mais divertidos e descontraídos dos meus dias.

À todos os professores do departamento de Física da UFV com os quais tive a oportunidade de aprender muito nas disciplinas cursadas.

Aos funcionários do departamento.

À CAPES pela bolsa concedida e também ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte oferecido.

Sumário

Lista de Tabelas	ix
Lista de Símbolos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
Introdução	1
1 Revisão de Conceitos Biológicos	4
1.1 Membrana Plasmática	4
1.2 Citoesqueleto	6
1.3 Curvatura de Membrana	8
1.4 Nanotubo de Membrana	8
1.5 Linhagens de Células Utilizadas	10
2 Migração Celular	11
2.1 O Passeio Aleatório e a Difusão	11
2.2 Distribuição de Probabilidade	14
2.2.1 Passeio aleatório de tempo discreto	14
2.2.2 Passeio aleatório de tempo contínuo	15
2.2.3 Passeio aleatório em espaço- tempo contínuo	17
2.3 Metodologia Experimental	19
2.4 Metodologia utilizada para análise dos experimentos	19

2.4.1	Velocidade	20
2.4.2	Deslocamento quadrático médio	22
2.4.3	Ângulo de giro	23
2.4.4	Autocorrelação das velocidades	24
2.4.5	Voos Direcionais e de Reorientação	24
2.5	Resultados	25
2.6	Discussão	35
3	Membrana Plasmática	44
3.1	Metodologia Experimental	44
3.2	Metodologia utilizada para análise dos experimentos	45
3.2.1	Centroide	45
3.2.2	Rugosidade	46
3.2.3	Espectro de Potência	48
3.2.4	Curvatura	49
3.2.5	Energia de Curvatura	52
3.3	Resultados	54
3.4	Discussão	64
4	Extração de Amarras	70
4.1	Aspéctos Teóricos da Formação de Amarras de Membrana	70
4.1.1	Mecânica de Membranas	70
4.1.2	Amarras de Membrana	72
4.2	Funcionamento da Pinça Ótica	73
4.3	Metodologia Experimental	77
4.3.1	Cultura de Células	77
4.3.2	Pinça Ótica	78
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	81
4.4	Resultados	82
4.5	Discussão	84

5	Conclusões e Perspectivas	86
5.1	Conclusões	86
5.2	Perspectivas	87
A	Metodologia para preparação da cultura de células	88
B	Outras análises para a distribuição das velocidades e deslocamento quadrático médio de células B16F10	91
B.1	Distribuição das velocidades	91
B.1.1	Alta migração	92
B.1.2	Baixa migração	93
B.1.3	Muita variação de forma	94
B.2	Deslocamento quadrático médio	94
B.2.1	Células com comportamentos oscilatórios	95
B.2.2	Células com comportamentos persistentes	96
C	Artigo - Anomalous diffusion and q-Weibull velocity distributions in epithelial cell migration	97
	Referências Bibliográficas	110

Lista de Tabelas

2.1	Parâmetros de ajustes, expoentes de escala, skewness e curtose para $P(v)$. Os parâmetros q-gaussiana foram obtidos no ajuste com uma q-gaussiana e, q-Weibull e r foram obtidos no ajuste com uma q-Weibull, todos esses parâmetros de ajustes estão relacionados a cauda da distribuição.	25
2.2	Parâmetros de ajustes e expoentes de escala para $\langle r^2 \rangle$	32
2.3	Valores do parâmetro q obtidos no ajuste com uma q-exponencial e valores dos tempos característicos t^* obtidos no ajuste com uma exponencial, para todas as densidades aqui estudadas.	33
2.4	Valores do comprimento característico l^* obtidos nos ajustes com distribuições exponenciais para todas as densidades aqui estudadas e para grupos de células com migração alta, baixa migração e grandes variações de forma de membrana. Na segunda linha temos o comprimento característico l^* para os modos de migração direcional e na terceira linha para reorientação. Na quarta linha, tem-se o expoente γ obtido no ajuste com uma lei de potência na curva do deslocamento quadrático médio. As três últimas colunas representam uma média de cinco células para cada grupo.	42
3.1	Média dos expoentes de Hurst e do expoente α para o espectro de potência do perfil da borda da membrana. O erro das medidas foi calculado utilizando o desvio padrão.	57
3.2	Média do módulo das curvaturas ao longo do tempo ($t = 60 \text{ min}$) e média da energia de curvatura ao longo do tempo para um grupo de N células. Para linhagem B16F10, $N = 7$; Melan-A, $N = 7$; NIH-3T3 grupo 1, $N = 6$ e NIH-3T3 grupo 2, $N = 5$. O erro das medidas foi calculado utilizando o desvio padrão.	62

4.1 Média das medidas: força para formação da amarra da membrana, F_0 ; raio da amarra, R_0 ; tensão da membrana, σ , e rigidez de flexão da membrana, κ . Os dados referentes a linhagem NIH-3T3 foram obtidos de [52] e os correspondentes aos eritrócitos foram obtidos de [56]. 83

Lista de Símbolos

v : velocidade instantânea

v_{med} : velocidade média

$P(v)$: distribuição das velocidades

$\langle r^2 \rangle$: deslocamento quadrático médio

α_i : ângulo de giro

c_v : autocorrelação das velocidades

l : comprimento de contorno do voo

$P(l)$: distribuição de densidade acumulada

l_i : comprimento de cada passo dos n consecutivos em cada modo de migração

q-gaussiana: parâmetro q obtido no ajuste com uma distribuição do tipo q-gaussiana nas curvas de $P(v)$

q-Weibull: parâmetro q obtido no ajuste com uma distribuição do tipo q-Weibull nas curvas de $P(v)$

r : parâmetro r obtido no ajuste com uma distribuição do tipo q-Weibull nas curvas de $P(v)$

s : skewness

k : curtose

λ_ξ, μ_1 e ξ : parâmetros obtidos em um ajuste com duas leis de potência nas curvas de $\langle r^2 \rangle$

γ_{TC} : parâmetro obtido no ajuste com uma lei de potência nas curvas de $\langle r^2 \rangle$, indicando em qual tipo de difusão as células se enquadram para pequenos intervalos de tempo

γ_{TL} : parâmetro obtido no ajuste com uma lei de potência nas curvas de $\langle r^2 \rangle$, indicando em qual tipo de difusão as células se enquadram para intervalos de tempo maiores

q -exponencial: parâmetro q obtido no ajuste com uma distribuição do tipo q -exponencial nas curvas de c_v

r_i : distância de cada ponto da membrana com relação ao centroide da célula

W : rugosidade da borda da membrana

H : expoente de Hurst

α : expoente obtido no espectro de potência

k : curvatura local (capítulo 3)

E : energia de curvatura

F_0 : força para formação da amarra da membrana

F : força

R_0 : raio da amarra da membrana

σ : tensão da membrana

κ : rigidez de flexão da membrana

Resumo

PODESTÁ, Tatiane de Souza Vilela, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Estudo da dinâmica de migração, da forma e da extração de nanotubos de membrana em células.** Orientador: Marcelo Lobato Martins. Coorientadores: Hallan Souza e Silva, Anésia Aparecida dos Santos e Nathan Bessa Viana.

Estudos sobre migração celular, flutuações da membrana plasmática, extração de amarras em células, ou em geral, sobre o comportamento de células *in vitro* são de grande importância para a ciência. Através deles, podemos compreender vários processos biológicos tais como cicatrização de feridas, formação de tumores, divisão celular, tráfego de vesículas, mobilidade celular, comunicação celular entre outros. Neste contexto, é que surge a principal motivação deste trabalho. Para caracterizar o processo de migração de células individuais em cultura, analisamos o comportamento de células tumorais de melanoma B16F10 variando a densidade celular. Observamos que as trajetórias das células são aleatórias, algumas migram em caminhada persistente, enquanto outras giram em torno de si mesmas. Independente da densidade as células migram em um regime de difusão anômalo, indicando uma subdifusão para tempos curtos e uma superdifusão para tempos longos. As distribuições de magnitude das velocidades são do tipo q-Weibull e as autocorrelações das velocidades são de curto alcance. Com o objetivo de verificarmos a relação entre a migração celular e as flutuações da membrana plasmática das células, estudamos as flutuações da membrana das células B16F10 e verificamos que células com muita variação de forma apresentam uma dinâmica do tipo Browniano fracionária com correlações persistentes entre as protusões de lamelipódios e migração em regime superdifusivo, enquanto que células com pouca variação de forma apresentam uma migração subdifusiva. Estudamos também as flutuações da membrana de células normais de melanócito Melan-A e de fibroblasto NIH-3T3, o qual foi dividido em dois grupos: células com forma mais arredondada (grupo 1) e células com forma indefinida (grupo 2). Todas as linhagens demonstram que a rugosidade da interface da membrana tem correlação persistente de longo alcance apresentando dinâmica do tipo Browniano fracionária. Observando a média das curvaturas locais e média da energia de curvatura ao longo do tempo de todas as linhagens aqui citadas, e fazendo uma comparação entre as linhagens tumoral B16F10 e normal Melan-A, verificamos que as curvaturas da B16F10, são em média, mais acentuadas e armazenam mais energia na sua forma que a Melan-A. Comparando as células NIH-3T3 grupo I e grupo 2 observamos que as células do grupo 2 armazenam em média mais energia em sua forma do que as células do grupo 1. Através do pinçamento ótico e da microscopia eletrônica de varredura (MEV), caracterizamos as propriedades mecânicas, ten-

são superficial e rigidez de flexão da membrana, de células das linhagens Melan-A e B16F10. Nossos resultados revelam que a rigidez de flexão e tensão da membrana não variam entre essas duas linhagens.

Abstract

PODESTÁ, Tatiane de Souza Vilela, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Study of the dynamics of migration, form and extraction of membrane nanotubes in cells.** Adviser: Marcelo Lobato Martins. Co-advisers: Hallan Souza e Silva, Anésia Aparecida dos Santos and Nathan Bessa Viana.

Studies on cell migration, plasma membrane fluctuations, teather extraction in cells, or in general, the behavior of cells in vitro are of great importance to science. Indeed they can help is to understand several biological processes such as: wound healing, tumor formation, cell division, vesicle trafficking, cellular mobility, cellular communication, etc . In this context, it lies the main motivation of this work. In order to characterize the cell migration process of individual cells in culture, we analyzed the behavior of B16F10 melanoma tumor cells varying cell density. We observed that the trajectories of the cells are random, some migrate on a persistent walk, while others revolve around themselves. Independent of the density, the cells migrate under an anomalous diffusion regime, subdiffusive for short times and a superdiffusive for long times. The speed distributions are q-Weibull and the velocity autocorrelations are short-ranged. In order to explore the relationship between cell migration and cell plasma membrane fluctuations, we studied the membrane fluctuations of B16F10 cells. We found that cells with great shape of variation have a fractional Brownian dynamics with persistent correlations between the lamellipodia protrusions, as well as a superdiffusive In contrast cells with little shape variation exhibit a sub-diffusive migration. We also studied the membrane fluctuations of normal Melan-A melanocytes and NIH-3T3 fibroblasts, which are divided into two groups: cells with a more rounded shape (group 1) and cells with indefinite shape (group 2). For all cell lines the membrane roughness has persistent long-range correlation, indicating fractional Brownian dynamics. From the averages of the local curvatures and curvature energies for cell lines tested, we find that the curvatures of B16F10 are on average more pronounced and store more energy in their shape than Melan-A. Comparing the NIH-3T3 cells group 1 and group 2 we observed that the cells of group 2 store on average more energy in their shape than the cells of group 1. Through optical tweezers and scanning electron microscopy (SEM), we characterized the mechanical properties, surface tension and bending rigidity of the cell membrane, of Melan-A and B16F10 cells. Our results show that the bending rigidity and tension of the membrane do not vary between these two cell lines.

Introdução

A migração celular é um processo essencial para o desenvolvimento embrionário e na progressão de patologias importantes. Quando uma célula ou grupo de células migra de uma região a outra, geralmente este processo se dá devido a um sinal químico, que mobiliza as células para executar funções como a cicatrização de feridas, a formação de um tecido durante o desenvolvimento embrionário ou a vigilância imunológica [1, 2, 3]. Além disso, a metástase tumoral é um processo intimamente relacionado à migração celular e que pode ser combatido se encontramos meios de conter essa migração.

O comportamento migratório de células de Hidra (célula animal) foi estudado por Riew *et al.* [1]. Esses autores analisaram agregados celulares da ectoderme (parte externa do animal) e da gastroderme (parte interna do animal) separadamente. Seus resultados indicam que os agregados de células da ectoderme e da gastroderme realizam trajetórias características de movimento aleatório persistente. O deslocamento quadrático médio em função do tempo apresenta um crossover entre um regime de difusão anômala para difusão normal. As velocidades obedecem distribuições não gaussianas e só há correlação a curto prazo.

A migração de células individuais também está sendo estudada. Em 2014, Silva *et al.* [2] analisaram o comportamento migratório de células individuais das linhagens B16F10 (melanócito tumoral) e Melan-A (melanócito não-tumoral). A fim de obter baixa densidade celular, foi plaqueada uma pequena quantidade de células por cm^2 . Os resultados indicam que as linhagens estudadas apresentam um *crossover* entre um regime de difusão normal para uma superdifusão. As velocidades dessas células obedecem distribuições do tipo q- gaussiana, e para tempos longos, não há correlação entre as velocidades. Quanto à direção dos passos, verificou-se que as células tendem a realizar movimentos consecutivos em direções opostas.

Além dos estudos realizados sobre migração celular, pode-se obter muitas informações importantes sobre o comportamento da membrana plasmática das células. A membrana plasmática é um envoltório celular responsável pela forma da célula e pelo controle das substâncias que entram e saem dela. A membrana é composta principalmente por fosfolípidos e proteínas. Há dois tipos de substâncias que atravessam a membrana plasmática: as hidrossolúveis que chegam ao interior da célula somente após atravessarem os poros contidos nas proteínas transportadoras, o que ocorrerá somente se estas substâncias forem menores do que o tamanho do poro da

proteína; e as lipossolúveis que atravessam a membrana bem mais facilmente, independente do tamanho, devido a grande quantidade de lipídeos na membrana [4, 5].

Analisando o comportamento da membrana plasmática pode-se obter grandezas tais como: rugosidade, espectro de potência, autocorrelação temporal, curvatura, etc. Algumas dessas grandezas foram calculadas por Silva e colaboradores [6]. Eles estudaram as flutuações da membrana plasmática de células epiteliais de anfíbios A6CCL102 sob dois tipos de orientações gravitacionais: normal e invertida (placa de cultura orientada de cabeça para baixo). Seus resultados revelam que as flutuações da membrana exibem uma dinâmica estocástica com espectro de potência $\frac{1}{f}$, indicando correlação de longo alcance. A orientação gravitacional das células pouco influenciou na forma da membrana (espectro de potência e rugosidade), porém as oscilações de lamelipódios próximos aos pontos de adesão focal foram significativamente alteradas na cultura de células A6 com orientação invertida.

Em particular, a curvatura da membrana plasmática de células tem sido o foco de vários estudos. Recentemente, foram determinadas as curvaturas na membrana plasmática de células AX3 (espécie ameboide que vive no solo) aderidas a superfície da placa de meio de cultura e suspensas [3]. Nesse trabalho foi observado o contorno de cada célula ao longo do tempo a fim de visualizar protusões locais. Utilizando um marcador determinaram-se as regiões anterior e posterior de cada célula. Os resultados demonstraram que há mais protusões na membrana de células suspensas do que em células aderidas.

Por meio do pinçamento ótico é possível formar estruturas tubulares na membrana plasmática da célula de forma artificial, o que é conhecido como extração de amarras de membranas. Em 2013, foi realizado um experimento deste tipo, utilizando células NIH3T3 (fibroblasto) [7]. No experimento foram usadas células em estado inalterado e sob o efeito das drogas citocalasina D (Cito D), blebistatina (BBI) e jasplakinolida (JPK). Grandezas mecânicas como a força para formar a amarra e a força necessária para arrancar a amarra, o valor médio do raio das amarras, a tensão superficial efetiva e a rigidez de flexão efetiva foram quantificadas. Os autores verificaram que quanto maior a concentração de drogas, menor a força e maior o raio da amarra. A força e o raio medidos levam a diminuição da tensão efetiva da membrana para todos os tipos de drogas utilizados, principalmente no caso da citocalasina D. Isso indica a desestruturação do citoesqueleto, ou seja, a célula perde a capacidade de suportar grandes valores de tensão na sua membrana.

Estudar migração celular, flutuações da borda da membrana plasmática, extração de amarras ou em geral, o comportamento de células *in vitro* é de grande importância para a ciência, pois podemos compreender a dinâmica das células. Neste contexto é que surge a principal motivação deste trabalho de doutorado. No capítulo 1, faremos uma breve revisão sobre conceitos biológicos. No capítulo 2, analisamos o comportamento migratório de células tumorais de melanoma B16F10, variando a densidade celular. Para isto, calculamos grandezas como distribuição das velocidades e dos ângulos de giro, deslocamento quadrático médio, autocorrelação das velo-

idades e voos direcionais e de reorientação. No capítulo 3, estudamos o comportamento da borda da membrana plasmática das células Melan-A, que são células normais de melanócitos, da B16F10 que são células tumorais de melanoma e da NIH-3T3 que são fibroblastos do tecido conjuntivo. Analisamos grandezas como rugosidade, espectro de potências, curvatura e energia de curvatura. No capítulo 4, discutimos o procedimento de extração de amarras em células da linhagem Melan-A e B16F10 por meio do pinçamento ótico, determinando grandezas como tensão superficial e rigidez de flexão na membrana. Em cada capítulo será apresentado uma breve contextualização do tema, a metodologia, os resultados experimentais obtidos, a análise e a discussão desses resultados. Por fim, uma conclusão geral de todo o trabalho é elaborada juntamente com as perspectivas.

Capítulo 1

Revisão de Conceitos Biológicos

O principal objetivo deste capítulo é fazer uma revisão dos conceitos básicos da área de biologia molecular da célula, essenciais para boa compreensão deste trabalho. Além dos artigos citados usamos como referências para este capítulo os textos [4] e [5].

Na seção 1.1 faremos uma revisão sobre membrana plasmática, na seção 1.2 sobre citoesqueleto, na seção 1.3 curvatura de membrana, seção 1.4 sobre nanotubos de membrana e na seção 1.5 sobre as linhagens de células utilizadas.

1.1 Membrana Plasmática

A membrana plasmática é um envoltório constituído principalmente de lipídeos estruturais¹ e proteínas. Ela possui dupla camada lipídica (fosfolipídeos). Cada fosfolipídeo é constituído por um glicerol (álcool), um grupo fosfato e duas cadeias de ácidos graxos (figura 1.1). Existem vários tipos de fosfolipídeos tais como a fosfatidilcolina e a fosfatidilserina, entre outros.

Nos fosfolipídeos existem regiões hidrofóbicas (não interage com a água → apolar) e regiões hidrofílicas (interage com a água → polar), então, pode-se dizer que os fosfolipídeos são moléculas anfipáticas.

A bicamada lipídica atua como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas solúveis em água.

Entre as camadas lipídicas tem-se as proteínas. Quando as proteínas estão inseridas na dupla camada, elas são chamadas de proteínas integrais ou transmembrana. Já as proteínas localizadas na periferia das células, são chamadas de proteínas periféricas, elas se prendem à superfície externa ou interna da membrana através de vários mecanismos. A maioria das

¹Dentre os lipídios estruturais constituintes de membrana celulares estão as esfingomiéline, os glicolipídeos e principalmente os fosfolipídeos.

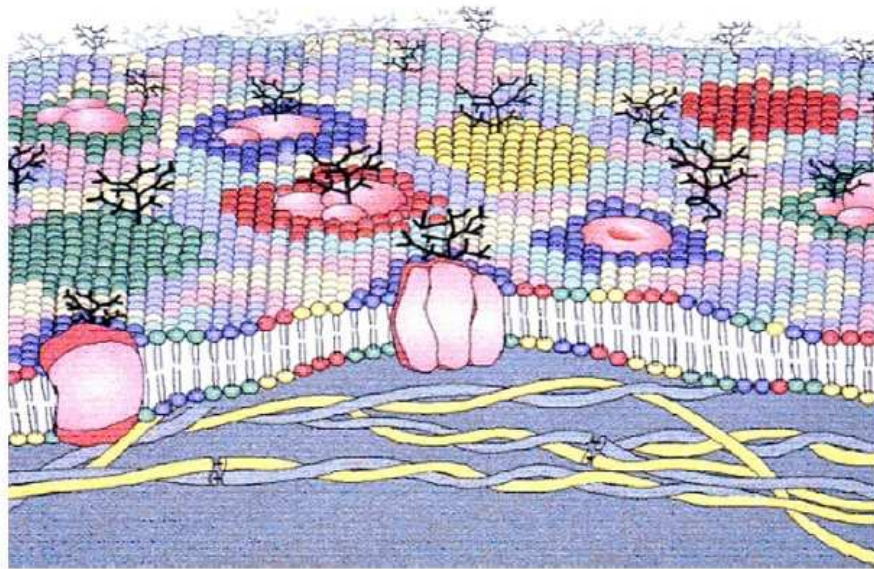


Figura 1.1: Modelo da membrana plasmática, uma modificação do modelo Mosaico- fluído; diferentes lipídios são indicados com cores distintas formando domínios em torno das proteínas integrais e das glicoproteínas; Na figura podemos observar a dupla camada lipídica, as fibras do citoesqueleto (cordas trançadas em amarelo e azul), proteínas integrais (intercaladas na dupla camada lipídica) e as glicoproteínas (estruturas ramificadas em preto) [8].

proteínas atua como ligações estruturais conectando o citoesqueleto à matriz extracelular, ou a uma célula próxima, através da bicamada lipídica. Outras proteínas atuam como sensores de sinais externos, permitindo uma mudança de comportamento em resposta a sinais ambientais, incluindo sinais de outras células.

Além dos fosfolípidos e proteínas, a membrana plasmática também é composta de colesterol [5] que ajuda a aumentar a rigidez da membrana. O colesterol interage com os fosfolípidos e tem como uma de suas principais funções diminuir a permeabilidade da membrana a pequenas moléculas solúveis. A maior parte das moléculas de colesterol se encontra nos microdomínios da membrana ².

As principais funções da membrana plasmática são: circundar a célula e delimitar os compartimentos intracelulares. Com relação as proteínas de membrana estas são responsáveis por funções especializadas como atuar no tráfego de substâncias que entram e saem da célula (permeabilidade seletiva), atuar como receptoras para sinais externos e internos, interagir com o citoesqueleto celular, mediar interações entre as diversas células do organismo e com o ambiente [5].

²Microdomínios lipídicos são subdomínios específicos da membrana plasmática responsáveis pelo transporte e movimento intracelular e na transdução de sinal.

1.2 Citoesqueleto

Para que as células executem suas funções de maneira adequada, elas se organizam no espaço e interagem com o ambiente ao seu redor. As células tem a capacidade de modificar sua forma e migrar para outros locais. Elas são capazes também de reorganizar seus componentes internos em decorrência dos processos de crescimento, divisão e adaptação à mudanças no ambiente. O principal responsável para que essas funções estruturais e mecânicas ocorram, é o citoesqueleto.

Durante a mitose, o citoesqueleto tem como função separar os cromossomos e, conseqüentemente, dividir a célula em duas. As principais funções do citoesqueleto são: guiar e direcionar o tráfego intracelular de organelas, transportando materiais de uma região à outra da célula; dar suporte à membrana plasmática e proporcionar ligações mecânicas que fazem com que a célula resista a tensão e esforços sem que seja destruída quando ocorrem mudanças ou alterações no ambiente. É o citoesqueleto que guia o crescimento da parede celular vegetal e controla a diversidade de formas das células eucariotas.

Todas essas funções são executadas devido a três famílias de proteínas que se organizam para formar três tipos de filamentos: intermediários, microfilamentos e microtúbulos. Esses filamentos atuam coletivamente dando à célula resistência, forma e capacidade de locomoção.

Os filamentos responsáveis por conferir resistência mecânica e sustentação à célula são os filamentos intermediários, que em organismos pluricelulares são compostos pela proteína queratina. Os filamentos intermediários revestem a face interna do envoltório nuclear protegendo o DNA como se fosse uma "gaiola". Os filamentos intermediários são como fibras em forma de corda.

Os microtúbulos são cilindros longos formados pela proteína tubulina [9]. Suas principais funções são : posicionamento das organelas no interior das células, formação de um fuso mitótico para o transporte de cromossomos durante a divisão celular e transporte intracelular de vesículas [10]. Os microtúbulos são também responsáveis pela movimentação dos cílios e flagelos³, localizados na superfície da célula.

Por último, temos os microfilamentos, que são compostos pelas proteínas actina e miosina, que tem alto poder de contração. Os microfilamentos de actina (actina -F) são polímeros enrolados entre si na forma de dupla hélice, formados por monômeros de actina (actina -G) [9]. Os filamentos de actina revestem a face interna da membrana plasmática de células animais proporcionando resistência e forma à membrana. São responsáveis também por projeções na superfície da célula, tais como os lamelipódios e os filopódios⁴. Por meio do anel contrátil,

³Cílios e flagelos são pequenos apêndices celulares, que variam em número e tamanho. São semelhantes a pelos que possuem um feixe de microtúbulos em seu interior. Se são escassos e longos são denominados flagelos, mas se são numerosos e curtos são denominados cílios.

⁴Os lamelipódios são estruturas bidimensionais semelhantes a camadas ou lençóis, enquanto que os filopódios

constituído basicamente por actina, que se dá a divisão celular, permitindo que a célula se fixe e contraia. Os filamentos de actina são polarizados (baseados no padrão criado quando a miosina se liga a actina) em extremidades de polimerização e despolimerização. Uma extremidade é de crescimento mais lento e a outra de crescimento mais rápido. Onde a extremidade de crescimento é mais rápida, os filamentos de actina promovem protusões na membrana capazes de desencadear o movimento migratório. Além disso, essas protusões são responsáveis pela locomoção das células permitindo movimentos morfogênicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e movimentos quimiotáticos.

Na figura 1.2 temos uma ilustração do citoesqueleto da célula de um neurônio.

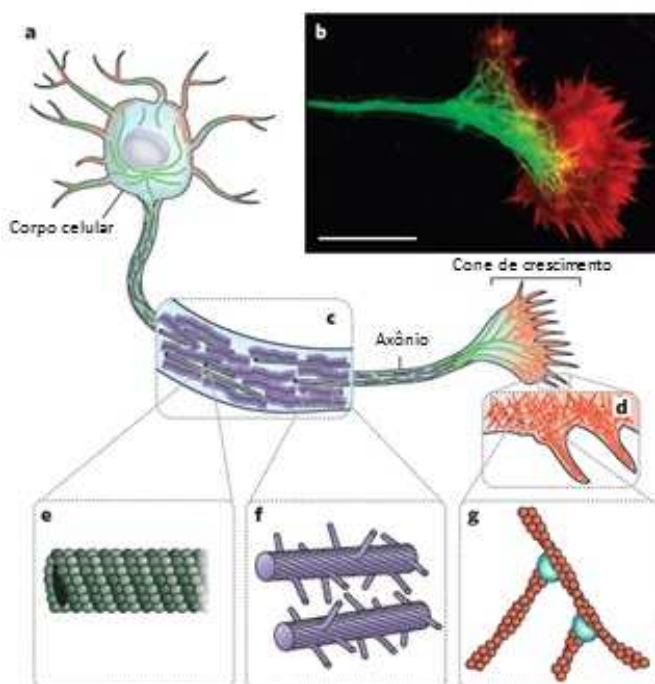


Figura 1.2: Elementos do citoesqueleto da célula de um neurônio; a) ilustração de um citoesqueleto, composto pelos três tipos de filamentos: microtúbulos (verde), barra de escala de $5 \mu m$, filamentos intermediários (roxo), barra de escala de $0.5 \mu m$ e filamentos de actina (vermelha), barra de escala de $13.5 \mu m$; b) Micrografia de fluorescência de um cone de crescimento que migra em resposta a um sinal químico durante o desenvolvimento do sistema nervoso. A barra de escala é de $20 \mu m$; c) Axônio do neurônio: é uma membrana delimitada e longa em que os neurofilamentos (classe de filamentos intermediários) formam uma matriz estruturada que incorpora microtúbulos, transportando materiais do corpo da célula ao terminal do axônio; d) Cone de crescimento; e) microtúbulos; f) neurofilamentos: possuem braços flexíveis que repelem neurofilamentos vizinhos e determina o raio do axônio; g) filamentos de actina. [11].

Células crescidas em cultura apresentam tanto lamelipódios quanto filopódios. Já em células dendríticas e no cone de crescimento de neurônios os filopódios são predominantes.

são formados por cones de crescimento em migração e são unidimensionais.

1.3 Curvatura de Membrana

Como vimos a membrana celular muda sua conformação durante vários processos, tais como, divisão celular, migração, extensão de neurônios, tráfego de vesículas etc. Essas conformações estão diretamente relacionadas a curvatura da membrana, que estão presente na microvilosidade, na árvore dentrítica, nas fenestrações de Golgi, nos endossomos, no nascimento de vesículas, etc [12].

A curvatura da membrana se dá através de vários mecanismos. Um deles está relacionado à composição lipídica da membrana, onde propriedades químicas de diferentes lipídeos, cadeias de acilo ou grupos cabeça podem formar diferentes curvaturas na membrana [12]. A flipase que é uma proteína capaz de translocar fosfolipídios de um lado a outro da membrana, mesmo contra um gradiente de concentração, tem a capacidade de estabelecer ou aniquilar uma distribuição assimétrica de lipídios transmembrana, provocando variações na curvatura da membrana [12], [13]. As enzimas quando interagem com a região polar da monocamada lipídica, influenciam na área ocupada pelos lipídios afetando a curvatura da membrana. De maneira geral, se alguma molécula se insere profundamente na bicamada, essa molécula empurra os fosfolipídeos e causa um rearranjo entre os fosfolipídeos próximos. Como resultado a membrana se dobra localmente para compensar a diferença de área das duas camadas, alterando sua curvatura [14].

Outro mecanismo diretamente relacionado à curvatura da membrana é a sua interação com proteínas. Algumas famílias de proteínas utilizam o mecanismo de andaime [12], em que o agregado de proteínas, ou domínios de proteínas, funciona como um andaime que impõe curvaturas intrínsecas aos lipídios. Dentre essas famílias de proteínas estão os domínios BAR [12], a Clatrina [15], COPI [16] e COPII [16].

A curvatura da membrana pode ser positiva ou negativa. Sua convexidade pode ser compreendida pelo brotamento de uma vesícula (figura 1.3). No brotamento de uma vesícula há regiões com curvatura positiva, negativa e nula [12].

1.4 Nanotubo de Membrana

Os nanotubos de membrana desempenham uma variedade de funções tais como: transporte de carga de uma célula à outra, mobilidade, comunicação celular, ponte para o transporte de bactérias e vírus de uma célula infectada para uma célula sadia, etc [17].

Os nanotubos são estruturas cilíndricas finas e longas, com comprimento da ordem de μm . Esses tipos de estruturas podem ser encontradas no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático. Em alguns tipos de células essas estruturas estão presentes na parte externa da célula, ou seja, na membrana plasmática e estão associadas à comunicação celular. Os nanotubos de membrana podem ser formados após o contato célula- célula (como na figura 1.4) ou podem

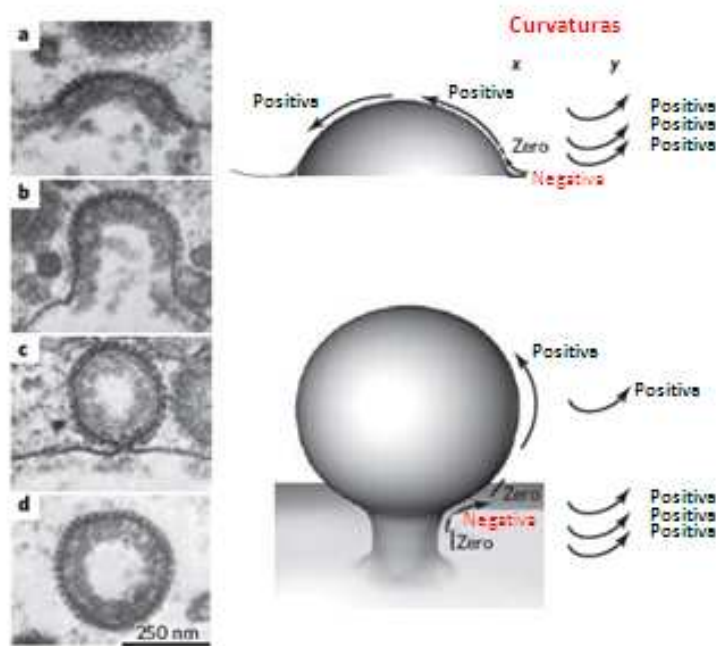


Figura 1.3: Brotamento de uma vesícula revestida de Clatrina, onde as proteínas do interior são incorporadas em uma vesícula de oócito (células germinativas femininas ou células sexuais produzidas nos ovários). As figuras de a-d representam as diversas curvaturas. Podemos verificar as invaginações da membrana e suas curvaturas correspondentes. A curvatura no estágio inicial do brotamento da vesícula é positiva em ambas as direções. No "corpo da vesícula" há regiões com curvatura negativa e nula. Desta forma, curvaturas côncavas, convexas e nulas estão sendo formadas constantemente [12].

crescer em direção à uma célula vizinha [18].

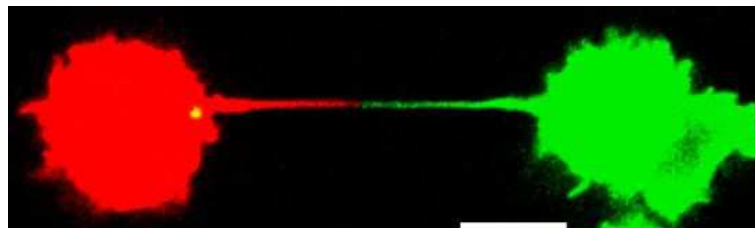


Figura 1.4: Conexão entre duas células através de seus nanotubos de membrana, onde cada cor representa uma célula diferente e a barra referente a escala equivale a $10\mu m$. [19].

Exemplos de nanotubos de membrana são os filopódios e as citonemas [20], que tem funções muito importantes como a migração celular.

A fim de compreender as propriedades mecânicas dos nanotubos, eles tem sido extraídos de células de maneira artificial (figura 1.5), como por exemplo, através do pinçamento óptico e são conhecidos como amarras de células. O procedimento de extração de amarras de maneira artificial iniciou-se em vesículas [21]. Em 2011, foi verificado por Pontes *et. al* [17] que as amarras extraídas artificialmente possuem filamentos de actina.

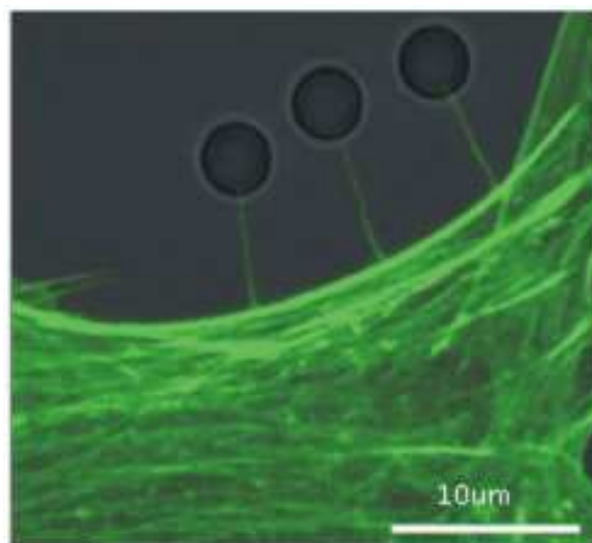


Figura 1.5: Amarras extraídas através de pinçamento ótico, indicando a presença de actina [17].

1.5 Linhagens de Células Utilizadas

As linhagens de células utilizadas para o desenvolvimento desta tese foram: Melan-A, B16F10 e NIH- 3T3.

A Melan-A [22] é um melanócito (célula pigmentada encontrada predominantemente na pele), derivada do melanoblasto⁵ epidérmico normal a partir de embriões de camundongos C57BL. É uma linhagem não tumorigênica.

A B16F10 [23] é derivada do melanoma⁶ murino à partir do músculo do camundongo C57BL/6J. Esta linhagem surgiu espontaneamente em camundongos. O termo F10 está relacionado ao grau metastáticos das células, sendo que as células B16F10 são mais metastático que a B16F1, sendo geneticamente menos estáveis.

As células Melan-A e B16F10 são semelhantes. Ambas são células epiteliais (células de revestimento de órgãos), porém a B16F10 é uma linhagem tumorigênica.

Já a NIH-3T3 [24] é um fibroblasto (tecido conjuntivo), extraída do embrião de camundongo. O termo 3T3 está relacionado ao protocolo de transferência e inoculação de células.

Uma das funções do fibroblasto é sintetizar colágeno e elastina. Estas células produzem fatores de crescimento, que atuam no metabolismo celular. Além disso, os fibroblastos são responsáveis pela regeneração. No processo de cicatrização, o fibrócito (células metabolicamente quiescentes) tem a capacidade de voltar a sintetizar fibras, reassumindo o aspecto de um fibroblasto jovem.

⁵célula eptelial que contém grânulos de melanina.

⁶É uma neoplasia maligna derivada dos melanócitos, células pigmentadas encontradas predominantemente na pele.

Capítulo 2

Migração Celular

O principal objetivo deste capítulo é analisar o processo de migração de células da linhagem B16F10, variando a densidade celular em cultura. São determinadas grandezas como distribuição das velocidades e dos ângulos de giro, deslocamento quadrático médio, autocorrelação das velocidades e voos direcionais e de reorientação.

Este capítulo será dividido da seguinte forma: na seção 2.1, faremos uma breve revisão sobre o passeio aleatório e a difusão e na seção 2.2 sobre distribuição de probabilidade. Na seção 2.3 apresentaremos a metodologia experimental e na seção 2.4 a metodologia utilizada para a análise dos dados. Na seção 2.5 serão apresentados os resultados e na seção 2.6 a discussão.

2.1 O Passeio Aleatório e a Difusão

Esta seção foi redigida com base nas seguintes referências: [25] e [26].

Para um bom entendimento dos processos difusivos, vamos relembrar o problema do caminhante aleatório. Consideraremos o caso mais simples, o passeio aleatório simétrico unidimensional, que consiste no deslocamento de uma partícula sobre uma reta, a partir da origem, realizando passos unitários, para a direita ou para a esquerda, com igual chance, a cada instante de tempo.

Como o passeio aleatório é um processo estocástico, ele deve ser descrito pela probabilidade $P_n(t)$ da partícula estar na posição n e no tempo t . A probabilidade $P_n(t)$ varia de acordo com o tempo, a medida que os passos são realizados. Assim,

$$\frac{\partial P_n(t)}{\partial t} = \frac{1}{2}P_{n-1}(t) + \frac{1}{2}P_{n+1}(t) - P_n(t). \quad (2.1)$$

A equação (2.1) é conhecida como equação mestra. Ela nos fornece a taxa de variação no tempo da probabilidade $P_n(t)$. Os dois primeiros termos da equação 2.1 levam em conta o aumento de $P_n(t)$, já que os passos são realizados do sítio $n - 1$ para n , ou do sítio $n + 1$ para n (figura 2.9-a). O terceiro termo é o contrário, pois leva em conta a diminuição de $P_n(t)$, devido a realização de passos do sítio n para o sítio $n - 1$ ou para $n + 1$ (figura 2.9-b).

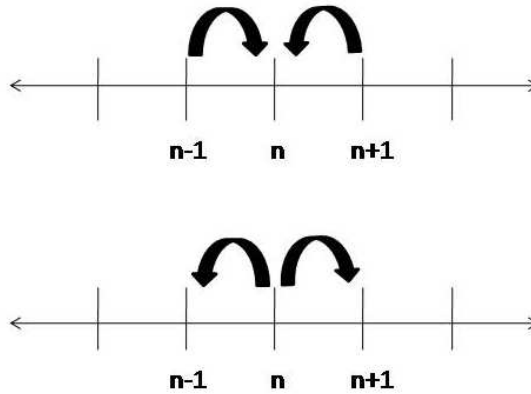


Figura 2.1: Caminhada aleatória unidimensional.

Assim, se a partícula estiver no sítio $n - 1$, ela pode saltar para o sítio n com probabilidade $1/2$, que corresponde a $\frac{1}{2}P_{n-1}(t)$. Se a partícula estiver no sítio $n + 1$ ela pode saltar para o sítio n com probabilidade $1/2$, que corresponde a $\frac{1}{2}P_{n+1}(t)$. Mas se a partícula estiver no sítio n , ela deixará com certeza este sítio na próxima unidade de tempo, ou seja, $(-\frac{1}{2} - \frac{1}{2})P_n(t) = -P_n(t)$.

Equações estocásticas dessa natureza, em que os detalhes da dinâmica de um sistema físico são substituídos por afirmações probabilísticas, tem exercido um papel fundamental no estudo de sistemas fora do equilíbrio [25].

O passeio aleatório no limite contínuo é descrito pela densidade de probabilidade $P(x, t)$. Em termos dessa densidade, $P(x, t)dx$ é a probabilidade da partícula estar entre x e $x + dx$ no instante t . A densidade de probabilidade $P(x, t)$ satisfaz a equação de difusão

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 P(x, t)}{\partial x^2}, \tag{2.2}$$

em que D é o coeficiente de difusão ou difusividade da partícula.

Acrescentando uma condição inicial na equação 2.2, $P(x, 0) = \delta(x)$ teremos um passeio que parte da origem.

Mesmo não conhecendo qual a solução da equação 2.2, podemos determinar o deslocamento médio $\langle x \rangle$ da partícula. Como não há qualquer preferência na escolha de direção dos passos, por simetria temos que

$$\langle x \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x P(x, t) dx = 0 . \quad (2.3)$$

O deslocamento quadrático médio é dado por

$$\langle x^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x^2 P(x, t) dx . \quad (2.4)$$

Podemos observar que o deslocamento quadrático médio não é nulo e pode ser obtido através da análise dimensional.

Se L representa a unidade de comprimento e T a unidade de tempo, da equação de difusão 2.2, podemos determinar as dimensões de $\langle x^2 \rangle$, D e t :

$$[\langle x^2 \rangle] = L^2$$

$$[D] = \frac{L^2}{T}$$

$$[t] = T$$

Como o deslocamento quadrático médio $\langle x^2 \rangle$ depende do coeficiente de difusão D e do tempo t , fazendo uma combinação desses dois parâmetros, obtemos a dimensão de $\langle x^2 \rangle$, dado por

$$\langle x^2 \rangle = c Dt , \quad (2.5)$$

onde c é uma constante adimensional. A equação 2.5 é um resultado central da física estatística fora do equilíbrio.

Uma generalização da forma 2.5 , é descrita por

$$\langle x^2 \rangle(t) \propto t^\gamma , \quad (2.6)$$

onde x pode ser uma grandeza d -dimensional e não unidimensional como considerado anteriormente. Quando $\gamma = 1$, dizemos que a difusão é normal, mas se $\gamma \neq 1$ dizemos que a difusão é anômala. Se $\gamma < 1$ tem-se uma subdifusão, ou seja, uma difusão mais lenta. Mas se $\gamma > 1$, tem-se uma superdifusão, ou seja, uma difusão mais rápida. Uma difusão do tipo balística, é o caso particular em que $\gamma = 2$.

O passeio aleatório e o seu limite contínuo da difusão, ou movimento Browniano ¹ estão no centro da física estatística fora do equilíbrio. O movimento Browniano é o movimento microscópico irregular devido a colisões aleatórias que ocorrem entre as partículas e as moléculas do meio circundante. Esse movimento microscópico irregular gera um movimento macroscópico

¹O movimento Browniano foi descoberto em 1785 por Jan Ingenhousz, que verificou o movimento irregular de partículas, tipo pó de carvão, sobre a superfície do álcool. Em 1827, Robert Brown fez observações do movimento de grãos de pólen em suspensão na água [26]

regular conhecido como processo difusivo [26].

2.2 Distribuição de Probabilidade

2.2.1 Passeio aleatório de tempo discreto

Para determinarmos a probabilidade $P_N(x)$ de uma partícula estar no sítio x (x é um inteiro, $-N \leq x \leq N$) após ter dado N passos, vamos primeiramente considerar que a partícula realiza passos de comprimento unitário. Os passos realizados para direita tem probabilidade p e para a esquerda tem probabilidade $q = 1 - p$. A probabilidade de uma sequência de N passos, com N_1 passos para a direita e N_2 passos para a esquerda é dada por $p^{N_1} q^{N_2}$. Mas, existem muitas maneiras de se dar N passos, sendo N_1 passos para a direita e N_2 passos para a esquerda. O total de maneiras distintas é dado pelo fator combinatório $\frac{N!}{N_1!N_2!}$. Assim, a probabilidade de uma caminhada com N passos, ter N_1 passos para a direita é

$$P_N(N_1) = \frac{N!}{N_1!N_2!} p^{N_1} q^{N_2}, \quad (2.7)$$

onde $p + q = 1$ e $N_1 + N_2 = N$.

Sabendo que $x = N_1 - N_2$, a probabilidade $P_N(x)$ pode ser dada por

$$P_N(x) = \frac{N!}{\left(\frac{N+x}{2}\right)! \left(\frac{N-x}{2}\right)!} p^{\frac{N+x}{2}} q^{\frac{N-x}{2}}. \quad (2.8)$$

Além disso, considerando que o caminhante inicia seus passos na origem, a posição x após ter dado N passos é $x = 2N_1 - N$.

No limite $N \rightarrow \infty$, $P_N(-N) = q^N \rightarrow 0$ e $P_N(N) = p^N \rightarrow 0$. $P_N(x)$ deve ter um máximo para $N = \tilde{N} = rN$, com $0 < |r| < 1$. Para N grande, embora N_1 seja um inteiro, podemos supor que próximo do máximo a função $P_N(x)$ seja quase contínua com relação a variável aleatória N_1 . Utilizando $\ln P_N(N_1)$, pois varia bem mais lentamente que $P_N(N_1)$, temos

$$f(N_1) = \ln P_N(N_1) = \ln N! - \ln N_1! - \ln(N - N_1)! + N_1 \ln p + (N - N_1) \ln q. \quad (2.9)$$

Aplicando a aproximação de Stirling para $\ln N!$ com $N \gg 1$, e após alguma álgebra², encontramos que

²Para mais detalhes consulte a referência [25]

$$P_N(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi Npq}} e^{-\frac{[x-N(p-q)]^2}{2Npq}}. \quad (2.10)$$

A equação 2.10 é uma distribuição gaussiana. Sua média e sua variância são dadas por

$$\langle x \rangle = N(p - q), \quad (2.11)$$

$$\langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2 = 2Npq. \quad (2.12)$$

que resulta em um deslocamento quadrático médio dado por

$$\langle x^2 \rangle = N^2(1 - 4pq) + 2Npq. \quad (2.13)$$

Se o passeio for sem tendência por qualquer direção, temos que $p = q = \frac{1}{2}$. Assim, $\langle x \rangle = 0$ e $\langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}N$.

Considerando que cada passo é realizado a uma unidade de tempo, tem-se que

$$\langle x^2 \rangle \sim t. \quad (2.14)$$

A mesma lei de escala obtida anteriormente (equação 2.5) por análise dimensional. Neste caso, a equação 2.14, corresponde a $\gamma = 1$, ou seja, uma difusão normal.

Porém, se o passeio for executado com qualquer tendência, ou seja, $p \neq q$, teremos

$$\langle x^2 \rangle \sim N^2 \longrightarrow \langle x^2 \rangle \sim t^2, \quad (2.15)$$

portanto $\gamma = 2$, e a difusão será balística.

2.2.2 Passeio aleatório de tempo contínuo

Em algumas áreas como Matemática ou Ciências da Computação, os passeios aleatórios de tempo discreto são muito importantes, porém em fenômenos naturais surgem os passeios aleatórios simétricos de tempo contínuo, onde a partícula realiza passos unitários (espaço discreto) para a direita ou para a esquerda com taxa γ . Neste caso, a probabilidade do caminhante estar na posição N em um tempo t , $P_N(t)$ obedece a equação mestra

$$\frac{\partial P_N(t)}{\partial t} = \gamma P_{N+1} + \gamma P_{N-1} - 2\gamma P_N. \quad (2.16)$$

Assumindo a condição inicial $P_N(t=0) = \delta_{N,0}$ (passeio que parte da origem) e resolvendo

a equação 2.16 utilizando a transformada de Fourier discreta e sua inversa

$$P_k(t) = \sum_{N=-\infty}^{\infty} P_N(t) e^{ikN}, \quad (2.17)$$

$$P_N(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{\pi} P_k(t) e^{-ikN} dk. \quad (2.18)$$

Temos,

$$\begin{aligned} \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dP_k(t)}{dt} e^{-ikN} dk &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \gamma P_k(t) [e^{-ik(N-1)} + e^{-ik(N+1)} - 2e^{-ikN}] dk \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \gamma P_k(t) [2e^{-ikN} \cos(k) - 2e^{-ikN}] dk \end{aligned} \quad (2.19)$$

Assim,

$$\frac{dP_k(t)}{dt} = 2\gamma P_k(t) (\cos k - 1).$$

Cuja solução é

$$P_k(t) = c e^{2\gamma(\cos k - 1)t}. \quad (2.20)$$

Sabendo que a transformada de Fourier de $P_N(t = 0)$ é

$$P_k(0) = \sum_{N=-\infty}^{\infty} \delta_{N,0} e^{ikN} = 1. \quad (2.21)$$

A constante c deve ter valor $c = 1$. Assim,

$$P_k(t) = e^{2\gamma(\cos k - 1)t}. \quad (2.22)$$

Utilizando a função geratriz das funções de Bessel modificadas

$$e^{z \cos k} = \sum_{N=-\infty}^{\infty} I_N(z) e^{ikN}, \quad (2.23)$$

e fazendo $z = 2\gamma t$, temos

$$P_k(t) = e^{-2\gamma t} \sum_{n=-\infty}^{\infty} I_N(2\gamma t) e^{ikN}. \quad (2.24)$$

Comparando 2.24 com a equação 2.17, verificamos que a solução $P_N(t)$ da equação mestra 2.16 é dada por

$$P_N(t) = I_N(2\gamma t) e^{-2\gamma t}, \quad (2.25)$$

onde I_N é a função de Bessel modificada de ordem N . No limite de tempos muito longos, a

forma assintótica da função de Bessel leva novamente a uma distribuição gaussiana

$$P_N(t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi\gamma t}} e^{-\frac{N^2}{4\gamma t}}. \quad (2.26)$$

2.2.3 Passeio aleatório em espaço- tempo contínuo

No que segue, mostraremos que ao tomarmos o limite contínuo do passeio aleatório, obtemos a equação de difusão que descreve o comportamento macroscópico da dispersão de uma substância em outra. Para isto, vamos assumir que a partícula realiza passos de comprimento Δx em intervalos de tempo Δt . Para simplificar, consideraremos um passeio simétrico ($p = q = \frac{1}{2}$). Desta forma, a densidade de probabilidade da partícula estar na posição x , no tempo t , satisfaz a equação

$$P(x, t) = \frac{1}{2}P(x + \Delta x, t - \Delta t) + \frac{1}{2}P(x - \Delta x, t - \Delta t). \quad (2.27)$$

A partícula pode executar passos para a direita ($x + \Delta x$) ou para a esquerda ($x - \Delta x$) durante um intervalo de tempo Δt .

Expandindo o lado direito da equação 2.27 em série de Taylor até termos de segunda ordem em Δx e Δt , tem-se

$$P(x, t) = P(x, t) - \frac{\partial P}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} (\Delta x)^2 + \frac{\partial^2 P}{\partial t^2} (\Delta t^2), \quad (2.28)$$

Dividindo 2.28 por Δt e tomando os limites $\Delta x \rightarrow 0$ e $\Delta t \rightarrow 0$, com $\frac{(\Delta x)^2}{2\Delta t} = D \neq 0$, chegamos a EDP

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 P(x, t)}{\partial x^2}, \quad (2.29)$$

conhecida como equação de difusão. O parâmetro D é a constante de difusão, que representa a difusividade da partícula. Quanto maior for a difusividade D de uma substância com relação a outra, mais rapidamente elas difundirão uma na outra.

Para determinarmos a solução da equação 2.29, vamos usar a condição inicial $P(x, t = 0) = \delta(x)$, que corresponde a uma partícula saindo da origem, em $t = 0$. A fim de garantir a normalização de $P(x, t)$, utilizaremos a condição de contorno de Dirichlet

$$\lim_{x \rightarrow \pm\infty} P(x, t) = P(\pm\infty, t) = 0, \forall t. \quad (2.30)$$

Considerando a transformada de Fourier de $P(x, t)$ e sua inversa

$$P(k, t) = \int_{-\infty}^{\infty} P(x, t) e^{ikx} dx, \quad (2.31)$$

$$P(x, t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} P(k, t) e^{-ikx} dk . \quad (2.32)$$

Podemos reescrever a equação 2.29, como

$$\begin{aligned} \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\partial P(k, t)}{\partial t} e^{-ikx} dk &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} D \frac{\partial^2 P(k, t)}{\partial x^2} e^{-ikx} dk \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} D e^{-ikx} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \left[\int_{-\infty}^{\infty} P(k, t) e^{-ikx} \right] \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} D e^{-ikx} k^2 i^2 P(k, t) dk \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} e^{-ikx} (-D k^2) P(k, t) dk \end{aligned}$$

Assim,

$$\frac{\partial P(k, t)}{\partial t} = (-D k^2) P(k, t) . \quad (2.33)$$

Cuja solução é

$$P(k, t) = P(k, 0) e^{-D k^2 t} , \quad (2.34)$$

onde $P(k, 0)$ é a transformada de Fourier da densidade de probabilidade inicial $P(x, 0)$. Como $P(x, 0) = \delta(x)$

$$P(k, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} P(x, 0) dx = \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} \delta(x) dx = 1 , \quad (2.35)$$

Substituindo $p(k, 0)$ na equação 2.34, obtemos

$$P(k, t) = e^{-D k^2 t} . \quad (2.36)$$

Fazendo a inversão da transformada de Fourier, temos

$$P(x, t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-D k^2 t} e^{-ikx} dk . \quad (2.37)$$

Utilizando o método de completar quadrado $[Dt k^2 + ikx = Dt(\frac{k+ix}{2Dt})^2 + \frac{x^2}{4Dt}]$ na equação 2.37, fazendo uma substituição de variáveis $[y = \frac{k+ix}{2Dt}]$ e usando $\int_{-\infty}^{\infty} e^{-a y^2} dy = \sqrt{\frac{\pi}{a}}$, resulta em

$$P(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} . \quad (2.38)$$

Como podemos observar, a equação 2.38 é mais uma vez uma distribuição gaussiana.

2.3 Metodologia Experimental

A metodologia experimental utilizada para preparação de cultura de células pode ser verificada no apêndice A.

Analisamos o comportamento migratório de células em cultura pertencentes a linhagem B16F10. São células tumorais derivadas de melanoma murino fornecidas pelo departamento de farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte. Após a contagem de células, a cultura é mantida em garrafas plásticas com capacidade de 60 ml (25 cm^2), à uma temperatura de 37°C e fluxo de 5% de CO_2 por cerca de 8 h para assegurar a adesão celular.

A quantidade de células plaqueadas nos experimentos foi de 20 cel/cm^2 , 100 cel/cm^2 , 2000 cel/cm^2 e 10000 cel/cm^2 .

Os vídeos para análise de migração celular ao longo do tempo foram obtidos utilizando um microscópio invertido da NIKON, modelo TS 100, com uma objetiva de ampliação de 10x e abertura numérica $NA = 0.3$, com contraste de fase e uma câmera CCD analógica JAI CM-140 GE acoplada ao microscópio. Através de um programa de linguagem LabView as células de uma única região foram fotografadas, mantendo temperatura controlada, por aproximadamente 12 horas, com intervalos de tempo de um minuto e resolução de 1392×1040 pixels, onde $1\text{ pixel} = 0.48\ \mu\text{m}$ (figura 2.2(a)). As 6 primeiras horas foram analisadas, após este período muitas células se duplicaram dificultando o processo de análise de células individuais. Utilizando o software imageJ juntamente com o "mousepen 8x6" (figura 2.2(b)), determinamos o contorno manualmente de cada célula individual ao longo do tempo (para cada frame). Através do pacote "cell outliner" obtemos as coordenadas bidimensionais dos centroides das células.

Nossa estimativa na incerteza ³ da medida do centroide foi de $\pm 0,5\ \mu\text{m}$. O número de células analisadas para densidade de 20 cel/cm^2 foi $N = 13$, para densidade de 100 cel/cm^2 , $N = 10$, para 2000 cel/cm^2 , $N = 14$ e para densidade de 10000 cel/cm^2 , $N = 13$.

2.4 Metodologia utilizada para análise dos experimentos

De posse das coordenadas bidimensionais do centroide (x_i, y_i) de cada célula, ao longo do tempo, calculamos grandezas tais como: velocidade, ângulo de giro, deslocamento quadrático médio e autocorrelação das velocidades, além dos modos de migração (voos direcionais e de reorientação). Estas grandezas são definidas a seguir.

³A incerteza foi calculada considerando o contorno manual de um grupo amostral de seis pessoas.

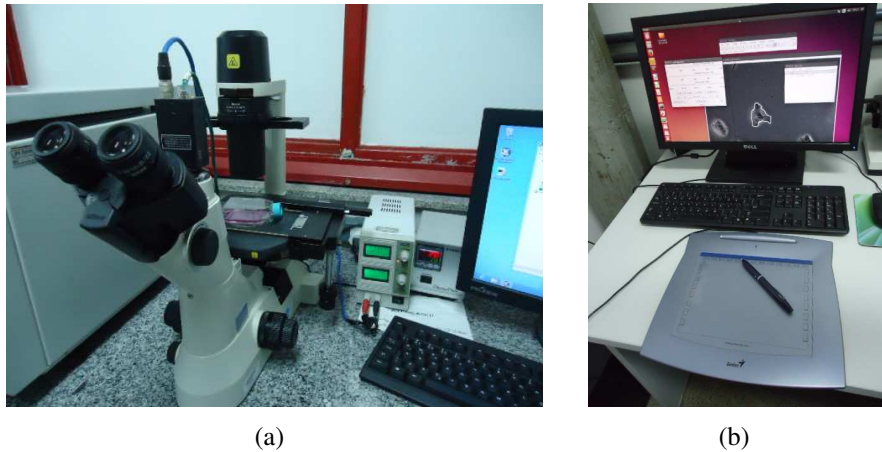


Figura 2.2: (a) Equipamentos utilizados para o procedimento de videomicroscopia da cultura de células; (b) Equipamentos utilizados para obtenção dos centroides das células.

2.4.1 Velocidade

Para obtermos a de cada célula, utilizamos a seguinte equação

$$\vec{v}_i = \frac{\vec{r}_i - \vec{r}_{i-1}}{t_i - t_{i-1}}, \quad (2.39)$$

sendo r a posição do centroide e t o tempo, onde $t_i = i\Delta t$, com $\Delta t = 1 \text{ min}$ (intervalo de tempo entre as imagens), e $i = 1, 2 \dots 360$. Após obtermos a velocidade de cada célula, construímos o histograma das velocidades escalares $v = |\vec{v}|$, que nos fornece a distribuição de probabilidade da célula executar um movimento com velocidade entre v e $v + \Delta v$. Utilizamos um número de caixas fixo de tamanho⁴ $\Delta v = \frac{(v_{max} - v_{min})}{30}$. Foram feitos ajustes das curvas destas distribuições $P(v)$ para verificarmos em qual tipo de regime de difusão elas se enquadram. Usamos três tipos de ajustes: gaussiana (regime de difusão normal), q-gaussiana e q-Weibull (regime de difusão anômalo).

A distribuição de probabilidade q-gaussiana [2, 27] é dada por

$$p_{qg}(x) = p_0 \left[1 - (1 - q) \cdot \frac{(x - \bar{x})^2}{x_0} \right]^{\frac{1}{(1-q)}}, \quad (2.40)$$

onde p_0 é o valor máximo da distribuição, q é um parâmetro associado a largura da curva, \bar{x} é o valor médio de x e x_0 é a variância. Na figura 2.3, podemos observar que quanto maior o valor de q , mais larga é a curva. Para $q \rightarrow 1$, temos uma distribuição gaussiana. Desta forma,

⁴Vale ressaltar que em geral a forma da distribuição depende da escolha do tamanho de Δv , com isso, realizamos alguns testes variando o tamanho da caixa, até obtermos um valor em que a forma da curva não variasse muito. Para tamanhos de caixa iguais à $n = 25, 30, 35$ e 40 observamos que os parâmetros obtidos nos ajustes são similares (para mais detalhes consulte S1 PDF no link: http://www.posfisicaaplicada.ufv.br/?page_id=2714).

podemos dizer que a q-gaussiana é uma generalização da gaussiana.

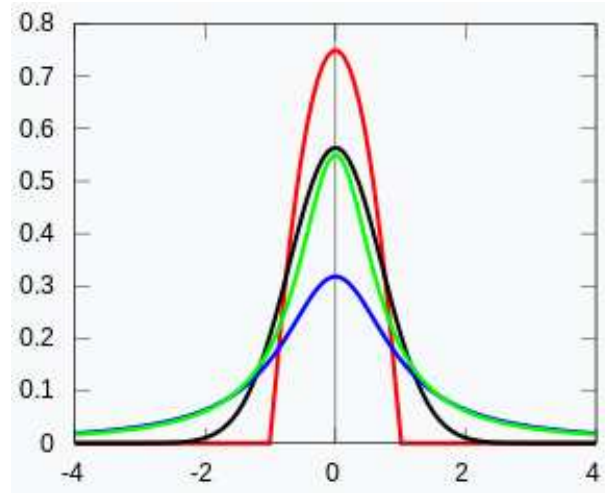


Figura 2.3: Distribuição de probabilidade q-gaussiana ($P(x) \times x$). A cor vermelha equivale a $q = 0$ e $x_0 = 1$, a preta equivale a $q \rightarrow 1$ e $x_0 = 1$, a azul equivale a $q = 2$ e $x_0 = 1$ e a verde a $q = 2$ e $x_0 = 3$. Figura extraída de [28].

A distribuição de probabilidade q-Weibull [27, 29], é dada por

$$p_{qW}(x) = p_0 \frac{r x^{r-1}}{x_0^r} \left[1 - (1 - q) \cdot \left(\frac{x}{x_0} \right)^r \right]^{\frac{1}{(1-q)}}, \quad (2.41)$$

onde p_0 é o valor máximo da distribuição, os parâmetros q e r controlam o comportamento da cauda de $p_{qW}(x)$ e x_0 é o comprimento característico da distribuição. Note que para $r = 1$ e $q \neq 1$ a distribuição 2.41 torna-se uma q-exponencial⁵. Para $q \rightarrow 1$ e $r = 1$ temos uma exponencial. Este comportamento pode ser verificado na figura 2.4. Porém, se $q \rightarrow 1$ com $r \neq 1$ tem-se uma Weibull. A Weibull é definida como [27]

$$p_W(x) = p_0 \frac{r x^{r-1}}{x_0^r} \exp \left[- \left(\frac{x}{x_0} \right)^r \right]. \quad (2.42)$$

A Weibull é a “versão” bi-dimensional da distribuição Maxwelliana⁶, que é importante no regime da termodinâmica clássica de equilíbrio já que a probabilidade de uma molécula de gás ideal ter uma velocidade com módulo entre v e $v + dv$ tem exatamente a sua forma [31]. Neste regime, as moléculas de um gás ideal estão realizando um processo de difusão normal [25], sugerindo que quando $q \rightarrow 1$ e $r \rightarrow 2$ as células teriam uma caminhada aleatória.

⁵A distribuição q-exponencial será discutida mais a frente, ela é dada pela equação 2.53

⁶Para mais detalhes consultar o apêndice D da referência [31]

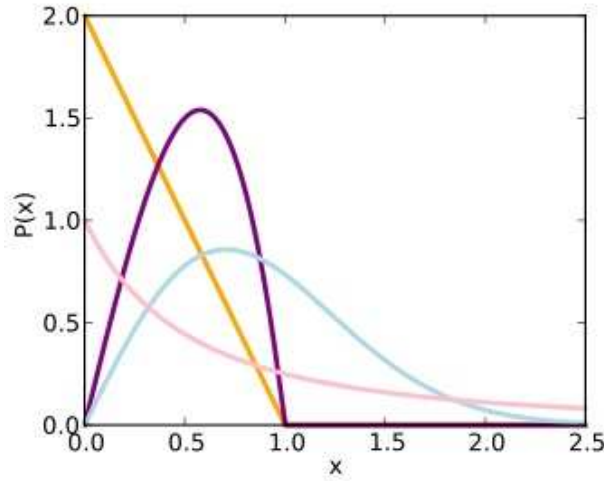


Figura 2.4: Distribuição de probabilidade q-Weibull. A cor laranja equivale a $r = 1$, $q = 0$ e $x_0 = 1$, a roxa equivale a $r = 2$, $q = 0$ e $x_0 = 1$, a azul equivale a $r = 2$, $q \rightarrow 1$ e $x_0 = 1$ e a rosa a $r = 1$, $q = 1.5$ e $x_0 = 0.5$. Figura extraída de [30].

2.4.2 Deslocamento quadrático médio

O deslocamento quadrático de cada célula é obtido através da seguinte equação

$$r^2(\tau) = |\vec{r}_{i+\tau} - \vec{r}_i|^2 = (x_{i+\tau} - x_i)^2 + (y_{i+\tau} - y_i)^2, \quad (2.43)$$

onde $i = 1, 2, 3, \dots$ e τ é o intervalo de tempo entre os passos. Utilizamos a técnica de overlap com o objetivo de minimizar as flutuações estatísticas, já que estamos trabalhando com dados experimentais. Esta técnica assume que cada ponto da trajetória seja o início de uma nova trajetória. Observando a figura 2.5, podemos compreender a trajetória de uma célula. Partindo da origem (x_0, y_0) em direção a (x_1, y_1) , considerando $\tau = 1 \text{ min}$, tem-se o deslocamento quadrático $\vec{r}_0(1)$ e partindo da mesma (x_0, y_0) em direção a (x_3, y_3) , tem-se $\vec{r}_1(2)$ após um intervalo de tempo $\tau = 2 \text{ min}$. Partindo da nova origem (x_1, y_1) em direção a (x_2, y_2) , considerando $\tau = 1 \text{ min}$, tem-se o deslocamento quadrático $\vec{r}_1(1)$. Fazendo (x_2, y_2) como origem em direção a (x_3, y_3) , considerando $\tau = 1 \text{ min}$, tem-se o deslocamento quadrático $\vec{r}_2(1)$, e assim por diante. Desta forma, o deslocamento quadrático médio da célula para $\tau = 1 \text{ min}$ é dado pela média de quatro deslocamentos quadráticos ($r_0^2(1)$, $r_1^2(1)$, $r_2^2(1)$, $r_3^2(1)$) ao invés de apenas um deslocamento $r^2(\tau = 1)$ de (x_0, y_0) para (x_1, y_1) . Para cada célula j temos um deslocamento quadrático médio $\langle r^2(\tau) \rangle_j$. Assim, para a amostra contendo n células, o deslocamento quadrático médio foi obtido através de

$$\langle r^2(\tau) \rangle = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \langle r^2(\tau) \rangle_j. \quad (2.44)$$

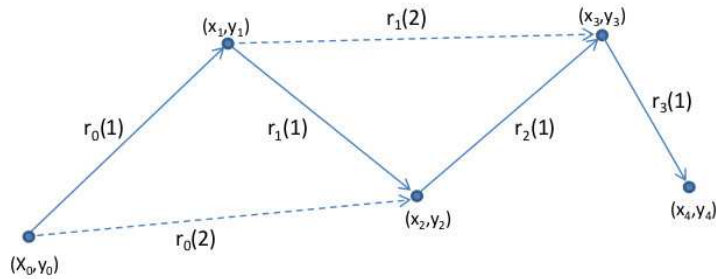


Figura 2.5: Ilustração do deslocamento quadrático médio de uma célula. Cada bolinha preenchida representa uma nova origem (x, y) . As linhas contínuas representam o primeiro deslocamento r com relação à origem e as linhas tracejadas representam o segundo deslocamento com relação a mesma origem.

2.4.3 Ângulo de giro

Os ângulos de giro ou variação angular entre duas posições consecutivas foram obtidos através de

$$\alpha_i = \theta_{i+1} - \theta_i, \tag{2.45}$$

onde $i = 1, 2, 3, \dots, N - 1$. θ_i representa o ângulo com relação a linha horizontal do passo i , de acordo com a figura 2.6 (ângulos acima da linha horizontal, eixo x , foram considerados positivos e abaixo da linha negativos). De posse, desses ângulos construímos o histograma dos ângulos de giro, que pode indicar se existem direções preferenciais de movimento das células. Utilizamos caixas de largura fixa ⁷ igual a $\frac{(\theta_{max} - \theta_{min})}{50}$.

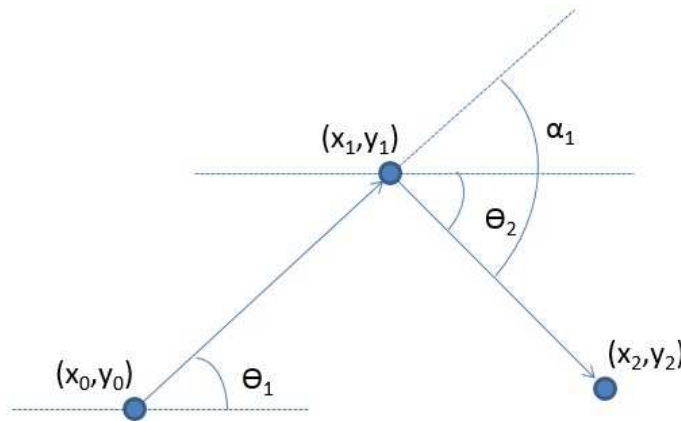


Figura 2.6: Representação do ângulo de giro α . θ_i é o ângulo que especifica a direção do passo i . (x_0, y_0) é a posição de partida, (x_1, y_1) e (x_2, y_2) são posições após os primeiros passos, θ_1 é considerado positivo, pois está acima da linha tracejada na horizontal (eixo x), enquanto θ_2 é negativo.

⁷Escolhemos a largura da caixa fixa devido ao elevado valor do desvio padrão para θ_i .

2.4.4 Autocorrelação das velocidades

A função correlação entre as velocidades é dada por

$$c_v(\tau) = \frac{\langle \vec{v}(t + \tau) \cdot \vec{v}(t) \rangle}{\langle v^2(t) \rangle}, \quad (2.46)$$

onde $\tau = i\Delta t$, $i = 1, 2, 3, \dots$

Para minimizar tendências devido ao número finito de pontos obtidos experimentalmente, como por exemplo efeitos de borda, vamos utilizar a seguinte equação [2, 32]

$$c_v(\tau) = \frac{\frac{1}{N - \tau - 1} \sum_{i=1}^{N-\tau} \left(\vec{v}_i - \frac{1}{N - \tau} \sum_{j=1}^{N-\tau} \vec{v}_j \right) \cdot \left(\vec{v}_{i+\tau} - \frac{1}{N - \tau} \sum_{j=\tau+1}^N \vec{v}_j \right)}{\left[\frac{1}{N - 1} \sum_{i=1}^N \left(\vec{v}_i - \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \vec{v}_j \right)^2 \right]}, \quad (2.47)$$

onde N é o número de pontos amostrados.

2.4.5 Voos Direcionais e de Reorientação

A fim de verificarmos o modo de migração direcional e de reorientação [2, 33] escolhemos um ângulo α^* fixo e analisamos a trajetória de cada célula individualmente de acordo com esse ângulo limite ao longo do tempo. O primeiro ângulo α_1 representa um modo de migração direcional. À partir deste os demais ângulos α_i podem representar um modo de migração direcional ou de reorientação. Os voos são ditos direcionais quando uma sequência de n movimentos após o instante t_i é executada dentro de uma região limitada de variação angular dada por α^* , ou seja, se $|\alpha(t_j)| < \alpha^*$, com $j = i + 1, \dots, i + n$. E os voos são ditos de reorientação, quando uma sequência de movimentos é executada com desvios angulares acima do valor limite de α^* , ou seja, se $|\alpha(t_j)| \geq \alpha^*$.

Em cada um dos modos de migração direcional e reorientação determinamos a distância total percorrida,

$$l = \sum_{j=1}^n |\vec{r}_{i+j} - \vec{r}_{i+j-1}|, \quad (2.48)$$

l pode ser chamado de comprimento de contorno do voo, n é o número de passos que constituem o voo. À partir do comprimento de contorno, determinamos funções distribuição de densidade

acumulada $P(l)$, de acordo com

$$P(l) = 1 - \sum_{i=1}^n p(l_i). \quad (2.49)$$

onde l_i é o comprimento de cada passo dos n consecutivos em cada modo de migração.

2.5 Resultados

As figuras 2.7(a), 2.7(b), 2.8(a) e 2.8(b) correspondem às fotos iniciais ($t = 1min$) de um campo de observação das células de melanócito tumoral B16F10, para as diferentes densidades aqui estudadas.

A figura 2.9 ilustra as trajetórias de cada célula ao longo do tempo ($t = 360min$). Podemos observar que, independente da densidade de células por centímetro quadrado, elas apresentam um comportamento bastante aleatório. Algumas células migram em caminhadas persistentes ao longo de uma direção, enquanto outras giram em torno de si mesmas.

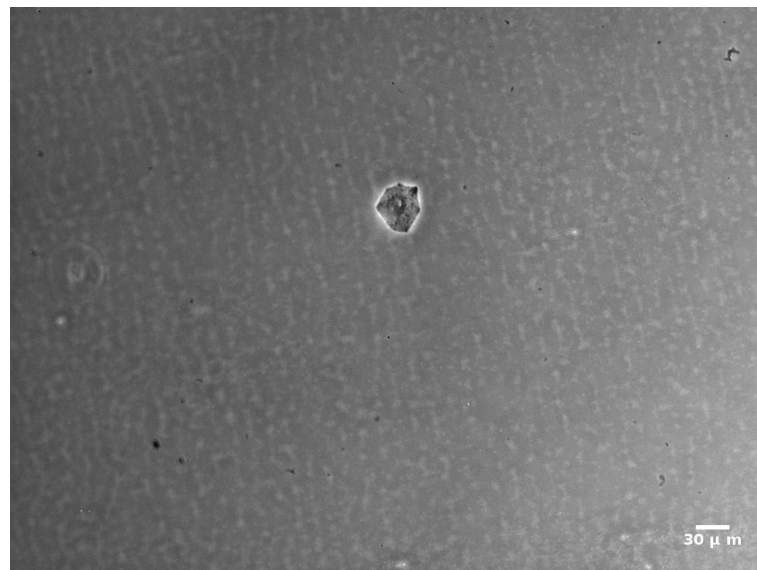
As velocidades médias para cada densidade celular, estão registradas na tabela 2.1. Como podemos observar elas se mantêm praticamente constantes dentro das barras de erro.

Densidade cel/cm^2	$v_{med}(\mu m/min)$	q-gaussiana	q-Weibull	r	s	κ
20	$0,68 \pm 0,50$	$1,82 \pm 0,07$	$1,42 \pm 0,08$	$2,38 \pm 0,10$	$1,01 \pm 0,30$	$1,52 \pm 0,90$
100	$0,68 \pm 0,50$	$1,67 \pm 0,06$	$1,37 \pm 0,02$	$2,77 \pm 0,02$	$1,27 \pm 0,50$	$0,43 \pm 0,40$
2000	$0,76 \pm 0,60$	$1,85 \pm 0,06$	$1,40 \pm 0,09$	$2,28 \pm 0,20$	$1,14 \pm 0,20$	$1,68 \pm 0,60$
10000	$0,78 \pm 0,70$	$1,64 \pm 0,05$	$1,37 \pm 0,03$	$2,20 \pm 0,08$	$1,16 \pm 0,20$	$2,46 \pm 0,80$

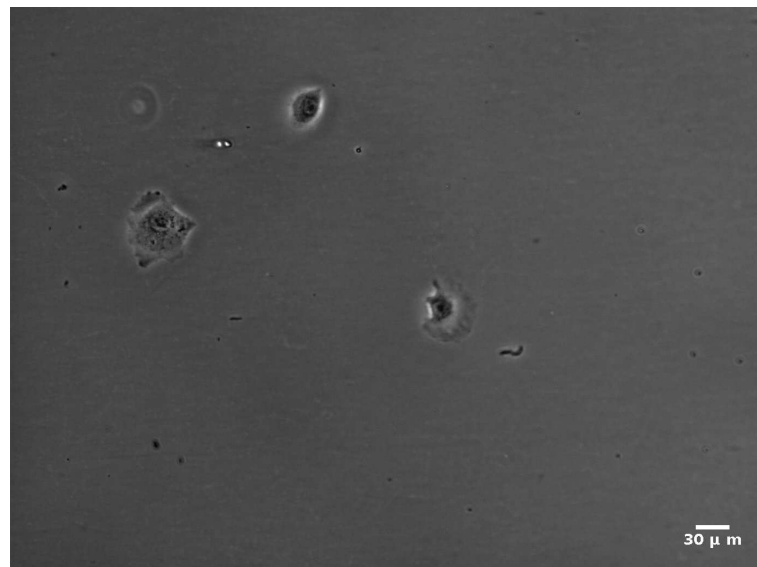
Tabela 2.1: Parâmetros de ajustes, expoentes de escala, skewness e curtose para $P(v)$. Os parâmetros q-gaussiana foram obtidos no ajuste com uma q-gaussiana e, q-Weibull e r foram obtidos no ajuste com uma q-Weibull, todos esses parâmetros de ajustes estão relacionados a cauda da distribuição.

Nas figuras 2.10(a), 2.10(b), 2.11(a) e 2.11(b) são mostradas as distribuições de probabilidade das velocidades $P(v)$ em função de v . Foram feitos três tentativas de ajustes: distribuição gaussiana, q-gaussiana e q-Weibull. Os parâmetros de ajustes para essas distribuições são listadas na tabela 2.1.

De acordo com as distribuições $P(v)$ os ajustes com as funções q-Weibull ficaram visualmente melhores do que os ajustes com as q-gaussianas. Para confirmar os nossos resultados calculamos a skewness e a curtose dos dados das velocidades sem qualquer referência à ajustes.



(a)

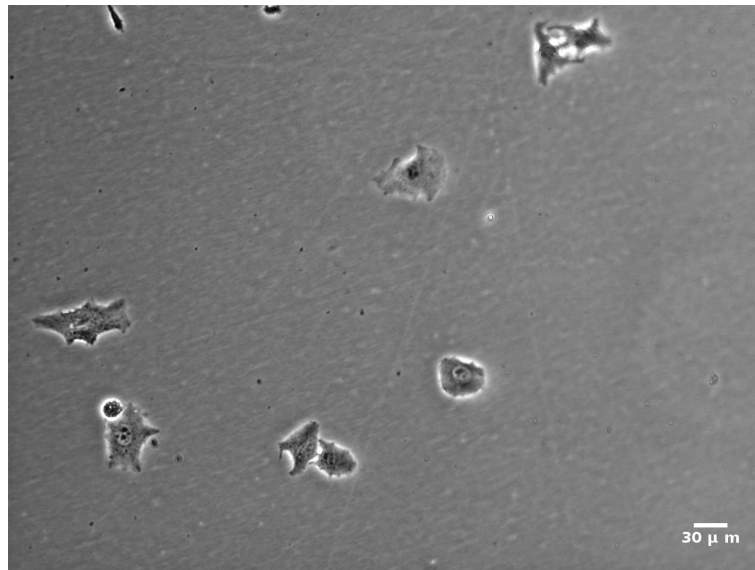


(b)

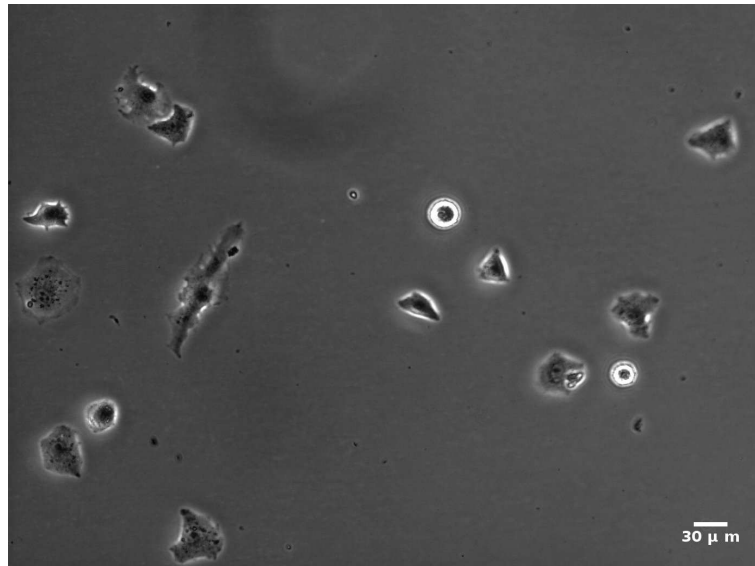
Figura 2.7: Imagem de um campo de observação das células de melanócito tumoral B16F10 para as densidades (a) 20 cel/cm^2 (b) 100 cel/cm^2 .

A skewness é definida pela seguinte equação

$$s = \frac{\mu_3}{(\mu_2)^{\frac{3}{2}}} = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (v_i - \bar{v})^3}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(v_i - \bar{v})^2]^{\frac{3}{2}}}, \quad (2.50)$$



(a)



(b)

Figura 2.8: Imagem de um campo de observação das células de melanócito tumoral B16F10 para as densidades (a) 2000 cel/cm^2 e (b) 10000 cel/cm^2 .

em que μ_2 é o segundo momento e μ_3 o terceiro momento, enquanto a curtose é dada por

$$\kappa = \frac{\mu_4}{(\mu_2)^2} - 3 = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (v_i - \bar{v})^4}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(v_i - \bar{v})^2]^2} - 3, \quad (2.51)$$

sendo μ_4 o quarto momento. A curtose é uma medida de dispersão que caracteriza o grau de achatamento da distribuição da seguinte forma:

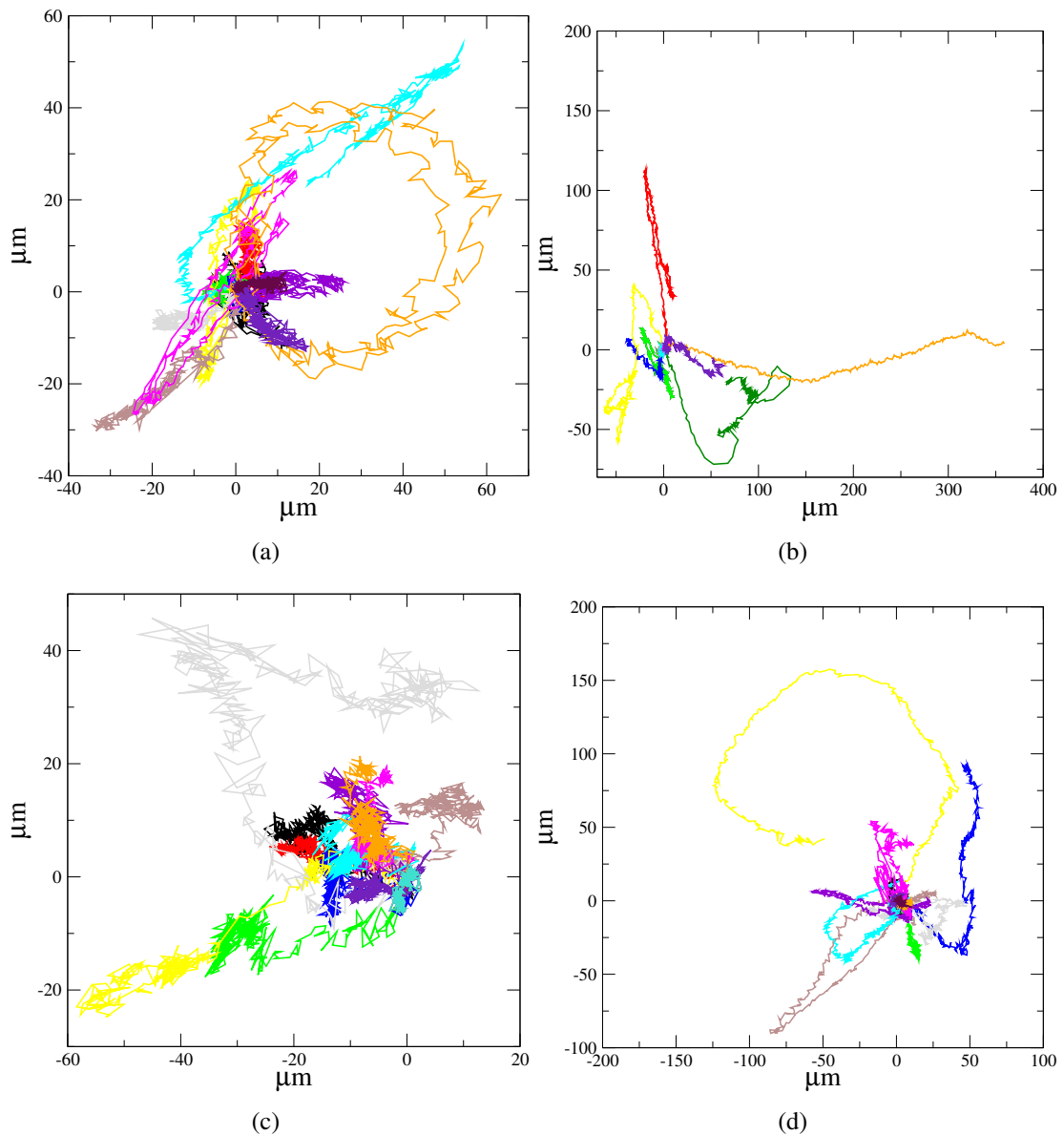


Figura 2.9: Trajetórias das células ao longo do tempo. Cada cor representa a caminhada de uma única célula com 360 passos fotografados a cada minuto; (a) densidade de $20 \text{ cel}/\text{cm}^2$, (b) densidade de $100 \text{ cel}/\text{cm}^2$, (c) densidade de $2000 \text{ cel}/\text{cm}^2$, e (d) densidade de $10000 \text{ cel}/\text{cm}^2$.

- Se $\kappa = 0$, tem-se uma distribuição normal denominada distribuição mesocúrtica;
- se $\kappa < 0$, o pico é mais arredondado com caudas mais curtas e a distribuição é denominada platicúrtica;
- se $\kappa > 0$, o pico é mais agudo e a cauda mais longa e pesada, neste caso a distribuição é denominada leptocúrtica.

Já a skewness mede a assimetria da distribuição. Se $s = 0$, a distribuição é simétrica, como o caso da gaussiana e da q-gaussiana. Se $s \neq 0$ a distribuição é assimétrica, como a distribuição q-Weibull. Para $s > 0$, a distribuição assimétrica tem a cauda mais pesada à esquerda, diz-se

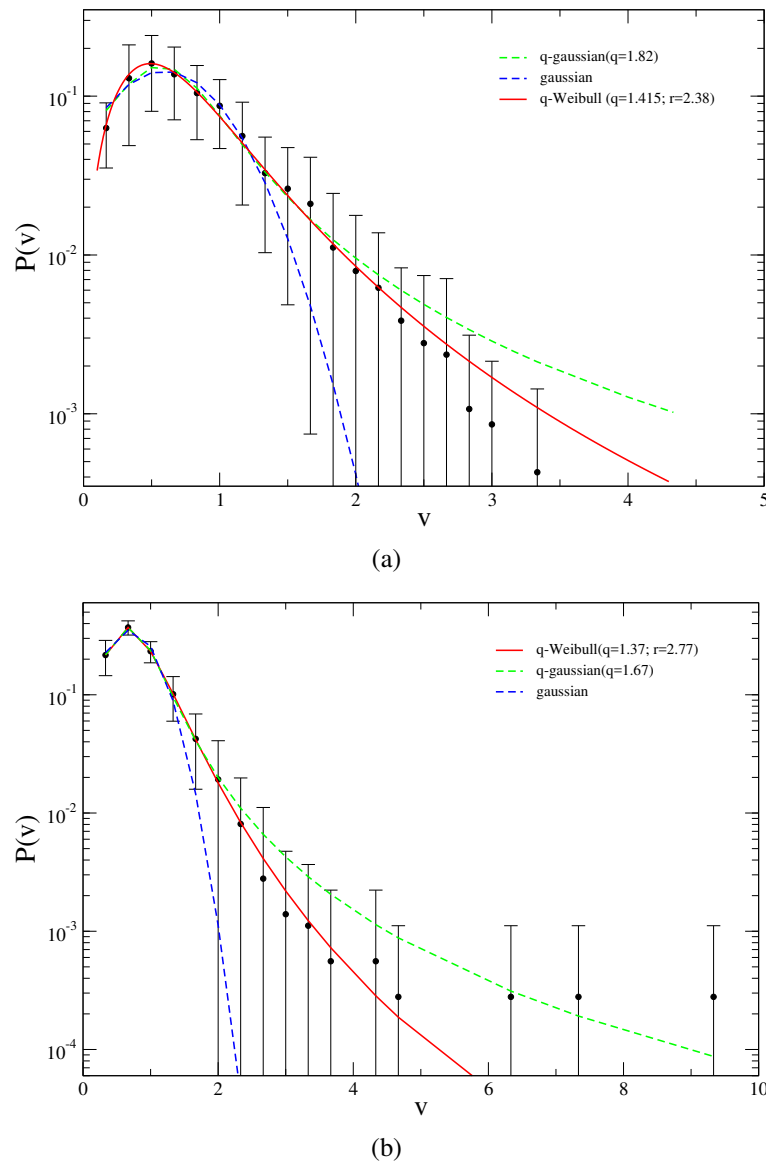


Figura 2.10: Distribuição das densidades de probabilidade das velocidades $P(v)$ em função da velocidade $v(\mu m/min)$. Os símbolos pretos representam o conjunto de dados experimentais, a curva vermelha representa o ajuste da distribuição q-Weibull, a curva azul tracejada representa o ajuste da distribuição gaussiana e a curva verde tracejada é uma tentativa de ajuste por uma distribuição q-gaussiana. (a) densidade de $20\text{ cel}/\text{cm}^2$ e (b) densidade de $100\text{ cel}/\text{cm}^2$.

que a distribuição é assimétrica positiva, e para $s < 0$, a cauda é mais pesada à direita, diz-se que a distribuição é negativa. Nossos resultados podem ser verificados na tabela (2.1). Eles indicam uma distribuição de velocidade leptocúrtica e assimétrica, confirmando que nossas distribuições são do tipo q-Weibull e não do tipo gaussiana ou q-gaussiana, que são distribuições simétricas. Desta forma, as distribuições de velocidade, independente da densidade, seguem um regime de difusão anômalo ($q \neq 1$) do tipo q-Weibull.

O deslocamento quadrático médio em função do tempo, pode ser observado nas figuras B.5(b), 2.12(d), 2.13(b) e 2.13(d). Cada curva representa $\langle r^2 \rangle / \langle v^2 \rangle$ para cada célula. Dividi-

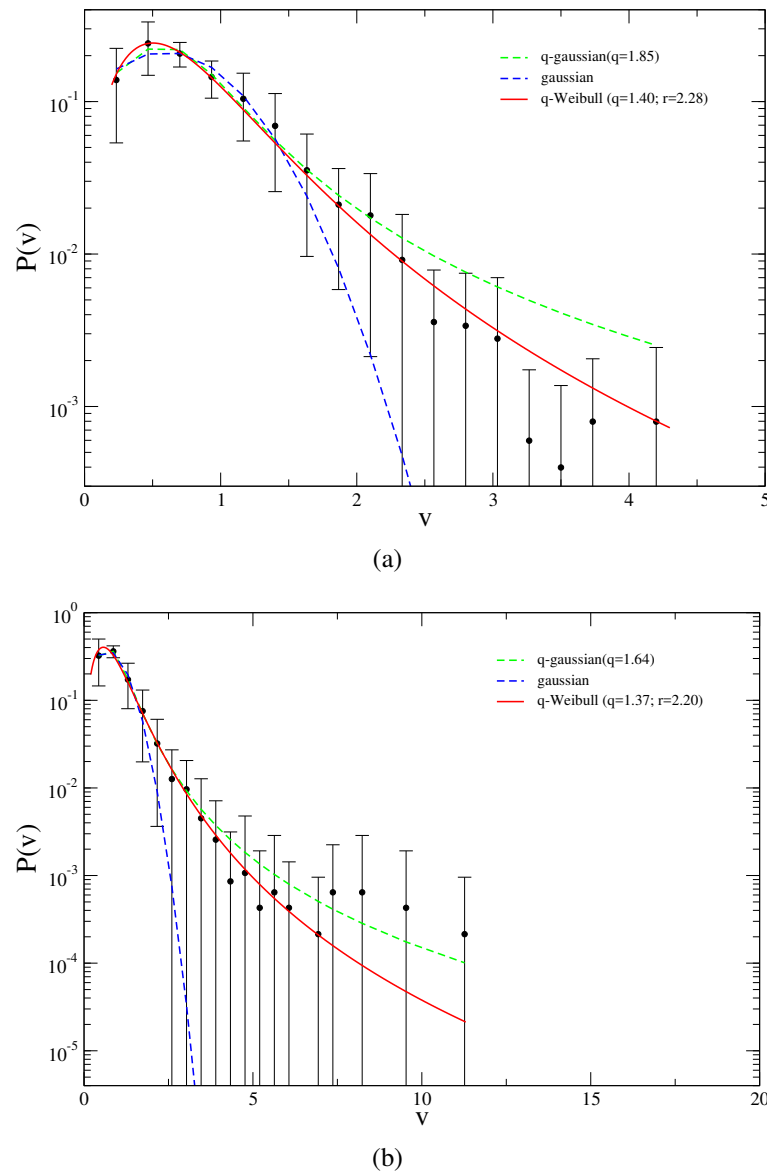


Figura 2.11: Distribuição das densidades de probabilidade das velocidades $P(v)$ em função da velocidade $v(\mu\text{m}/\text{min})$. Os símbolos pretos representam o conjunto de dados experimentais, a curva vermelha representa o ajuste da distribuição q-Weibull, a curva azul tracejada representa o ajuste da distribuição gaussiana e a curva verde tracejada é uma tentativa de ajuste por uma distribuição q-gaussiana. (a) densidade de $2000 \text{ cel}/\text{cm}^2$, e (b) densidade de $10000 \text{ cel}/\text{cm}^2$.

mos o deslocamento quadrático médio pela velocidade média ao quadrado com o objetivo de normalizar as curvas, possibilitando analisarmos o comportamento de $\langle r^2 \rangle$ independente das velocidades individuais, que apresentam comportamentos bem distintos umas das outras, mesmo as células estando nas mesmas condições. A curva mais grossa preta representa $\langle r^2 \rangle / \langle v^2 \rangle$ medida sobre todas as células. Foram feitos ajustes nessa curva. Para densidade de $20 \text{ cel}/\text{cm}^2$, a curva $\langle r^2 \rangle / \langle v^2 \rangle$ foi ajustada com duas leis de potência, uma para tempos curtos, e outra para tempos longos. Os coeficientes γ indicam o quão difusiva é a migração (equação 2.6), e estão indicados na tabela 2.2. Para densidade de $100 \text{ cel}/\text{cm}^2$, $2000 \text{ cel}/\text{cm}^2$ e $10000 \text{ cel}/\text{cm}^2$ as

curvas foram ajustadas usando a seguinte equação

$$\langle r^2 \rangle(t) = \left[1 - \frac{\lambda_\xi}{\mu_1} + \frac{\lambda_\xi}{\mu_1} e^{(1-\xi)\mu_1 t} \right]^{\frac{1}{1-\xi}}, \quad (2.52)$$

que descreve o *crossover* entre duas leis de potência [2, 34]. Especificamente essa equação descreve um crescimento no tempo, que passa de um regime linear para um regime não linear caracterizado pelo expoente ξ . Os parâmetros λ_ξ e μ_1 estão relacionados à taxa de crescimento: μ_1 está relacionado a taxa de crescimento linear e $(\lambda_\xi - \mu_1)$ é a taxa de crescimento não linear. Os valores dos parâmetros λ_ξ , μ_1 e ξ estão indicados na tabela 2.2.

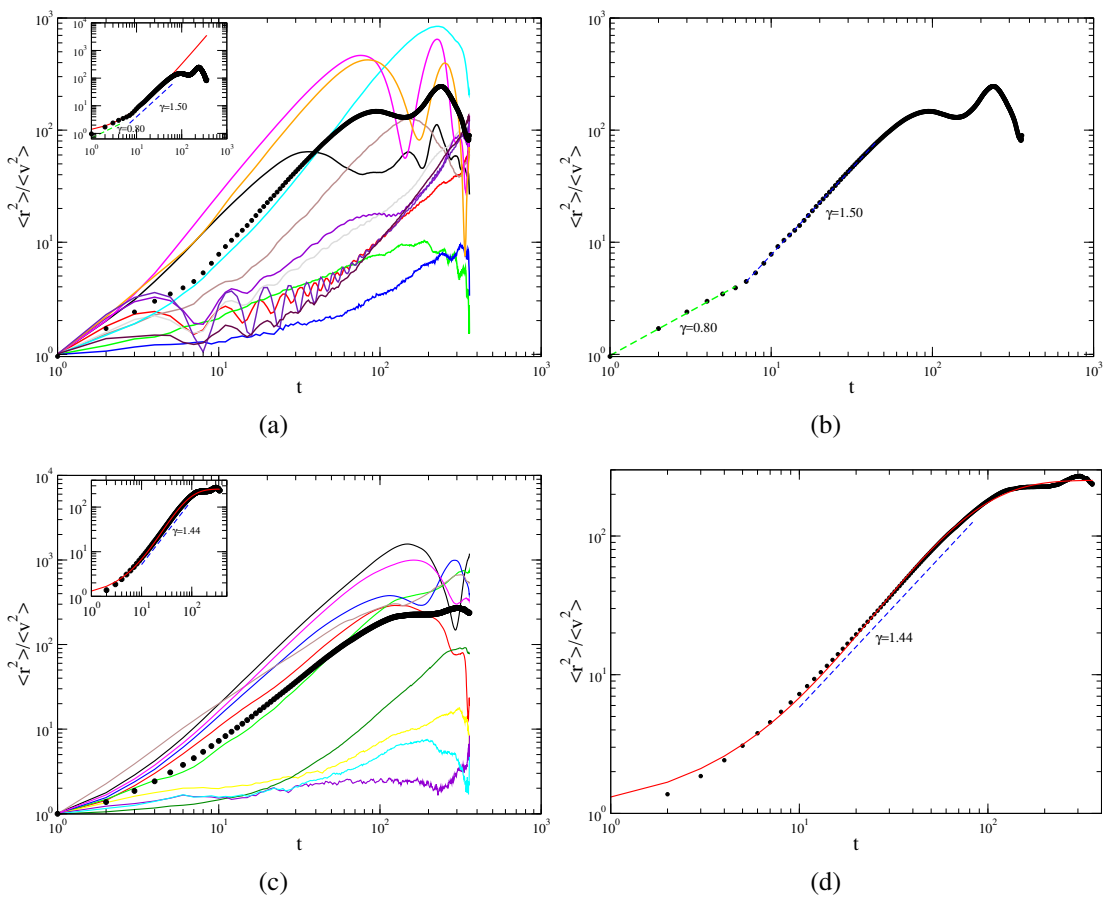


Figura 2.12: Razão entre o deslocamento quadrático médio e velocidade média ao quadrado em função do tempo em minutos. Cada curva colorida representa uma única célula. A curva preta mais grossa representa a média dessa razão para todas as células. A linha tracejada em vermelho representa um ajuste com uma função do tipo lei de potência. A direita, curva média de $\langle r^2 \rangle / \langle v^2 \rangle$, a linha tracejada em azul representa um ajuste com uma lei de potência; (a) e (b) densidade de 20 cel/cm^2 , (c) e (d) densidade de 100 cel/cm^2 .

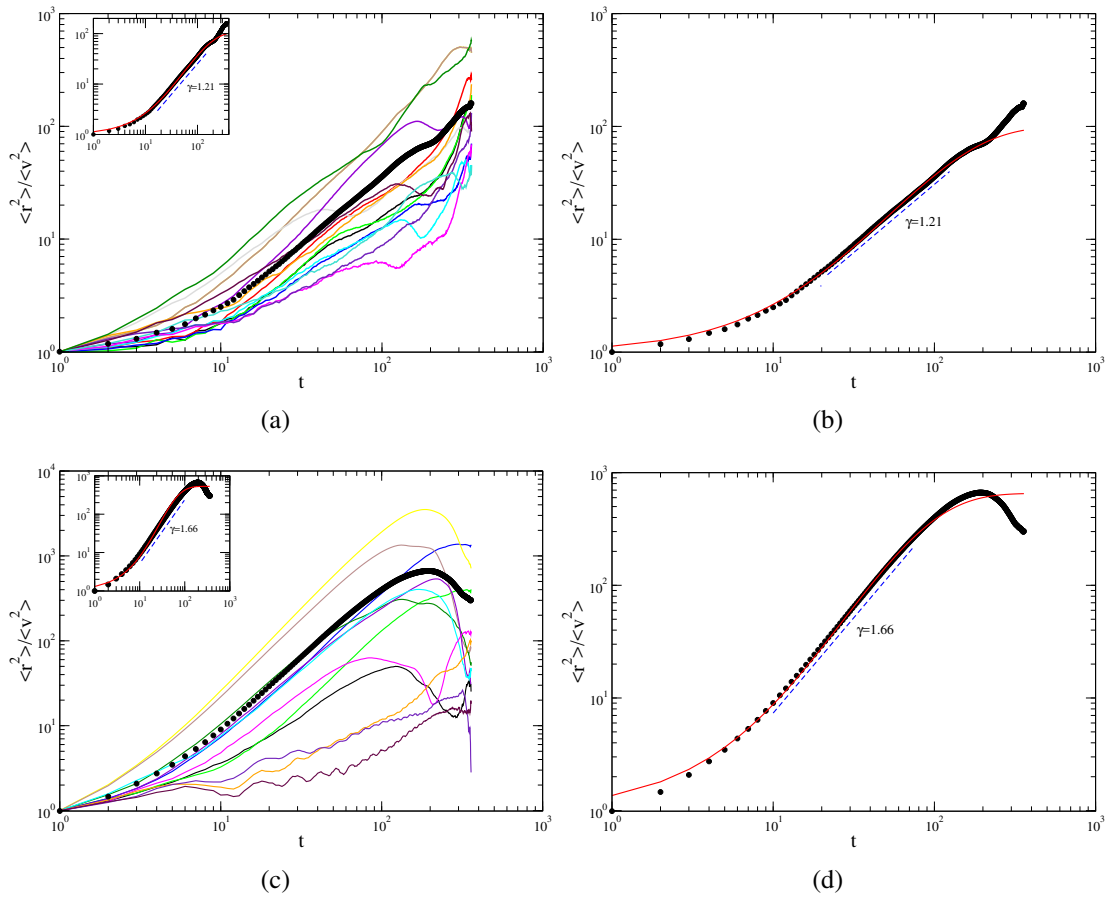


Figura 2.13: Razão entre o deslocamento quadrático médio e velocidade média ao quadrado em função do tempo em minutos. Cada curva colorida representa uma única célula. A curva preta mais grossa representa a média dessa razão para todas as células. A linha tracejada em vermelho representa um ajuste com uma função do tipo lei de potência. A direita, curva média de $\langle r^2 \rangle / \langle v^2 \rangle$, a linha tracejada em azul representa um ajuste com uma lei de potência; (a) e (b) densidade de 2000 cel/cm^2 e (c) e (d) densidade de 10000 cel/cm^2 .

Densidade cel/cm^2	λ_ξ	μ_1	ξ	γ_{TC}	γ_{TL}
20	-	-	-	0.80	1.50
100	0.17	-0.015	0.53	-	1.44
2000	0.13	-0.02	0.59	-	1.21
10000	0.33	-0.06	0.70	-	1.66

Tabela 2.2: Parâmetros de ajustes e expoentes de escala para $\langle r^2 \rangle$.

Verificamos mais uma vez o caráter anômalo quanto a migração das células ($\gamma \neq 1$) independente da densidade. Para tempos curtos, todas as densidades seguem um regime de migração subdifusivo ($\gamma < 1$), indicando uma difusão mais lenta. Enquanto que, para tempos longos seguem um regime de migração superdifusivo ($\gamma > 1$), ou seja, difundem mais rapidamente.

A correlação temporal ou autocorrelação das velocidades é mostrada nas figuras 2.14(a), 2.14(b), 2.15(a) e 2.15(b). As curvas foram ajustadas com uma função q-exponencial (linha verde), de acordo com a equação

$$p_q(x) = p_0 \left[1 - (1 - q) \cdot \left(\frac{x}{x_0} \right) \right]^{\frac{1}{(1-q)}}, \quad (2.53)$$

onde p_0 é o valor máximo da correlação e x_0 é o comprimento característico da função. A linha vermelha foi uma tentativa de ajuste com uma exponencial $c \sim e^{t/t^*}$, onde t^* é o tempo característico que varia entre 0.5 e 0.7 min, indicando que a autocorrelação entre as velocidades decai rapidamente com o tempo. Os valores de t^* e q obtidos nos ajustes podem ser vistos na tabela 2.3.

Densidade <i>cel/cm</i> ²	20	100	2000	10000
q-exponencial	2.62	2.11	2.15	2.34
t^*	0.53	0.69	0.56	0.59

Tabela 2.3: Valores do parâmetro q obtidos no ajuste com uma q-exponencial e valores dos tempos característicos t^* obtidos no ajuste com uma exponencial, para todas as densidades aqui estudadas.

De acordo com os ajustes verificamos que, para todas as densidades estudadas, tem-se $q > 1$, indicando um decaimento mais lento do que uma exponencial.

Nas figuras 2.16(a), 2.16(b), 2.17(a) e 2.17(b), temos os histogramas dos ângulos de giro. Podemos observar que, independente da densidade de células plaqueadas, a variação angular entre duas posições consecutivas é mais frequente em torno de $-\pi$ e π , indicando que as células tem uma tendência em executar passos em sentidos contrários. Este mesmo comportamento pode ser confirmado quando observamos as figuras 2.18(a), 2.18(b), 2.19(a) e 2.19(b), onde há uma concentração maior de pontos em torno de $-\pi$ e π .

Nas figuras 2.20(a), 2.20(b), 2.21(a) e 2.21(b), podemos observar a distribuição da densidade acumulada complementar $P(l)$ em função do tamanho do comprimento dos voos l para todas as densidades. A curva preta corresponde aos modos de migração direcional e a curva vermelha representa a reorientação, usando $\alpha^* = 30^\circ$. As distribuições da densidade acumulada tanto para os modos de migração direcional quanto para reorientação são do tipo exponencial, ou seja, $P(l) \sim e^{-\frac{l}{l^*}}$. Na tabela 2.4, podemos verificar que a medida que aumenta a densidade, os comprimentos característicos dos voos l^* diminui para os modos de migração direcional enquanto que os de reorientação aumentam, indicando que são predominantes os voos de reorientação à medida que aumenta a densidade. Este mesmo comportamento foi observado para $\alpha^* = 15^\circ$ e $\alpha^* = 45^\circ$. Verificamos também a distribuição da densidade acumulada complementar $P(l)$ em função do tamanho dos voos l , com $\alpha^* = 30^\circ$, para células individuais, que foram separadas em três grupos: células com migração alta, células com baixa migração e células com grande varia-

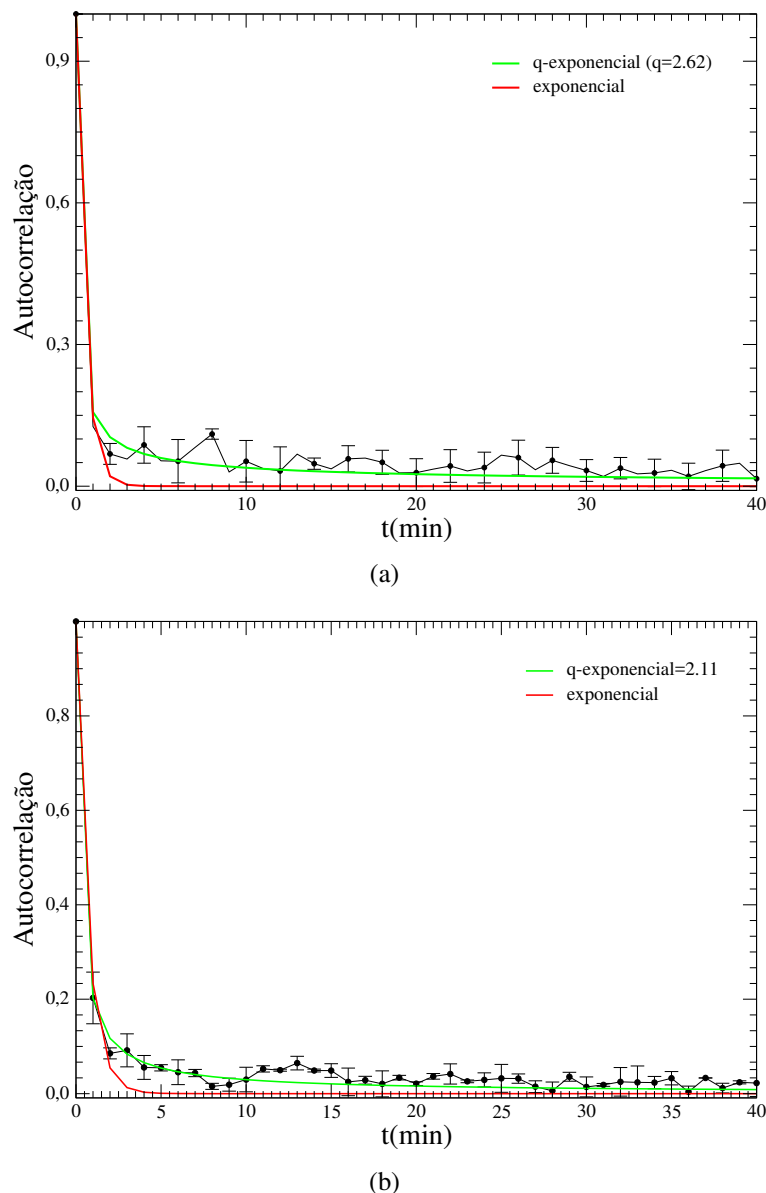


Figura 2.14: Correlação das velocidades em função do tempo. A linha vermelha é uma tentativa de ajuste com uma função exponencial e a linha verde é o ajuste com uma função do tipo q-exponencial; (a) densidade de 20 cel/cm^2 , (b) densidade de 100 cel/cm^2 .

ção de forma de membrana. Tais distribuições podem ser verificadas nas figuras 2.22(a), 2.22(b) e 2.22(c). De acordo com a tabela 2.4, células com baixa migração não apresentam voos direcionais. Olhando para o deslocamento quadrático médio, observa-se que as células com migração alta difundem mais rapidamente que as células com pouca migração ou com grande variação de forma. As células com muita variação de forma apresentam um comprimento característico dos voos l^* maior que as células que migram pouco, tanto para os voos direcionais quanto para os de reorientação, apresentando um comportamento superdifusivo assim como as células com migração alta.

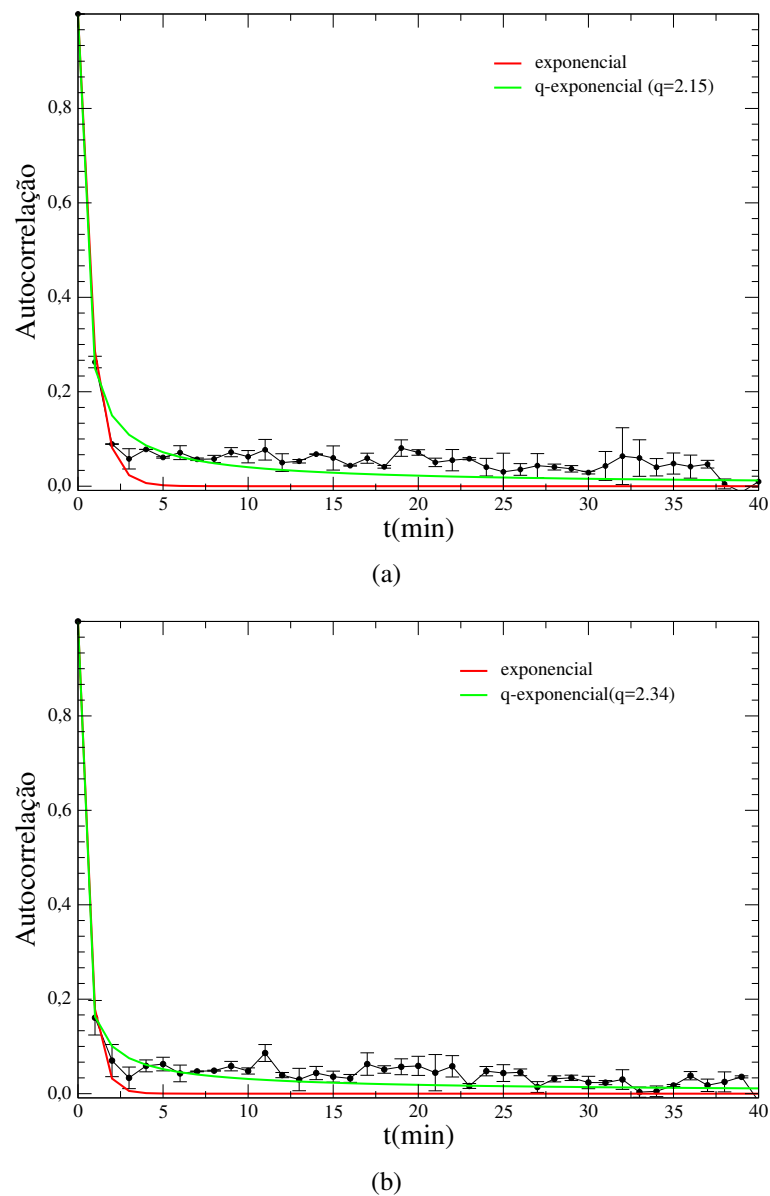
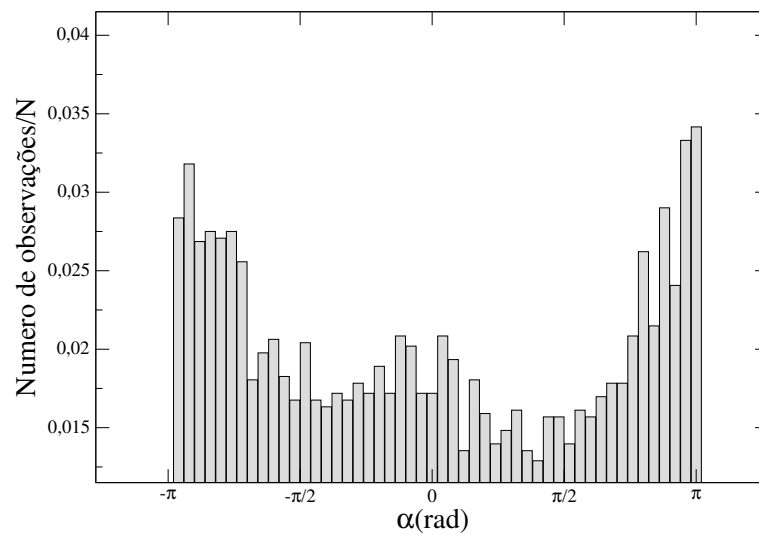


Figura 2.15: Correlação das velocidades em função do tempo. A linha vermelha é uma tentativa de ajuste com uma função exponencial e a linha verde é o ajuste com uma função do tipo q-exponencial; (a) densidade de 2000 cel/cm^2 , e (b) densidade de 10000 cel/cm^2 .

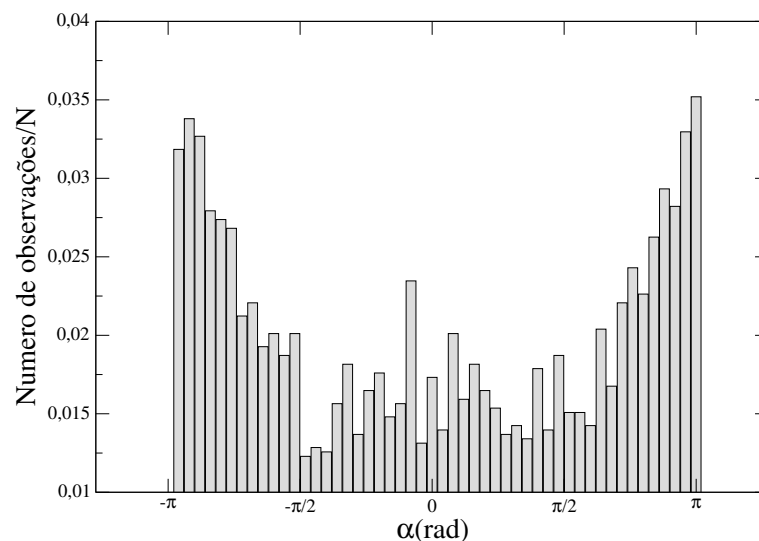
2.6 Discussão

Neste capítulo, verificamos o comportamento migratório de células epeliais tumorais B16F10, variando a densidade de células. Observamos que as trajetórias individuais de cada célula são totalmente aleatórias (figura 2.9), algumas migram em caminhada persistente ao longo de uma direção, enquanto outras giram em torno de si mesmas. Vale lembrar que nossos experimentos foram realizados na ausência de sinais quimiotáticos externos, levando em consideração apenas os eventuais gradientes químicos gerados por outras células.

De acordo com as figuras 2.10(a), 2.10(b), 2.11(a) e 2.11(b), independente da densidade,



(a)



(b)

Figura 2.16: Histograma normalizado do ângulo de giro; (a) densidade de 20 cel/cm^2 (b) densidade de 100 cel/cm^2 .

as células migram em um regime de difusão anômalo, com distribuições de velocidades do tipo q-Weibull. Observamos ainda que grupos de células com alta migração (figura B.1), baixa migração (figura B.2) e muita variação de forma (figura B.3) também apresentam um comportamento do tipo q-Weibull independente da densidade (os gráficos podem ser observados no apêndice B). A autocorrelação das velocidades são do tipo q-exponencial ($q > 1$) e de curto alcance. Este mesmo comportamento foi verificado por [2], porém as distribuições de velocidade são do tipo q-gaussiana tanto para linhagem Melan-A quanto para B16F10, o que não está correto, pois as distribuições de velocidades são assimétricas. Análises similares tem sido realizadas para várias linhagens celulares, como por exemplo, as células eucarióticas de *Dictyostelium* e *Polysphondylium* que apresentam distribuição de velocidades que aproxima-se

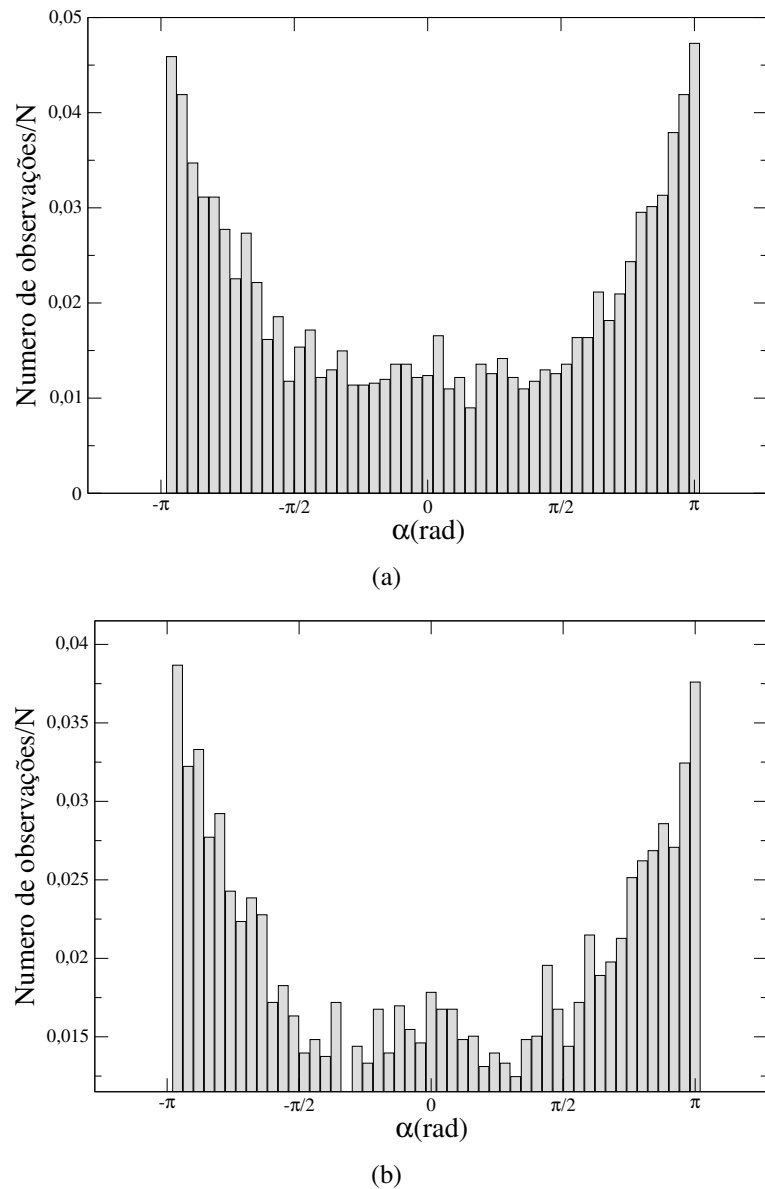


Figura 2.17: Histograma normalizado do ângulo de giro; (a) densidade de $2000 \text{ cel}/\text{cm}^2$ e (b) densidade de $10000 \text{ cel}/\text{cm}^2$.

da distribuição normal (gaussiana) [35].

Temos uma confirmação de nossos resultados quanto as células B16F10 migrarem em um regime de difusão anômalo, quando calculamos o deslocamento quadrático médio ao longo do tempo ($\langle r^2 \rangle \sim t^\gamma$). Observamos que independente da densidade o expoente da difusão é $\gamma \neq 1$. Para tempos curtos $\gamma < 1$ indicando um comportamento subdifusivo, migração mais lenta. Para tempos longos $\gamma > 1$ indicando um comportamento superdifusivo, ou seja, uma migração mais rápida. No entanto, analisando $\langle r^2 \rangle$ de cada célula separadamente, observamos que independente da densidade, a maioria das células ($\sim 55\%$) apresentam uma migração mais lenta, o restante das células ($\sim 45\%$) apresentam alta migração ou muita variação de forma, exceto para densidade de $10000 \text{ cel}/\text{cm}^2$, onde 18% da células apresentam migração aproximando-se de

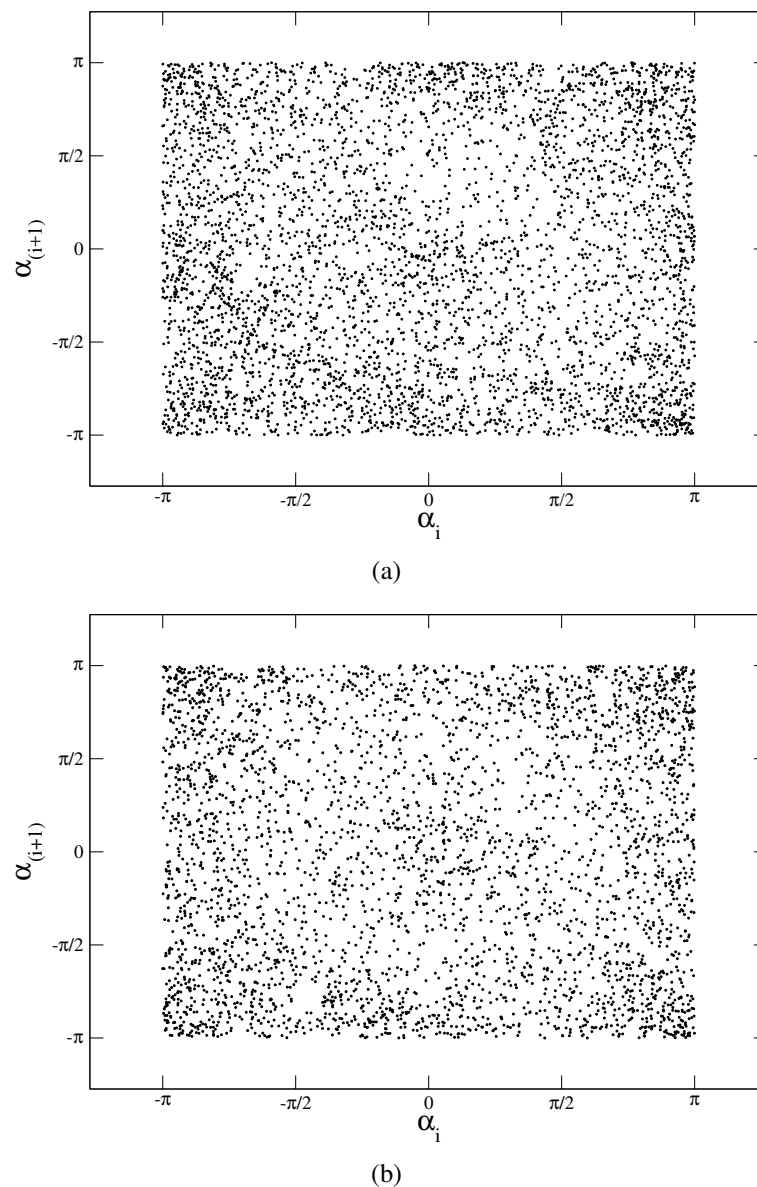


Figura 2.18: Variação dos ângulos de giro; (a) densidade de 20 cel/cm^2 (b) densidade de 100 cel/cm^2 .

uma migração balística ($\gamma \sim 1, 8$), o que pode justificar o aumento do expoente γ com relação à densidade de 2000 para 10000 cel/cm^2 (tabela 2.4). Desta forma, podemos dizer que aumentar a densidade de células ocasiona uma difusão cada vez mais lenta tendendo a um regime de difusão normal. Além disso, verificamos que algumas células apresentam um comportamento migratório persistente enquanto outras oscilam em torno de suas posições iniciais. Observamos que células com comportamento oscilatório apresentam uma migração subdifusiva para tempos longos, enquanto que células com comportamento migratório persistente apresentam uma superdifusão (para mais detalhes consulte o apêndice B, figuras B.4 e B.5). Em um outro trabalho (artigo em anexo no final da tese, anexo C), células epteliais MDCK apresentam um comportamento um pouco mais complexo quanto à migração. Independente da densidade as

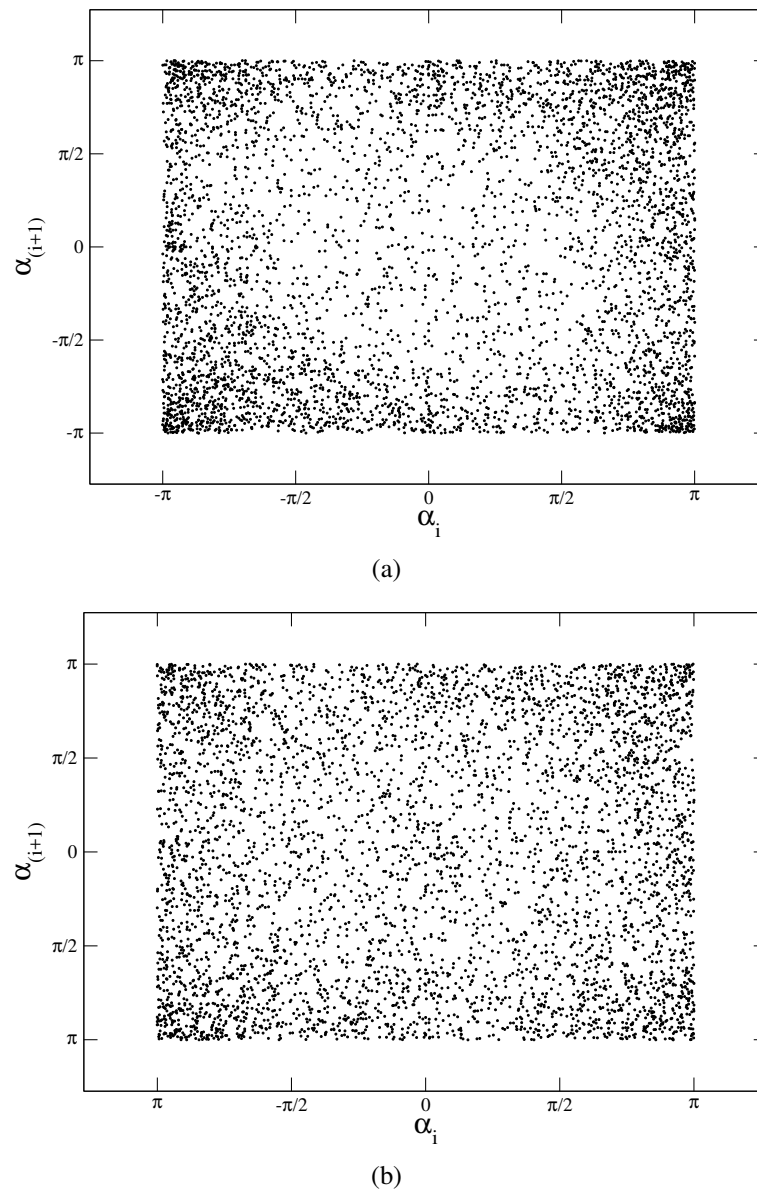


Figura 2.19: Variação dos ângulos de giro; (a) densidade de 2000 cel/cm^2 e (b) densidade de 10000 cel/cm^2 .

células MDCK apresentam *crossovers* entre os regimes de migração, indo de um regime de difusão superdifusivo para subdifusivo, ou seja, inicialmente as células migram balisticamente e em tempos superiores elas migram em caminhada aleatória persistente, contrário ao comportamento das células B16F10.

Verificamos também que independente da densidade, as células tem uma tendência em executar passos em sentidos contrários, sendo mais frequentes em torno de π e $-\pi$. Esses passos em sentidos contrários, nada mais são que as protusões e retrações dos lamelipódios, emitidos pela membrana celular.

Por meio da densidade acumulada complementar $P(l)$ em função dos comprimentos dos

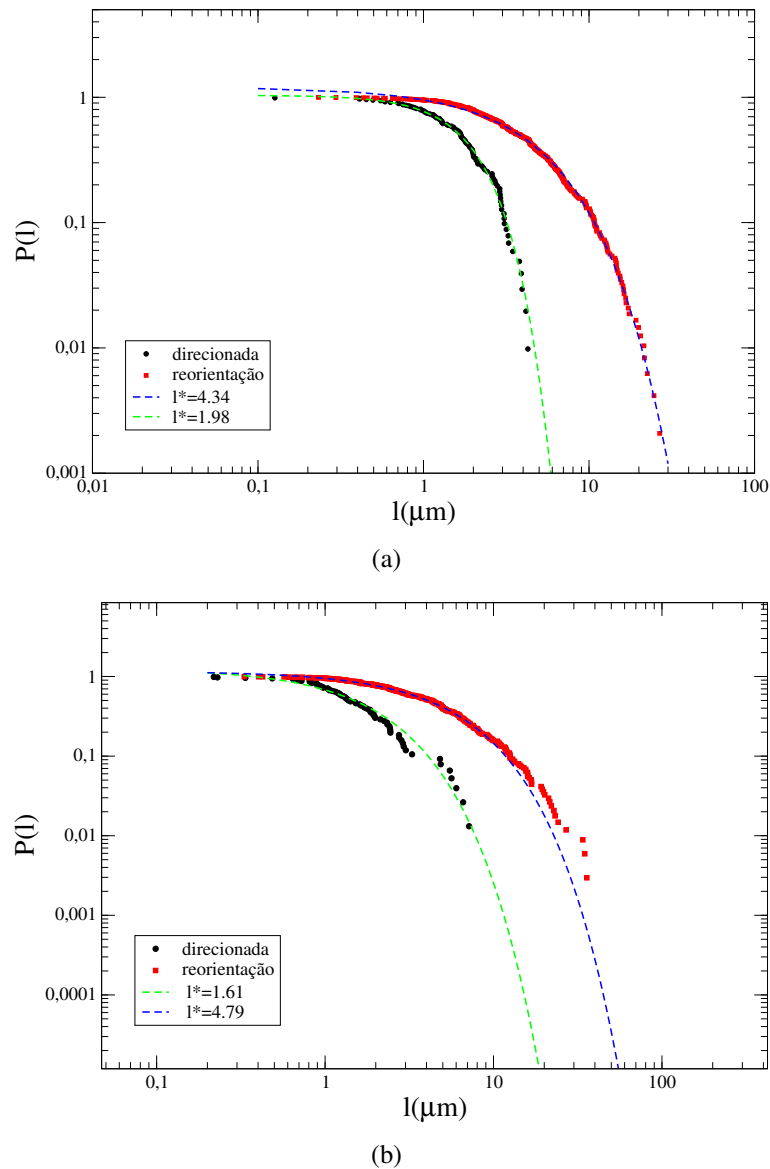


Figura 2.20: Distribuição da densidade acumulada complementar $P(l)$ em função do tamanho dos voos l . A curva preta representa as distâncias percorridas nos voos de migração direcional e a curva vermelha representa a reorientação, usando $\alpha^* = 30^\circ$. As curvas tracejadas são ajustes com distribuições exponenciais. (a) densidade de 20 cel/cm^2 (b) densidade de 100 cel/cm^2 .

voos l , observamos que as células apresentam mais voos de reorientação do que voos direcionais, independente da densidade. Porém, o comprimento característico dos voos l^* para voos direcionais diminuem, enquanto os de reorientação aumentam com o aumento da densidade. Além disso, observamos que células com baixa migração não apresentam voos direcionais, elas se reorientam o tempo todo através das protusões e retrações dos lamelipódios. O comprimento característico dos voos l^* de células com grande variação de forma é maior do que das células que migram pouco independente dos voos serem direcionais ou reorientação. O comportamento de escala de $\langle r^2 \rangle$ para esses grupos de células revela que células com migração alta migram mais balisticamente do que as células com muita variação de forma, e que células com

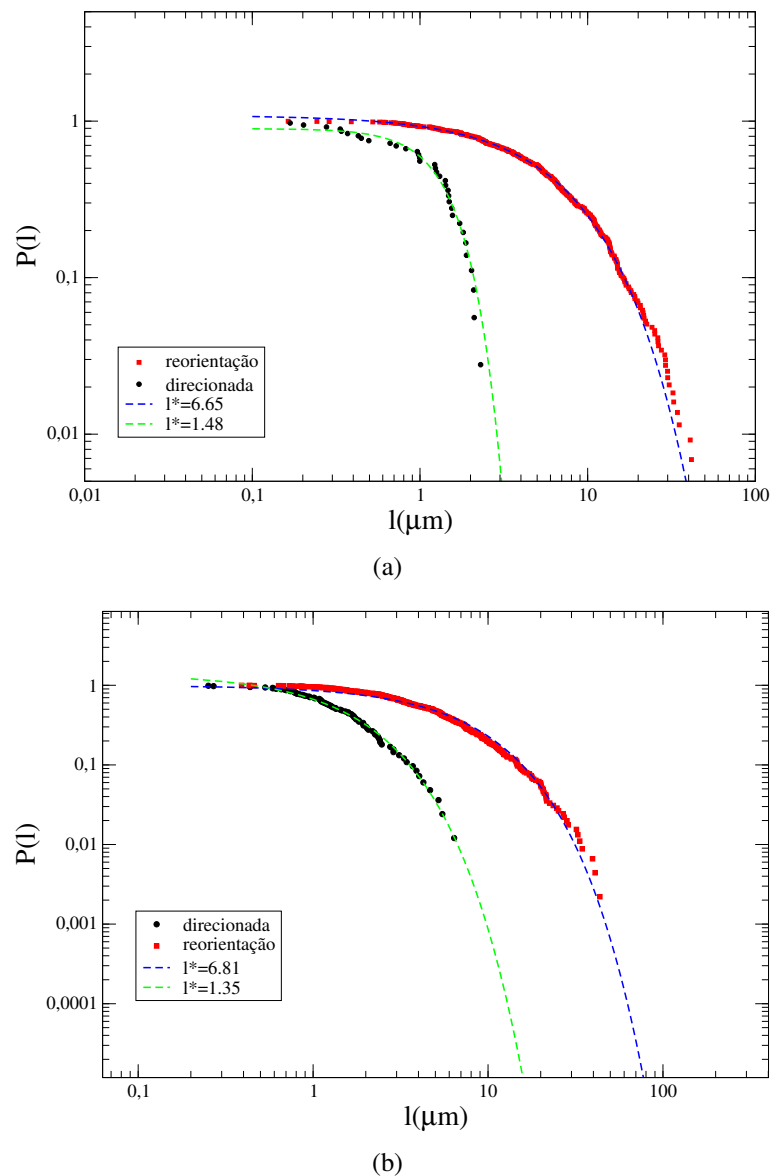


Figura 2.21: Distribuição da densidade acumulada complementar $P(l)$ em função do tamanho dos voos l . A curva preta representa voos de migração direcional e a curva vermelha representa a reorientação, usando $\alpha^* = 30^\circ$. As curvas tracejadas são ajustes com distribuições exponenciais; (a) densidade de 2000 cel/cm^2 e (b) densidade de 10000 cel/cm^2 .

pouca migração migram como em caminhada aleatória.

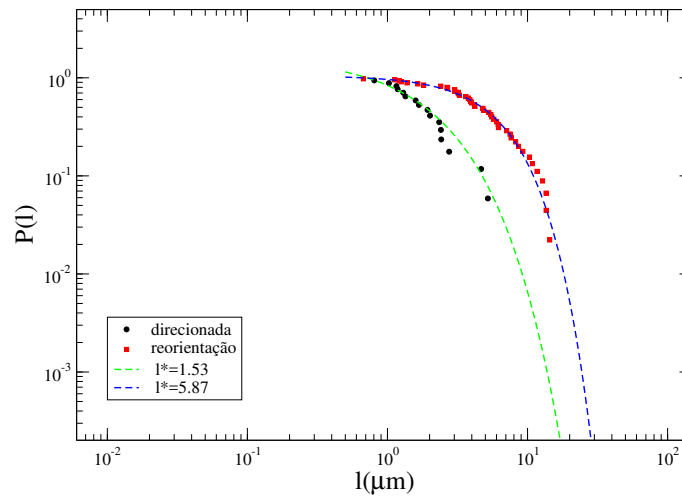
A fim de compreender mecanismos que levam a uma distribuição de velocidade tipo q-Weibull, foram realizadas simulações⁸ por [31]. Dois modelos foram considerados: uma caminhada aleatória persistente e o modelo de Vicsek [36]. Foi observado que sistemas em que as partículas possuem caminhadas com persistência levam a distribuição de velocidades q-Weibull. Observou-se ainda que no limite de uma caminhada aleatória, tipo Browniano, o coeficiente $q \rightarrow 1$ e $r = 2$, levando a uma distribuição tipo Weibull, que é a versão bidimensional

⁸Para mais detalhes consulte o artigo “Anomalous diffusion and q- Weibull velocity distributions in epithelial cell migration”, em anexo no final dessa tese, ou a referência [31].

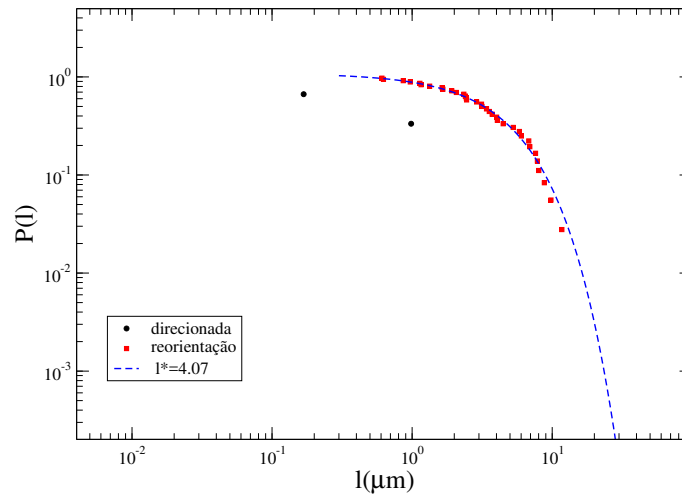
	20 <i>cel/cm</i> ²	100 <i>cel/cm</i> ²	2000 <i>cel/cm</i> ²	10000 <i>cel/cm</i> ²	Baixa Migração	Migração Alta	Varição de Forma
l^* (direc.)	1.98	1.61	1.48	1.35	-	1.56 ± 0.70	1.67 ± 0.20
l^* (reor.)	4.34	4.79	6.65	6.81	5.03 ± 0.30	4.06 ± 1.40	5.98 ± 1.68
γ	1.50	1.44	1.21	1.66	0.99 ± 0.10	1.76 ± 0.05	1.50 ± 0.08

Tabela 2.4: Valores do comprimento característico l^* obtidos nos ajustes com distribuições exponenciais para todas as densidades aqui estudadas e para grupos de células com migração alta, baixa migração e grandes variações de forma de membrana. Na segunda linha temos o comprimento característico l^* para os modos de migração direcional e na terceira linha para reorientação. Na quarta linha, tem-se o expoente γ obtido no ajuste com uma lei de potência na curva do deslocamento quadrático médio. As três últimas colunas representam uma média de cinco células para cada grupo.

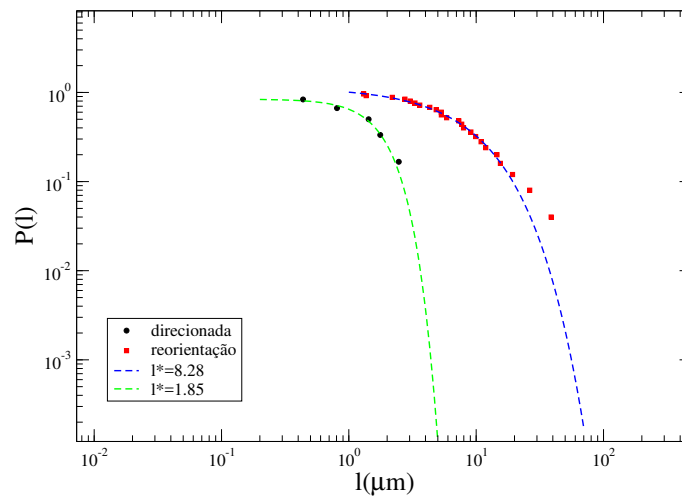
da distribuição Maxwelliana. Vale salientar que quanto maior a persistência, mais a distribuição afasta-se da Weibull.



(a)



(b)



(c)

Figura 2.22: Distribuição da densidade acumulada complementar $P(l)$ em função do tamanho dos voos l . A curva preta representa voos de migração direcional e a curva vermelha representa a reorientação, usando $\alpha^* = 30^\circ$. As curvas tracejadas são ajustes com distribuições exponenciais. (a) migração alta (b) sem grandes migrações (c) grandes variações de forma da membrana.

Capítulo 3

Membrana Plasmática

O principal objetivo deste capítulo é analisar o comportamento das flutuações da borda da membrana plasmática de células da linhagem normal Melan-A, tumoral B16F10, e do fibroblasto NIH-3T3. São determinadas grandezas como rugosidade do contorno da membrana, espectro de potência, curvatura e energia local do contorno da membrana, assim como a média das curvaturas e das energias de curvatura ao longo do tempo.

Este capítulo será dividido da seguinte forma: na seção 3.1, descrevemos a metodologia experimental de cultivo de células e na seção 3.2 a metodologia utilizada para análise dos experimentos. Na seção 3.3 serão apresentados os resultados e na seção 3.4 a discussão.

Esta parte do trabalho foi realizada em parceria com o professor Hallan Souza e Silva, da Universidade Federal de Viçosa -UFV, que colaborou com o desenvolvimento dos programas.

3.1 Metodologia Experimental

Analisamos três linhagens distintas de células em cultura. A B16F10, que é uma linhagem tumoral derivada de melanoma murino fornecida pelo departamento de farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte. A Melan-A derivada de melanócito murino fornecida pelo Instituto de Câncer do Estado de São Paulo e a NIH-3T3, uma linhagem de fibroblasto fornecida pelo Instituto de Ciências Biomédicas do Rio de Janeiro. Assim que as células atingiam a confluência elas foram repicadas, e 10^3 células foram plaqueadas ¹ em placas com fundo de vidro (ibid, μ – Dish, 35 mm de diâmetro). Após o plaqueamento as células foram mantidas a 37 °C e fluxo de 5% de CO₂. Após a adesão celular, em torno de 4 à 5 h obtivemos os vídeos utilizando o equipamento *Bio Station IMQ* (NIKON) para análise da flutuação da borda

¹A metodologia utilizada para o plaqueamento de células pode ser verificado no apêndice A.

da membrana plasmática ao longo do tempo. Este equipamento é composto por um microscópio invertido e incubador. Utilizamos uma objetiva de ampliação de 40x ($1\text{ pixel} = 0.32\ \mu\text{m}$) com abertura numérica $N.A = 0.8$ e objetiva de 80x ($1\text{ pixel} = 0.16\ \mu\text{m}$), ambas com contraste de fase. A placa de cultura de células é colocada dentro do incubador, mantendo temperatura de 37°C e fluxo de 5% de CO_2 . Com este equipamento é possível filmar vários quadros ao mesmo tempo e com aumentos diferentes. Os vídeos duravam em média 6 h, com $\Delta t = 1\text{ min}$ e resolução de 640x680 pixels. Neste trabalho, o tempo de filmagem variam de 3 à 6 horas, tempo suficiente para verificar as flutuações da borda da célula. Utilizando o programa paint do Windows e com o auxílio de "mousepen 8x6" obtivemos o contorno manualmente de cada célula ao longo do tempo. À partir do contorno digitalizado determinamos a posição (x,y) de cada pixel do contorno. De posse do perfil do contorno, determinamos grandezas como rugosidade, espectro de potências, curvatura e energia de curvatura. À seguir, faremos uma breve discussão de como obtivemos nossos resultados.



Figura 3.1: Equipamento *Bio Station IMQ*. A seta em vermelho indica a localização do porta amostra.

3.2 Metodologia utilizada para análise dos experimentos

3.2.1 Centroide

O primeiro passo para obtenção de qualquer uma das grandezas citadas anteriormente é determinar o centroide da célula. Para isto, fizemos uma média de todas as posições (pontos do contorno e pontos do interior da célula). Sendo N o número total de pontos, temos que o centroide da célula é dado por (x_{CM}, y_{CM}) ,

$$x_{CM} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i, \quad (3.1)$$

$$y_{CM} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i . \quad (3.2)$$

onde $i = 1, 2, \dots, N$. Em seguida, determinamos a posição x_i e y_i de cada ponto do contorno da membrana celular com relação ao centroide da célula. O primeiro ponto foi determinado utilizando o ponto mais externo, à esquerda do centroide (figura 3.2).

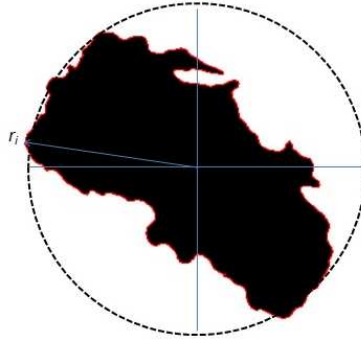


Figura 3.2: Contorno digitalizado de uma célula. r_i indica a posição inicial, representando o ponto mais externo da célula.

Calculamos a distância r_i de cada ponto da membrana com relação ao centroide da célula, de acordo com

$$r_i = \sqrt{(x_i - x_{CM})^2 + (y_i - y_{CM})^2} . \quad (3.3)$$

Nossa estimativa na incerteza da medida do centroide da célula foi de $\pm 0,08 \mu m$ para a posição x e $\pm 1,7 \mu m$ para a posição y . A incerteza com relação a um ponto r_i do contorno foi de $\pm 0,09 \mu m^2$.

Para linhagem B16F10 e Melan-A analisamos um grupo de células igual à $N = 7$, para NIH-3T3 do grupo I, $N = 6$ e do grupo II, $N = 5$.

3.2.2 Rugosidade

A rugosidade de uma interface é uma medida com relação a sua altura média, que em uma rede discreta com L sítios pode ser escrita como

$$\bar{h}(t) = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L h(i, t) , \quad (3.4)$$

onde $h(i, t)$ é a altura da coluna i em um tempo t , e a soma é feita sobre todos os sítios da rede. A rugosidade da interface pode ser interpretada como sendo o desvio quadrático médio

²As incertezas (desvio médio) foram calculadas considerando o contorno manual de um grupo amostral de cinco pessoas.

das alturas [37], dada por

$$W(L, t) = \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{i=1}^L (h(i, t) - \bar{h}(t))^2}. \quad (3.5)$$

Para um melhor entendimento sobre o processo de rugosidade vamos partir de uma superfície lisa (linha reta), onde temos altura nula. A medida que as partículas vão aderindo a superfície, aumenta-se a quantidade de alturas acessíveis e conseqüentemente as flutuações em torno da média, resultando em uma interface cada vez mais rugosa.

Neste trabalho, calculamos a rugosidade da borda da membrana plasmática de cada célula da seguinte forma

$$W_N(N, t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N W_i(\varepsilon, t), \quad (3.6)$$

com rugosidade local $W_i(\varepsilon, t)$ definida como

$$W_i(\varepsilon, t) = \sqrt{\frac{1}{2\varepsilon + 1} \sum_{j=i-\varepsilon}^{i+\varepsilon} [r_j(t) - \bar{r}_i(t)]^2}, \quad (3.7)$$

em que $r_j(t)$ é a distância do ponto j ao centroide, j varia de $(i - \varepsilon)$ à $(i + \varepsilon)$, sendo ε a largura da janela, e $\bar{r}_i(t)$ representa a distância média ao centroide na janela de tamanho $2\varepsilon + 1$ centrada no sítio i .

Se for auto-afim a rugosidade dos contornos das células obedece a seguinte lei de potência

$$W(\varepsilon, t) \sim \varepsilon^H, \quad (3.8)$$

onde H é o expoente de Hurst [6, 38, 39].

O expoente de Hurst pode ser obtido através da inclinação da parte linear do gráfico log-log da rugosidade e pode ser interpretado de acordo com [6, 38, 39, 40, 41]:

- Para $H = \frac{1}{2}$, não há correlação entre as alturas, elas são aleatórias, o movimento é do tipo Browniano;
- para $\frac{1}{2} < H < 1$, a correlação é de longo alcance e persistente, ou seja, as alturas tem uma tendência definida. Alturas maiores tendem a seguir as alturas maiores e as alturas menores tendem a seguir as alturas menores. Neste caso a correlação entre as alturas é positiva;
- Para $0 \leq H < \frac{1}{2}$, as correlações são anti-persistentes, ou seja, as alturas maiores tendem a seguir as alturas menores e vice-versa, assim a correlação entre as alturas é negativa;

- Para $H > 1$ existem correlações, mas elas não decaem seguindo uma lei de potência.

Quanto maior for o valor de H , mais suave é a rugosidade. Os casos $\frac{1}{2} < H < 1$ e $0 \leq H < \frac{1}{2}$, onde os eventos passados interferem nos eventos futuros são chamados de movimento Browniano fracionário.

Movimento Browniano e Movimento Browniano Fracionário

Sabe-se que movimento Browniano é o nome de um processo estocástico contínuo no tempo (seção 2.1) e que faz parte de uma classe de processos denominados de processos gaussianos. Assim,

$$F[A(t_2) - A(t_1)]^2 = \sigma^2 |t_2 - t_1|, \quad (3.9)$$

onde F denota uma média. A equação 3.10 indica que a variância dos incrementos de um movimento Browniano é proporcional à própria magnitude do deslocamento.

Para o caso de um movimento do tipo Browniano fracionário a equação 3.10 é generalizada para

$$F[A_H(t_2) - A_H(t_1)]^2 = \sigma^2 |t_2 - t_1|^{2H}, 0 < H < 1, \quad (3.10)$$

desta forma, a variância dos incrementos não precisa ser uma função linear do tempo, para os casos em que $H \neq \frac{1}{2}$ como ocorre no movimento Browniano.

Segundo [42] uma das principais características do movimento Browniano fracionário é que a “extensão de interdependência” entre seus incrementos é infinita, ou seja, mesmo amostragens distintas entre si exibem uma interdependência.

Para mais detalhes sobre essa seção consulte a referência [42].

3.2.3 Espectro de Potência

O espectro de potência é dado pelo módulo da transformada de Fourier ao quadrado, $|\tilde{r}|^2$. Para calcularmos a transformada de Fourier das flutuações da membrana plasmática utilizamos a transformada de Fourier discreta

$$\tilde{r}(q) = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} r_k e^{\frac{2\pi i q k}{N}}, \quad (3.11)$$

onde N representa o número total de pixels do contorno da membrana e q é a frequência angular, $q = 0, 1, 2, \dots, N - 1$.

Sabemos que uma série temporal é representada pela soma de funções harmônicas (seno e cosseno) com frequências e amplitudes diferentes. Para o caso de uma onda senoidal periódica

simples ela é representada por uma única componente (função), o que corresponde a um único pico no espectro de potências. Porém, se a série temporal possui várias periodicidades, ela terá vários picos. Se não houver nenhuma periodicidade, o espectro de potência é uma linha, e temos um ruído branco [39].

O espectro de potência para séries temporais fractais, possui ruído $\frac{1}{f^\alpha}$, pois a potência de cada componente da frequência é inversamente proporcional a uma potência α da frequência (α varia de 0 à 3) [39].

Através do espectro de potência ou análise de Fourier podemos investigar se uma série temporal é um ruído ou um movimento. Para isto, devemos primeiramente determinar o coeficiente α através da inclinação da parte linear do gráfico log-log do espectro de potência, e em seguida verificar em que tipo de movimento ou ruído, α se enquadra. Para isto, temos que [39]:

- Se $\alpha = 0$, $\frac{1}{f^\alpha} = 1$, tem-se um ruído branco;
- se $\alpha = 2$, a potência decai proporcionalmente ao quadrado da frequência, o movimento é do tipo Browniano;
- se $-1 < \alpha < 1$, tem-se um ruído gaussiano fracionário. Neste caso, pode-se relacionar os expoentes H e α da seguinte forma: $\alpha = 2H - 1$;
- se $1 < \alpha < 3$, tem-se um movimento Browniano fracionário. Para este caso, também há uma relação entre os expoentes H e α , dada por: $\alpha = 2H + 1$.

3.2.4 Curvatura

Determinamos a curvatura de cada ponto do contorno utilizando a metodologia de Lewiner e colaboradores [43, 44].

Vamos considerar uma curva paramétrica regular. Uma curva paramétrica no plano é uma função $r: I \subset \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^2$, $r[x(t), y(t)]$, onde x e y são funções de $t \in I \subset \mathbb{R}$. Na figura 3.3 podemos observar a curvatura local para alguns pontos de uma dada curva.

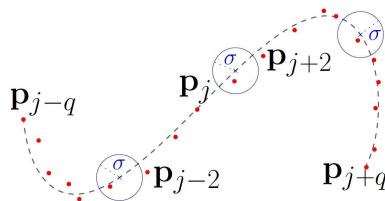


Figura 3.3: Representação da curvatura local determinada através do melhor círculo, onde σ é o raio do melhor círculo [43].

Na figura 3.4, o comprimento de arco i do ponto $r(t)$, com $(t \in I)$, é definido por

$$i(t) = \int_{t_0}^t \|\dot{r}(t)\| dt . \quad (3.12)$$

A curva pode ser parametrizada pelo comprimento de arco se considerarmos $r(i) = r \circ t(i)$. Denotamos a derivada com relação ao comprimento de arco i como r' , e a derivada com relação à t por \dot{r} .

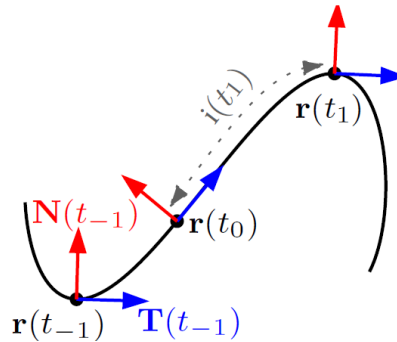


Figura 3.4: O comprimento de arco $i(t)$ é definido pelos vetores tangente $T(t)$ e pelo vetor normal $N(t)$ [43].

Chamamos o vetor $T(i)$ de vetor tangente, onde $T(i) = r'(i)$, e $N(i)$ de vetor normal. $N(i)$ é diretamente ortogonal ao vetor tangente, assim $N(i) = (-y'(i), x'(i))$. Os vetores $T'(i)$ e $N(i)$ são colineares, ou seja, há uma função $\kappa(i)$, tal que $T'(i) = \kappa(i) \cdot N(i)$, que é a curvatura da curva em um ponto $r(i)$.

Quando a curvatura não é parametrizada pelo comprimento de arco, a curvatura é dada por

$$\kappa(i) = \frac{\dot{x}(t)\ddot{y}(t) - \dot{y}(t)\ddot{x}(t)}{(\dot{x}^2(t) + \dot{y}^2(t))^{\frac{3}{2}}} . \quad (3.13)$$

O valor absoluto da curvatura pode também ser definido geometricamente por

$$|\kappa(i)| = \frac{1}{\rho(i)} , \quad (3.14)$$

onde $\rho(i)$ é o raio da circunferência que melhor se ajusta ao ponto i onde queremos calcular a curvatura (figura 3.5). Os sinais de $\kappa(i)$ indicam se a curvatura é côncava ou convexa. Se $\kappa = \frac{1}{\rho} < 0$, a curvatura é côncava. Se a curvatura $\kappa = \frac{1}{\rho} > 0$, a curvatura é convexa. E se $\kappa(i) = 0$, $\rho(i) \rightarrow \infty$, a curvatura descrita será plana na direção definida por ρ .

A curvatura corresponde a variação da direção tangencial θ com relação ao comprimento de arco i

$$\kappa(i) = \frac{d\theta(i)}{di} , \quad (3.15)$$

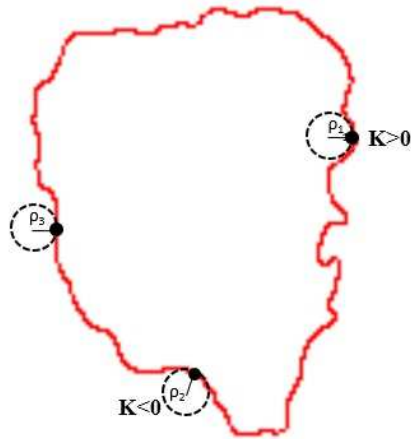


Figura 3.5: Contorno digitalizado de uma célula. $\rho(i)$ é o raio da circunferência que melhor se ajusta ao ponto i onde queremos calcular a curvatura. Se a curvatura $\kappa = \frac{1}{\rho_1} > 0$, a curvatura é convexa. Se $\kappa = \frac{1}{\rho_2} < 0$, a curvatura é côncava. E se $\kappa = 0$, $\rho_3 \rightarrow \infty$.

onde $\theta'(i) = \angle(T(i), (1, 0))$, ou seja, é o ângulo do vetor tangente com uma direção fixa.

Seguindo estas definições, calculamos a curvatura local das células através de 3.14. Fizemos alguns testes do controle das análises. Um dos testes foi aplicado na figura 3.6. Considerando uma janela de $2q + 1$ ($q = 5$) pontos centrados em torno de p_i (comprimento de arco), observamos que as regiões 1 e 2, que correspondem as orelhas do gato, apresentam os maiores valores de curvatura, indicando regiões convexas. Regiões como 7, 8, 9 e 10 apresentam curvatura nula, e regiões como 3, 4, 5 e 6 apresentam curvaturas negativas, ou seja, regiões côncavas (3.7(a)). Outro teste foi realizado com um círculo de raio igual à 664 pixels, ou seja, curvatura média em torno de 0,0015. Porém, como não conseguimos fazer um círculo perfeito, algumas regiões apresentam curvatura nula, com isso, a curvatura média fica em torno de 0,0013 (figura 3.7(b)).

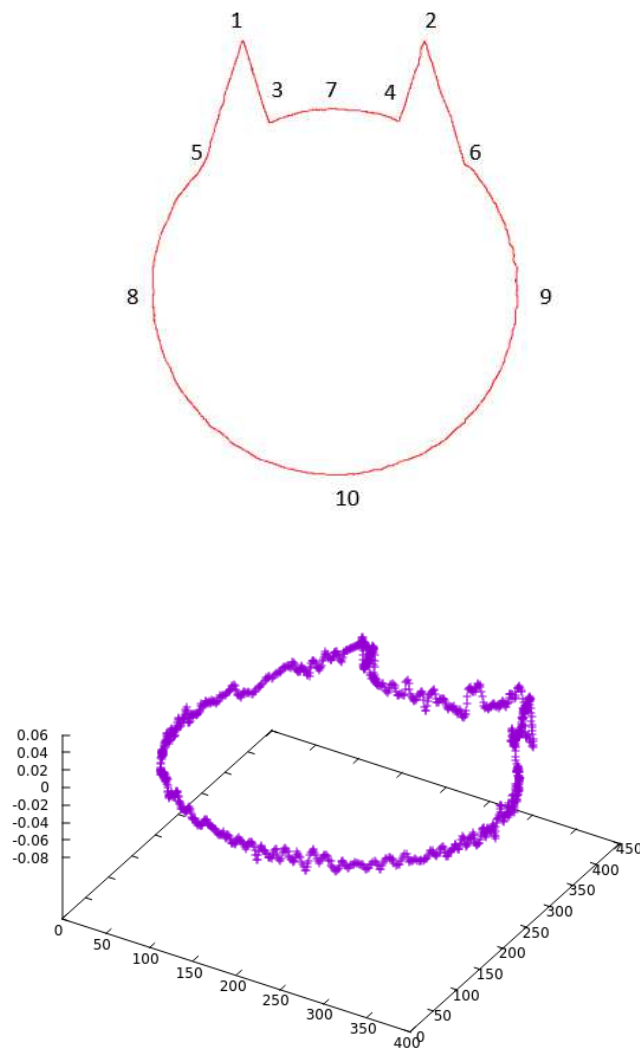


Figura 3.6: (a) Contorno digitalizado de um gato. As regiões 1 e 2 são as que apresentam maior curvatura, regiões convexas; regiões do tipo 3, 4, 5 e 6 apresentam curvaturas negativas, ou seja, regiões côncavas e regiões do tipo 7, 8, 9 e 10 apresentam alguns pontos com curvatura local igual à zero. (b) Gráfico representando as curvaturas da figura (a).

3.2.5 Energia de Curvatura

A energia de curvatura de um objeto dá a energia armazenada em sua forma [45]. Neste trabalho, determinamos a energia de curvatura armazenada na borda da membrana das células.

Através da teoria de elasticidade podemos mostrar que a energia de curvatura é diretamente proporcional a energia de curvatura de uma haste deformada [46]. Em um dado ponto i , tem-se

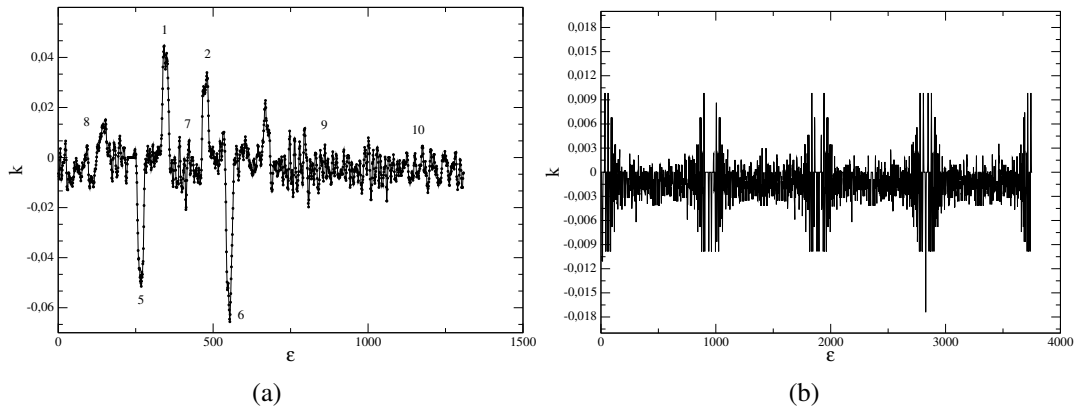


Figura 3.7: Curvatura local, considerando uma janela de tamanho $2q + 1$ ($q = 5$) em torno de cada pixel do contorno: (a) referente ao gato da figura 3.6; e (b) referente a um círculo de raio igual à 664 pixels.

a seguinte energia de curvatura

$$u = \frac{1}{2} Y(i) I_y(i) \kappa^2(i) . \quad (3.16)$$

onde $Y(i)$ é o módulo de Young no ponto i , $I_y(i)$ é o momento de inércia no ponto i e $\kappa(i)$ é a curvatura no ponto i .

Considerando uma haste de comprimento L , sua energia total é dada por

$$U = \frac{1}{2} \int_0^L Y(i) I_y(i) \kappa^2(i) di . \quad (3.17)$$

Se a haste for linear, $Y(i) = Y_0$. Se a haste for uma casca fina, $I_y(i) = I_0$. Assim,

$$U = \frac{1}{2} Y_0 I_0 \int_0^L \kappa^2(i) di . \quad (3.18)$$

Normalizando a equação 3.18, com $E = \frac{U}{\frac{1}{2} Y_0 I_0}$, temos que

$$E = \int_0^L |\kappa(i)|^2 di . \quad (3.19)$$

Normalizando a equação 3.19 para o comprimento total do perímetro de um contorno, encontramos uma média da energia de curvatura por unidade de comprimento

$$E = \frac{1}{N} \int_0^L |\kappa(i)|^2 di . \quad (3.20)$$

onde N seria o número total de pontos do contorno.

Para determinarmos a energia de curvatura do contorno da membrana utilizamos

$$E = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} |\kappa(n)|^2. \quad (3.21)$$

Desta forma, para cada tempo tem-se uma energia de curvatura.

3.3 Resultados

As figuras 3.8, 3.9, 3.10 e 3.11 apresentam, respectivamente, as imagens de uma única célula em um tempo t para as linhagens B16F10, Melan-A e NIH-3T3 com forma mais arredondada (grupo 1) e com forma indefinida (grupo 2). Em (a) tem-se a imagem da célula em cultura, (b) o contorno digitalizado da membrana plasmática e em (c) o gráfico da distância de cada ponto do contorno com relação ao centroide em função do comprimento de arco ao longo do contorno.

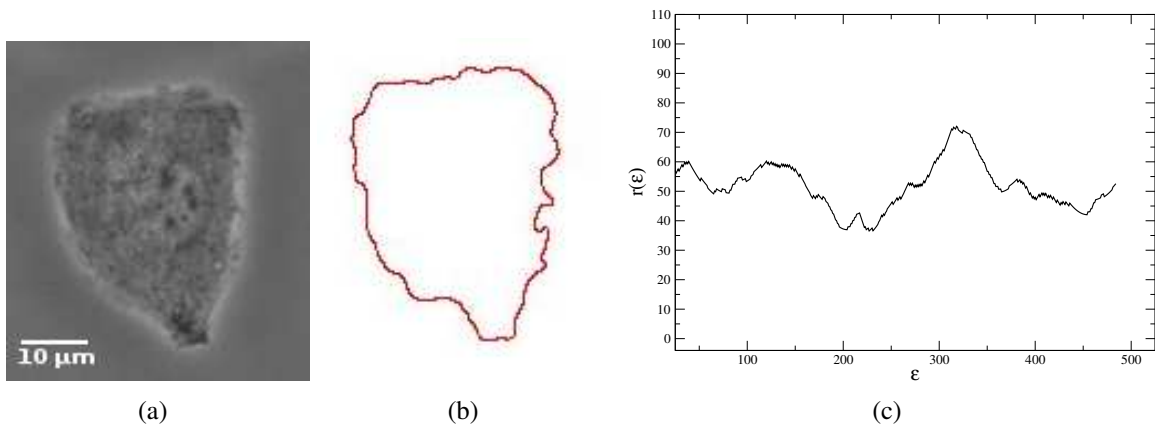


Figura 3.8: (a) célula B16F10 em cultura; (b) contorno digitalizado da membrana dessa célula e (c) gráfico da distância de cada ponto desse contorno com relação ao centróide em função do comprimento de arco ao longo do contorno.

A rugosidade da interface de uma única célula e a evolução do expoente de Hurst ao longo do tempo, para as linhagens B16F10, Melan-A e NIH-3T3 grupo 1 e grupo 2, podem ser observadas nas figuras 3.12, 3.13, 3.14 e 3.15. Na tabela 3.1, temos a média do expoente Hurst para cada linhagem. Independentemente da linhagem celular, o valor médio do expoente de Hurst se enquadra na condição $\frac{1}{2} < H < 1$, indicando que a correlação é de longo alcance e persistente, e o movimento é do tipo Browniano fracionário. Porém, as células que apresentam rugosidade da interface da membrana mais suave são as células da linhagem Melan-A.

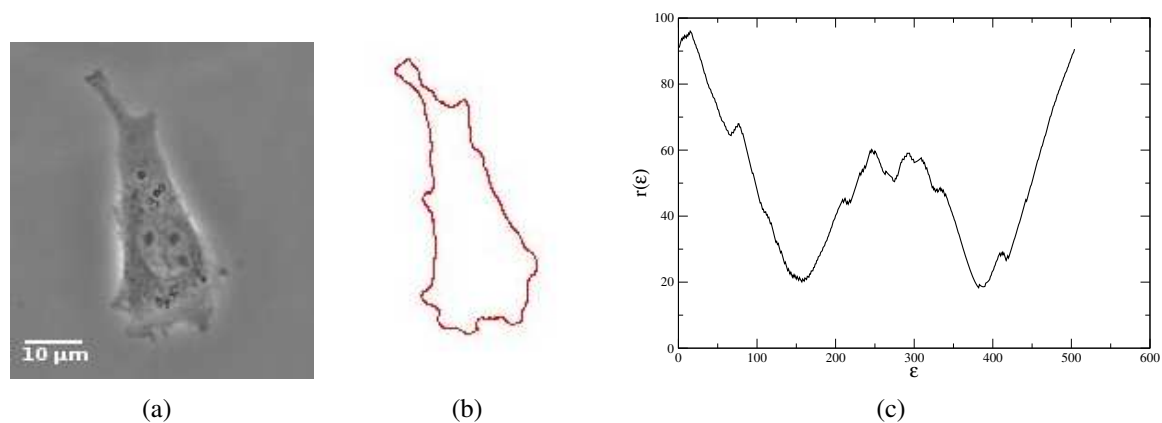


Figura 3.9: (a) célula Melan-A em cultura; (b) contorno digitalizado da membrana dessa célula e (c) gráfico da distância de cada ponto desse contorno com relação ao centroide em função do comprimento de arco ao longo do contorno.

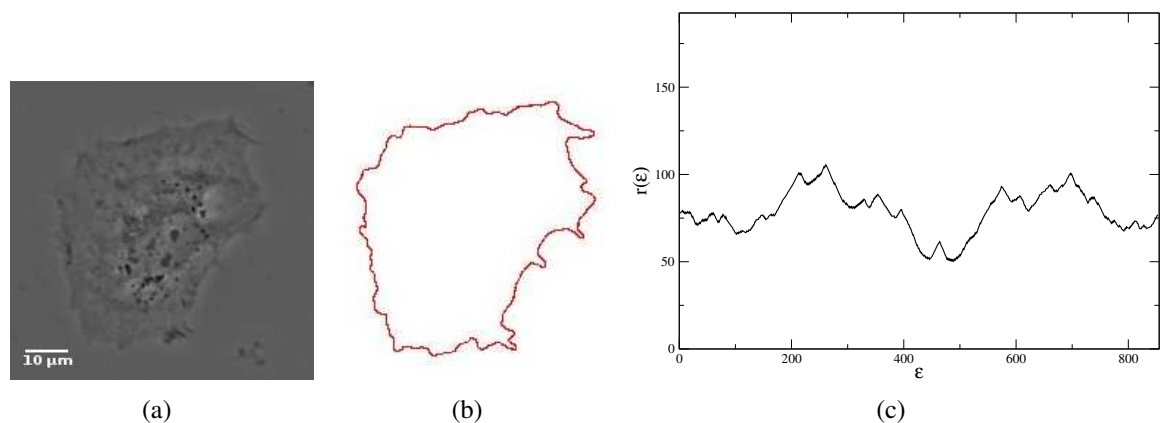


Figura 3.10: (a) célula NIH-3T3 em cultura, referente ao grupo 1; (b) contorno digitalizado da membrana dessa célula e (c) gráfico da distância de cada ponto desse contorno com relação ao centroide em função do comprimento de arco ao longo do contorno.

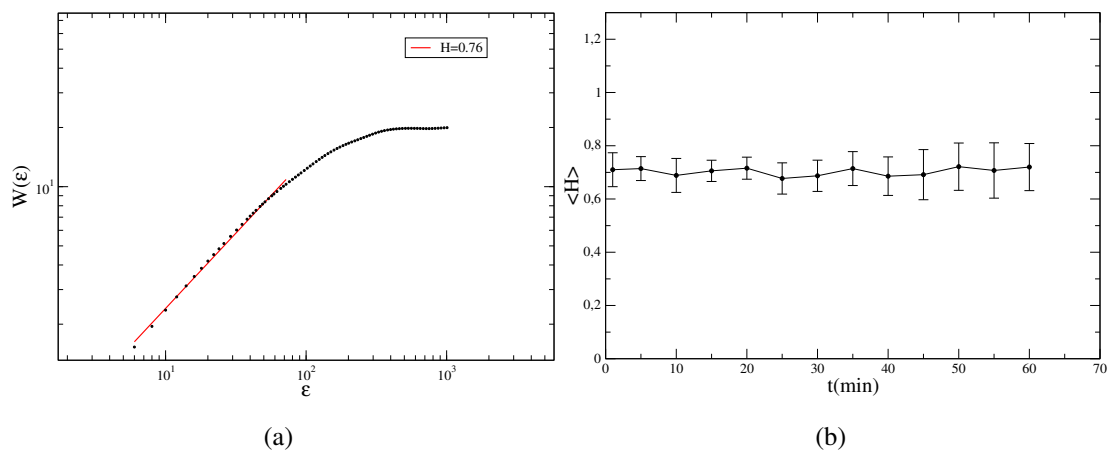


Figura 3.12: (a) Gráfico log-log da rugosidade do contorno da membrana em função da escala ϵ de uma célula da linhagem B16F10; (b) evolução da média do expoente de Hurst ao longo do tempo.

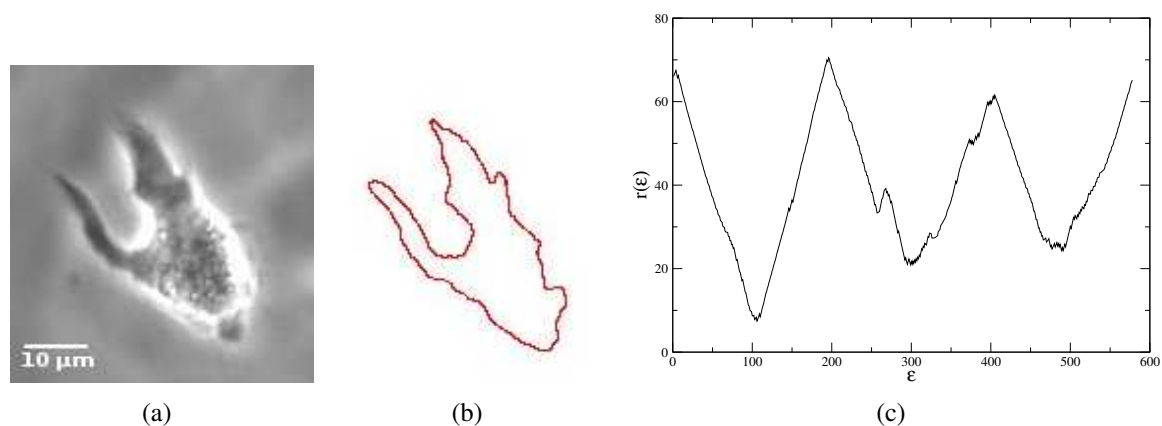


Figura 3.11: (a) célula NIH-3T3 em cultura, referente ao grupo 2; (b) contorno digitalizado da membrana dessa célula e (c) gráfico da distância de cada ponto desse contorno com relação ao centroide em função do comprimento de arco ao longo do contorno.

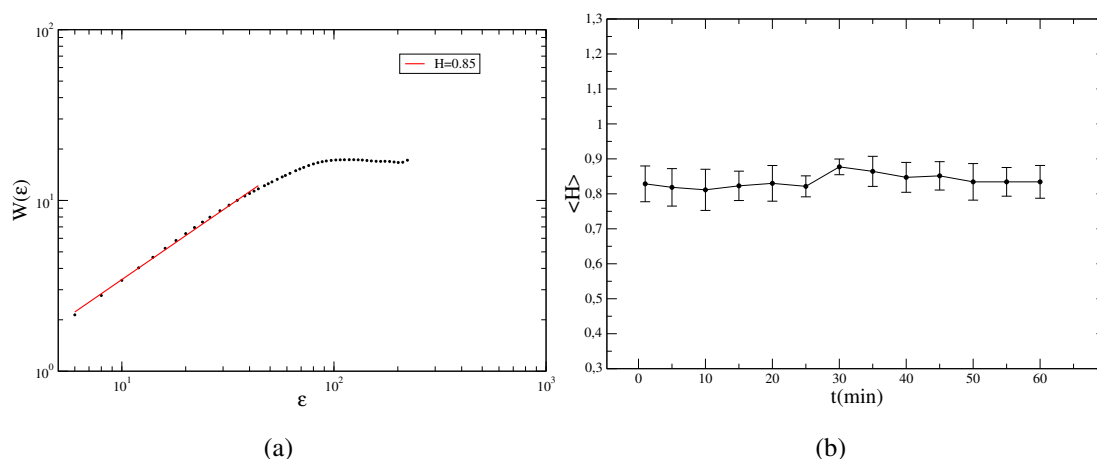


Figura 3.13: (a) Gráfico log-log da rugosidade do contorno da membrana em função da escala ϵ de uma célula da linhagem Melan-A; (b) evolução da média do expoente de Hurst ao longo do tempo.

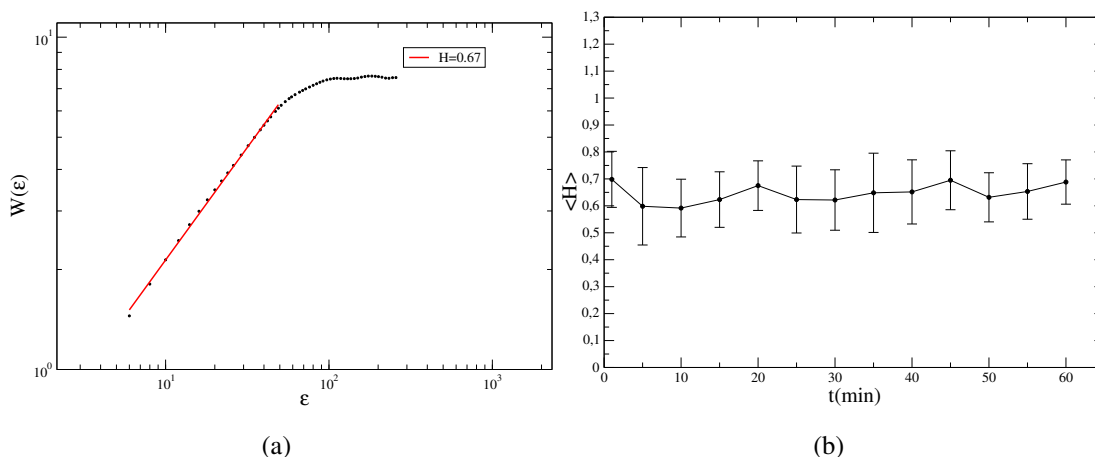


Figura 3.14: (a) Gráfico log-log da rugosidade do contorno da membrana em função da escala ε de uma célula da linhagem NIH-3T3 referente ao grupo 1, ou seja, células com forma mais arredondada; (b) evolução da média do expoente de Hurst ao longo do tempo.

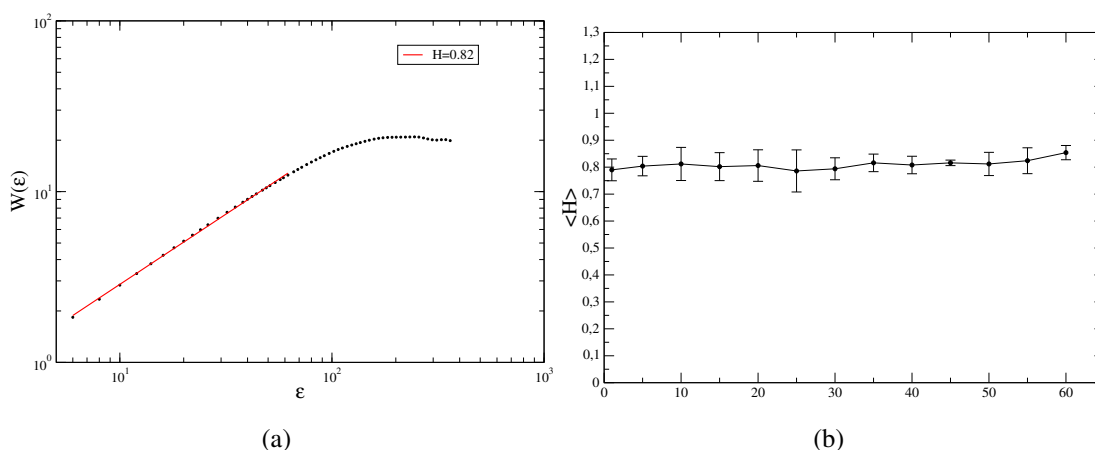


Figura 3.15: (a) Gráfico log-log da rugosidade do contorno da membrana em função da escala ε de uma célula da linhagem NIH-3T3 referente ao grupo 2, ou seja, células com formas indefinidas; (b) evolução da média do expoente de Hurst ao longo do tempo.

Linhagem Celular	$\langle H \rangle$	$\langle \alpha \rangle$
B16F10	$0,72 \pm 0,02$	$2,90 \pm 0,20$
Melan-A	$0,85 \pm 0,02$	$3,54 \pm 0,20$
NIH-3T3 Grupo 1	$0,71 \pm 0,03$	$3,05 \pm 0,10$
NIH-3T3 Grupo 2	$0,80 \pm 0,03$	$3,29 \pm 0,06$

Tabela 3.1: Média dos expoentes de Hurst e do expoente α para o espectro de potência do perfil da borda da membrana. O erro das medidas foi calculado utilizando o desvio padrão.

Nas figuras 3.16, 3.17, 3.18 e 3.19 são mostrados os gráficos do espectro de potência em um dado tempo t para uma única célula e a evolução da média do expoente α ao longo do tempo

para as linhagens B16F10, Melan-A, NIH-3T3 referentes aos grupos 1 e grupo 2. De acordo com a tabela 3.1, verificamos que as linhagens B16F10 e NIH-3T3 grupo 1 apresentam um expoente α médio que se enquadra no intervalo $1 < \alpha < 3$ indicando que a série temporal é um movimento Browniano fracionário. Já as células Melan-A e a NIH-3T3 grupo 2, apresentam um expoente $\alpha > 3$.

O erro com relação as medidas dos expoentes de Hurst e o expoente α (tabela 3.1) foram determinados utilizando o erro médio. Realizamos uma média dos expoentes para cada tempo, considerando um grupo de N células. Para linhagem B16F10, $N = 7$; Melan-A, $N = 7$; NIH-3T3 grupo 1, $N = 6$ e NIH-3T3 grupo 2, $N = 5$. Em seguida fizemos uma média desses expoentes para cada linhagem e calculamos o erro médio.

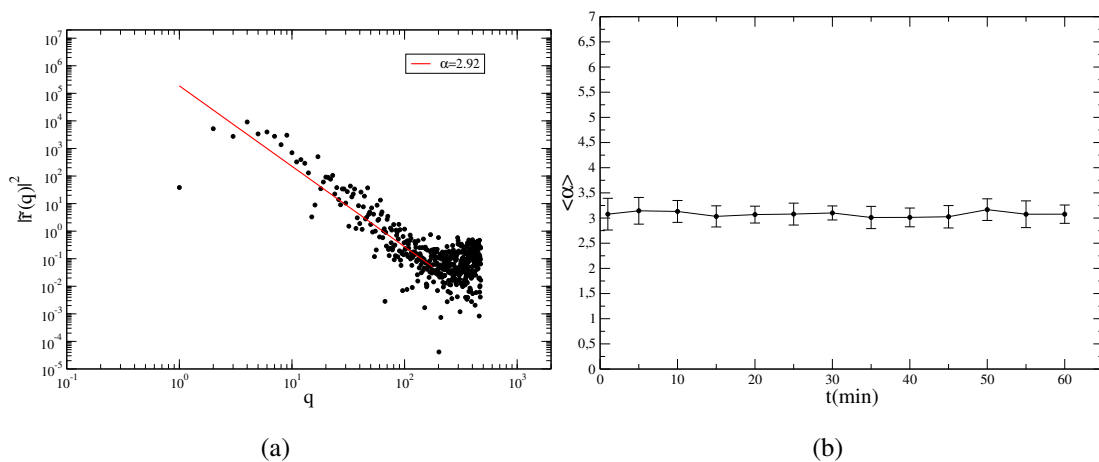


Figura 3.16: (a) Gráfico log-log do espectro de potência para o perfil do contorno da membrana em função da frequência angular q , referente à linhagem B16F10; (b) evolução da média do expoente α ao longo do tempo.

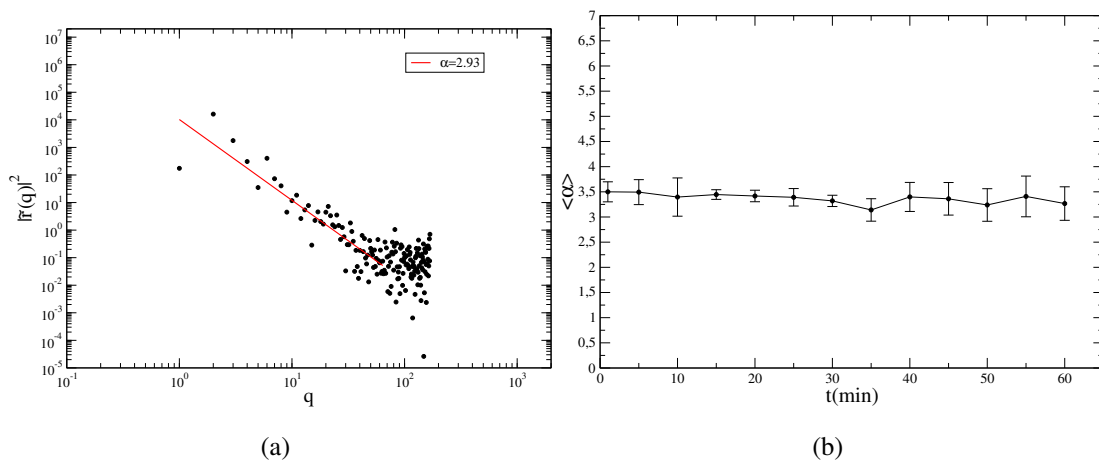


Figura 3.17: (a) Gráfico log-log do espectro de potência para o perfil do contorno da membrana em função da frequência angular q , referente à linhagem Melan-A; (b) evolução da média do expoente α ao longo do tempo.

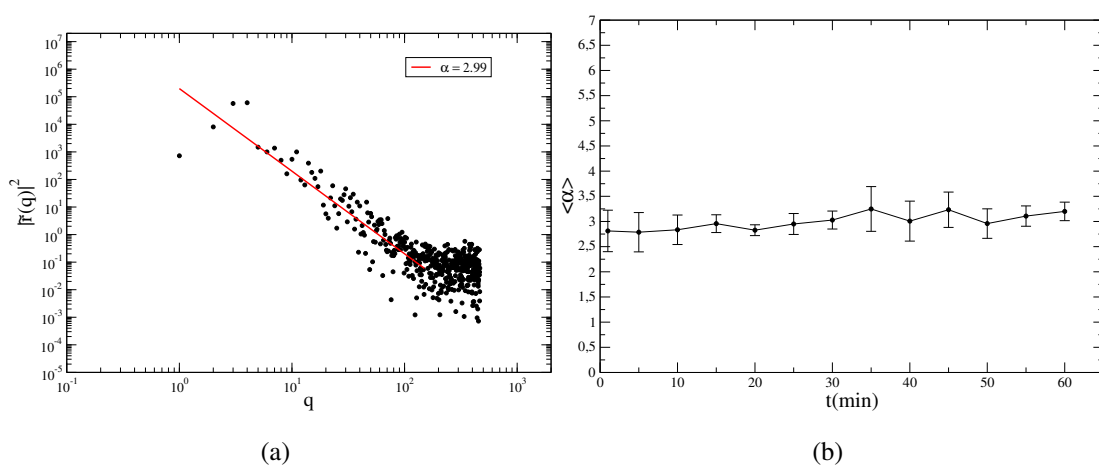


Figura 3.18: (a) Gráfico log-log do espectro de potência para o perfil do contorno da membrana em função da frequência angular q , referente à linhagem NIH-3T3 referente ao grupo 1, ou seja, células com forma mais arredondada; (b) evolução da média do expoente α ao longo do tempo.

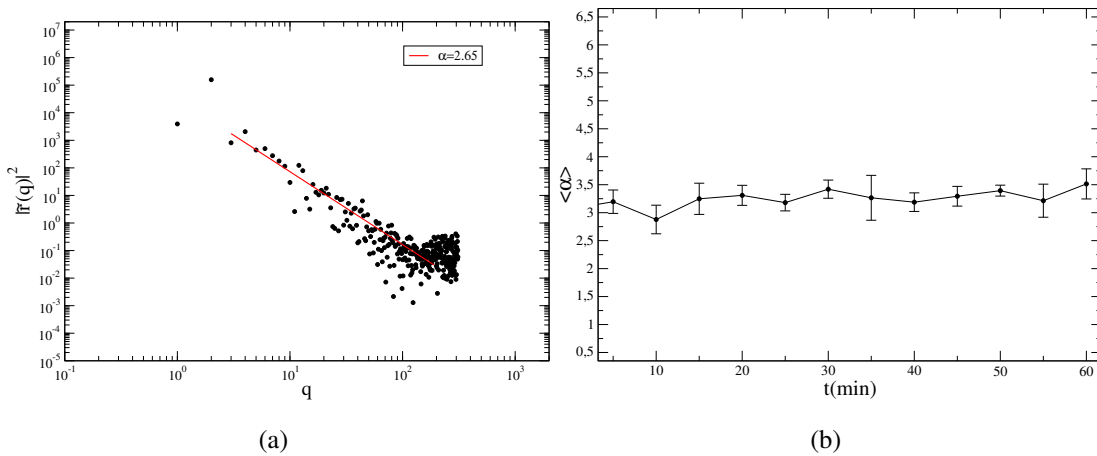


Figura 3.19: (a) Gráfico log-log do espectro de potência para o perfil do contorno da membrana em função da frequência angular q , referente à linhagem NIH-3T3 referente ao grupo 2, ou seja, células com formas indefinidas; (b) evolução da média do expoente α ao longo do tempo.

As curvaturas das células foram determinadas. Nas figuras 3.20, 3.21, 3.22 e 3.23 são apresentados para cada linhagem o cimógrafo de uma única célula, a média do módulo das curvaturas locais da membrana de uma única célula em função do tempo, energia de curvatura da membrana em função do tempo para uma única célula e as respectivas imagens das células em cultura para um tempo t . Nos cimógrafos, o eixo y à esquerda indica as regiões onde a curvatura é positiva (regiões convexas) e negativa (regiões côncavas). A escala de cores corresponde a frequência em que as curvaturas se repetem, tons mais claros significa que a curvatura local se repete com muita frequência e tons mais escuros com pouca frequência.

A célula B16F10 referente a figura 3.20, varia muito sua conformação ao longo do tempo, esta variação de forma pode ser verificada nas figuras 3.20(d) ($t = 25 \text{ min}$) e 3.20(e) ($t = 180 \text{ min}$). Analisando o vídeo 1 (material suplementar), observamos que ocorreu migração ao longo do tempo. O valor médio do módulo da curvatura local é dado por $(0,373 \pm 0,020) \mu\text{m}^{-1}$. A média é representada pela linha vermelha pontilhada na figura 3.20(b). No cimógrafo figura 3.20(a), verificamos que a célula apresenta mais regiões côncavas (curvatura negativa) do que convexas (curvatura positiva). As curvaturas mais frequentes (cor alaranjada) estão em torno de 15 à 45 min , onde a forma da célula é mais arredonda (3.20(d)). Neste intervalo de tempo a curvatura local fica em torno de 0 à $-0,2$, indicando que a região é mais côncava do que convexa. A energia de curvatura da membrana em função do tempo (figura 3.20(c)) apresenta um comportamento oscilatório, e o valor médio da energia de curvatura, indicado pela linha pontilhada em vermelho, é $\langle E \rangle = (0,0350 \pm 0,0080) \mu\text{m}^{-2}$.

A célula Melan-A referente a figura 3.21, varia muito sua conformação ao longo do tempo. Inicialmente sua forma é tipo tubo (3.21(d)), por alguns minutos sua forma fica mais arredondada (3.21(e)) e volta a forma tipo tubo (3.21(f)). Neste caso, ocorreu migração devido a

variação de forma ao longo do tempo, ou seja, não ocorreu grandes deslocamentos, mas muitas protusões de lamelipódios devido à variação de forma. Observando o vídeo 2 (material suplementar), verificamos que as protusões de lamelipódios são aleatórias. No cimógrafo (figura 3.21(a)) observamos que a célula apresenta mais regiões côncavas (curvatura negativa) do que regiões convexas (curvatura positiva). As curvaturas que aparecem com maior frequência são em torno de $-0,1 < k < 0$, que correspondem aos tempos de 140 à 170 *min*. Neste intervalo de tempo a célula apresenta uma forma mais arredonda. O valor médio do módulo da curvatura local é dado por $(0,212 \pm 0,020)\mu m^{-1}$. A energia de curvatura da membrana em função do tempo (figura 3.21(c)) apresenta um comportamento praticamente constante e seu valor médio é $\langle E \rangle = (0,0098 \pm 0,0020)\mu m^{-2}$. As médias são representadas pelas linhas pontilhadas vermelha nas figuras 3.20(b) e 3.20(c).

A célula NIH grupo 1 (forma mais arredondada) referente a figura 3.22, não varia muito sua conformação ao longo do tempo, mantendo-se mais arredondada. Observando o vídeo 3 (material suplementar), verificamos que à variação de forma se dá devido às protusões dos lamelipódios, somente para pequenos intervalos de tempo. No cimógrafo (figura 3.22(a)) observamos que a célula apresenta mais regiões côncavas (curvatura negativa) do que regiões convexas (curvatura positiva). As curvaturas que aparecem com maior frequência estão em torno de $t = 169 \text{ min}$ à $t = 182 \text{ min}$, onde a célula permanece com a forma mais arredondada (3.22(e)), não apresentando grandes protusões de lamelipódios. O valor médio do módulo da curvatura local é $(0,186 \pm 0,040)\mu m^{-1}$. A energia de curvatura da membrana em função do tempo (figura 3.22(c)) apresenta um comportamento praticamente constante e seu valor médio é $\langle E \rangle = (0,0089 \pm 0,0020)\mu m^{-2}$. As médias são representadas pelas linhas pontilhadas vermelha nas figuras 3.22(b) e 3.22(c).

A célula NIH grupo 2 (forma indefinida) referente a figura 3.23, varia muito sua conformação ao longo do tempo. De acordo com o vídeo, ocorreu migração, e muita variação de forma e os estiramentos de lamelipódios são aleatórios. No cimógrafo (figura 3.23(a)) observamos que a célula apresenta mais regiões côncavas (curvatura negativa) do que regiões convexas (curvatura positiva). As curvaturas mais frequentes estão em torno $-0,12 < k < 0$. No intervalo de $t = 75$ à $t = 115 \text{ min}$ a célula possui forma arredondada (3.23(e)), é neste intervalo que as curvaturas locais aparecem com maior frequência. O valor médio do módulo da curvatura local é $(0,189 \pm 0,030)\mu m^{-1}$. A energia de curvatura da membrana em função do tempo (figura 3.23(c)) se mantém praticamente constante até $t \sim 60 \text{ min}$. Depois ela apresenta uma queda e se mantém constante até $t \sim 115 \text{ min}$. Em seguida, a média apresenta um aumento e oscila até $t = 200 \text{ min}$. Seu valor médio é $\langle E \rangle = (0,0125 \pm 0,0040)\mu m^{-2}$. As médias são representadas pelas linhas pontilhadas vermelha nas figuras 3.23(b) e 3.23(c).

Na tabela 3.2 temos o valor médio do módulo da curvatura $\langle |k| \rangle$ e da média da energia de curvatura $\langle E \rangle$ para um grupo de células de cada linhagem aqui estudada. Para isto, calculamos a média do módulo das curvaturas locais de cada célula, e em seguida calculamos a média de todas

as células. O mesmo procedimento foi utilizado para calcular a média da energia. Os resultados podem ser verificados na tabela 3.2. Comparando a média do módulo da curvatura $\langle |k| \rangle$ entre

Linhagem Celular	$\langle k \rangle (\mu m^{-1})$	$\langle E \rangle (\mu m^{-2})$
B16F10	$0,264 \pm 0,100$	$0,0153 \pm 0,0100$
Melan-A	$0,185 \pm 0,020$	$0,0104 \pm 0,0010$
NIH-3T3 Grupo 1	$0,220 \pm 0,020$	$0,0096 \pm 0,0010$
NIH-3T3 Grupo 2	$0,204 \pm 0,010$	$0,0585 \pm 0,0030$

Tabela 3.2: Média do módulo das curvaturas ao longo do tempo ($t = 60 \text{ min}$) e média da energia de curvatura ao longo do tempo para um grupo de N células. Para linhagem B16F10, $N = 7$; Melan-A, $N = 7$; NIH-3T3 grupo 1, $N = 6$ e NIH-3T3 grupo 2, $N = 5$. O erro das medidas foi calculado utilizando o desvio padrão.

as linhagens B16F10 e Melan-A, verifica-se que não há diferenças entre as curvaturas, e que a média da energia de curvatura $\langle E \rangle$ é maior para B16F10 indicando que elas armazenam mais energia em sua forma (borda) do que as células Melan-A. Quanto a linhagem NIH-3T3 grupo 1 e grupo 2 possuem basicamente a mesma $\langle |k| \rangle$, porém $\langle E \rangle$ varia, indicando que a energia armazenada nas formas (bordas) das células do grupo 2, que correspondem a formas indefinidas, são maiores que a energia armazenada no grupo 1, que possuem formas mais arredondas.

Com o objetivo de verificarmos a relação entre o processo de variação de forma e migração celular, escolhemos algumas células da linhagem B16F10 e, observando vídeos da célula em cultura e seu deslocamento quadrático médio, analisamos individualmente células com muita variação de forma, baixa migração e alta migração. Independente da quantidade de células por centímetro quadrado verificamos que:

- Para um grupo de $N = 13$ células com alta migração, 100% apresentam muita variação de forma;
- Para um grupo de $N = 13$ células com baixa migração, 69,2% apresentam pouca variação de forma;
- Para um grupo de $N = 5$ células com muita variação de forma, 80% apresentam mais variação de forma do que alta migração.

Na figura 3.24(a) temos o gráfico do deslocamento quadrático médio em função do tempo para uma célula com muita variação de forma enquanto que a figura 3.24(d) representa uma célula com pouca variação de forma. Observamos que a célula que possui muita variação de forma ao longo do tempo apresenta um coeficiente de difusão do tipo anômalo e superdifusivo ($\gamma = 1.69$). Já a célula com pouca variação de forma apresenta um comportamento indo de um regime de difusão anômalo para normal ($\gamma = 0.87$). Analisamos ainda a rugosidade ao longo do tempo para células individuais com muita variação de forma e alta migração e com pouca variação de forma e baixa migração, figura 3.25. Verificamos que a média do coeficiente

de Hurst ao longo do tempo para células com alta migração e variação de forma, $\langle H \rangle = 0,82 \pm 0,05$, é maior do que para células com pouca variação de forma e baixa migração, $\langle H \rangle = 0,66 \pm 0,04$.

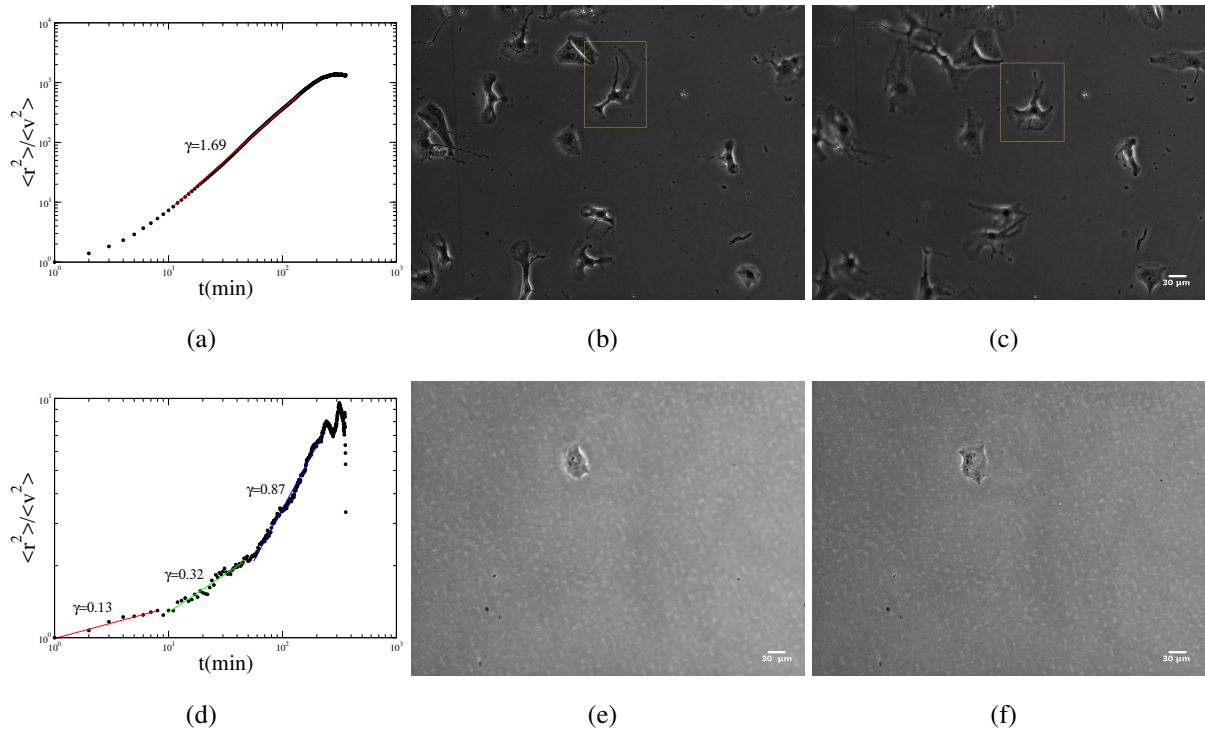


Figura 3.24: (a) Razão entre o deslocamento quadrático médio e velocidade média ao quadrado em função do tempo para uma única célula, referente a linhagem B16F10, que apresenta muita variação de forma e alta migração; (b) imagem das células em cultura, com aumento de 10x, em $t = 1 \text{ min}$. A célula sublinhada corresponde à célula analisada e (c) imagem em $t = 360 \text{ min}$; (d) Razão entre o deslocamento quadrático médio e velocidade média ao quadrado em função do tempo para uma única célula, referente a linhagem B16F10, que apresenta pouca variação de forma e pouca migração; (e) imagem da célula que apresenta pouca variação de forma e baixa migração, em $t = 1 \text{ min}$ e (f) em $t = 360 \text{ min}$.

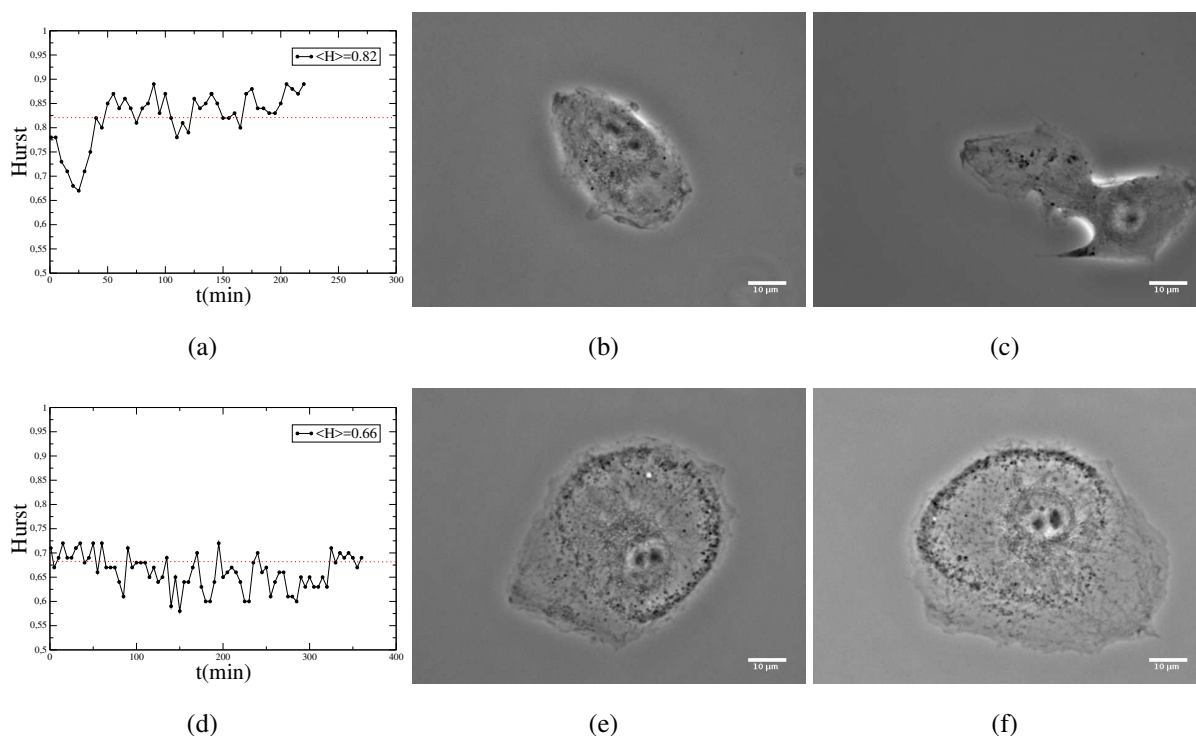


Figura 3.25: (a) Evolução do expoente de Hurst ao longo do tempo para uma única célula da linhagem B16F10 com muita variação de forma e alta migração; (b) imagem da célula em cultura com aumento de 80x, em $t = 1 \text{ min}$ e (c) $t = 220 \text{ min}$; (d) Evolução do expoente de Hurst ao longo do tempo para uma única célula da linhagem, com pouca variação de forma e baixa migração; (e) imagem da célula em cultura com aumento de 80x, em $t = 1 \text{ min}$ e (f) $t = 360 \text{ min}$.

3.4 Discussão

Neste capítulo, verificamos o comportamento das flutuações da membrana plasmática de células de melanócito normal Melan-A, melanona tumoral B16F10 e do fibroblasto NIH-3T3 (dividida em dois grupos: células com formas mais arredondadas e células com formas indefinidas). De acordo com a tabela 3.1, observamos que, independentemente da linhagem, as células apresentam um coeficiente de Hurst médio no intervalo de $\frac{1}{2} < H < 1$, indicando que a rugosidade da interface da membrana tem correlação persistente de longo alcance, ou seja, há correlação entre as protusões de lamelipódios. O movimento é do tipo Browniano fracionário. Este mesmo tipo de movimento foi observado em células de anfíbios A6 [6].

Quanto ao espectro de potência do contorno da membrana, de acordo com a tabela 3.1, verificamos que, para as linhagens B16F10 e NIH-3T3 do grupo 1, a série temporal é um movimento do tipo Browniano fracionário ($\alpha < 3$). As linhagens Melan-A e NIH-3T3 do grupo 2 apresentam um expoente $\alpha > 3$, não se enquadrando em nenhum tipo de movimento ou ruído.

Na literatura sabe-se que células de anfíbios A6 [6] apresentam um comportamento semelhante às células B16F10 e NIH-3T3 grupo 1, porém até o momento não encontramos nenhum comportamento semelhante à Melan-A e NIH-3T3 do grupo 2, quanto ao escalonamento do espectro de potência ($\alpha > 3$).

Verificamos que, independentemente da linhagem, as células variam muito sua conformação ao longo do tempo, conseqüentemente suas curvaturas também variam (figuras 3.20, 3.21, 3.22 e 3.23). De acordo com a tabela 3.2, ao fazermos uma comparação entre as linhagens normal Melan-A e tumoral B16F10, observa-se que $\langle |k| \rangle$ não varia, porém a média da energia é maior para B16F10 indicando as células tumorais armazenam mais energia em sua forma do que as células Melan-A. Essas diferenças podem estar relacionadas ao fenótipo característico de cada linhagem. Ou seja, cada linhagem apresenta uma morfologia, uma taxa de crescimento, propriedades antigênicas diferentes, além do comportamento invasivo que as células tumorais possuem, influenciando na dinâmica da membrana. Fazendo uma comparação entre os dois grupos de células da linhagem de fibroblasto NIH-3T3, observamos que a média da energia armazenada nas formas do grupo 2 são maiores que a do grupo 1. Neste caso, em que trata-se de uma mesma linhagem, o que pode justificar essa diferença com relação a energia armazenada é a plasticidade fenotípica de cada célula, ou seja, mesmo estando sobre as mesmas condições (meio de cultura, tempo de adesão, etc) as células podem apresentar características diferentes. Nos cimógrafos, independentemente da linhagem, por alguns instantes as células apresentam formas bem arredondadas (como na figura 3.23(a)). Este fato pode estar relacionado à adesão celular. De fato, [47] revelaram que células pouco aderidas apresentam formas mais arredondadas, em estudos com células epiteliais de peixe. Muitas informações podem ser obtidas ao se estudar curvaturas da membrana de células, Wang *et. al* [3] mediram a curvatura de cada ponto do contorno e através do cimógrafo verificaram a polarização das células AX3 (*Dyctyostelium discoideum*). Eles observaram que as protusões da membrana são mais frequentes em células suspensas do que em células aderidas à superfície da placa.

Analisando células individuais da linhagem B16F10 com alta migração, baixa migração e grande variação de forma, observamos que células com grande variação de forma apresentam coeficientes de difusão $\gamma > 1$ (figura 3.24(a)), indicando um comportamento migratório superdifusivo. Células com pouca variação de forma apresentam coeficientes de difusão $\gamma < 1$ (figura 3.24(d)), indicando uma difusão mais lenta, subdifusiva. Além disso, verificamos que as células com muita variação de forma apresentam uma dinâmica de protusões de lamelipódios do tipo Browniano fracionário $\frac{1}{2} < H < 1$ com correlações persistentes. Porém em células com pouca variação de forma e baixa migração a dinâmica tende ao movimento Browniano ($H = 0,66$), sem correlações, com flutuações de membrana totalmente aleatórias, confirmando os resultados obtidos com relação ao deslocamento quadrático médio. Com isso, podemos afirmar que a migração celular das células B16F10, está diretamente relacionada à variação de forma.

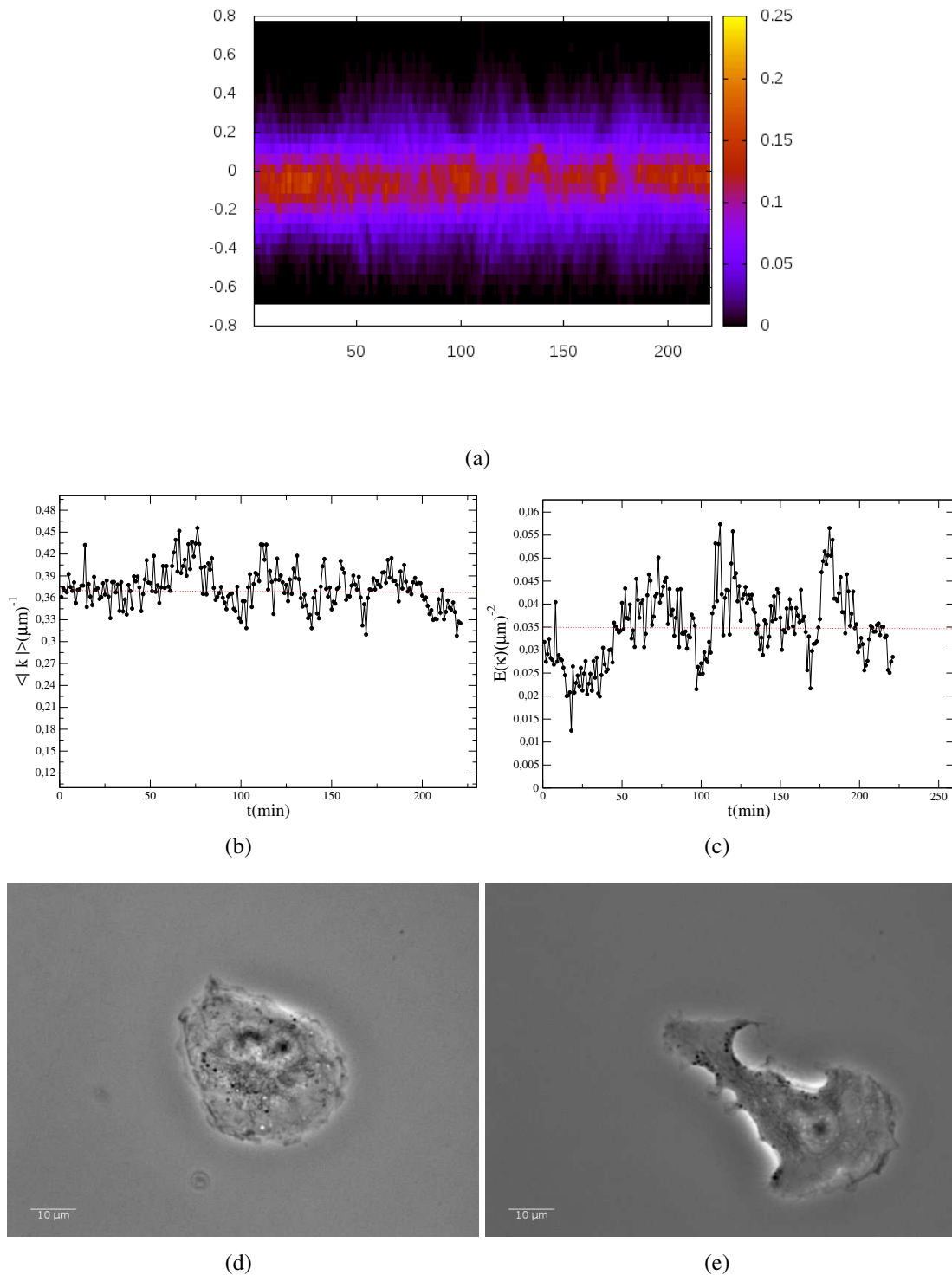


Figura 3.20: Figuras referente a linhagem B16F10. a) Cimógrafo representando a variação da curvatura ao longo do tempo. O eixo x representa o tempo em minutos, o eixo y à esquerda representa a curvatura e a direita temos uma escala de cores que representa a frequência que cada curvatura se repete; b) Média do módulo das curvaturas locais da membrana em função do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média das curvaturas; c) Energia de curvatura da membrana em função do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média das energias de curvaturas; d) Imagem de uma célula em cultura, com aumento de 80x referente a $t = 25 \text{ min}$; f) Imagem da célula em cultura, com aumento de 80x referente a $t = 180 \text{ min}$.

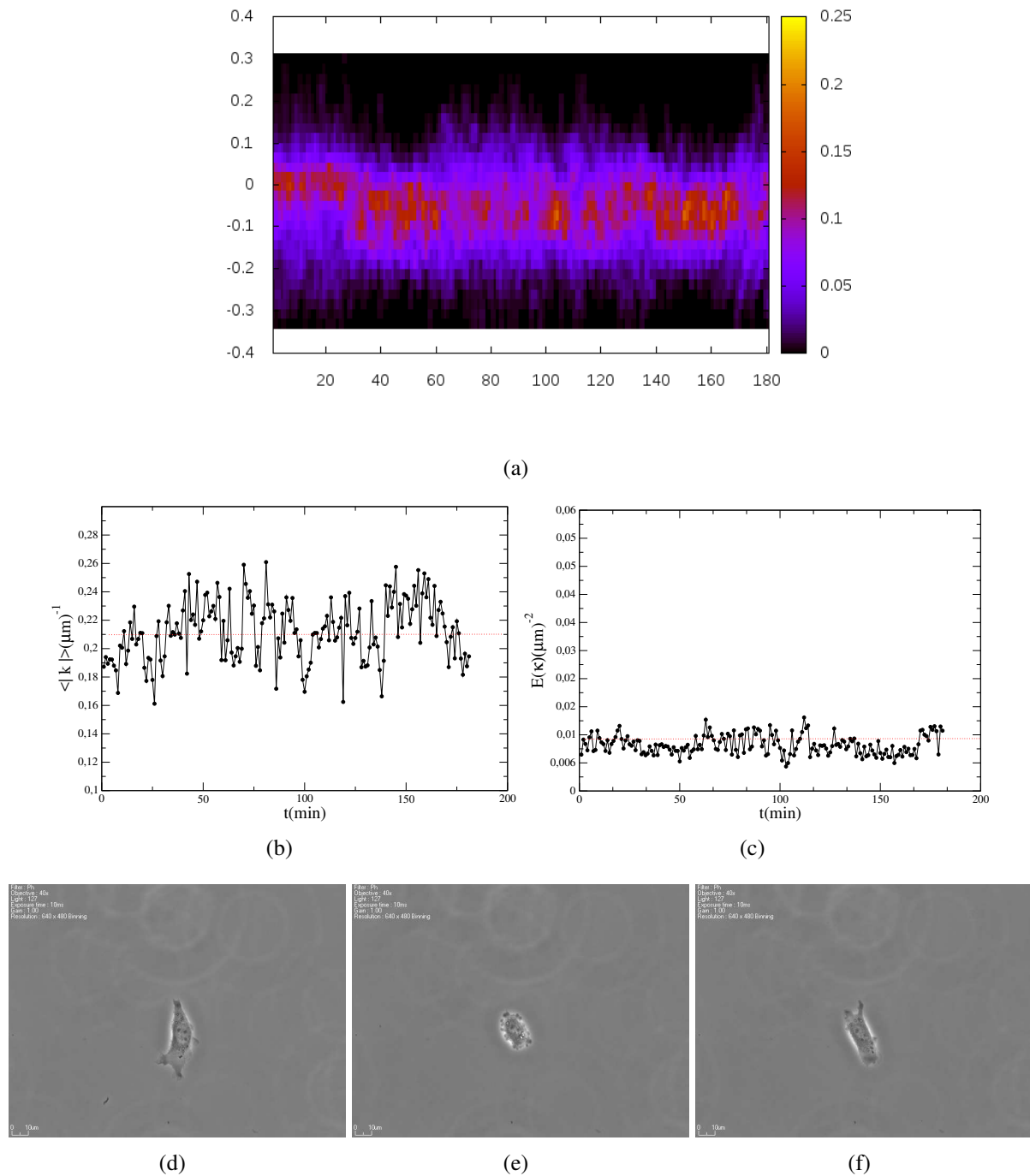


Figura 3.21: Figuras referente a linhagem Melan-A. a) Cimógrafo representando a variação da curvatura ao longo do tempo. O eixo x representa o tempo em minutos, o eixo y à esquerda representa a curvatura e à direita temos uma escala de cores que representa a frequência que cada curvatura se repete; b) Média das curvaturas locais da membrana em do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média das curvaturas; c) Energia de curvatura da membrana em função do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média das energias de curvaturas; d) Imagem de uma célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 9 \text{ min}$; e) Imagem da célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 154 \text{ min}$; f) Imagem da célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 181 \text{ min}$.

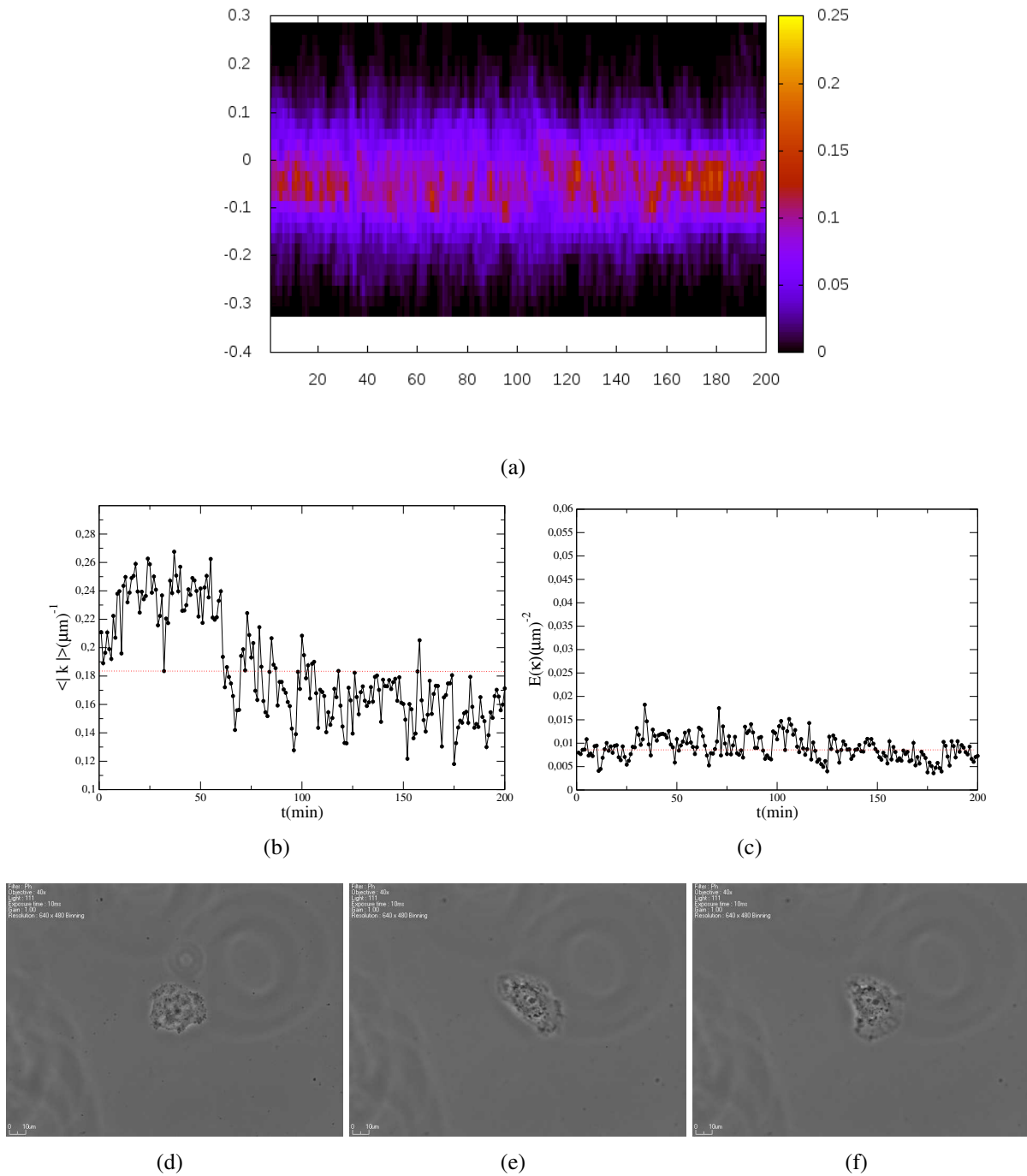


Figura 3.22: Figuras referente a linhagem NIH grupo 1 (arredondada) . a) Cimógrafo representando a variação da curvatura ao longo do tempo. O eixo x representa o tempo em minutos, o eixo y à esquerda representa a curvatura e à direita temos uma escala de cores que representa a frequência que cada curvatura se repete; b) Média das curvaturas locais da membrana em função do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média das curvaturas; c) Energia de curvatura da membrana em função do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média da energias de curvaturas; d) Imagem de uma célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 11 \text{ min}$; e) Imagem da célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 173 \text{ min}$; f) Imagem da célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 200 \text{ min}$.

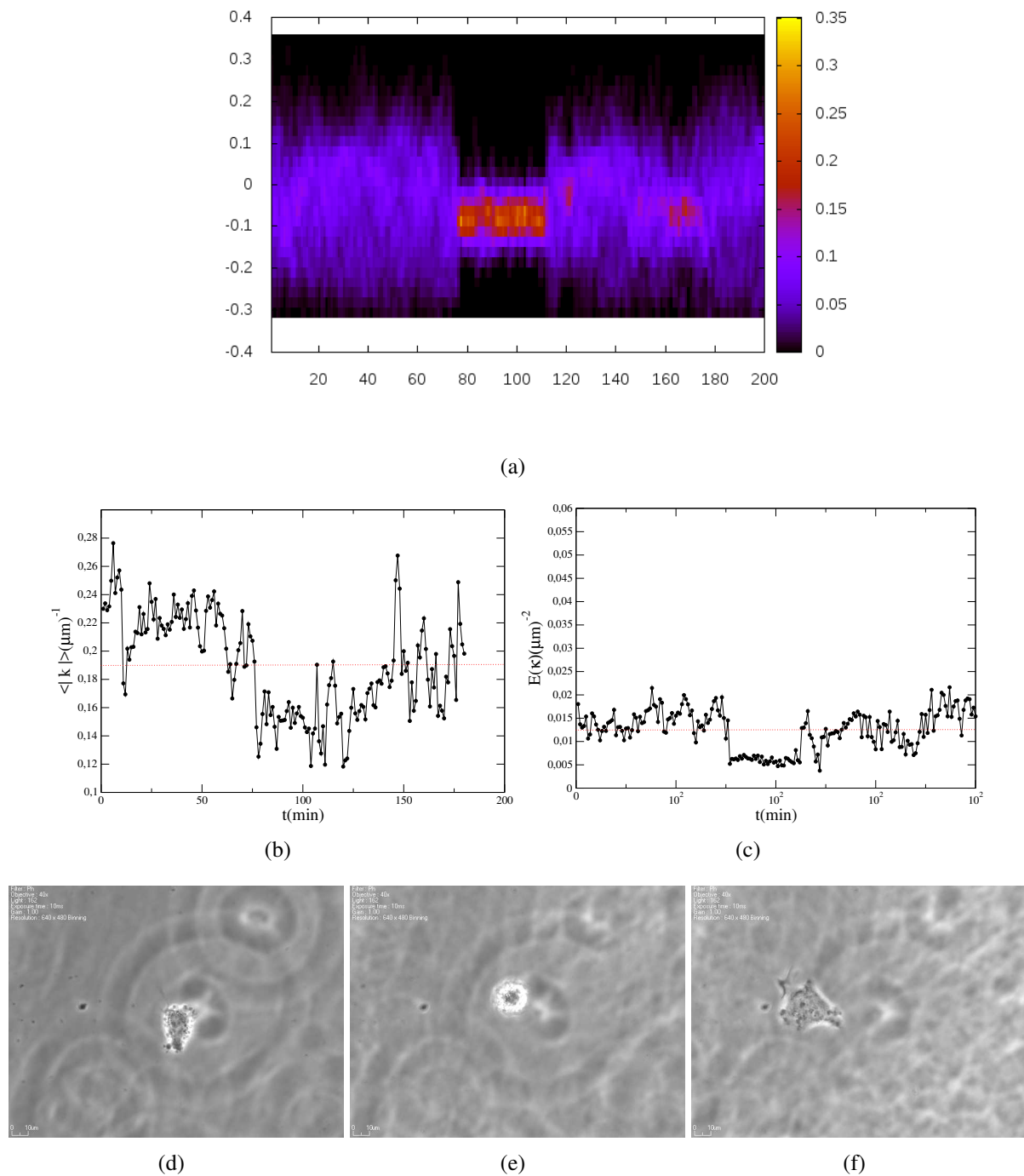


Figura 3.23: Figuras referente a linhagem NIH grupo 2 (forma diferente); a) Cimógrafo representando a variação da curvatura ao longo do tempo. O eixo x representa o tempo em minutos, o eixo y à esquerda representa a curvatura e à direita temos uma escala de cores que representa a frequência que cada curvatura se repete; b) Média das curvaturas locais da membrana em função do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média das curvaturas; c) Energia de curvatura da membrana em função do tempo. A linha vermelha pontilhada representa a média das energias de curvaturas; d) Imagem de uma célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 6 \text{ min}$; e) Imagem da célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 87 \text{ min}$; f) Imagem da célula em cultura, com aumento de 40x referente a $t = 200 \text{ min}$.

Capítulo 4

Extração de Amarras

O principal objetivo deste capítulo é descrever a extração de amarras em células por meio do pinçamento ótico. Este experimento permite caracterizar propriedades mecânicas, como a força necessária para formação da amarra, a tensão superficial e rigidez de flexão da membrana da célula. Além disso, obtivemos o raio da amarra através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As linhagens de células estudadas foram a Melan-A (melanócito normal) e a B16F10 (melanoma tumoral).

Este capítulo está dividido da seguinte forma: na seção 4.1 discutimos os aspectos teóricos envolvidos na formação de amarras de membrana, na seção 4.2 descrevemos o funcionamento da Pinça Ótica, na seção 4.3 a metodologia experimental, na seção 4.4 os resultados e na seção 4.5 a discussão.

Esta parte do trabalho foi realizada sob coorientação do professor Nathan Bessa Viana com a colaboração do doutor Bruno Pontes, do laboratório de Pinças Óticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ e com a colaboração do professor Márcio Santos Rocha (UFV-MG).

4.1 Aspectos Teóricos da Formação de Amarras de Membrana

4.1.1 Mecânica de Membranas

O modelo utilizado para estudar a formação de nanotubos de membrana (amarras), é baseado na energia livre (Helfrich-Canham) [48], em que a membrana pode ser tratada como uma

camada delgada com curvatura média local dada por

$$H = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right), \quad (4.1)$$

onde R_1 e R_2 (figura 4.1) são os raios de curvaturas principais C_1 e C_2 respectivamente [48]. Em um determinado ponto da superfície da membrana, H pode ser escrito como

$$H = \frac{1}{2}(C_1 + C_2). \quad (4.2)$$

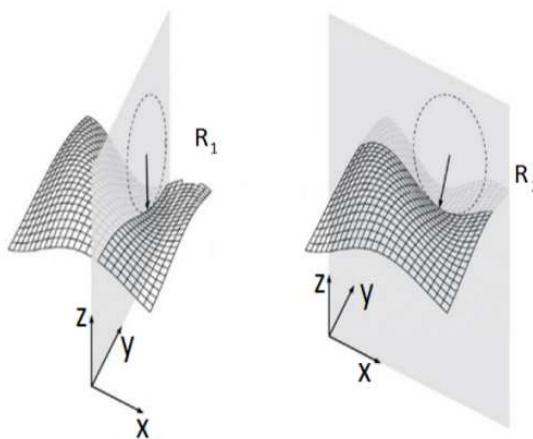


Figura 4.1: Representação de uma camada delgada, em que R_1 e R_2 são os raios de curvatura principais. R_1 é obtido do melhor círculo onde deseja-se calcular a curvatura, ou seja, desenha-se uma circunferência sobre o plano, que tem a mesma curvatura que a membrana nesse ponto. O raio R_2 deve ser ortogonal ao plano de curvatura R_1 . Figura extraída de [7].

Para uma membrana de área fixa, a energia livre pode ser escrita como [48]

$$E = \frac{k}{2} \int (C_1 + C_2 - C_0)^2 dA, \quad (4.3)$$

em que k denota a rigidez de flexão da membrana, que mede o quanto a membrana resiste à curvatura e C_0 é a curvatura espontânea da membrana que pode ser usada para descrever as diversas assimetrias da bicamada. A integral é sobre toda a superfície da membrana.

Sabemos que a membrana é composta por uma camada lipídica dupla. Assim, a descrição de uma fina camada não é sempre adequada. Um novo termo deve ser implementado na equação 4.3, levando em conta o acoplamento das duas monocamadas (dupla camada). Quando uma das monocamadas está prestes a se curvar, a monocamada externa é esticada, enquanto que a monocamada interna é comprimida [48]. Desta forma, é necessário adicionar um termo ΔA relacionado a essa mudança de área entre as duas bicamadas, já que o termo C_0 da equação 4.3

não inclui os termos relacionados com a espessura da bicamada. Assim, a energia livre pode ser escrita como

$$E_{bicamada} = \frac{k}{2} \int (C_1 + C_2 - C_0)^2 dA + \frac{\bar{k}\pi}{2Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0), \quad (4.4)$$

em que \bar{k} é o módulo da curvatura não local, que está relacionado ao gasto de energia devido ao estiramento e contração das monocamadas, ΔA é a variação de área entre as duas monocamadas (externa e interna), ΔA_0 é a diferença de área de relaxação entre as monocamadas, A é a área total da membrana e d a distância entre as monocamadas. A equação (4.4), revela que as áreas de cada monocamada não são constantes (membrana móvel), mas podem ser expandidas elasticamente devido à flexão sofrida.

De acordo com [49], para o caso de vesículas, devido ao vínculo em manter área e volume fixos, inseridos na equação 4.4, os termos σA e $-PV$. A energia livre torna-se

$$E_{vesicula} = \frac{k}{2} \int (C_1 + C_2 - C_0)^2 dA + \frac{\bar{k}\pi}{2Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0) + \sigma A - PV, \quad (4.5)$$

onde σ é a tensão superficial da membrana, P é a diferença de pressão entre o interior e o exterior da vesícula e V é o volume.

4.1.2 Amarras de Membrana

A energia livre que caracteriza a mecânica da formação de amarra da membrana é obtida à partir da equação 4.5. Porém, os termos $\frac{\bar{k}\pi}{2Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0)$ e C_0 são desprezados, pois a formação da amarra de membrana não modifica a diferença de área total do reservatório e estamos desconsiderando as assimetrias entre as monocamadas (membrana de área fixa). Acrescentado o termo F_0L e fazendo a pressão P como um parâmetro fixo, resulta

$$E_{amarra} = \frac{k}{2} \int (C_1 + C_2)^2 dA + \sigma A - F_0L, \quad (4.6)$$

onde F_0 é a força necessária para a formação da amarra e L é o comprimento da amarra.

Considerando a amarra como sendo um cilindro de raio R e comprimento L , as curvaturas principais que descrevem a flexão realizada pela membrana são escritas como $C_1 = \frac{1}{R}$ e $C_2 = 0$. Integrando a equação 4.6 sobre a área da amarra ($A_{cilindro} = 2\pi RL$) resulta em uma energia livre dada por

$$E_{amarra} = \left[\frac{k}{2} \left(\frac{1}{R} \right)^2 + \sigma \right] 2\pi RL - F_0L. \quad (4.7)$$

Minimizando a energia (equação 4.7) com relação a R e L , tem-se

$$R_0 = \sqrt{\frac{k}{2\sigma}}. \quad (4.8)$$

e a força necessária pra a formação da amarra é

$$F_0 = 2\pi\sqrt{2\sigma k}. \quad (4.9)$$

À partir das equações 4.8 e 4.9 podemos obter a tensão superficial

$$\sigma = \frac{F_0}{4\pi R_0}, \quad (4.10)$$

e a rigidez de flexão da membrana, dada por

$$\kappa = \frac{F_0 R_0}{2\pi}. \quad (4.11)$$

Ao aplicar uma força de módulo F na superfície de uma determinada célula em cultura, inicia-se a formação da amarra da célula. A membrana é deformada até atingir um valor máximo conhecido como força máxima F_{max} , resultando na forma típica de uma catenoide para região da membrana entre o ponto de aplicação da força e da vesícula [50]. Logo em seguida, inicia-se a formação de um tubo que se estende até L . Chamamos essa força necessária para formação do tubo de F_0 . Na figura (4.2), podemos observar o esboço da formação da amarra de uma membrana. Segundo [48], a força máxima F_{max} para membranas puras (por exemplo a membrana de vesículas não tem citoesqueleto) é 13% maior que F_0 .

Não há uma teoria disponível pra calcular a energia livre de amarras em células. Alguns trabalhos [17, 51, 52] investigaram o comportamento das amarras em células usando o modelo descrito pela equação 4.6, foram obtidos parâmetros efetivos como a força necessária pra formar a amarra, raio da amarra, tensão superficial e rigidez de flexão da membrana em células.

4.2 Funcionamento da Pinça Ótica

Em 1969, Arthur Ashkin e seus colaboradores descobriram o fenômeno do pinçamento ótico [53] que baseia-se em um feixe de laser fortemente focalizado através da objetiva de um microscópio. Esse feixe de laser possui a capacidade de aprisionar objetos dielétricos micrométricos próximo ao foco do feixe [54]. A pinça ótica funciona como uma espécie de dinamômetro, medindo forças da ordem de piconewton ($1pN = 10^{-12}N$). Desta forma, a pinça ótica tornou-se uma ferramenta muito utilizada em diversas áreas, especialmente na física-biológica, pois possibilita a manipulação de células vivas, ou mesmo o DNA. Além de permitir a visualização

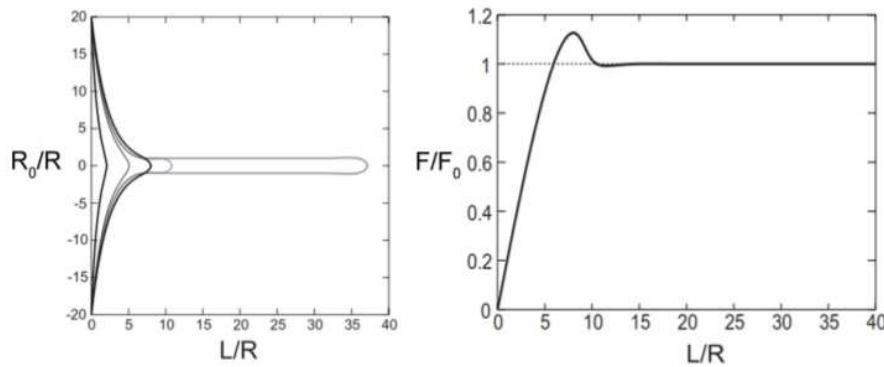


Figura 4.2: À esquerda tem-se o gráfico da razão entre a distância em relação ao centro da membrana R_0 e o raio da amarra R em função da razão entre o comprimento da amarra L e o raio da amarra R . Este gráfico nos dá as diversas formas de uma amarra formada por uma força pontual exercida na membrana. À direita tem-se o gráfico da razão entre a força necessária para a formação da amarra em função da razão entre o comprimento da amarra L e o raio da amarra R [48].

em tempo real de processos biológicos de grande importância tais como a divisão celular, locomoção, adesão e remodelamento de células, o pinçamento ótico fornece dados quantitativos desses processos.

O princípio de funcionamento da pinça ótica baseia-se na competição das forças de pressão de radiação e de gradiente, que são geradas à partir da interação da luz com uma microesfera [55]. A pressão de radiação provém da teoria eletromagnética de James Clerk Maxwell. Se uma onda luminosa de energia E , incide em um meio e é absorvida ela transfere para esse meio um momento

$$p = \frac{E}{c}, \quad (4.12)$$

onde c é a velocidade da luz, exercendo uma força sobre este meio, conhecida como pressão de radiação, confirmando assim a conjectura de Kepler¹ [56]. Esta força depende da potência da luz incidente, P e da velocidade de propagação no meio de incidência de acordo com

$$F \propto \frac{P}{v}, \quad (4.13)$$

em que $v = \frac{c}{n}$, sendo n o índice de refração do meio de incidência.

As forças relacionadas à pressão de radiação sobre uma partícula tendem a empurrar o objeto com o qual interagem. Para compensar este afastamento e aprisionar o objeto surgem as forças de gradiente, que podem ser interpretadas através da teoria eletromagnética da luz. Uma maneira simples pra entender este tipo de força seria através do seguinte exemplo: atritando um tubo de plástico e colocando-o próximo à pedacinhos de papel, por indução eletrostática, os

¹Johannes Kepler, observou em 1619, que as caudas dos cometas sempre se afastam do Sol, independente do sentido do seu movimento. Este fenômeno ocorre devido à pressão que a luz exerce sobre as partículas que compõem o cometa.

pedacinhos de papel serão atraídos pelo tubo, gerando um campo elétrico mais intenso próximo à borda do tubo. Devido à esse gradiente de intensidade de campo elétrico, a extremidade de cada dipolo mais próximo à borda é mais atraída do que a extremidade oposta é repelida, resultando em uma força atrativa. Assim, para produzir um gradiente intenso a luz deve ser fortemente focalizada por uma lente, por isso, a necessidade de uso do laser e da objetiva do microscópio [9].

O confinamento numa pinça ótica pode ser compreendido qualitativamente através da ótica geométrica. Para isto, vamos considerar um meio de índice de refração n_1 que contém uma microesfera de raio r e índice de refração n_2 interagindo com um feixe de luz fortemente focalizado de comprimento de onda λ , com $r \gg \lambda$ (limite assintótico descrito pela ótica geométrica) [54]. O feixe de laser possui um perfil de intensidade gaussiano, com intensidade máxima na região central e decai ao se aproximar dos extremos. Os raios incidentes a e b , que são focalizados por uma lente sobre a microesfera sofrem reflexão e refração devido aos diferentes índices de refração, causando uma mudança em suas direções de propagação. A contribuição da reflexão para a força total do feixe sobre a esfera está na pressão de radiação, enquanto que os raios refratados contribuem com forças do tipo gradiente, que surgem devido ao momento linear total do sistema isolado luz-objeto ter que ser conservado, ou seja, $\vec{p}_{antes} = \vec{p}_{depois}$. O raio é desviado de sua trajetória original, já que os índices de refração são diferentes, indicando que o raio refratado tem um momento linear em uma direção diferente da direção inicial. Ou seja, o raio sofre uma variação em seu momento linear, já que houve mudança em sua trajetória. Pela conservação do momento linear do sistema, a esfera deve sofrer uma variação de momento de mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento do raio de luz. Para esclarecer essa discussão, temos alguns exemplos. Na figura 4.3, temos um exemplo, onde a força resultante é a pressão de radiação. Os raios a e b incidem nas extremidades opostas do feixe de laser gaussiano sobre a microesfera dielétrica e são refletidos. Devido a essa reflexão, ambos os raios exercem força sobre a microesfera empurrando-a para cima, pois a força resultante é a pressão de radiação (figura 4.3, à direita).

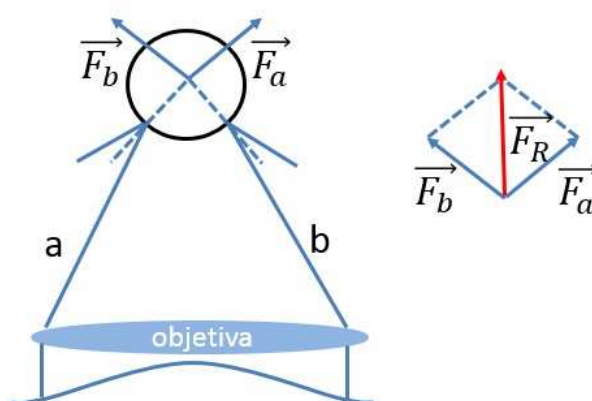


Figura 4.3: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refletidos que dão origem a força de pressão de radiação. À direita o diagrama de forças, onde a seta vermelha representa a resultante empurrando a microesfera para cima. Figura modificada de [57].

Na figura 4.4, temos que a microesfera está situada abaixo do foco, na metade direita do perfil de intensidade do laser. O raio a incide no centro do feixe de laser gaussiano, e é desviado de sua trajetória inicial, o que provoca uma variação em seu momento, em resposta a variação do momento do feixe de laser é produzida uma força \vec{F}_a sobre a microesfera de mesmo módulo e sentido contrário. O raio incidente b , produz uma força \vec{F}_b . Porém, $|\vec{F}_a| > |\vec{F}_b|$, já que o perfil de intensidade do laser é gaussiano. A força resultante desloca a microesfera para a região do foco do feixe (4.4, à direita).

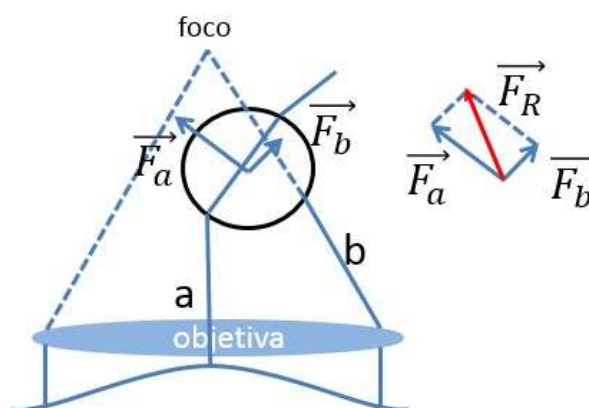


Figura 4.4: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refratados originando a força de gradiente. A microesfera está situada abaixo do foco e na metade direita do perfil de intensidades do laser. À direita temos o diagrama de forças. A seta vermelha representa a resultante. Observa-se que a microesfera tende a desloca-se para a região do foco do feixe. Figura modificada de [57].

Na figura 4.5 a microesfera está acima do foco. Os raios a e b incidem nas extremidades opostas do feixe de laser gaussiano sobre a microesfera e são refratados, gerando uma força

resultante que aponta para baixo (4.5, à direita) no sentido do foco do laser.

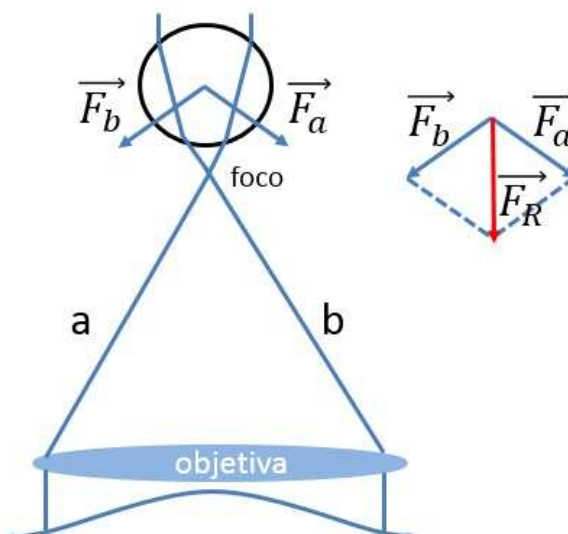


Figura 4.5: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refratados originando a força de gradiente. A microesfera está situada acima do foco do laser. À direita temos o diagrama de forças, onde a seta vermelha representa a resultante. Observa-se que a microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe. Figura modificada de [57].

Nas figuras 4.3, 4.4 e 4.5 cada raio incidente origina um raio transmitido e um outro raio refletido que dependem dos coeficientes de reflexão e transmissão na interface meio-esfera. Além disso, nas figuras 4.4 e 4.5 verifica-se apenas as refrações na interface meio-esfera, porém os raios refratados sofrem múltiplas reflexões no interior da esfera, que devem ser considerados em qualquer teoria quantitativa de pinças óticas.

Assim, verificamos a competição entre as duas forças: pressão de radiação originada da reflexão (empurra a microesfera para fora do foco) e gradiente originada da refração (desloca o centro da microesfera para o foco). Na figura 4.6 observa-se o efeito das duas forças. A pressão de radiação equilibra-se com a força de gradiente mantendo a esfera aprisionada.

4.3 Metodologia Experimental

4.3.1 Cultura de Células

Analisamos duas linhagens distintas de células em cultura: a B16F10 e a Melan-A. A metodologia pra cultura de células pode ser verificada no apêndice A. As placas utilizadas foram exclusivamente adaptadas. Perfuramos o fundo das placas de petri de 35 mm de diâmetro, e fixamos lamínulas de vidro de 18 × 18 mm com parafina. Antes do plaqueamento, as placas foram devidamente esterilizadas e recobertas com poli-l-lisina, garantindo uma melhor adesão

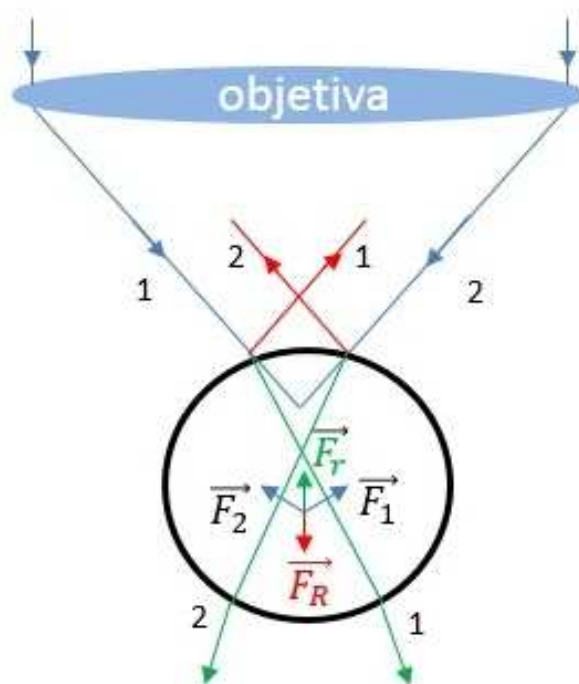


Figura 4.6: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refletidos e refratados. Os raios iniciais 1 e 2 (setas azuis) têm a mesma intensidade e sofrem refração e reflexão. A seta vermelha é a força resultante (\vec{F}_R) gerada à partir dos raios refletidos, ou seja, representa a pressão de radiação. A seta verde é a força resultante (\vec{F}_r) dos raios refratados, representando a força de gradiente. Enquanto a pressão de radiação empurra a microesfera para fora do foco, a força de gradiente desloca o centro da microesfera para o foco, mantendo a microesfera presa na pinça. Figura modificada de [7].

das células à lamínula. Após 30 *min*, plaqueamos 1×10^5 células. Em seguida, as placas foram mantidas na estufa com temperatura de 37 °C e fluxo de 5% de CO₂ por 24 *h*.

4.3.2 Pinça Ótica

Aparato Experimental

O aparato experimental pode ser observado na figura 4.7. Ele consiste de um laser de diodo Nd: Y_oV₄ (Quantronix, EUA), com comprimento de onda $\lambda = 1064 \text{ nm}$, funcionando em modo contínuo (CW). O laser é direcionado para o microscópio ótico invertido (amostra fica por cima da objetiva), Nikon Eclipse TE300 (Nikon Melville NY) que está acoplado ao deslocador de motor de passos (Prior Scientific, Rockland, MA) e a uma câmara que mantém temperatura e concentração de CO₂ controladas. A objetiva possui aumento de 100x e abertura numérica $NA = 1.4$. O microscópio está acoplado a uma câmara CCD modelo C2400 (Hamamatsu, Japão) juntamente com uma placa de captura FG7 (Scion, Torrance, CA). As imagens obtidas são digitalizadas utilizando o software ImageJ.

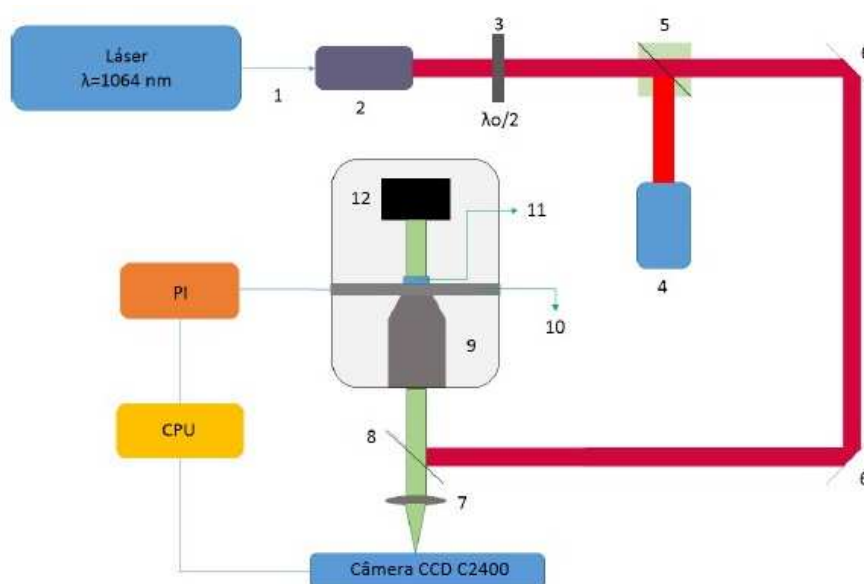


Figura 4.7: Aparato experimental da pinça óptica. Figura modificada de [56]. O laser (1) segue por um cabo de fibra óptica, colocado em um suporte fixo (2) na mesa óptica. O laser passa por uma placa de meia onda (3) e pelo divisor de feixe polarizado (5), onde é dividido em duas partes. Uma parte é absorvida por um atenuador (4) e a outra passa por espelhos (6), em direção ao microscópio invertido. O laser incide em um espelho dicróico (8) e entra na objetiva (9), onde será focalizada a amostra. Através do deslocador de motor de passos (10) que se dá a movimentação da amostra. O deslocador de motor de passos é conectado a um computador. As imagens da amostra são coletadas por uma câmara Hamamatsu C2400.

Calibração

Antes de iniciarmos os experimentos de extração de amarras, fizemos a calibração da pinça óptica a fim de obtermos o valor da constante elástica k , pois é via esta constante que se define o quão forte é a pinça óptica.

A calibração da pinça óptica foi realizada da seguinte forma: aprisionamos uma microesfera de poliestireno e deslocamos o estágio do microscópio com diferentes velocidades. A pinça óptica gera um poço de potencial do tipo oscilador harmônico sobre a microesfera que estará sujeito à forças óticas restauradoras e a forças de interação com o fluido, como atrito exercida pelo fluido ao deslocarmos o fluido sobre ela. Essa força é conhecida como força de Stokes (equação 4.15) [7, 17, 58, 59]. No caso estacionário, a força de Stokes é igual a força que a pinça óptica realiza para manter a microesfera presa. Para cada velocidade obtivemos um vídeo do deslocamento da microesfera. As análises dos vídeos foram feitas via programa ImageJ, onde obtemos a posição do centro de massa da microesfera pinçada. Para uma velocidade v , a posição do centro de massa da microesfera $\rho(v)$ se encontra fora da posição de equilíbrio $\rho(0)$

quando $v = 0$, do centro de massa. Ou seja,

$$\Delta\rho = \rho(v) - \rho(0) . \quad (4.14)$$

Sabendo que a força de Stokes pode ser escrita como

$$F = -\beta v , \quad (4.15)$$

e que a força resultante é nula na nova posição de equilíbrio ($F_{stokes} = F_{otica}$), podemos escrever que

$$\Delta\rho = \frac{\beta v}{k_{\perp}} , \quad (4.16)$$

em que k_{\perp} é a constante elástica da pinça em relação ao plano perpendicular à direção de propagação do feixe e β o coeficiente de Stokes-Faxen [7, 17, 60], definido da seguinte forma

$$\beta = 6\pi\eta(T)a \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 \right]^{-1} , \quad (4.17)$$

sendo a o raio da microesfera, h a distância do centro da microesfera à lamínula e η a viscosidade da solução. À 25°C , $\eta = (8,9 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{Pa}\cdot\text{s}$.

A amostra é deslocada com diferentes velocidades com o objetivo de medirmos diferentes $\Delta\rho$ (figura 4.8). Fazendo-se um ajuste linear do gráfico $\Delta\rho \times v$, determinamos o coeficiente angular β e, conseqüentemente a constante elástica da pinça. Para uma potência de $(900 \pm 15) \text{mW}$ na objetiva, a constante elástica é $k = (189 \pm 9) \text{pN}/\mu\text{m}$.

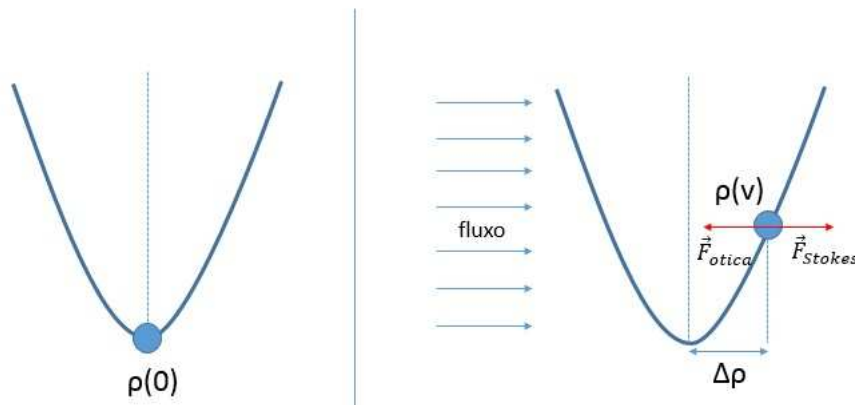


Figura 4.8: Esboço da microesfera presa na pinça. À esquerda, microesfera presa na pinça com $v = 0$, ou seja, na ausência do fluxo. À direita, devido ao fluxo a microesfera presa na pinça sofre um deslocamento. Nesse caso há competição entre as duas forças ($F_{stokes} = F_{otica}$). Figura modificada de [57].

Experimento de Extração de Amarras

Aproximadamente $24 h$ após o plaqueamento das células, adicionamos à placa de cultura $1\mu l$ de solução estoque de microesferas de poliestireno com raio $(1.52 \pm 0.02)\mu m$. Em seguida, a amostra é levada ao microscópio. Através do deslocamento do estágio do microscópio, onde é colocada a amostra, a célula é levada próxima à microesfera presa na pinça. A potência do laser utilizada é de $(900 \pm 15)mW$. Pressiona-se a microesfera contra a célula de 5 a 10 s, até que ela esteja aderida. O estágio do microscópio é deslocado com velocidade constante, afastando a célula da pinça ótica gerando a amarra da membrana. Este procedimento é gravado utilizando uma câmera CCD modelo C2400 (Hamamatsu, Japão) e digitalizadas por uma placa de captura FG7 (Scion, Torrance, CA), com uma taxa de captura de 10 quadros/s. O primeiro e o último vídeo realizados, referem-se à microesfera em repouso aprisionadas na pinça, que foram utilizadas como referência de posição para força nula. Através do software ImageJ, com o "plugin" de determinação de centro de massa foi realizada a análise do filme, permitindo-nos determinar a força necessária para a extração da amarra, chamada de F_{max} e a força para formação da amarra da membrana, chamada de F_0 (figura 4.9). As forças medidas são da ordem de piconewton (pN). As análises de dados foram realizadas utilizando o programa Kaleidagraph (Synergy Software, EUA).

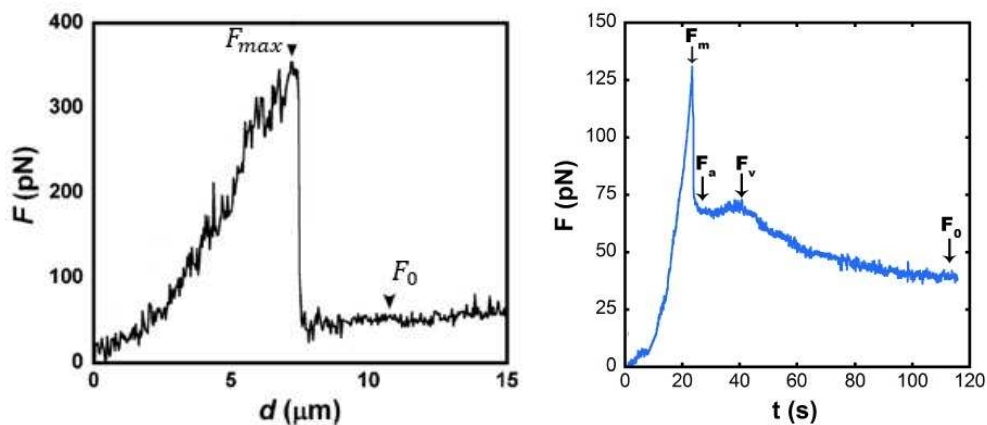


Figura 4.9: À esquerda, força (pN) $\times d(\mu m)$, $d = vt$, gráfico típico da linhagem celular NIH-3T3 [17]. À direita, força(pN) $\times t(s)$, gráfico típico de eritrócitos [56]. De acordo com os gráficos F_m é a força máxima, F_a é uma força transitória (valor inicial da força para produção de amarra) e F_v é uma força que indica que o estágio do microscópio ficou parado. No repouso a força decai até F_0 que é a força de amarra.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com o objetivo de medirmos o raio R_0 da amarra. Conhecendo a força necessária para a formação da amarra F_0 e o raio da amarra R_0 , po-

demos determinar a tensão σ e a rigidez de flexão da membrana κ . Para isto, foram plaqueadas 1×10^3 células seguindo a mesma metodologia utilizada nos experimentos de extração de amarras. Após a extração das amarras e fixação das microesferas nas amarras, as amostras foram preparadas para a microscopia eletrônica de varredura. Inicialmente as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5%(v/v) e paraformaldeído 4,0%(v/v) diluídos em 0,1M de tampão cacodilato (pH 7.4) durante à noite. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em O_3O_4 e 1,25%(v/v) FeCNK por 40 minutos e lavadas novamente com tampão cacodilato. Então, foram desidratadas em uma série que inicia-se com a imersão da amostra em soluções com concentrações crescentes de etanol (10%, 30%, 70%, 90% e 100%), até alcançar o etanol absoluto. A lamínula é removida da placa de petri e passa pelo processo de secagem de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030) (BAL-TEC, Liechtenstein). Em seguida, as lamínulas foram fixadas em suportes específicos para microscopia eletrônica de varredura. Por fim, as amostras foram colocadas no metalizador BALTEC SCD 050 SputterCoater (BAL-TEC Liechtenstein), onde foram metalizadas com ouro. Para observação das amostras utilizamos um microscópio de varredura (EVO Carl Zeiss, Jena, Germany). Todo o procedimento descrito acima baseia-se em *Pontes et al.* [51, 52].

4.4 Resultados

Na figura 4.10, temos a imagem de uma amarra extraída de uma célula da linhagem Melan-A. A amarra está indicada pela seta.

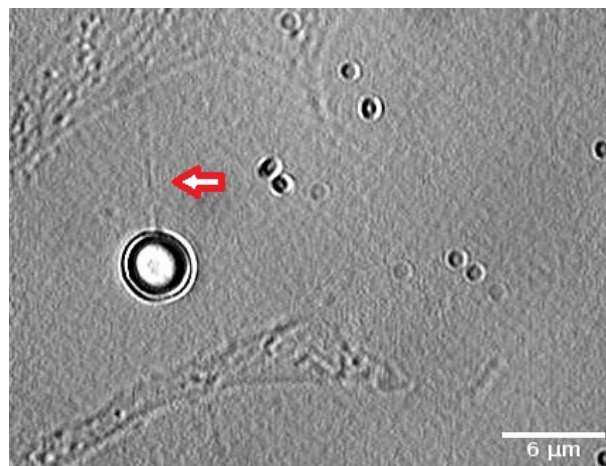


Figura 4.10: Imagem de uma amarra extraída via pinçamento ótico, de uma célula da linhagem Melan-A. A amarra está presa na microesfera de poliestireno (indicada pela seta).

Aplicando a técnica de extração de amarras nas células em cultura para as linhagens B16F10 e Melan-A, obtivemos medidas com relação a força para formação da amarra da membrana, F_0 (B16F10, $N = 52$ e Melan-A, $N = 25$) e com relação ao raio da amarra, R_0 (B16F10, $N = 6$

e Melan-A, $N = 10$). À partir destes dados, utilizando as equações definidas pela energia livre de Helfrich-Canham aplicada à formação de amarras em vesículas, determinamos a tensão na membrana,

$$\sigma = \frac{F_0}{4\pi R_0}, \quad (4.18)$$

e a rigidez de flexão da membrana,

$$\kappa = \frac{F_0 R_0}{2\pi}. \quad (4.19)$$

Para calcularmos o erro das medidas utilizamos o erro padrão da média, dado por

$$\varepsilon = \frac{\mu}{\sqrt{N}}, \quad (4.20)$$

onde μ é o desvio padrão amostral, $\mu = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$.

A figura 4.11, demonstra a curva de força-deformação da extração e formação da amarra em função do tempo para uma única célula. A figura 4.11(a) refere-se à B16F10 e 4.11(b) refere-se à Melan-A. Vale ressaltar que as curvas de força são qualitativas, pois verificamos em nossas análises comportamentos distintos dentro de uma mesma linhagem (figura 4.1). Algumas células apresentam comportamento típico de eritrócito (hemácia) [56], outras típico de células NIH-3T3 [52], enquanto outras apresentavam mais de uma amarra. Esses vários comportamentos se fizeram presente mesmo variando a velocidade. Utilizamos velocidades constantes para mover o microscópio dadas por: $v_1 = 0,25 \mu\text{m}/\text{s}$, $v_2 = 0,5 \mu\text{m}/\text{s}$, $v_3 = 1 \mu\text{m}/\text{s}$ e $v_4 = 2 \mu\text{m}/\text{s}$. O valor médio da força de amarra F_0 , para todas as velocidades, pode ser verificado na tabela 4.1.

Na tabela 4.1 podemos observar que a força de amarra, F_0 , e o raio da amarra, R_0 , dentro da barra de erro, não variam para as linhagens B16F10 e Melan-A. Conseqüentemente, a rigidez de flexão da membrana, κ , e a tensão na membrana, σ , também não variam. Porém, essas linhagens possuem força de amarra, F_0 , e raio de amarra, R_0 , menor que o da NIH-3T3 [52] e menor que dos eritrócitos.

linhagem celular	$F_0(pN)$	$R_0(\mu m)$	$\sigma(pN/\mu m)$	$\kappa(pN \cdot \mu m)$
B16F10	23 ± 2	$0,038 \pm 0,003$	48 ± 6	$0,14 \pm 0,02$
Melan-A	23 ± 2	$0,036 \pm 0,004$	50 ± 7	$0,13 \pm 0,02$
NIH-3T3	39 ± 4	$0,049 \pm 0,004$	59 ± 7	$0,30 \pm 0,03$
eritrócitos	47 ± 2	$0,041 \pm 0,004$	90 ± 4	$0,31 \pm 0,01$

Tabela 4.1: Média das medidas: força para formação da amarra da membrana, F_0 ; raio da amarra, R_0 ; tensão da membrana, σ , e rigidez de flexão da membrana, κ . Os dados referentes a linhagem NIH-3T3 foram obtidos de [52] e os correspondentes aos eritrócitos foram obtidos de [56].

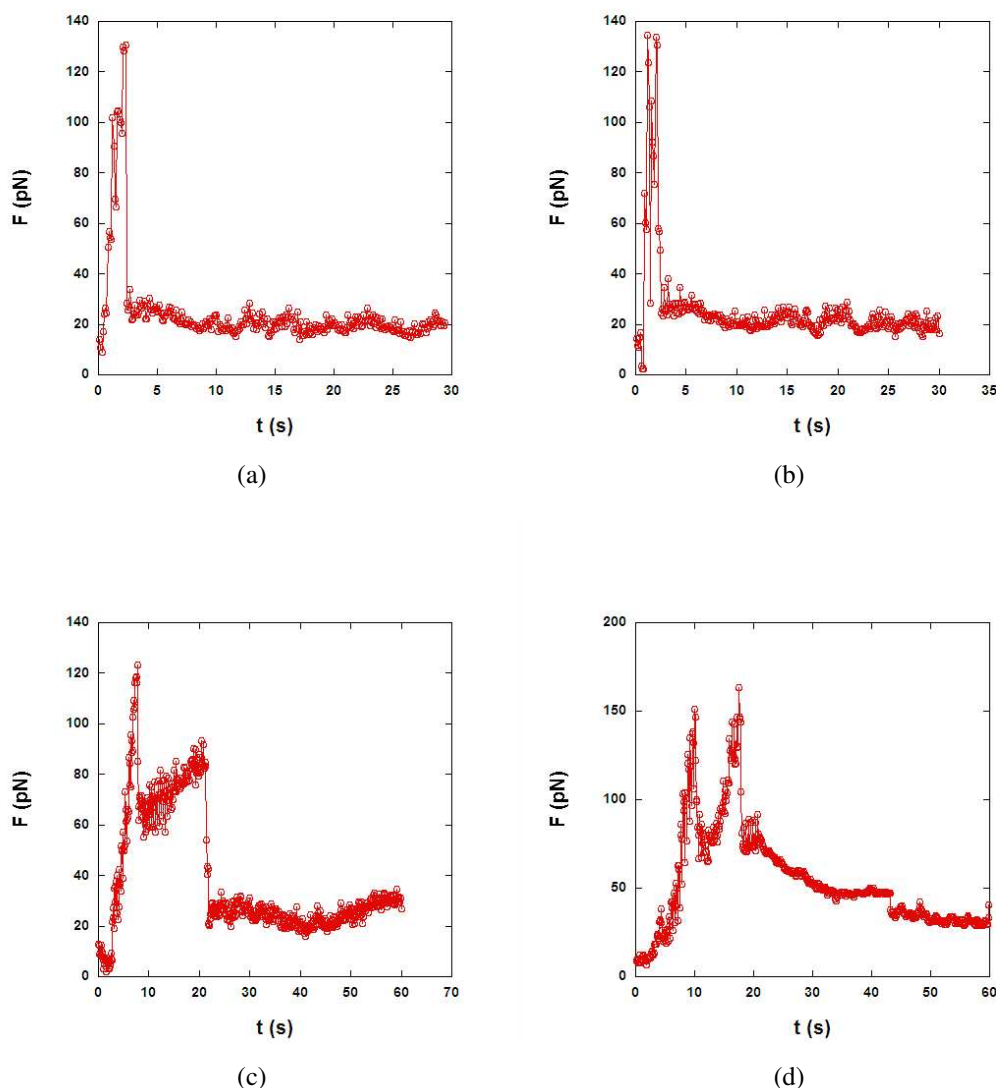


Figura 4.11: Curva de força (pN) x tempo (s): a) B16F10, comportamento típico de NIH-3T3; b) Melan-A comportamento típico de NIH-3T3; c) B16F10, comportamento típico de hemácia; e d) B16F10, formação de mais de uma amarra.

4.5 Discussão

Neste capítulo apresentamos resultados de extração de amarras de células das linhagens Melan-A e B16F10. Observamos que as curvas de força (figura 4.11) apresentam comportamentos distintos dentro de uma mesma linhagem. Algumas células apresentam comportamento típico de hemácia (figura 4.11(c)) [56], outras típico de células NIH-3T3 (figura 4.11(a) e 4.11(b)) [52], enquanto outras apresentavam mais de uma amarra (figura 4.11(d)). Segundo [47], em estudos realizados com queratócito (células epiteliais de peixe), a maneira em que as células estão aderidas à superfície da placa interfere na auto-organização de actina e miosina.

Desta forma, os vários comportamentos obtidos para as curvas de força podem estar relacionadas à adesão celular, ou seja, mesmo tratando-se de uma mesma linhagem as células podem aderir a superfície da placa de formas distintas (plasticidade fenotípica), influenciando na maneira em que as amarras foram extraídas.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 4.1, as células Melan-A e B16F10 são mais flexíveis, ou seja, mais fáceis de dobrar, que as NIH-3T3 [52] e os eritrócitos [56], o que indica um citoesqueleto mais maleável.

Relacionando nossos resultados referentes à extração de amarras das células à curvatura e energia de curvatura obtidas no capítulo 3 (Membrana Plasmática), verificamos que a rigidez de flexão das células B16F10 e Melan-A são as mesmas, indicando que a flexibilidade do citoesqueleto de ambas as linhagens seja semelhante. Porém, as protusões da membrana plasmática apresenta uma média de curvaturas locais e energia de curvatura diferentes. Desta forma, o fato das células possuírem mesma rigidez de flexão e mesma tensão superficial não significa que as células possuem o mesmo fenótipo, daí as diferenças com relação a média de curvaturas e energia de curvatura.

Quanto a migração celular das células Melan-A e B16F10, segundo [2], as distribuições de velocidades sugerem um regime de difusão anômalo para ambas as linhagens, porém as distribuições de velocidades foram ajustadas a uma q -gaussiana, que é uma distribuição simétrica. O parâmetro q obtido para ambas as linhagens foi $q = 1,52$. Vale ressaltar que as distribuições são assimétricas, possivelmente ficariam melhor ajustadas a uma distribuição do tipo q -Weibull, que é uma distribuição assimétrica. Quanto ao deslocamento quadrático médio das células, Silva *et al.* verificaram que as células B16F10 difundem mais rápido do que as células Melan-A. Sendo assim, esperaríamos que as membranas das células B16F10 fossem mais flexíveis que a Melan-A, mas segundo nossos resultados a rigidez de flexão da membrana não varia entre as linhagens. Para uma melhor interpretação seria preciso analisar o citoesqueleto das células.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

5.1 Conclusões

As análises de migração de células tumorais B16F10 variando a densidade de células revela que as trajetórias individuais das células são totalmente aleatórias, algumas migram em caminhada persistente, enquanto outras giram em torno de si mesmas. Verificamos que independente da densidade, as células migram em um regime de difusão anômalo, com distribuições de velocidades do tipo q-Weibull e que a autocorrelação das velocidades são do tipo q-exponencial de curto alcance. O deslocamento quadrático médio enfatiza que o regime de difusão é anômalo, indicando uma subdifusão para tempos curtos e uma superdifusão para tempos longos. Porém, aumentar a densidade de células ocasiona uma difusão cada vez mais lenta tendendo a um regime de difusão normal. Observamos que as células tem uma tendência em executar protusões e retrações de lamelipódios em torno de π e $-\pi$, e que as células apresentam mais voos de reorientação do que voos direcionais. Além disso, verificamos que células com migração alta migram mais balisticamente do que as células com muita variação de forma, e que células com baixa migração migram como em caminhada aleatória.

Analisando a dinâmica das flutuações da membrana plasmática de células de melanócito normal Melan-A, melanoma tumoral B16F10 e fibroblasto NIH-3T3 com forma mais arredondada (grupo 1) e forma indefinida (grupo 2) concluímos que independente da linhagem ou grupo, as células apresentam um movimento do tipo Browniano fracionário, indicando correlações entre as protusões de lamelipódios. O espectro de potência das células B16F10 e da NIH-3T3 do grupo 1 apresentam uma série temporal com movimento do tipo Browniano fracionário. Concluímos ainda que a B16F10 possui armazenada mais energia em sua forma que a Melan-A, e que a energia armazenada na forma das células do grupo 2 são maiores do que a do grupo 1.

Observando células individuais da linhagem B16F10 com alta migração, baixa migração e

muita variação de forma concluímos que células com muita variação de forma apresentam uma migração superdifusiva e dinâmica de protusões de lamelipódios do tipo Browniano fracionário. Células com pouca variação de forma e baixa migração apresentam uma migração mais lenta, subdifusiva com dinâmica de protusões de lamelipódios tendendo ao movimento do tipo Browniano.

Os experimentos de extração de amarras das células normais Melan-A e tumorais B16F10 revela que a rigidez de flexão e tensão da membrana não diferem entre si.

5.2 Perspectivas

- Realizar experimentos de migração celular com as células NIH-3T3;
- Testar fármacos utilizados em tratamento de câncer nas células B16F10 e verificar a migração e o comportamento das flutuações de membrana;
- Realizar experimentos de reologia com as células Melan-A e B16F10 para verificarmos o módulo viscoelástico das mesmas. Além de experimentos com fluorescência para verificarmos as características do citoesqueleto.
- Caracterização da motilidade das células B16F10, Melan-A e NIH-3T3 em diferentes substratos.

Apêndice A

Metodologia para preparação da cultura de células

As linhagens de células adquiridas pelo laboratório de física biológica da UFV-MG são mantidas em nitrogênio líquido a temperaturas de aproximadamente -70°C , a fim de conservar as células em boas condições por longo período de tempo. A medida que ocorrem os experimentos essas células são descongeladas e cultivadas em meio de cultura. O meio de cultura é um dos fatores mais importantes para manter as células vivas, pois é ele que as alimenta. Cada linhagem celular necessita de um tipo de meio de cultura. Neste trabalho, realizamos experimentos com linhagens distintas, desta forma, o meio de cultura utilizado na linhagem B16F10 foi o meio DMEM - "Dulbecco's Minimum Essential Medium" (high glucose-Sigma Aldrich), enriquecido com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen). Foram adicionados 100 i.u./ml de penicilina, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 2.5 ng/ml de anfotericina B e 262 mM de bicarbonato de sódio. O pH foi acertado em 7.0 à 7.2. Para Melan-A e NIH-3T3 o meio de cultura utilizado foi o meio RPMI - "Roswell Park Memorial Institute Medium" (Sigma Aldrich), enriquecido com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen), $2,2\text{ g/l}$ de bicarbonato de sódio, $0,1\text{ g/l}$ de estreptomicina, $2.5 \cdot 10^{-3}\text{ g/l}$ de anfotericina B e 1 g/l de penicilina. O pH foi acertado em 6.9. No caso da Melan-A foi acrescentado 200 nM de fator de crescimento PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate). Assim que as células atingem a confluência elas são replicadas e colocadas em novas garrafas. A cada replicada dizemos que houve uma passagem. Em nossos experimentos usamos as passagens entre P5 e P13. Para realização dos experimentos devemos fazer a contagem de células, que pode ser realizada através de uma câmara de Neubauer (figura A.2). Em seguida, as células são plaqueadas em garrafas ou placas, e levadas à estufa (figura A.3) aguardando o tempo de adesão, que varia de 4 à 8 horas. A quantidade de células plaqueadas, o tipo de placa ou garrafa e o tempo de adesão variam de acordo com o experimento. Assim que as células estão aderidas à superfície da placa ou garrafa, são adquiridas imagens das células ao longo do tempo. Os principais equipamentos utilizados na metodologia podem ser observados nas figuras A.1 à A.3.



Figura A.1:

Capela de fluxo laminar de segurança tipo 2. É na capela de fluxo laminar que preparamos a cultura de células.

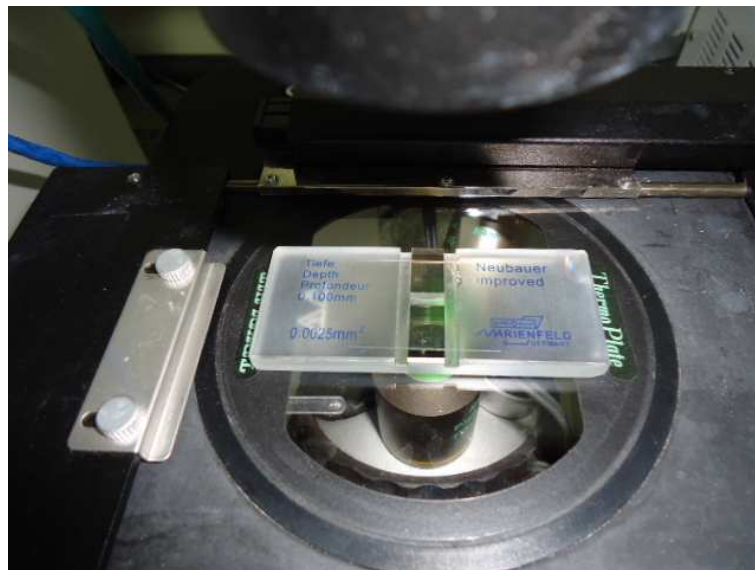


Figura A.2:

Câmara de Neubauer. Após tripsinizarmos ¹a cultura de células, fazemos a contagem de células usando a câmara de Neubauer.

¹A tripsina é uma enzima que criva proteínas de membrana e são responsáveis por fazerem a interação entre as células vizinhas e células substrato



Figura A.3:

Estufa. Preparada a cultura de células, as garrafas e placas são mantidas na estufa com temperatura e CO_2 controlados, aguardando até que as células estejam aderidas ao substrato.

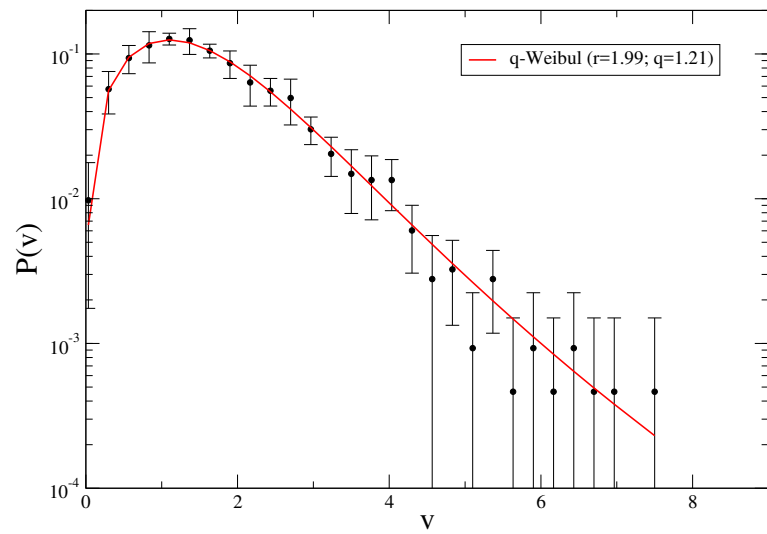
Apêndice B

Outras análises para a distribuição das velocidades e deslocamento quadrático médio de células B16F10

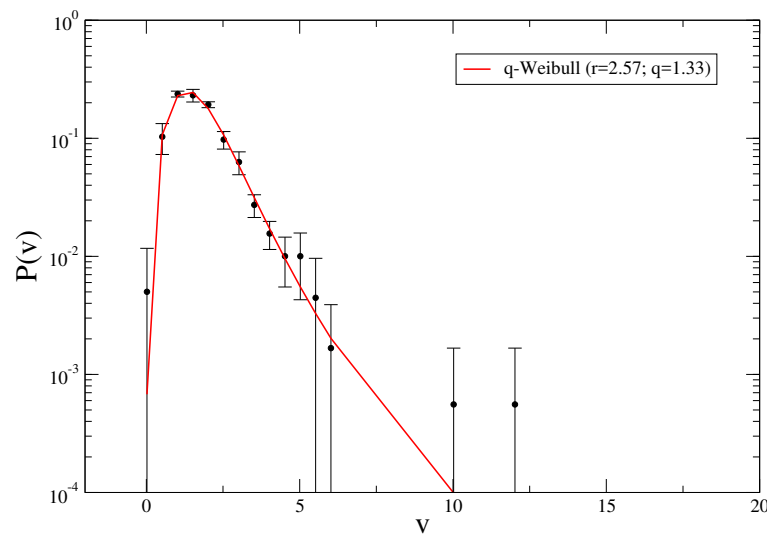
B.1 Distribuição das velocidades

Para uma mesma densidade de células por centímetro quadrado (20 cel/cm^2 e 10000 cel/cm^2), separamos as células em três grupos distintos: células com alta migração, células com baixa migração e células que apresentam muita variação de forma. À partir destes grupos determinamos a distribuição das velocidades das células que são apresentados à seguir:

B.1.1 Alta migração



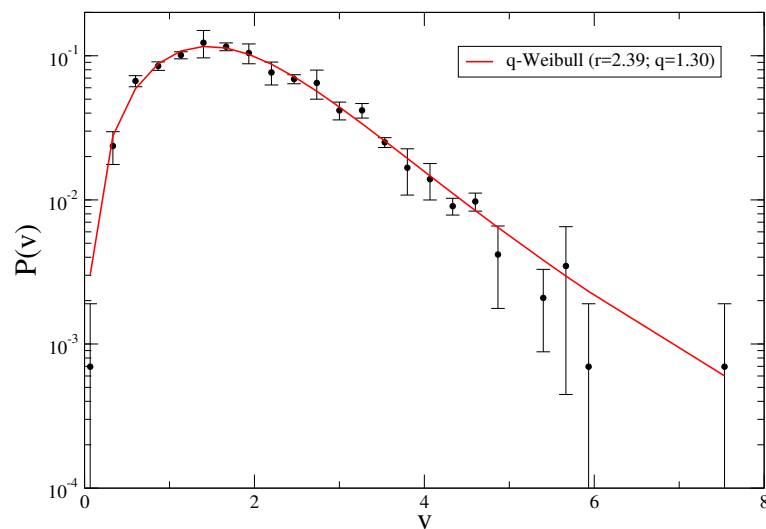
(a)



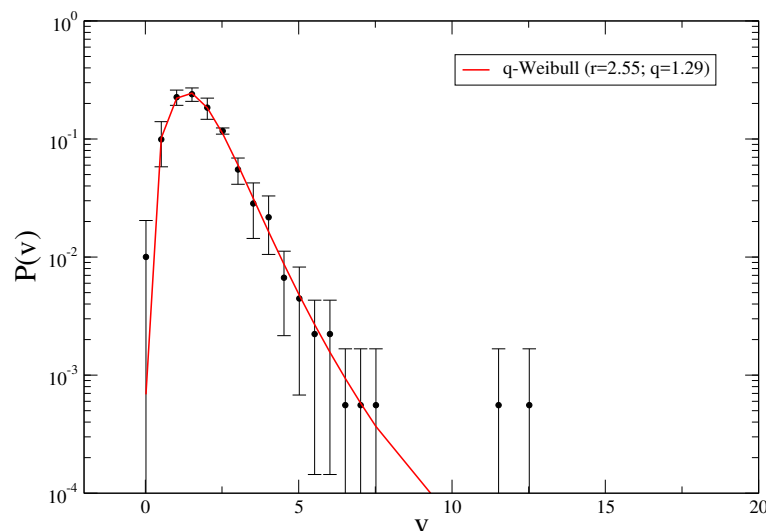
(b)

Figura B.1: Distribuição das densidades de probabilidade das velocidades $P(v)$ em função da velocidade $v(\mu\text{m}/\text{min})$ para um grupo de células com alta migração. Os símbolos pretos representam o conjunto de dados experimentais e a curva vermelha representa o ajuste da distribuição q-Weibull. (a) densidade de 20 cel/cm^2 e (b) densidade de 10000 cel/cm^2 .

B.1.2 Baixa migração



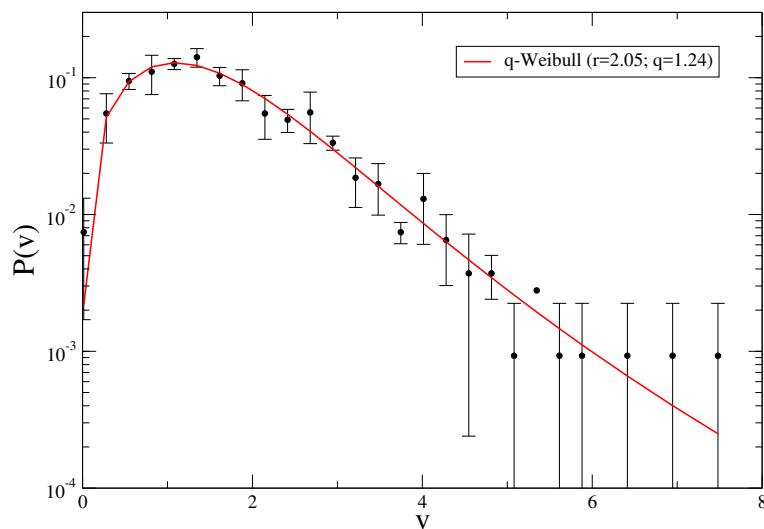
(a)



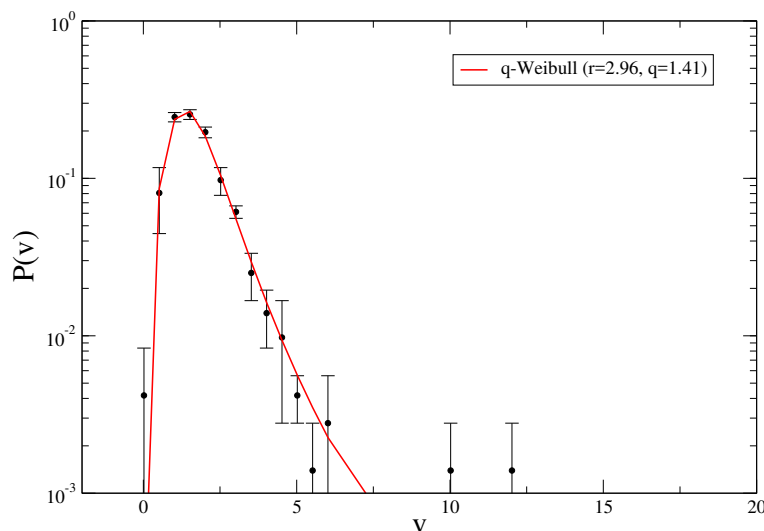
(b)

Figura B.2: Distribuição das densidades de probabilidade das velocidades $P(v)$ em função da velocidade $v(\mu m/min)$ para um grupo de células com baixa migração. Os símbolos pretos representam o conjunto de dados experimentais e a curva vermelha representa o ajuste da distribuição q-Weibull, q e r são os parâmetros obtidos com a q-Weibull. (a) densidade de $20\text{ cel}/\text{cm}^2$ e (b) densidade de $10000\text{ cel}/\text{cm}^2$.

B.1.3 Muita variação de forma



(a)



(b)

Figura B.3: Distribuição das densidades de probabilidade das velocidades $P(v)$ em função da velocidade $v(\mu m/min)$ para um grupo de células com muita variação de forma. Os símbolos pretos representam o conjunto de dados experimentais e a curva vermelha representa o ajuste da distribuição q-Weibull, q e r são os parâmetros obtidos com a q-Weibull. (a) densidade de $20\text{ cel}/\text{cm}^2$ e (b) densidade de $10000\text{ cel}/\text{cm}^2$.

B.2 Deslocamento quadrático médio

Observamos em nossas análises que dentro de uma mesma densidade celular algumas células apresentam comportamento migratório oscilatório (as células giram em torno de suas

posições iniciais), enquanto outras apresentam uma certa persistência em uma dada direção. Com isso, separamos dois grupos distintos de células para as densidades de $20 \text{ cel}/\text{cm}^2$ e $10000 \text{ cel}/\text{cm}^2$, são eles:

B.2.1 Células com comportamentos oscilatórios

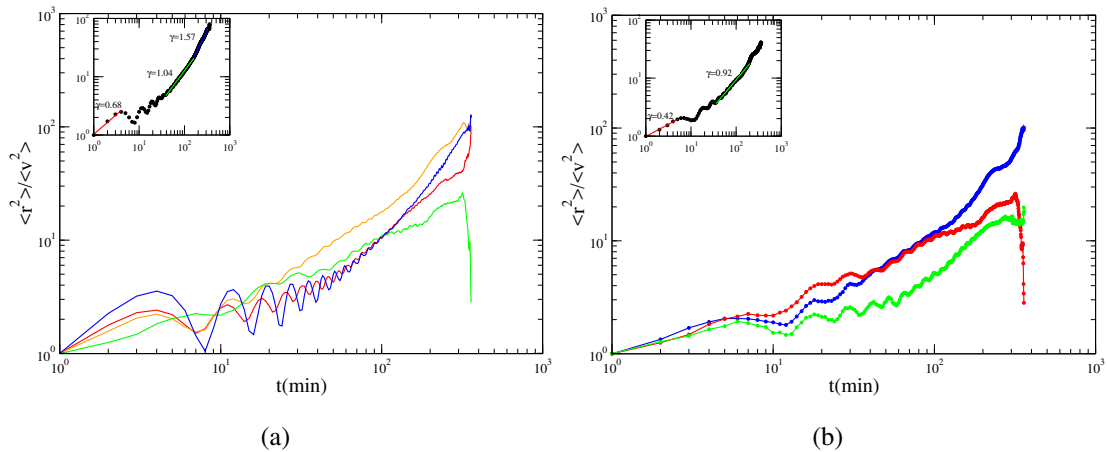


Figura B.4: Razão entre o deslocamento quadrático médio e velocidade média ao quadrado em função do tempo em minutos considerando um grupo de células com comportamento migratório oscilatório. Cada curva colorida representa uma única célula. No insert, a curva preta representa a média dessa razão para todas as células e as linhas em vermelho, verde e azul representam ajustes com uma função do tipo lei de potência. (a) Densidade de $20 \text{ cel}/\text{cm}^2$ e (b) densidade de $10000 \text{ cel}/\text{cm}^2$.

B.2.2 Células com comportamentos persistentes

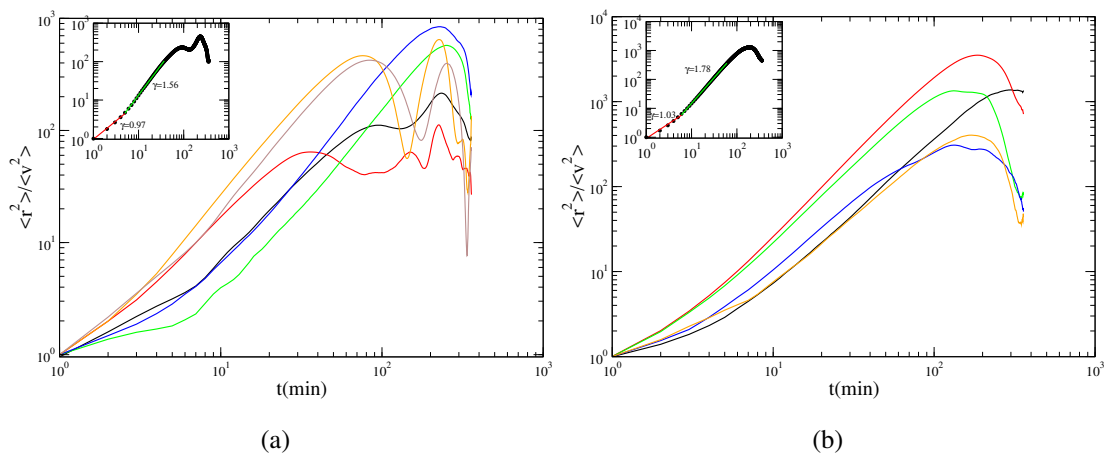


Figura B.5: Razão entre o deslocamento quadrático médio e velocidade média ao quadrado em função do tempo em minutos considerando um grupo de células com comportamento migratório persistente. Cada curva colorida representa uma única célula. No insert, a curva preta representa a média dessa razão para todas as células e as linhas em vermelho e verde representam ajustes com uma função do tipo lei de potência. (a) Densidade de 20 cel/cm^2 e (b) densidade de 10000 cel/cm^2 .

Observamos que células com comportamento oscilatório apresentam uma migração subdifusiva para tempos longos, enquanto que células com comportamento migratório persistente apresentam uma superdifusão.

Para mais detalhes acesse S1 PDF no link: http://www.posfisicaaplicada.ufv.br/?page_id=2714

Apêndice C

**Artigo - Anomalous diffusion and
q-Weibull velocity distributions in
epithelial cell migration**

RESEARCH ARTICLE

Anomalous diffusion and q-Weibull velocity distributions in epithelial cell migration

Tatiane Souza Vilela Podestá¹✉, Tiago Venzel Rosembach¹✉, Anésia Aparecida dos Santos², Marcelo Lobato Martins^{1,3}*

1 Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, **3** National Institute of Science and Technology for Complex Systems, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

* mmartins@ufv.br



OPEN ACCESS

Citation: Souza Vilela Podestá T, Venzel Rosembach T, Aparecida dos Santos A, Lobato Martins M (2017) Anomalous diffusion and q-Weibull velocity distributions in epithelial cell migration. PLoS ONE 12(7): e0180777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777>

Editor: Miklos S. Kellermayer, Semmelweis Egyetem, HUNGARY

Received: February 17, 2017

Accepted: June 21, 2017

Published: July 10, 2017

Copyright: © 2017 Souza Vilela Podestá et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received funding for this work from FAPEMIG (APQ-04232-10 and APQ-02710-14), CNPq (306024/2013-6 and 400412/2014-4), and CAPES (Podestá and Venzel graduate fellowships).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

In multicellular organisms, cell motility is central in all morphogenetic processes, tissue maintenance, wound healing and immune surveillance. Hence, the control of cell motion is a major demand in the creation of artificial tissues and organs. Here, cell migration assays on plastic 2D surfaces involving normal (MDCK) and tumoral (B16F10) epithelial cell lines were performed varying the initial density of plated cells. Through time-lapse microscopy quantities such as speed distributions, velocity autocorrelations and spatial correlations, as well as the scaling of mean-squared displacements were determined. We find that these cells exhibit anomalous diffusion with q-Weibull speed distributions that evolves non-monotonically to a Maxwellian distribution as the initial density of plated cells increases. Although short-ranged spatial velocity correlations mark the formation of small cell clusters, the emergence of collective motion was not observed. Finally, simulational results from a correlated random walk and the Vicsek model of collective dynamics evidence that fluctuations in cell velocity orientations are sufficient to produce q-Weibull speed distributions seen in our migration assays.

Introduction

Cell migration is a dynamic and complex process guided by a vast array of chemical and physical signals [1]. All nucleated cell types migrate at least during a given period of their development. In multicellular organisms, the regulation of cell motility is central in all morphogenetic processes, tissue maintenance, wound healing and immune surveillance [2]. Its failure potentiates numerous diseases, including inflammation, cardiovascular disease, cancer metastasis and various birth defects [3]. On the other hand, the major goal of regenerative medicine, which is the creation of artificial tissues and organs through the colonization of biomaterials by cells, requires the control of their organization, communication and movements [4]. So, it is imperative to characterize how cells move *in vitro* and *in vivo* to understand the mechanisms that govern cell motile behavior.

Besides their biological relevance, motile cells constitute a preeminent topic of interest in the physics of active systems [5, 6]. The self-propelled, stochastic and nonlinear motions of active interacting particles generate collective dynamics, patterns on mesoscopic scales, and unusual mechanical and rheological properties that are fundamentally different from those observed in ordinary matter (purely passive gases, liquids or solids) at thermal equilibrium. Understanding the general principles that enable active agents to generate internal forces that control and direct their own motion and that of their surroundings is imperative to develop not only a theoretical description of living matter, but also a framework for a systematic engineering of biomimetic materials exhibiting actively driven far-from-equilibrium properties.

From the statistical physicist stand point, individual cell migration can be mapped on a search process for targets (e. g., nutrients, growth factors and chemokines), which can be detected by the cell only within a limited spatial range [7]. In the absence of external gradients of such cues, motile cells perform random walks whose characteristic features probably reflect some of the molecular and subcellular mechanisms that regulate their migration phenotype. Hence, the systematic analysis of experimental time series for trajectories of migrating cells will yield much quantitative information for generate cell-type specific motility models. These “macroscopic” models of cellular behavior integrated with “microscopic” descriptions of the dynamics involving integrin binding to extracellular ligands, actin polymerization and generation of traction forces by myosin II [8] will constitute the systems biology of cell motility.

In this context, the movement of several cell types, from unicellular to multicellular organisms, were characterized. The data confirm that most cells diffuse anomalously. Indeed, cells commonly migrate with a directional persistence generating correlated random walk patterns [9]. This is the case, for instance, of *Dictyostelium* [10, 11], Hydra [12], and human mammary epithelial [13] cells, fibroblasts and keratinocytes [14]. Some of these cells [10, 14, 15] exhibit non-Gaussian speed distributions, in contrast to the Ornstein-Uhlenbeck process [16], maybe the simplest and most popular model for persistent random walks. Furthermore, micro-organisms and cells of the immune system can perform Lévy walks, a special case of superdiffusion in which the distribution of step lengths has infinite variance [17]. So, for example, the dinoflagellate *Oxyrrhis marina* executes Lévy flights when its prey decreases in abundance [18]. Also, the movement of CD8⁺ T cells in the brains of mice infected by *Toxoplasma gondii* is well described by an intermittent Lévy walk [19]. However, T and B cells migrate within intact lymph nodes by a normal random walk [20]. Summarizing, the motion of cells is rich in variety and no single universal search strategy fits to all cell types and environmental conditions.

In the present paper, we performed individual cell migration assays on plastic 2D surfaces using normal and tumoral epithelial cells plated at distinct initial densities and in conditions free from any biasing cues. Experimental time series for trajectories of migrating cells were recorded by time-lapse microscopy. We then determined speed, displacement, and turn angle distributions within these trajectories, as well as velocity autocorrelation functions. We also examined from spatial velocity correlations whether these cells execute exhibit neat cues for collective motion.

Materials and methods

Cell culture

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, an immortalized epithelial cell line (Cell Bank, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and B16F10 cells, derived from a

murine melanoma (Pharmacology Department, Minas Gerais Federal University, Belo Horizonte, MG, Brazil) were used. These cells were cultured in 25 cm², 60 ml flasks (Techno Plastic Products AG 90025) at 37°C with 5% of CO₂ in Dulbecco's Minimum Essential Medium (high glucose Sigma Aldrich) at 7–7.2 pH, supplemented with 10% fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 i.u./ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 2.5 ng/ml amphoterycin B, and 262 mM sodium bicarbonate.

Cells were sparsely seeded on either the plastic surface growth of the flasks or on the glass bottom of µ-Dish^{35mm,high} plates (Ibid). Distinct numbers $N = 500, 2500, 50,000,$ and $250,000$ cells, corresponding to densities of 20, 100, 2000, and 10,000 cells per cm² were plated on the plastic surfaces. In turn, $N = 5000$ and $50,000$ cells were plated on the glass surfaces, corresponding to densities of 1190 and 11,900 cells per cm². All migration assays had 3 biological replicates and were performed without any externally established chemo-attractant gradients.

Time lapse microscopy

Cell displacements were tracked via an inverted Nikon TS 100 phase-contrast microscope equipped with a CCD camera (JAI CM 140 GE) and a 10× 0.3 NA objective. Data were collected at a resolution of 1 pixel = 0.48 µm² from a fixed imaged field with 1392 × 1040 pixels. Imaging started 8 hours after cell plating with a video-microscopy sampling interval of 1 min and typically last for 6 h. The 8 h period ensures complete cell adhesion to the plastic substrate. Only cells that did not adhere to other cells, or undergone division or death or moved out of the imaged field were included in the analysis. The number of cells filtered for tracking procedure was at least $N = 10$ for every cell line and initial densities plated.

Large-field-of-view images for investigate possible collective cell migration were obtained by stitching together 30 fields acquired with 20× objectives using a Nikon IMq-Biostation and µ-Dish^{35mm,high} plates. The size of a large-field was roughly 2511 × 1557 µm, corresponding to a resolution of 3840 × 2400 pixels (1 pixel = 2.33 µm²). Typically, around 50 and 430 cells were observed per large-field at the densities tested, namely, 119 and 11,900 cells per cm². The time between two successive images of these large-fields was set to 5 min. and the experiments last for 12 h.

Data analysis

For each cell trajectory $\vec{r}(t)$, the positions \vec{r}_i of the cell centroid at the times $t_i = i\Delta t$ ($i = 1, 2, \dots, 360$), were recorded. The corresponding velocities were calculated as $\vec{v}_i = (\vec{r}_i - \vec{r}_{i-1})/\Delta t$. From these data, velocity distributions and autocorrelation functions, as well as the probability distributions of the turn angles within cell trajectories were determined.

The speed distribution $p(v)$ was defined as the fraction of velocity data points with speed v binned between $k\Delta v$ and $\Delta v = (v_{max} - v_{min})/k_{max}$, where k was varied from 0, 1, . . . , k_{max} . As in reference [21], $k_{max} = 30$ was empirically chosen aiming to generate the largest number of bins, each one containing statistically significant sample of data points. Then, the distribution $p(v)$ was built as a histogram with a fixed bin size $\Delta v = (v_{max} - v_{min})/30$. For comparison, distinct values for k_{max} were tested (see S1 PDF).

The velocity autocorrelation function defined as

$$c_v(\tau) = \frac{1}{N - k} \sum_{i=1}^{N-k} \frac{\vec{v}(t_i + \tau) \cdot \vec{v}(t_i)}{\langle \vec{v}(t)^2 \rangle} \tag{1}$$

where N is the total number of data points and $k = \tau/\Delta t$ is the number of sampling intervals

associated to the time lapse τ considered. As in references [10] and [21], $c_v(\tau)$ was calculated for each trajectory as

$$c_v(\tau) = \frac{\frac{1}{N-\tau-1} \sum_{i=1}^{N-\tau} \left(\vec{v}_i - \frac{1}{N-\tau} \sum_{j=1}^{N-\tau} \vec{v}_j \right) \cdot \left(\vec{v}_{i+\tau} - \frac{1}{N-\tau} \sum_{j=\tau+1}^N \vec{v}_j \right)}{\left[\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\vec{v}_i - \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \vec{v}_j \right)^2 \right]} \quad (2)$$

in order to minimize the effects of bias and noise on time-lapse recorded positions which otherwise leads to a negative c_v at small τ values.

The turn angle distribution $p(\alpha)$ was defined as the fraction of trajectory steps for which their instantaneous turn angle α_i lies between $k\Delta\alpha$ and $(k+1)\Delta\alpha$ relative to their previous steps. The turn angle is $\alpha_i = \theta_i - \theta_{i-1}$, where θ_i is the orientation of the displacement i , $\Delta\vec{r}_i \equiv \vec{r}_i - \vec{r}_{i-1}$, relative to the horizontal axis. A histogram for the turn angles with a bin size $\Delta\alpha = (\alpha_{max} - \alpha_{min})/50$ were built. As in reference [21], $n = 50$ was empirically chosen as the number of bins, each one containing a significant sample of data points.

We analyzed if the cellular migration exhibits alternating modes (directional and re-orientation phases). Here, we adopted the following mode definition [13, 21]. From the turn angles $\alpha(t_i)$ of an individual cell trajectory and a chosen threshold value α^* , a directional "flight" starts at a time point t_i if at least $n > 1$ successive steps have $\alpha(t_j) < \alpha^*$, $j = i + 1, \dots, i + n$. In turn, a re-orientation flight begins at t_i if $n > 1$ successive time steps have $\alpha(t_j) \geq \alpha^*$. The values $\alpha^* = 15^\circ, 30^\circ$ and 45° were chosen. Once the migration modes have been defined, their distributions of flight lengths were determined as the fraction of flights with contour lengths l . The contour length l of a flight starting at a time point t_i is defined as the total distance it traverses. Therefore, $l = \sum_{j=1}^n |\vec{r}_{i+j} - \vec{r}_{i+j-1}|$, where n is the number of steps comprising the flight.

In searching for possible coordinated motions, the cell velocity fields in large-field images were used to calculate the two-dimensional orientational order parameter, the spatial pair and velocity correlation functions. The orientational order parameter is defined as

$$\xi = \left| \frac{1}{N} \sum_i \hat{v}_i \right|, \quad (3)$$

where \hat{v}_i is the unit velocity vector of the cell i and $\langle \dots \rangle$ represents the average over all cells. In turn, the spatial pair correlation function is expressed as

$$g(x, y) = \frac{1}{\rho} \left\langle \sum_{j \neq i} \delta(|x\hat{x} + y\hat{y} - (\vec{r}_i - \vec{r}_j)|) \right\rangle_i, \quad (4)$$

where δ is the Dirac function, $\rho = N/A$ is the area cell density, and $\langle \dots \rangle_i$ is the average over all reference cells i . Finally, the spatial velocity correlation function is given by

$$c_v(\vec{r}) = \frac{\langle (\hat{v}_i \cdot \hat{v}_j) \delta[x\hat{x} + y\hat{y} - (\vec{r}_i - \vec{r}_j)] \rangle_{ij}}{\langle \delta[x\hat{x} + y\hat{y} - (\vec{r}_i - \vec{r}_j)] \rangle_{ij}} \quad (5)$$

where \vec{r} is the vector of coordinates (x, y) , and $\langle \dots \rangle_{ij}$ is the average over all possible cell pairs.

Results

Individual cell migration

In Fig 1 typical trajectories for B16F10 cells cultured on monolayers plated at distinct densities are shown. From them speed distributions were determined. As illustrated in Fig 2, the speeds

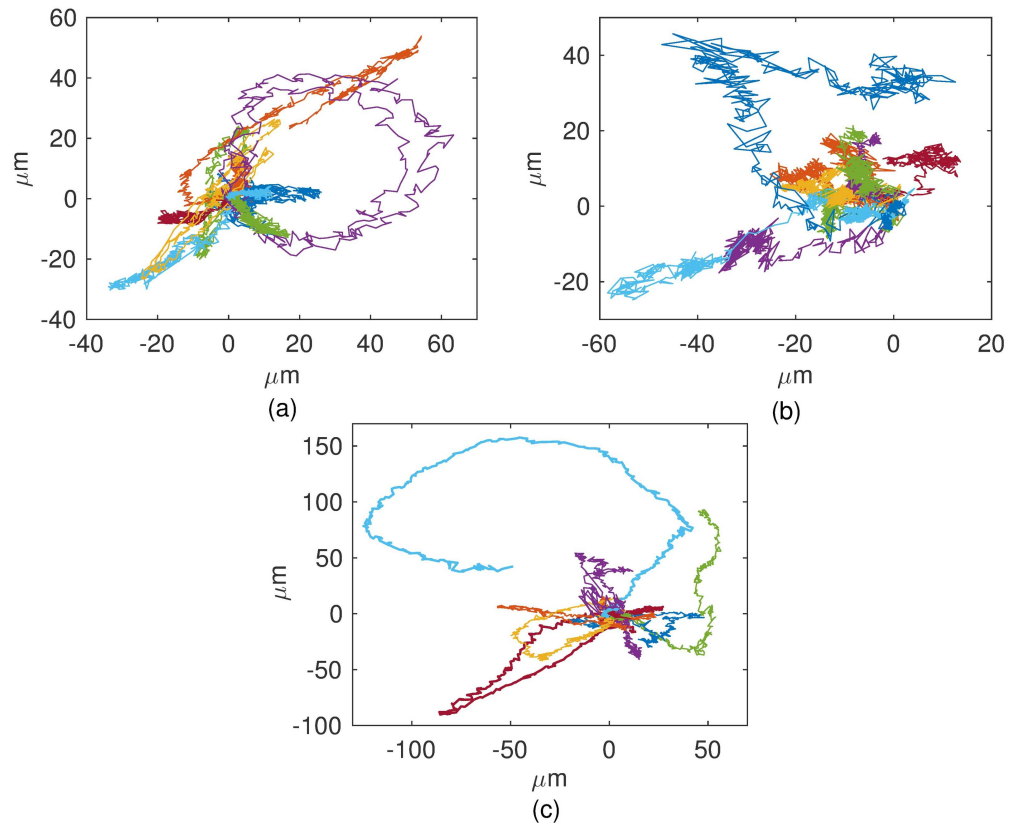


Fig 1. Typical migration tracks of B16F10. Cells on 2D plastic substrates plated at (a) 20, (b) 2000, and (c) 10000 cells per cm². The trajectories were produced by time-lapse recording of cells every 1 min and plotted from the origin.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g001>

of B16F10 melanocytes are best fitted by q-Weibull distributions [22] expressed by the formula

$$P_{qw}(x) = p_0 \frac{rx^{r-1}}{x_0^r} \exp_q \left[- \left(\frac{x}{x_0} \right)^r \right], \tag{6}$$

where $\exp_q(-x) \equiv [1 - (1 - q)x]^{1/(1 - q)}$ is the q-exponential [23]. Note that for $r = 1$ and $q \neq 1$ the q-exponential is recovered, whereas in the limit $q \rightarrow 1$ with $r \neq 1$ or $r = 1$ the Weibull or the exponential distributions, respectively, are obtained [22]. The values of q and r obtained for B16F10 cells are listed in Table 1.

Independently of fitting protocols, the skewness s and kurtosis κ of the speed distributions can be calculated from the raw data for cell speeds. These quantities, defined as

$$s = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}} \text{ and } \kappa = \frac{\mu_4}{\mu_2^2} - 3, \tag{7}$$

where $\mu_2, \mu_3,$ and μ_4 are, respectively, the second, third, and fourth moments of the distributions, provide relevant information to guide curve fitting. For B16F10 cells, the values obtained for s and κ are listed in Table 1. As one can see, these values correspond to asymmetric and leptocurtic speed distributions, hence excluding the Gaussian and q-Gaussian distributions, both symmetric. Consequently, the present analysis points out to a correction in our previous result,

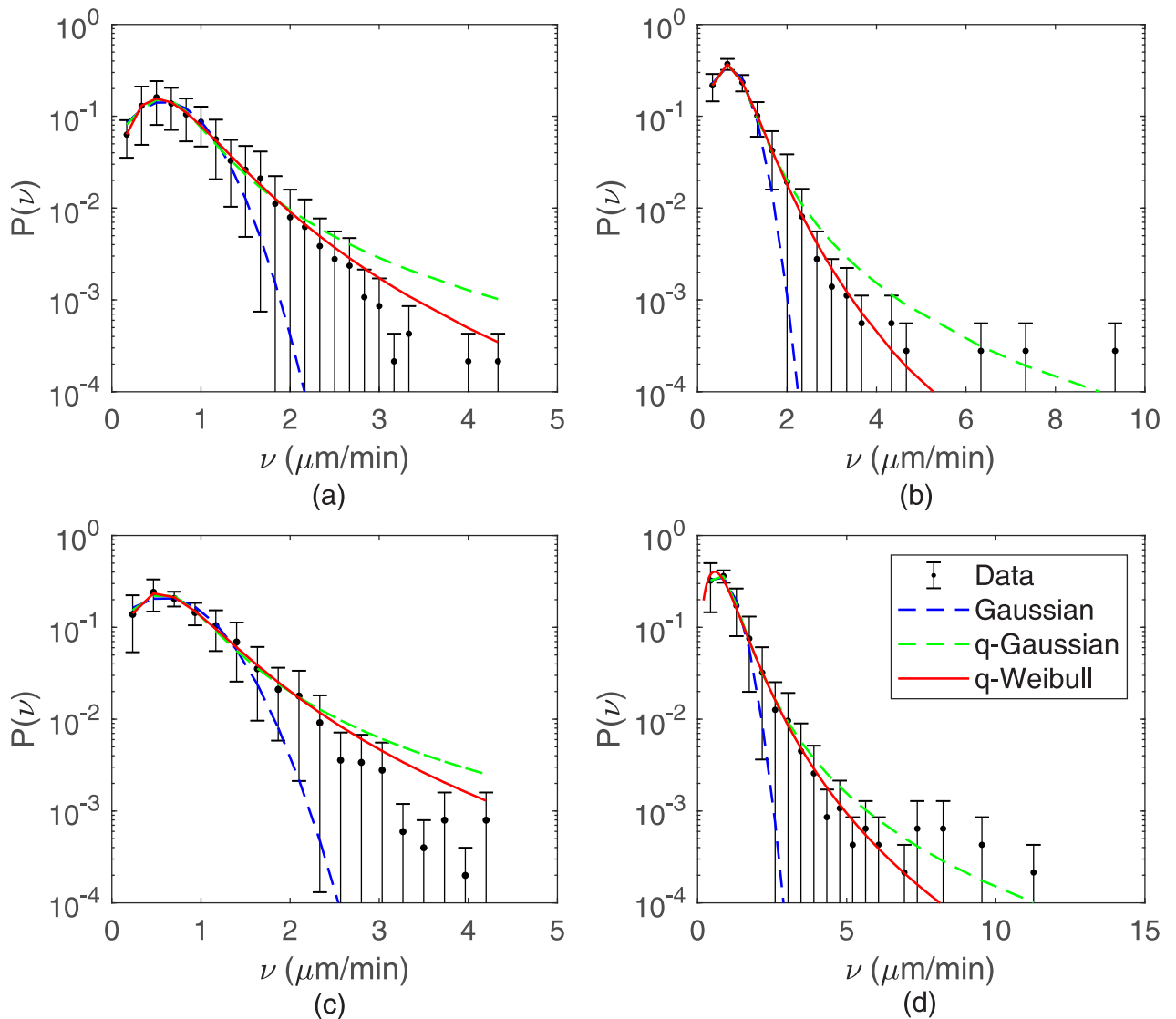


Fig 2. Ensemble speed distributions for B16F10. Cells plated at densities of (a) 20, (b) 100, (c) 2000, and (c) 10000 cells per cm^2 . The solid curves are q-Weibull fits to data. For comparison, Gaussian and q-Gaussian distributions fitted to data are shown (dashed curves). The velocities for every individual cell were merged to form single large data sets. Other values than $k_{max} = 30$ were used to fix the speed bin size, generating very similar speed distributions (see [S1 PDF](#)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g002>

Table 1. Table with some values obtained by adjustments.

B16F10 density	q	r	s	κ	γ_e	q_{c_v}
20 cells/ cm^2	1.42 ± 0.08	2.38 ± 0.10	1.01 ± 0.30	1.52 ± 0.90	1.50 ± 0.03	2.62 ± 0.30
100 cells/ cm^2	1.37 ± 0.02	2.77 ± 0.02	1.27 ± 0.50	0.43 ± 0.40	1.44 ± 0.02	2.11 ± 0.03
2000 cells/ cm^2	1.40 ± 0.09	2.28 ± 0.20	1.14 ± 0.20	1.68 ± 0.60	1.21 ± 0.02	2.15 ± 0.20
10000 cells/ cm^2	1.37 ± 0.03	2.20 ± 0.08	1.16 ± 0.20	2.46 ± 0.80	1.66 ± 0.03	2.34 ± 0.30

Parameters q and r characterizing the q-Weibull cell speed distributions, their skewnesses s and kurtoses κ , and exponents γ_e , the slopes of the empirical power-law fittings to average $\langle r^2 \rangle$ curves. Also, the q_{c_v} values used for fitting velocity autocorrelations c_v are listed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.t001>

contained in reference [21], according which normal (Melan A) and tumoral (B16F10) melanocytes migrate in monolayer culture exhibiting q-Gaussian speed distributions.

The anomalous character of B16F10 migration is confirmed by the scaling in time of the mean-squared displacement given by

$$\langle r^2 \rangle \sim t^\gamma \tag{8}$$

with $\gamma \neq 1$. In Fig 3 are shown log-log plots of mean-squared displacements for distinct individual cells as functions of time. Power-law fittings to empirically chosen linear portions of the average $\langle r^2 \rangle$ curves were drawn (dashed lines) and their slopes γ_e indicated. In the insets, we have fitted the whole set of experimental data for the average mean-squared displacements by using a nonextensive statistics scenario in which a crossover between two different power-laws

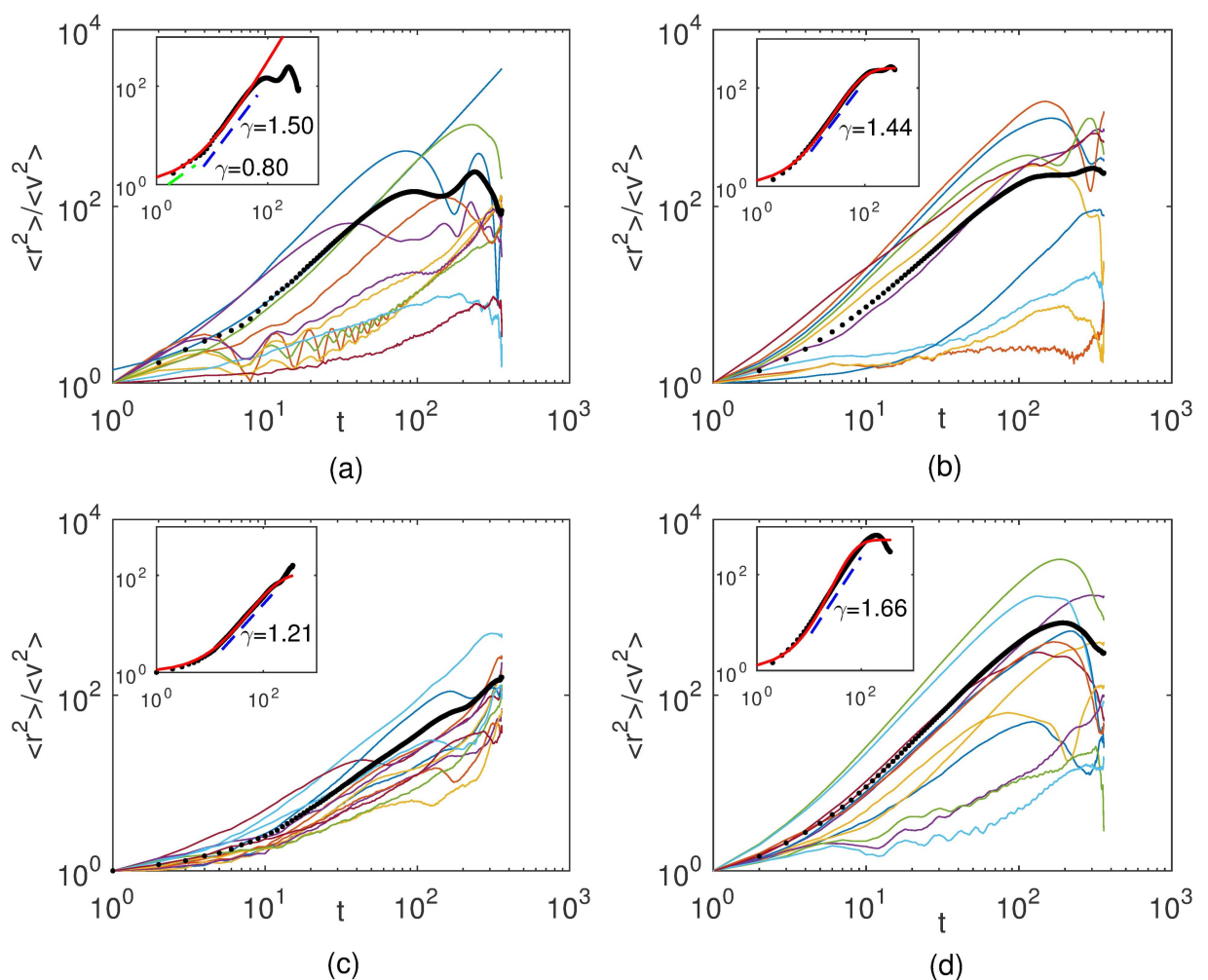


Fig 3. Mean-squared displacements $\langle r^2 \rangle$ as functions of time for B16F10. Cells plated at (a) 20, (b) 100, (c) 2000, and (c) 10000 cells per cm^2 . The color curves correspond to distinct cell trajectories. The thick black curve is the average of all trajectories. The dashed lines are power law fits to data whose slopes provide the exponents γ characterizing the migratory regimes. Mean-squared displacements were divided by $\langle v^2 \rangle$ in order to put in the same scale cells with very distinct motilities. Insets: Average mean-squared displacements fitted by Eq (9). A crossover in time from a normal to a superdiffusive regime is indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g003>

is assumed [21, 24]. Specifically, if $x \equiv \langle r^2 \rangle$ satisfy the equation

$$\frac{dx}{dt} = \mu_1 x + (\mu_2 - \mu_1)x^\lambda,$$

$\mu_1 < \mu_2$, its solution

$$x = \left[1 - \frac{\mu_2}{\mu_1} + \frac{\mu_2}{\mu_1} e^{(1-\lambda)\mu_1 t} \right]^{\frac{1}{1-\lambda}} \tag{9}$$

provides the parameters μ_1 , μ_2 , and λ for fitting the experimental data. The red curves shown in the insets correspond to such fits and their parameter values are listed in Table 1. Its worth to notice that the nonextensive fittings become worse at the lowest densities tested. Indeed, for 20 cells/cm², a sharp change from one to another power-law is observed

In Fig 4 are shown our experimental results for the velocity autocorrelation functions determined through Eq (2). B16F10 cells exhibit velocity correlations decaying q-exponentially in

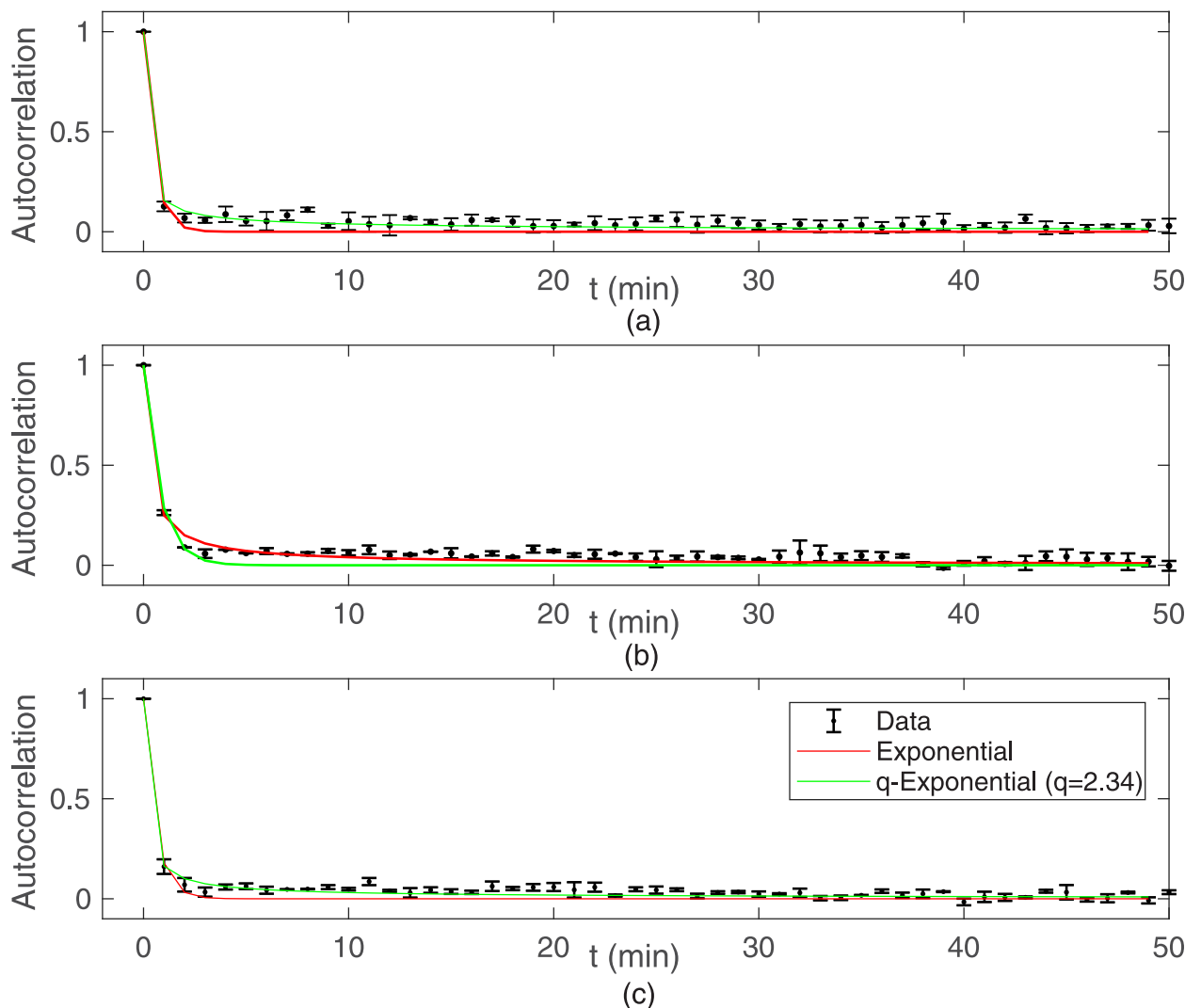


Fig 4. Velocity autocorrelation functions for B16F10. Cells plated at (a) 20, (b) 2000, and (b) 10000 cells per cm². Velocities were defined as (displacement vector)/(time-lapse) for each cell track.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g004>

time with very short characteristic time scales, typically $\sim 0.5 - 0.7$ min, for all densities plated. The q_c values obtained by fitting velocity autocorrelation c_v with q-exponentials are listed in Table 1.

As done in reference [21], every individual cell track was subdivided into directional and reorientation “flights”. The former (latter) are comprised of successive displacements whose turn angles are always smaller (greater) than a fixed threshold [13]. Our results, illustrated in Fig 5, reveal that both flight types are exponentially distributed for turn angle thresholds α^* ranging from $15^\circ - 45^\circ$. The directional flights have smaller characteristic number of steps than reorientation flights and, consequently, shorter characteristic contour lengths l^* .

Similar results were found for the migration of MDCK cells, as shown in Fig 6. Since these cells exhibit a greater motility than B16F10 cells, they were tested for the emergence of collective migration. Nevertheless, of special relevance is the complex behavior of the mean squared

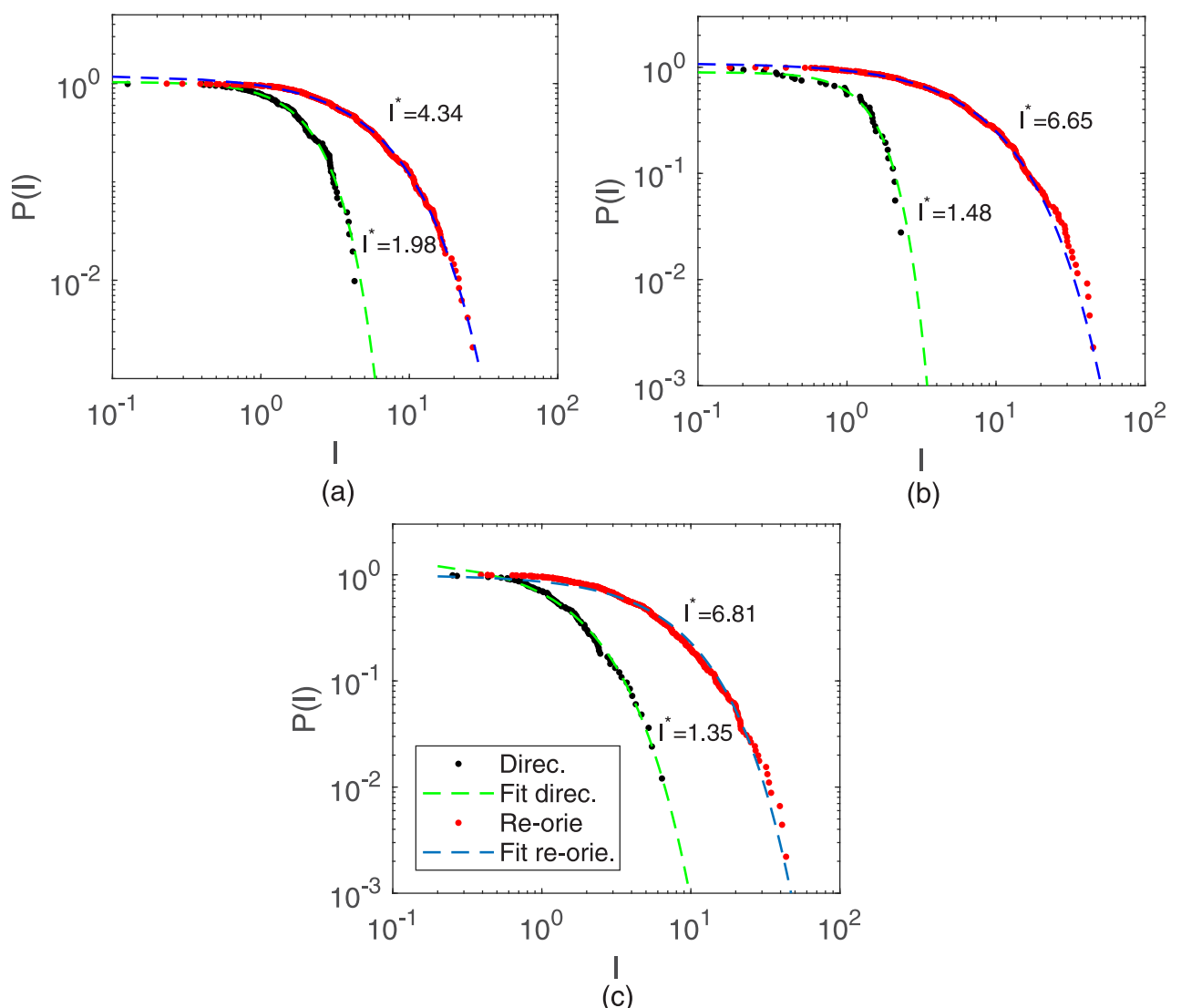


Fig 5. Cumulative distributions of flight lengths for B16F10. Cells plated at (a) 20, (b) 2000, and (c) 10000 cells per cm^2 . A threshold $\alpha^* = 30^\circ$ was used. The continuous curves correspond to exponential fittings to the data with characteristic contour lengths l^* .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g005>

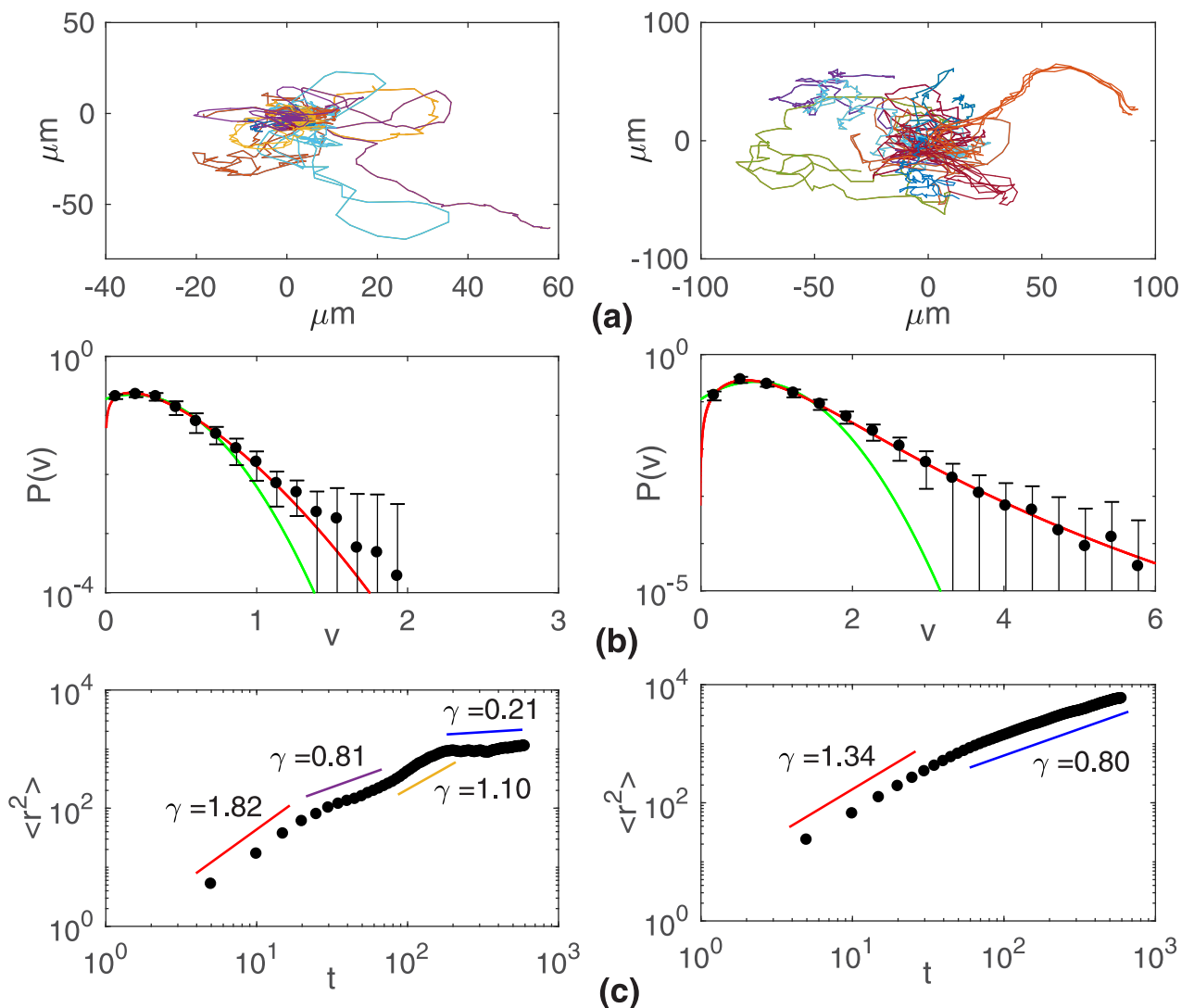


Fig 6. Migratory traits of MDCK. Cells plated at 1190 (left) and 11,900 (right) cells per cm^2 . (a) Typical cell tracks, (b) speed distributions, and (c) mean-squared displacements (r^2). As for B16F10 cells, q-Weibull speed distributions and anomalous diffusive motion are observed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g006>

displacement exhibited by MDCK cells (see Fig 6(c)). At low density, sub- and superdiffusive regimes alternate in time, a trait not observed in B16F10 cells.

Searching for collective migration

Fig 7 illustrates the evolution in time of the order parameter ξ , defined in Eq (3). At the two densities tested, the emergence of a coherent dynamics of MDCK cells characterized by a long-range alignment of their velocities seems to be elusive. At most, the very small, but non vanishing values of ξ can suggest that the system is bordering the transition point. However, the existence of short-ranged, high-ordered moving clusters is still possible.

In the quest for local correlations among individual cell motions, both the pair $g(x, y)$, defined in Eq (4), and the spatial velocity correlation functions, defined in Eq (5), respectively, were computed. The pair correlation function $g(x,y)$ quantifies the probability per unit area

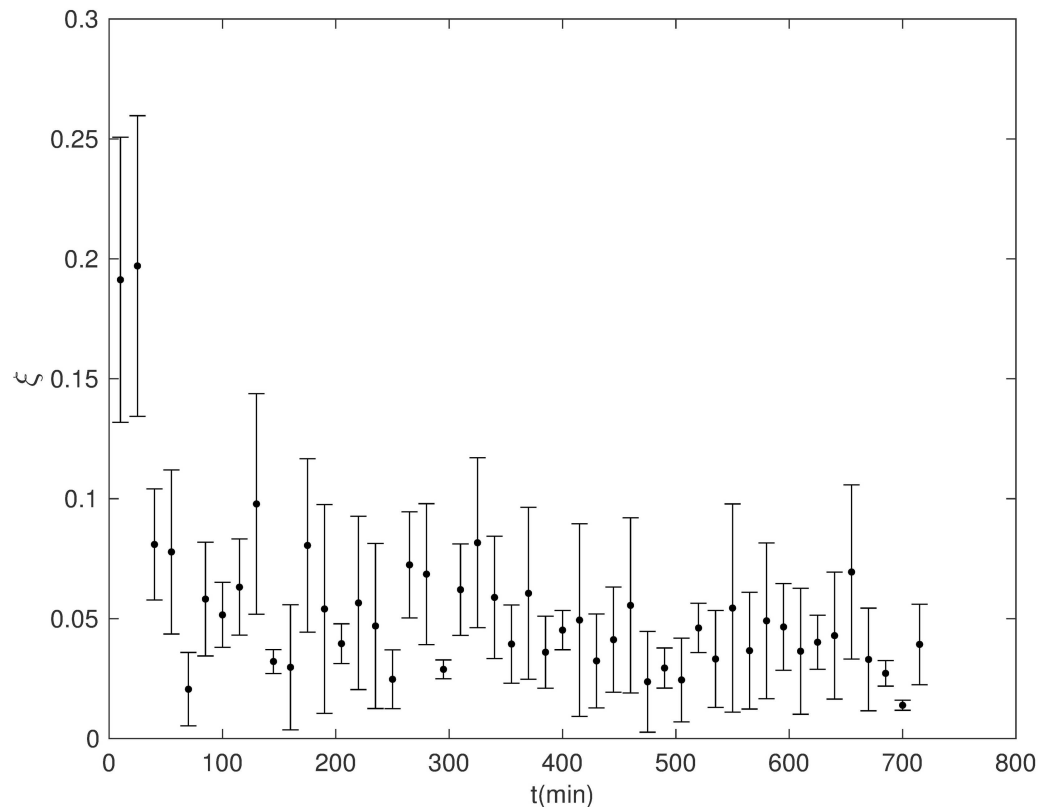


Fig 7. Evolution in time of the order parameter ξ for MDCK. Cells plated at 11,900 cells per cm^2 . The small ξ values indicate the absence of a long-range ordered cell migration.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g007>

(normalized by the area density ρ) of finding another cell at the location $\vec{x} = (x, y)$ away from the reference cell. The results for $g(x, y)$ are shown in Fig 8(a). Larger correlations are observed only at short distances $l \sim 14 \mu\text{m}$, roughly the diameter of a single cell, and at the higher density tested. Thus, MDCK cells can form small clusters in which a cell is positioned very close to a nearest neighbor. Cluster size distribution functions decaying as stretched exponentials with small characteristic sizes (of the order of 1.12 cells) provide further support to those findings (data not shown). Additionally, the spatial velocity correlation function $c_v(x, y)$ quantifies the similarity between the unit velocities (measured by their scalar product) of two cells separated by the vector $\vec{x} = (x, y)$ at the time t . The results for $c_v(x, y)$ are shown in Fig 8(b). For the two densities, there is evidence of significant correlation in velocity between close neighbor cells. This observation is consistent with the possibility, raised by $g(x, y)$, of small dynamical clusters to form, within which cell motions are significantly correlated.

Simulational tests

Concerning the origin of the q-Weibull distributions for cell speeds, we focused on a major trait of cell migration: persistence. Its effect on minimal models of single and collective cell motion was studied through computer simulations. Specifically, two models were considered, namely, a correlated random walk and the Vicsek model [25]. In both cases, N particles are randomly dispersed in a two-dimensional plane substrate and move off-lattice with a constant speed v_0 . The initial direction of motion, specified by the polar angle θ_i , $i = 1, 2, \dots, N$, is

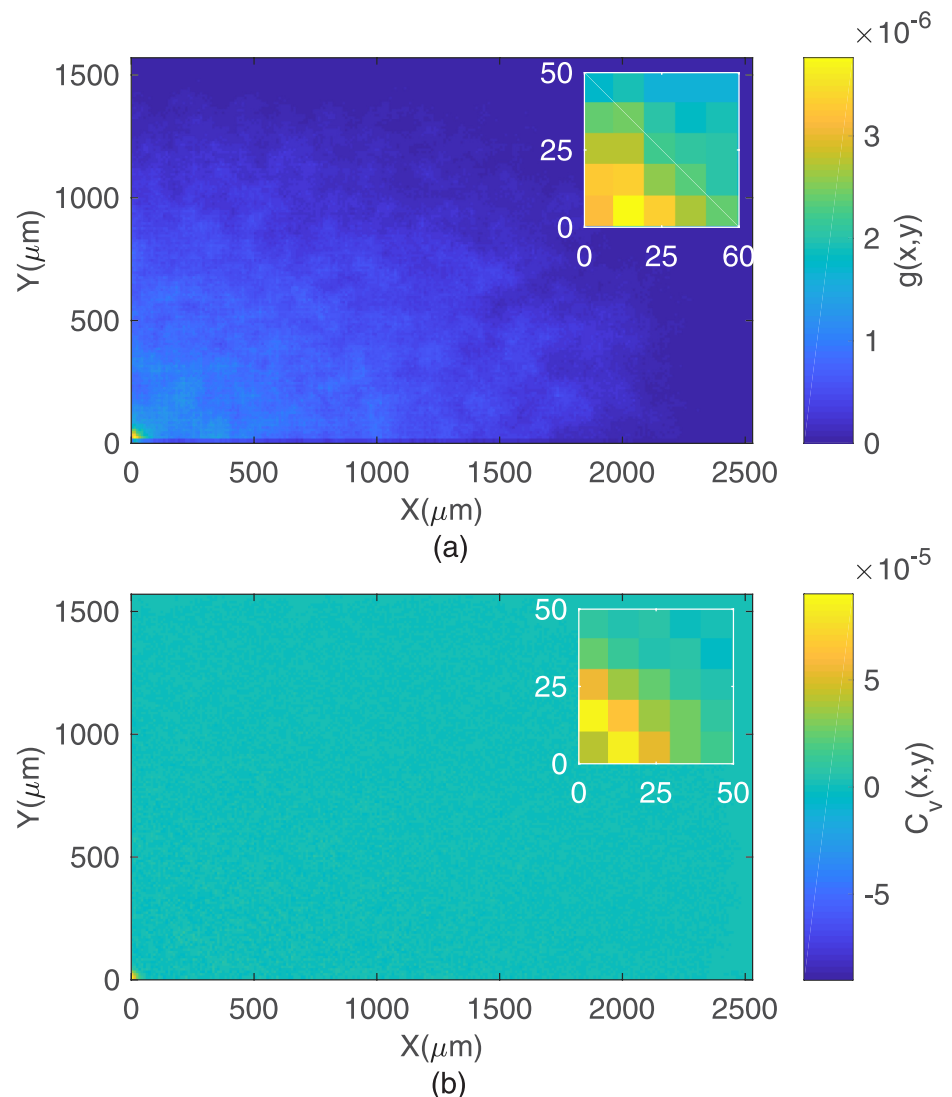


Fig 8. Pair and spatial velocity correlation to MDCK cells. (a) Pair correlation $g(x, y)$ and (b) spatial velocity correlation functions for MDCK cells plated at 11,900 cells per cm^2 , the larger density tested. Significant spatial correlations associated to the formation of small cell clusters are observed only at short distances, as shown in the inset.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180777.g008>

chosen at random. After each time step Δt , every particle changes its direction of motion according to the rule

$$\theta_i(t + \Delta t) = \phi_i(t + \Delta t) + \eta, \tag{10}$$

where $\eta \in [-\xi, +\xi]$ is a white noise with the intensity ξ ranging in the interval $[0, \pi]$. For the correlated random walk model, $\phi_i(t + \Delta t) = \theta_i(t)$, i. e., the polar angle specifying the direction of motion of the particle i at the previous time. In turn, for the Vicsek model,

$$\phi_i(t + \Delta t) = \text{Arg} \left[\sum_{j|r_{ij} \leq r_0} \hat{s}_j(t) \right], \tag{11}$$

where the function *Arg* returns the polar angle specifying the direction of the average vector

Referências Bibliográficas

- [1] J. P. Rieu, A. Upadhyaya, J. A. Glazier, N. B. Ouchi, Y. Sawada; "*Diffusion and deformations of single hydra cells in celular agregates*"; Biophysical Journal, 79, 1903-1914, (2000).
- [2] P. C. A. Silva, T. V. Rosembach, A. A. Santos, M. S. Rocha, M. L. Martins; "*Normal and tumoral melanocytes exhibit q- gaussian randon search patterns*"; PLOS ONE, **9(9)**, 1-13, (2014).
- [3] C. Wang, S. Chowdhury, M. Driscoll, C. A. Parent, S. K. Gupta, W. Losert; "*The interplay of cell-cell and cell-substrate adhesion in collective cell migration*"; Journal of the Royal Society Interface, **11**, 20140684, (2015).
- [4] D. L. Nelson, M. M. Cox; "*Princípios da Bioquímica*"; Quarta edição, (2006).
- [5] B. Alberts, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter; "*Biologia Molecular da Célula*"; Quinta edição, Artmed, (2011).
- [6] H. S. Silva, M. L. Martins, M. J. Vilela, R. Jaeger, B. Kachar; "*If ruffle oscilations in plasma membranes of amphibian epithelial cells under normal and inverted gravitacional orientations*"; Physical Review E, **74**, 041903 (2006).
- [7] Yareni Aguilar Ayala; "*Mecânica e Reologia de células*"; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro- Instituto de Física, (2013).
- [8] G. L. Nicolson; "*The fluid- mosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 yeas*"; Biochimica et Biophysica Acta, **1838**, 1451-1466, (2014).
- [9] B. A. C. C. Pontes; "*Mecânica de Nanotubos de Membrana: Mecanismos de Formação e Funções em Células*"; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro- Instituto de Física, (2011).
- [10] Desai, Arshad, and Timothy J. Mitchison; "*Microtubule Polymerization Dynamics*"; Annual review of cell and developmental biology, **13.1**, 83-117, (1997).

- [11] D. A. Fletcher, R. D. Mullins; "*Cell mechanics and the cytoskeleton*"; NATURE, **463**, (2010).
- [12] H. T. McMahon, J. L. Gallop; "*Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling*"; Nature, **438**, 590-596, (2005).
- [13] P. F. Devaux, A. Herrmann, N. Ohlwein, M. M. Kozlov; "*How lipid flippases can modulate membrane structure*"; Biochimica et Biophysica Acta, **1778.7**, 1591-1600, (2008).
- [14] P. A. Janmey, P. K. J. Kinnunen; "*Biophysical properties of lipids and dynamic membranes*"; Trends in cell biology, **16.10**, 538-546, (2006).
- [15] E. Ungewickell, H. Ungewickell, S. E. H. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martini, L. E. Greene, E. Eisenberg; "*Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles*"; Nature, **378.6557**, 632-635, (1995).
- [16] D. Rainer; "*ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (review)*"; Molecular membrane biology, **20.3**, 197-207, (2003).
- [17] B. Pontes, N. B. Viana, L. T. Salgado, M. Farina, V. Moura Neto, H. M. Nussenzveig; "*Cell Cytoskeleton and teather extraction*"; Biophysical Journal, **101**, 43-52, (2011).
- [18] A. Ruston, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, Gerdes; "*Nanotubular Highways for Intracellular Organelle Transport*"; Science, **303**, 1007-1010, (2004).
- [19] Belting, Mattias, and Anders Wittrup; "*Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease*"; The Journal of cell biology, **183.7**, 1187-1191, (2008).
- [20] F. Hsiung, F. A. W. Ramirez, D. D. Iwaki, T. B. Kornberg; "*Dependence of Drosophila Wing Imaginal Disc Cytonems on Decapentaplegic*"; Nature, **437**, 560-564, (2005).
- [21] J. F. Faucon, M. D. Mitov, P. Mélérd, I. Bivas and Both.; "*Bending Elasticity and Thermal Fluctuations of lipids Membranes. Theoretical and Experimental Requeriments*"; Journal de Physique, **50**, 2389-2414, (1989).
- [22] D. C. Bennet, P. J. Cooper, I. R. Hart; "*A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth*"; International journal of cancer, **393**, (1987).
- [23] R. L. MENDES; "*Morfologia e regimes de crescimento das linhagens celulares derivadas de melanona murino B16F10, primário e metastático, em camundongos BALB/c*"; Universidade Federal de Viçosa, (2011).

- [24] Disponível em <<http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-214-gfp-nih3t3-cell-line.pdf>>. Acesso em 21 de fevereiro de 2017.
- [25] S. R. A. Salinas. "*Introdução à Física Estatística*", EDUSP, (1999).
- [26] P. L. Krapivsky, S. Redner, E. B. Naim. "*A Kinetic View of Statistical*", Cambridge: Cambridge University Press, (2010).
- [27] S. Picoli Jr., R. S. Mendes, L. C. Malacarne; "*q-exponential, Weibull, and q-Weibull distributions: an empirical- analysis*"; *Physica A*, **324**, 678-688, (2003).
- [28] Disponível em <https://en.wikipedia.org/wiki/Q-Gaussian_distribution>. Acesso em 15 de novembro de 2015.
- [29] S. Picoli Jr., R. S. Mendes, L. C. Malacarne, R. P. B. Santos; "*q-distributions in complex systems: a brief review*"; *Brazilian Journal of Physics*, **39**, (2009).
- [30] Disponível em <https://en.wikipedia.org/wiki/Q-Weibull_distribution>. Acesso em 15 de novembro de 2015.
- [31] T.V. Rosembach; "*Migração de células MDCK em cultura: Uma caracterização quantitativa*"; Universidade Federal de Viçosa UFV, (2017).
- [32] L. Li Liang, E. C. Cox., H. Flyvbjerg; "*Dictyostelium Motility as Persistent Random Motion*"; *Physical Biology*, **8**, (2011).
- [33] A. A. Potdar, J. Jeon, A. M. Weaver, V. Quaranta, P. T. Cummings; "*Human mammary epithelial cells exhibit a bimodal correlated random walk pattern*"; *PLOS ONE*, **5(3)**, (2010).
- [34] C. Tsallis, G. Bemsiki, R.S Mendes; "*Is re-association in folded proteins a case of nonextensivity?*"; *Phys. Lett*, **A**, (1999).
- [35] L. Li Liang, S. F. Norrelykke, E. C. Cox. "*Persistent Cell Motion in the Absence of External Signals: A Search Strategy for Eukaryotic Cells*"; *PLOS ONE*, **3(5)**, (2008).
- [36] T. Vicsek, A. Czirók, E. Ben-Jacob, I. Cohen, O. Schochet; "*Novel type of phase transition in a system of self-driven particles*"; *Phys. Rev. Lett*, **75**, (1995).
- [37] A. L. Barabasi, H. E. Stanley; "*Fractal Concepts in Surface Growth*", Cambridge: Cambridge University Press (1995).
- [38] L. R. Silva. "*Correlações de Longo Alcance em Séries Temporais de Focos de Calor no Brasil*", Universidade Federal Rural de Pernambuco, (2009). .

- [39] A. B. Favaretto; "*Estimativa do Expoente de Hurst de Séries temporais de Chuvas do Estado de São Paulo usando as Transformadas de Fourier, Wavelets e Análise R/S*", Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, (2004).
- [40] A. Carbone, G. Castelli, H. E. Stanley; "*Time-dependent Hurst exponent in financial time series*"; *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **344.1**, 267-271, (2004).
- [41] J. A. Matos, S. M. Gama, H. J. Ruskin, A. A. Sharkasi, M. Crane; "*Time and scale Hurst exponent analysis for financial markets*"; *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **387(15)**, 3910-3915, (2008).
- [42] B. Mandelbrot, V. Ness. *Fractional Brownian motions, fractional noises and applications*, *SIAM Review* , (1968)
- [43] T. Lewiner, J. D. Gomes, H. Lopes, M. Craizer "*Curvature and torsion estimators based on parametric curve fitting*"; *Computer & Graphics*, **29**, 641-655,(2005).
- [44] T. Lewiner, J. D. Gomes, H. Lopes, M. Craizer; "*Arc- length curvature estimator*"; *Brazilian Symposium on. IEEE*, **17**, (2004).
- [45] P. W. Verbeek, and L. J. V. Vliet; "*Curvature and bending energy in digitized 2D and 3D images*"; *Scandinavian Conference on Image Analysis*, **8**, 1403-1410, (1993).
- [46] I. T. Young, J. E. Walker, J. E. Bowie; "*An analysis technique for biological shape*"; *Information and control*, **25**, 357-370, (1974).
- [47] E. L. Barnhart, K.C. Lee, K. Keren, A. Mogilner, J. A. Theriot; "*An Adhesion-Dependent Switch between Mechanisms That Determine Motile Cell Shape*"; *Plos Biology*, **9(5)**, (2011).
- [48] I. Derenyi, G. Koster, M. M. van Duijn, A. C. over, M. Dogterom, J. Prost; "*Membranes Nanotubes*"; *Springer Berlin Heidelberg*, 141-159, (2007).
- [49] D. J. Bukman, J. H. Yao, M. Wortis, "*Stability of cylindrical vesicles under axial tension*"; *Physical Review E*, **54**, 5463-5468, (1996).
- [50] I. Derenyi, F. Jülicher, J. Prost; "*Formation and Interaction of Membranes Tubes*"; *Physical Review Letters*, **88**, 238101, (2002).
- [51] B. Pontes, N. B. Viana, L. Campanati, M. Farina, V. Moura Neto, H. M. Nussenzveig; "*Structure and elastic properties of tunneling nanotubes*"; *Eur. Biophys*, **J-37**, 121-129, (2008).
- [52] B. Pontes, Y. Ayala, A. C. Fonseca, L. F. Romão, R. F. Amaral, L. T. Salgado, F. R. Lima, M. Farina, V. M. Neto, N. B. Viana, H. M. Nussenzveig; "*Membrane elastic properties and cell function*"; *Plos One*, **8**, 70-71, (2013).

- [53] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, Yaman; "*Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams*"; Nature, **330**, (1987).
- [54] R. Ghadiri, T. Weigel, C. Esen, A. Ostendorf; "*Microfabrication by Optical Tweezers*"; Plenary Paper, **7921**, (ver).
- [55] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu; "*Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*", Optics Letters, **11**, 288-290, (1986).
- [56] F. S. G. Cárdenas; "*Estudo das propriedades mecânicas e viscoelásticas de eritrócitos*"; Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro- Instituto de Física, (2016).
- [57] P. S. Alves; "*Teoria e calibração de pinças ópticas*"; Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, (2012).
- [58] N. B. Vianna, "*Ópticas e aplicações*"; Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2002).
- [59] F. A. P. Crisafuli; "*Caracterização da Interação DNA- Cisplatina usando Pinça Óptica e Videomicroscopia*"; Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (2012).
- [60] Happel, H. Brenner; "*Low Reynolds number hydrodynamics: with special applications to particulate media*"; Springer Science & Business Media, Vol.1, (2012).