

PRISCILA CAROLINE ALBUQUERQUE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM DE FENÔMENOS DE MIGRAÇÃO E
AGREGAÇÃO CELULAR *IN VITRO***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2014

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

T

S586c
2014
Silva, Priscila Caroline Albuquerque da, 1983-
Caracterização e modelagem de fenômenos de migração e
agregação celular *in vitro* / Priscila Caroline Albuquerque da
Silva. – Viçosa, MG, 2014.
ix, 109f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marcelo Lobato Martins.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.107-109.

1. Células - Migração. 2. Células - Agregação. 3. Difusão
anômala. 4. Cultura de células. 5. q-Gaussiana. 6. Câncer.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-graduação em Física. II. Título.

CDD 22. ed. 571.6

PRISCILA CAROLINE ALBUQUERQUE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM DE FENÔMENOS DE AGREGAÇÃO E
MIGRAÇÃO CELULAR IN VITRO**

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

APROVADA: 31 de outubro de 2014.

Cláudia Pio Ferreira

Leonardo Gregory Brunnet

**Márcio Santos Rocha
(Coorientador)**

Hallan Souza e Silva

**Marcelo Lobato Martins
(Orientador)**

À minha família e à pequena Cristal.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador prof. Dr. Marcelo Lobato Martins, por todo o incentivo e discussões geradas durante o desenvolvimento deste trabalho, que me fizeram amadurecer bastante durante o processo. Ao coorientador prof. Dr. Sidiney Alves, também pelo incentivo e pelo apoio na parte computacional. Ao coorientador Dr. Márcio Santos Rocha pelo suporte na condução dos experimentos. Aos professores Dr. Hallan Silva, Dr. Sílvio Ferreira Dr. Ésio Ramos pelas críticas e sugestões para o desenvolvimento deste trabalho. À Capes pelo suporte financeiro.

Agradeço a Deus por me dar forças nos momentos mais difíceis. Aos meus pais (biológicos e de coração), meu irmão e minha cunhada pelo amor incondicional e compreensão pela ausência nos momentos em família. Às minhas amigas-irmãs Camila Lopes e Simone Vasconcelos por todo apoio nos momentos mais críticos desta jornada e às suas respectivas famílias por me acolherem como filha nos momentos necessários. Aos meus amigos-irmãos Ronan Ferreira e Saulo Lima, pela parceria e fidelidade durante estes 5 anos em Viçosa (e que venham mais 50 anos de boas histórias!). À minha prima-gêmea Ana Paula Almeida pela torcida de sempre. Ao André Vitorino por se mostrar um anjo e por me dar o melhor presente: uma nova vida. Às amigas Aline Viol, Angélica Mata, Mirela Santos e Mara Baltazar pelo companheirismo durante o doutorado. Aos amigos da sala da Justiça (em especial para Tiago Martins, Davidson Viana, Renan Sander e Herman Fumiã) e demais colegas do departamento pela amizade, pela convivência amistosa durante estes anos e pelas inúmeras trocas de ideias.

Sumário

Lista de publicações	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1 Introdução e Motivação	1
2 Caracterização da migração celular <i>in vitro</i>	4
2.1 Motivação	4
2.2 Breve discussão sobre difusão normal e difusão anômala	6
2.3 Metodologia experimental, análise de imagens e obtenção dos dados de movimentos migratórios	8
2.4 Quantidades físicas utilizadas para a caracterização de movimentos celulares	10
2.5 Resultados	15
2.6 Modelo de uma caminhada q-Gaussiana com persistência de curto alcance	25
2.7 Conclusões e perspectivas futuras	30
3 Caracterização da dinâmica de agregação celular <i>in vitro</i>	33
3.1 Motivação	33
3.2 Revendo nossos dados experimentais relativos à agregação celular observada <i>in vitro</i>	40
3.2.1 Distribuições de densidade acumulada complementar dos tamanhos dos agregados	40

3.2.2	Comportamento do tamanho médio dos agregados em função do tempo	45
3.2.3	Comportamento do número médio dos agregados em função do tempo	46
3.3	Novos resultados para a dinâmica de agregação - linhagens B16F10 e NIH3T3	47
3.3.1	Distribuições de densidade acumulada complementar dos tamanhos dos agregados	47
3.3.2	Comportamento do tamanho e do número dos agregados em função do tempo	50
3.4	Modelos de Agregação <i>agregado-agregado</i>	50
3.5	Construção do modelo CCA com quimiotaxia, replicação e diferentes perfis de adesão celular	57
3.6	Resultados	60
3.7	Conclusões e perspectivas futuras	68
4	Considerações Finais	70
Anexo A – Determinação do erro posicional e análises complementares dos modos de migração direcional e de reorientação		72
A.1	Determinação do erro posicional	72
A.2	Modos de migração direcional e de reorientação	74
Anexo B – Artigo publicado referente ao trabalho de caracterização e modelagem de migração de melanócitos <i>in vitro</i>.		76
Anexo C – Informações complementares referentes às distribuições de densidade acumulada complementar e parâmetros de ajustes com distribuições teóricas		90
C.1	Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MDCK	90
C.2	Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MCF-10	90

C.3	Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem Hep-2	91
C.4	Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MDA-MB-231	92
C.5	Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem HN-5	93
C.6	Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MCF-7	94
C.7	Distribuições da densidade acumulada complementar para o tamanho dos agregados da linhagem B16F10	94
C.8	Distribuições da densidade acumulada complementar para o tamanho dos agregados da linhagem NIH-3T3	95
C.9	Parâmetros de ajuste das distribuições $P_s \times s$ - simulações	95
Referências Bibliográficas		107

Lista de publicações

- Normal and Tumoral Melanocytes Exhibit q -Gaussian Random Search Patterns
Priscila C. A. da Silva, Tiago V. Rosembach, Anésia A. Santos, Márcio S. Rocha and Marcelo L. Martins
PLoS ONE 9(9): e104253. doi:10.1371/journal.pone.010425
- Universal Kinetics of Cell Aggregation
Priscila C. A. da Silva, Anésia A. Santos, Sidiney G. Alves and Marcelo L. Martins (em preparação)

Resumo

SILVA, Priscila Caroline Albuquerque da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2014. **Caracterização e modelagem de fenômenos de migração e agregação celular *in vitro*.** Orientador: Marcelo Lobato Martins. Co-orientadores: Sidiney Geraldo Alves e Márcio Santos Rocha.

Processos biológicos normais como o desenvolvimento embrionário e a cicatrização de feridas dependem da movimentação organizada e direcionada de células para regiões específicas. Consequentemente, a falta ou a migração inadequada das células pode resultar em anomalias graves durante o desenvolvimento ou em cicatrizações defeituosas. Por outro lado, a agregação de células é um processo dinâmico complexo, ubíquo em sistemas vivos. É importante, por exemplo, durante a morfogênese, processos de coagulação sanguínea e também está envolvida na progressão do câncer. Neste contexto, surge a necessidade de caracterizar os fenômenos de migração e de agregação celular e compreender os mecanismos que governam estas dinâmicas. No presente trabalho realizamos ensaios de migração e de agregação celular em superfícies plásticas bidimensionais usando diferentes linhagens celulares (normais e tumorais). Observamos que, no que se refere à migração, as linhagens B16F10 (melanócito tumoral) e Melan A (melanócito não-tumoral) apresentam um *crossover* de uma difusão normal para uma superdifusão; suas velocidades obedecem distribuições q -gaussianas e não apresentam correlação de longo prazo, mas as células tendem a realizar movimentos consecutivos em direções opostas. No que diz respeito aos experimentos de agregação, foram estudadas oito linhagens celulares normais e tumorais. Nossos resultados indicam que, apesar das diferentes dinâmicas de agregação observadas, as distribuições acumuladas complementares para os tamanhos dos agregados celulares são do tipo exponencial esticada, independente da linhagem. Ou seja, aparentemente há um comportamento universal para a agregação celular em substratos plásticos bidimensionais. Modelos computacionais também foram propostos para descrever as dinâmicas de migração e agregação destas células em cultura, cujos resultados de simulação são qualitativamente semelhantes aos dados experimentais.

Abstract

SILVA, Priscila Caroline Albuquerque da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Characterization and modeling of cell migration and aggregation phenomena *in vitro***. Advisor: Marcelo Lobato Martins. Co-advisors: Sidiney Geraldo Alves and Márcio Santos Rocha.

Normal biological processes such as embryonic development and wound healing depend on organized and directed movement of cells. Consequently, the lack or inadequate cell migration can result in severe abnormalities during development or defective scarring. Furthermore, the aggregation of cells is a complex dynamic process ubiquitous in living systems. It is important, for example, during the morphogenesis process, blood coagulation and cancer progression. In this context, it is imperative to characterize the phenomena of cell migration and aggregation and understand the mechanisms that govern these dynamics. In the present work we performed cell migration and aggregation assays in two-dimensional plastic surfaces using different cell lines (normal and tumoral). Concerning migration, we observe that B16F10 (tumoral) and Melan A (non-tumoral) melanocytes exhibit a crossover between normal and a superdiffusion; their velocities obey q -gaussian distributions and have no long-term correlation, but the cells tend to perform consecutive movements in opposite directions. Concerning aggregation, eight normal and tumor cell lines were studied. Our results indicate that, despite the distinct aggregation dynamics observed, the complementary cumulative distributions for the sizes of the cell aggregates are described by stretched exponentials, regardless of cell type. So, our finds support a universal behavior cell aggregation in 2D plastic substrate. Computational models have also been proposed to describe the dynamics of cell migration and aggregation in culture, which provide simulational results in qualitative agreement with the experimental data.

1 Introdução e motivação

A agregação de células animais em cultura envolve uma série de processos, tais como mobilidade, coalescência e adesão, os quais são de fundamental importância para a engenharia de tecidos e pesquisa em oncologia. Existem evidências de que a progressão do câncer é inicialmente dirigida pela seleção de fenótipos celulares transformados que conferem vantagens proliferativas em relação às células normais. Além da instabilidade genética que ocorre nos estágios iniciais da carcinogênese, variações epigenéticas são parte dos eventos críticos na formação do câncer. Tais estados transformados são favoráveis ao aumento na capacidade proliferativa e/ou migratória sob condições inibitórias [1].

Por outro lado, sabe-se que processos biológicos normais tais como o desenvolvimento embrionário e a cicatrização de feridas dependem da movimentação organizada e direcionada de células para regiões específicas [2]. Conseqüentemente, a falta ou a migração inadequada das células pode resultar em anomalias graves durante o desenvolvimento ou em cicatrizações defeituosas. No caso particular da evolução tumoral, investigações mais aprofundadas dos processos de migração celular são importantes para uma melhor compreensão da metástase (disseminação de células cancerosas a partir de um tumor para locais secundários), como também podem proporcionar a descoberta de novos tratamentos para combater/controlar este tipo de evento.

Alguns autores reportaram movimento difusivo normal e distribuições gaussianas de velocidades para determinadas linhagens celulares [3,4]. Entretanto, outros trabalhos mostraram que algumas células apresentam um regime de difusão anômala, cuja distribuição de velocidades não é bem ajustada com distribuições de probabilidades do tipo gaussiana [5–10]. No primeiro trabalho desta tese, buscamos caracterizar o movimento de algumas linhagens celulares que encontravam-se disponíveis no laboratório de Física Biológica recém instalado no nosso departamento, a saber, Melan A (linhagem não tumoral de melanócito) e B16F10M (linhagem tumoral de melanócito), ambas de camundongos. Utilizando a técnica de videomicroscopia, estas culturas foram fotografadas em intervalos regulares de tempo, e as coordenadas bidimensionais dos centróides dos contornos celulares foram registradas. De posse destas co-

ordenadas bidimensionais, quantidades físicas tais como velocidade, ângulo de giro, deslocamento quadrático médio e autocorrelação de velocidades foram obtidas e utilizadas na caracterização da migração. Os resultados sugerem que tais células seguem um regime de difusão anômala, como iremos apresentar e discutir no capítulo 2. No entanto, a comparação dos resultados obtidos para estas linhagens indica que existem diferenças relacionadas à capacidade migratória de células normais e células tumorais. Um modelo de caminhada com persistência de curto alcance foi proposto neste primeiro trabalho. Os resultados do mesmo reforçam a hipótese que estas diferenças de capacidade migratória possam estar associadas aos movimentos persistentes e anti-persistentes numa mesma direção, os quais podem estar relacionados à capacidade de restauração do formato da membrana celular ou à dinâmica de polimerização-despolimerização do citoesqueleto. As conclusões deste trabalho e perspectivas futuras também serão apresentadas no final do capítulo 2. Acreditamos que tais resultados tenham valor no campo da Medicina, bem como permitirão construir modelos computacionais mais realistas usados na investigação do crescimento de tumores.

Parâmetros associados à cinética de migração e agregação podem ajudar a identificar diferentes características entre linhagens celulares, sejam elas normais ou cancerosas, bem como possíveis transições fenotípicas *in vitro*. Nas últimas décadas, o nosso grupo (em colaboração com pesquisadores de outros departamentos) vem realizando ensaios experimentais com diferentes linhagens celulares, tanto de humanos quanto de animais, buscando uma melhor compreensão dos mecanismos de migração, agregação e possíveis transições fenotípicas/genotípicas destas células em cultura [1, 11]. Nestes experimentos, as células foram plaqueadas em lamínulas, e após intervalos múltiplos de 24 horas do plaqueamento, três lamínulas foram removidas, fixadas e coradas com Giemsa para a contagem dos agregados. Nos primeiros trabalhos publicados pelo nosso grupo sobre estes estudos de agregação, foram apresentados diferentes tipos de distribuições de tamanhos de agregados n_s (densidade de agregados de tamanho s) em função do tamanho s dos agregados celulares de diferentes linhagens - HN-5 (carcinoma de língua), Hep-2 (carcinoma de laringe), MDCK (normais de rim de cão), MCF-7 (carcinoma de mama), MCF-10A (normal da mama) e MDA-MB-231 (carcinoma da mama). Na segunda parte deste trabalho de tese, revisitamos estes dados, e as distribuições de tamanho dos agregados foram analisadas através da construção de curvas de densidade acumulada complementar P_s , visando a minimização de flutuações dos pontos experimentais. Esta nova análise revelou que as funções que melhor ajustam as distribuições de tamanho destes agregados divergem das que foram identificadas originalmente por Vilela e colaboradores, conforme será discutido no capítulo 3. Novos experimentos de agregação celular foram conduzidos com duas outras linhagens celulares: B16F10 (melanoma) e NIH-3T3 (fibroblastos normais). Diferentemente da

metodologia experimental adotada anteriormente, nestes novos experimentos as culturas celulares foram filmadas ininterruptamente durante no mínimo 8 dias, e as imagens de uma mesma cultura foram registradas em intervalos regulares de 24 horas.

Buscando uma melhor compreensão dos mecanismos que levam às diferentes dinâmicas de agregação destas linhagens, nosso grupo propôs um novo modelo de agregação *agregado-agregado* (CCA, do inglês, *cluster-cluster aggregation*), incorporando aspectos biológicos ao modelo que havia sido originalmente proposto na década de 80 [12–14]. Na nova proposta de Alves e Martins [15], foram incluídos dois ingredientes ao modelo original: 1) replicação de partículas e 2) migração dos agregados guiada pela sinalização de substâncias químicas denominadas quimioatratores (quimiotaxia). A evolução temporal deste modelo resultou em curvas de agregação semelhantes às que foram registradas nos primeiros artigos referentes aos experimentos de agregação das linhagens HN-5, MCF-10A e MDA-MB-231. Porém, as transições entre diferentes regimes de agregação que foram observadas por Vilela e Colaboradores nas culturas das linhagens Hep-2, MDCK e MCF-7 não puderam ser explicadas através deste modelo.

Sendo assim, ainda neste segundo trabalho de tese, propusemos um novo modelo de agregação para descrever os comportamentos observados nas curvas de distribuição de densidade acumulada complementar do tamanho dos agregados observados em cultura, bem como o comportamento do crescimento do número de células e tamanho médio dos agregados. Tendo em vista que alterações na adesão célula-célula e célula-meio extracelular podem alterar o regime de agregação celular, neste novo modelo incorporamos aspectos relacionados à adesão celular ao modelo de Alves e Martins, além da quimiotaxia e da replicação de partículas. A evolução temporal deste modelo (utilizando conjuntos de parâmetros específicos) resultou em curvas de agregação semelhantes às que foram observadas nos experimentos com as linhagens MDCK, MCF-10 e B16F10. A discussão deste modelo, os resultados e conclusões deste segundo trabalho também serão apresentados e discutidos no capítulo 3.

Por fim, no capítulo 4 iremos apresentar as conclusões gerais destes dois trabalhos e perspectivas futuras.

A realização deste trabalho contou com a coorientação dos professores Sidiney G. Alves e Márcio S. Rocha e com a colaboração da pesquisadora Anésia A. dos Santos e do aluno de iniciação científica Tiago V. Rosembach.

2 *Caracterização da migração celular in vitro*

2.1 **Motivação**

A migração celular é um evento de fundamental importância para a sobrevivência de uma diversidade de seres vivos, desde bactérias a mamíferos [16, 17]. Por exemplo, bactérias e organismos unicelulares precisam migrar para encontrar suas fontes de alimento. Já nos organismos multicelulares, eventos tais como embriogênese, cicatrização e desenvolvimento da resposta imunológica durante uma infecção requerem o movimento coordenado de células para locais específicos. Acredita-se que, para realizar estes movimentos, as células são guiadas por sinais químicos e físicos [16, 17]. Consequências drásticas podem surgir quando ocorrem erros na interpretação destes sinais, tais como a má formação embrionária, doenças cardiovasculares, ou até a carcinogênese [17]. Em particular, muitos dos casos fatais devido ao câncer são decorrentes da metástase, pois há perda da coesão do tecido afetado e conseqüentemente as células cancerosas tornam-se livres para migrar para outros tecidos saudáveis através do sangue ou vasos linfáticos [18]. Por outro lado, o principal objetivo no campo da medicina regenerativa é a criação de tecidos artificiais e órgãos através da colonização de biomateriais por células, o que requer o controle da organização, da comunicação e dos movimentos destas [19]. Sendo assim, é importante compreender como as células se movem *in vivo* e os mecanismos que governam seus comportamentos.

Dada a relevância do tema, o movimento de vários tipos celulares, desde organismos unicelulares a multicelulares, foram caracterizados em diversos trabalhos publicados previamente. Foi reportado que algumas células seguem um regime de difusão normal com distribuições gaussianas de velocidades [3, 4]. Entretanto, em trabalhos recentes foram identificados regimes de difusão anômala, como é o caso, por exemplo, das células de *Hydra* [5], *Dictyostelium* [6, 7], fibroblastos e queratinócitos [8]. Além disso, a migração de alguns microorganismos e células é descrita por caminhadas do tipo Lèvy, um caso especial de superdifusão [9, 10]. Em alguns casos o movimento é persistente numa determinada direção, gerando

padrões de uma caminhada correlacionada. A existência de correlação não deve ser um resultado surpreendente: o movimento celular é dirigido por protusões da membrana que “experimentam” o microambiente na qual se encontram e guiam a célula para que se mova de acordo com a finalidade (busca de nutrientes ou sinalização). A formação destas protusões é decorrente da polimerização-despolimerização de filamentos de actina no citoesqueleto [2]. Portanto, a polarização do citoesqueleto de células representa uma manifestação de memória da direção do movimento. Desta maneira, as velocidades instantâneas das células dependem da atividade de pseudópodos, e a atividade destes, por sua vez, depende do estado de migração da célula em uma dada direção [20]. Esta ampla variedade de tipos de migração observados experimentalmente nos sugere que o movimento das células não segue uma lei universal.

Do ponto de vista de um físico, a migração celular pode ser mapeada no problema de busca por alvos (tais como nutrientes, fatores de crescimento ou quimiocinas), os quais podem ser percebidos pela célula dentro de um alcance limitado [21]. Quando colocadas em cultura e na ausência de gradientes externos, o tipo de movimento realizado por estas células pode revelar características inerentes ao seu fenótipo migratório. Desta maneira, a análise sistemática de séries temporais experimentais de tais movimentos pode fornecer informações quantitativas necessárias para gerar um modelo de movimento específico para um determinado tipo celular. Estes modelos macroscópicos de comportamento celular integrados com descrições microscópicas da dinâmica que envolve a conexão de integrinas a ligantes extracelulares, polimerização de actinas e a geração de forças de tração pelas miosinas II [22] constituem uma descrição mais completa ou sistêmica da biologia da motilidade celular.

Portanto, uma das propostas desta tese foi a caracterização do movimento migratório de duas linhagens de melanócitos: Melan A, uma linhagem não tumoral de melanócitos murinos¹, e B16F10, linhagem tumoral derivada de melanomas murinos². Nosso objetivo foi investigar a existência de diferenças na capacidade migratória entre as células normais e as tumorais, como também propor um modelo para descrever a migração das mesmas. Adicionalmente, nós analisamos os efeitos da infecção por micoplasma na motilidade dos melanócitos B16F10, uma vez que Murooka e colaboradores observaram que a infecção por vírus HIV reduz a motilidade de células T infectadas [23]. Como descreveremos em detalhes mais adiante, esta caracterização foi feita através da determinação das velocidades instantâneas, dos desvios angulares entre movimentos consecutivos, do deslocamento quadrático médio e da autocorrelação de velocidades. A análise destas quantidades físicas foi de fundamental importância para traçar o perfil

¹ A linhagem Melan A foi adquirida no Instituto do Câncer de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² A linhagem B16F10 foi adquirida no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

da curva de distribuição de velocidades bem como identificar a existência de persistência de movimento em uma dada direção.

2.2 Breve discussão sobre difusão normal e difusão anômala

A caminhada aleatória³ e seu limite contínuo, a difusão, também conhecida por movimento Browniano, faz parte do núcleo da mecânica estatística do não-equilíbrio [24]. Devido à sua ubiquidade e utilidade, as caminhadas aleatórias e os processos de difusão estão, indiscutivelmente, entre os modelos mais importantes da física teórica e, com aplicações muito mais abrangentes que meramente descrever o movimento de partículas microscópicas.

O mecanismo subjacente ao movimento Browniano são as repetidas colisões experimentadas por uma partícula cercada por moléculas no ambiente que a envolve. Vamos considerar inicialmente uma caminhada aleatória de tempo discreto em uma rede unidimensional. A cada passo, o “caminhante” se move uma unidade de distância para a direita (com probabilidade p) ou para a esquerda (com probabilidade $q = 1 - p$). Denominando $P_N(x)$ como a probabilidade do caminhante estar na posição x após N passos, temos que esta probabilidade obedece a relação de recorrência⁴:

$$P_N(x) = pP_{N-1}(x-1) + qP_{N-1}(x+1). \quad (2.1)$$

Ao invés de resolvermos diretamente a equação acima, podemos utilizar o fato que a probabilidade $\Pi_N(r)$ que o caminhante dê r passos para a direita e $N - r$ para a esquerda tem a forma binomial

$$\Pi_N(r) = \binom{N}{r} p^r q^{N-r}. \quad (2.2)$$

Se o caminhante inicia a caminhada a partir da origem, a posição x após N passos será $x = 2r - N$. Utilizando a aproximação de Stirling para um número grande de passos, encontramos que

$$P_N(x) \rightarrow \frac{1}{\sqrt{2\pi N pq}} e^{-[x-N(p-q)]^2/2Npq}. \quad (2.3)$$

³Do inglês, *random walk*.

⁴Recomendamos ao leitor consultar a referência [24] para maiores detalhes sobre os resultados apresentados nesta seção.

A forma gaussiana da equação 2.3 surge universalmente quando o deslocamento médio e o deslocamento quadrático médio de um único passo são finitos.

Apesar das caminhadas aleatórias de tempo discreto serem importantes no campo da matemática e da ciência computacional, nas ciências naturais as caminhadas aleatórias de tempo contínuo surgem naturalmente. Denotando por $P_n(t)$ a probabilidade do caminhante estar no sítio n no tempo t , a equação mestra para esta probabilidade de ocupação é:

$$\frac{\partial P_n}{\partial t} = P_{n+1} - 2P_n + P_{n-1}. \quad (2.4)$$

A solução da equação 2.4 é:

$$P_n(t) = I_n(2t)e^{-2t}, \quad (2.5)$$

onde I_n é a função modificada de Bessel de ordem n . No limite de tempos longos, o comportamento assintótico da função de Bessel leva a distribuição gaussiana, na forma:

$$P_n(t) \rightarrow \frac{1}{\sqrt{4\pi t}} e^{-n^2/4t}. \quad (2.6)$$

No caso do espaço contínuo, na equação 2.4 nós substituímos n por x e $P_n(t)$ por $P(x, t)$, a densidade de probabilidade do caminhante estar na posição x no tempo t . Posteriormente, expandimos a equação 2.4 em séries de Taylor até a segunda ordem e obtemos a equação de difusão

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 P(x, t)}{\partial x^2}. \quad (2.7)$$

Na equação 2.7, D é o coeficiente de difusão. Para um valor genérico D , esta equação é resolvida utilizando as transformadas de Fourier e suas inversas⁵, e sua solução é dada por

$$P(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-x^2/4Dt}. \quad (2.8)$$

Como vimos, a distribuição de probabilidade para o deslocamento total de um caminhante numa caminhada aleatória converge para uma distribuição gaussiana, independente da forma da distribuição do comprimento dos passos individuais desde que ela possua média e variância finitas. Esta universalidade surge do teorema central do limite. Ou seja, suponha uma

⁵Novamente, recomendamos o leitor a consultar a referência [24].

caminhada unidimensional, cujos passos são realizados em intervalos de tempo discretos. O deslocamento no n -ésimo passo, x_n , é obtido independentemente dos passos anteriores, por uma distribuição $p(x)$. Seja $X_N = \sum_{1 \leq n \leq N} x_n$ o deslocamento total após N passos. O teorema central do limite estabelece que, no limite de $N \rightarrow \infty$, a distribuição $P_N(X)$ é uma função gaussiana universal dada por:

$$P_N(X) \simeq \frac{1}{\sqrt{2\pi N\sigma^2}} e^{-(X-N\langle x \rangle)^2/2N\sigma^2}, \quad (2.9)$$

onde $\sigma^2 \equiv \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2$ ($\langle x \rangle$ e $\langle x^2 \rangle$ são, respectivamente, o primeiro e o segundo momento da distribuição $p(x)$). Contudo, para que o teorema do limite central seja válido, as condições que devem ser obedecidas são: i) os dois primeiros momentos devem ser finitos; ii) a distribuição espacial inicial também deve ter os dois primeiros momentos finitos; iii) os passos devem ser independentes. Nestes casos, o deslocamento médio e a variância são dados por $\langle X_N \rangle = N\langle x \rangle$ e $\text{var}(X_N) \equiv \langle X_N^2 \rangle - \langle X_N \rangle^2 = N\sigma^2$. No caso contínuo, o deslocamento quadrático médio $\text{var}(X(t) = \langle X^2 \rangle \sim t$, em que fizemos $\langle X \rangle = 0$ e N se transforma em t . Estes processos são comumente denominados de difusão normal.

Nos casos em que a distribuição dos deslocamentos de um único passo (p_x) tal que o seu primeiro e/ou segundo momento é divergente ou que o tempo de espera entre passos consecutivos não é fixo, tal que sua distribuição também tem primeiro e/ou segundo momento divergente, a distribuição $P(X_N)$ não é gaussiana e os momentos do deslocamento total escalam de maneira anômala com N , isto é, $\langle X^2 \rangle \sim N^\gamma$, com $\gamma > 1$. A caminhada como um todo passa a ser dominada por um passo de comprimento excepcionalmente longo ou por um tempo de espera entre dois passos excepcionalmente grande. A existência destes eventos excepcionais invalidam as condições do teorema do limite central, e portanto, surgem os processos de difusões anômalas.

2.3 Metodologia experimental, análise de imagens e obtenção dos dados de movimentos migratórios

Todas as etapas do experimento foram realizadas no laboratório de Física Biológica do DPF/UFV, recém instalado no Departamento de Física. As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 60ml e 25cm² de área, tal como a que aparece na figura 2.1(a), à 37° C e 5% de CO₂, além de outras condições específicas de cultura⁶. Estas garrafas foram plaqueadas com

⁶Meio mínimo essencial de Dulbecco (Sigma Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 i.u./ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 2.5 ng/ml de amfotericina, 2mM

aproximadamente 2500 células, de modo que a distância média entre elas foi de aproximadamente 100 diâmetros celulares, o que representa um meio de cultura de baixa densidade (100 células por cm^2). Após o plaqueamento, as garrafas foram lacradas e levadas para uma estufa, na qual permaneceram por 8 horas, tempo suficiente para que todas as células pudessem aderir à base das mesmas. Após este período, as garrafas foram transferidas para uma placa aquecedora instalada junto ao microscópio (para preservar a temperatura de $37^\circ C$), reduzindo desta forma o estresse pela variação de temperatura. A videomicroscopia foi realizada através de um microscópio invertido da Nikon (modelo TS 100) com uma objetiva de ampliação de $10\times$, equipado com uma câmera CCD analógica (JAI CM 140 GE), como mostra a figura 2.1(b). Foi desenvolvido um programa em linguagem de LabView para possibilitar a captura das imagens em intervalos regulares de 1 minuto, durante 12 horas. Tais imagens foram coletadas a uma resolução de $1\text{ pixel} = 0.48\mu\text{ m}$, em um campo visual de $1392 \times 1040\text{ pixels}$. Todas as imagens foram obtidas na mesma região, que continha aproximadamente 8 células no campo visual, uma vez que buscamos estudar o comportamento de células isoladas. Foram descartadas das análises as células que morreram, replicaram ou formaram microtubos de membrana (ligando-se a outras células), uma vez que observamos que tais comportamentos interferem na migração destas células. Observamos também que tipicamente após 6 horas do início das filmagens havia uma mudança na tonalidade das membranas das células, que tornaram-se praticamente imóveis. As causas ainda não puderam ser esclarecidas, mas acreditamos que este fenômeno é decorrente de alguma fase do ciclo celular (por exemplo, replicação) ou início da morte natural. Desta maneira, apenas os movimentos executados até a 6ª hora do filme foram analisados.

Utilizando estes critérios e repetindo de 3 a 4 experimentos para cada linhagem, o nosso conjunto de dados atual é constituído por 8 células da linhagem B16F10 (infectadas e não infectadas) e 7 células da linhagem Melan A. Nós supomos que a capacidade migratória destas células são representativas para as suas respectivas linhagens, uma vez que os seus comportamentos são homogêneos e que as células que se moveram muito rápida ou muito lentamente foram excluídas através dos critérios descritos acima.

A posição de cada célula em cada instante de tempo foi determinada através das coordenadas bidimensionais (x,y) do centróide destas. Utilizando o programa ImageJ⁷, definimos manualmente o contorno da célula através do pacote *Cell Outliner*, como ilustra a figura 2.2(a). Uma vez definido este contorno, o programa forneceu as coordenadas bidimensionais do centróide, e estas foram armazenadas num arquivo. Ao repetirmos este procedimento (definição

de glutamina, 2mM de piruvato de sódio e 1mM de aminoácidos não-essenciais. Para as células Melan A, 200 nM 12-o-tetradecanoilforbol 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) foi adicionado.

⁷Programa de distribuição gratuita, desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (NIH).

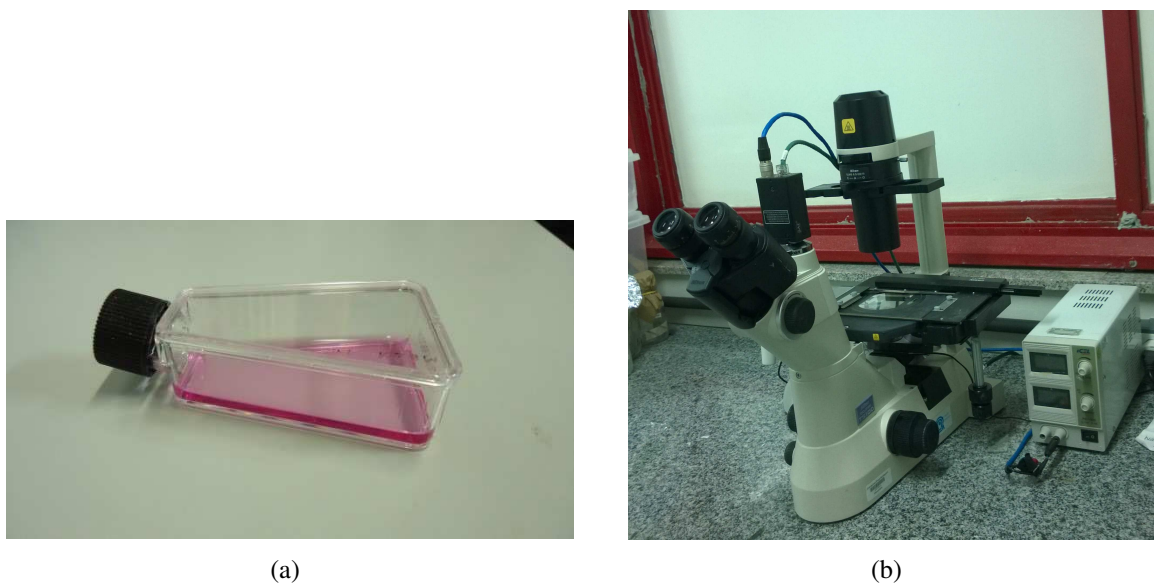


Figura 2.1: a) Fotografia de uma das garrafas que foram utilizadas para manter as células em cultura; b) Fotografia do microscópio utilizado para obtenção das imagens: Modelo Nikon TS 100, equipado com uma objetiva de 10× e uma câmera CCD (JAI CM 140 GE).

do contorno e extração das coordenadas) nas 360 imagens consecutivas de uma mesma célula, obtivemos a coleção de coordenadas do centróide de cada célula ao longo das 6 horas de filme, possibilitando assim traçar a trajetória da mesma, como mostra a figura 2.2(b). De posse deste conjunto de coordenadas, quantidades físicas importantes para a caracterização destes movimentos puderam ser obtidas.

2.4 Quantidades físicas utilizadas para a caracterização de movimentos celulares

- Velocidades

As velocidades \vec{v}_i de cada célula foram calculadas através das posições consecutivas (\vec{r}_i e \vec{r}_{i-1}) em instantes de tempos consecutivos (t_i e t_{i-1}), onde $i=1,2,3,\dots$ e $t_i = i\Delta t$. Ou seja,

$$\vec{v}_i = \frac{\vec{r}_i - \vec{r}_{i-1}}{t_i - t_{i-1}}, \quad (2.10)$$

sendo $\Delta t = 1$ minuto, que corresponde ao intervalo de tempo decorrido entre as imagens consecutivas.

A construção dos histogramas destas velocidades permite obter a curva de distribuição da densidade de probabilidade da célula realizar um movimento com velocidade entre \vec{v} e $\vec{v} + \Delta\vec{v}$. Nos estágios iniciais deste trabalho nós observamos que o número de caixas

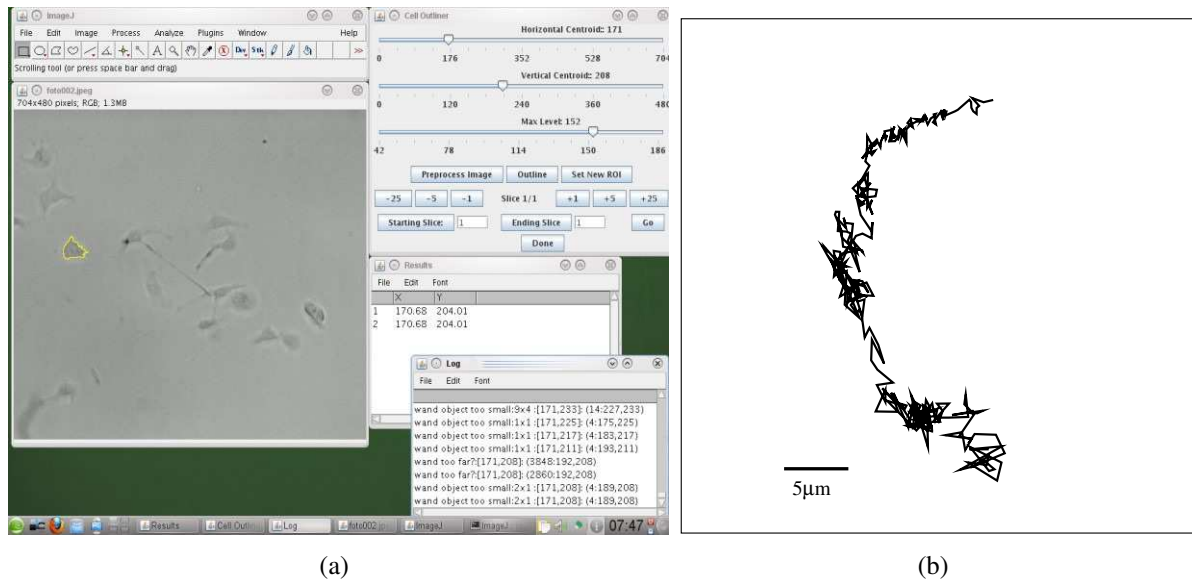


Figura 2.2: a) Imagem de uma janela do ImageJ durante a determinação manual do contorno de uma célula, que aparece destacado em amarelo na imagem. Após a definição deste contorno, o programa fornece as coordenadas do centróide; b) Exemplo de uma trajetória executada por uma célula da linhagem B16F10.

utilizadas na construção dos histogramas não altera o padrão das curvas de distribuição, mas influencia nos valores dos parâmetros utilizados nos ajustes com curvas teóricas. Sendo assim, resolvemos padronizar a construção de todos os histogramas utilizando as velocidades normalizadas \vec{v}_i , dadas por

$$\vec{v}_i = \frac{\vec{v}_i - \bar{\vec{v}}}{\sigma}, \quad (2.11)$$

as quais foram distribuídas em 30 caixas dentro do intervalo $[-1.5\sigma, 11.0\sigma]^8$. Na equação 2.11, o termo $\bar{\vec{v}}$ representa a velocidade média de uma única célula ao longo de 6 horas ($\bar{\vec{v}} = \sum \vec{v}/359$) e σ corresponde ao desvio padrão das velocidades \vec{v}_i de uma única célula.

Foram construídos os histogramas de cada célula, e a partir destes obtivemos a densidade de probabilidade destas velocidades normalizadas estarem no intervalo \vec{v} e $\vec{v} + \Delta\vec{v}$. Repetindo este procedimento para todas as células de uma dada linhagem, obtivemos a média e o desvio padrão destas densidades $P(\vec{v})$ para cada uma das linhagens que foram estudadas neste trabalho. O comportamento da curva de distribuição $P(\vec{v}) \times \vec{v}$ permite identificar o regime de difusão como normal ou anômalo. Quando a distribuição $P(\vec{v})$ é do tipo gaussiana, o regime de difusão é normal. Regimes de difusão anômala são ajustados com outras funções, tais como as distribuições de Lèvy ou q-gaussianas.

⁸Este intervalo abrange todas as velocidades normalizadas de todas as células, de todas as linhagens.

- Deslocamentos quadráticos

Sendo \vec{r}_i a posição da célula num dado instante de tempo t_i , o deslocamento quadrático em relação à esta posição após um intervalo de tempo τ , dado por $r^2(\tau)$, é obtido através da equação:

$$r^2(\tau) = |\vec{r}_{i+\tau} - \vec{r}_i|^2 = (x_{i+\tau} - x_i)^2 + (y_{i+\tau} - y_i)^2, \quad (2.12)$$

com $i = 0, 1, 2, 3, \dots$. No entanto, quando dispõe-se de poucos dados experimentais (como no nosso caso), utiliza-se a técnica de *overlap* para estimar esta quantidade, visando minimizar as flutuações estatísticas. Esta técnica consiste em fazer de cada ponto da trajetória uma nova origem; sendo assim, denotamos como $\vec{r}_i(\tau)$ o deslocamento quadrático em relação à posição \vec{r}_i após um intervalo de tempo τ , como ilustra a figura 2.3. Nesta, o vetor $\vec{r}_0(1)$ representa o deslocamento quadrático após o intervalo de tempo $\tau = 1$ minuto, considerando a posição \vec{r}_0 como origem; vetor $\vec{r}_0(2)$ representa o deslocamento quadrático após o intervalo de tempo $\tau = 2$ minutos, também considerando a posição \vec{r}_0 como origem; já vetor $\vec{r}_1(1)$ representa o deslocamento quadrático após o intervalo de tempo $\tau = 1$ minuto, porém considerando a posição \vec{r}_1 como origem, e assim por diante. Fazendo uso desta técnica, cada célula nos fornece $(N - \frac{\tau}{\Delta t})$ valores de $r^2(\tau)$ para cada intervalo de tempo τ . O deslocamento quadrático médio, portanto, foi obtido por:

$$\langle r^2(\tau) \rangle = \sum_{j=1}^n \langle r^2(\tau) \rangle_j, \quad (2.13)$$

onde n é o número de células.

Regimes de difusão anômalos são identificados pela análise do comportamento do desvio quadrático médio $\langle x^2 \rangle$ em função do tempo t . O deslocamento quadrático médio é obtido através da integral:

$$\langle x^2(t) \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} x^2 p(x, t) dx, \quad (2.14)$$

sendo assim, muitos tipos de relações entre $\langle x^2 \rangle$ e t podem existir, a depender da função $p(x, t)$. Porém é muito frequente encontrar relações do tipo lei de potência:

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

onde x é uma quantidade d -dimensional [25]. Quando $\gamma = 1$, o regime de difusão é dito normal. Entretanto, quando $\gamma > 1$ a difusão é superdifusiva, e subdifusiva quando $\gamma < 1$.

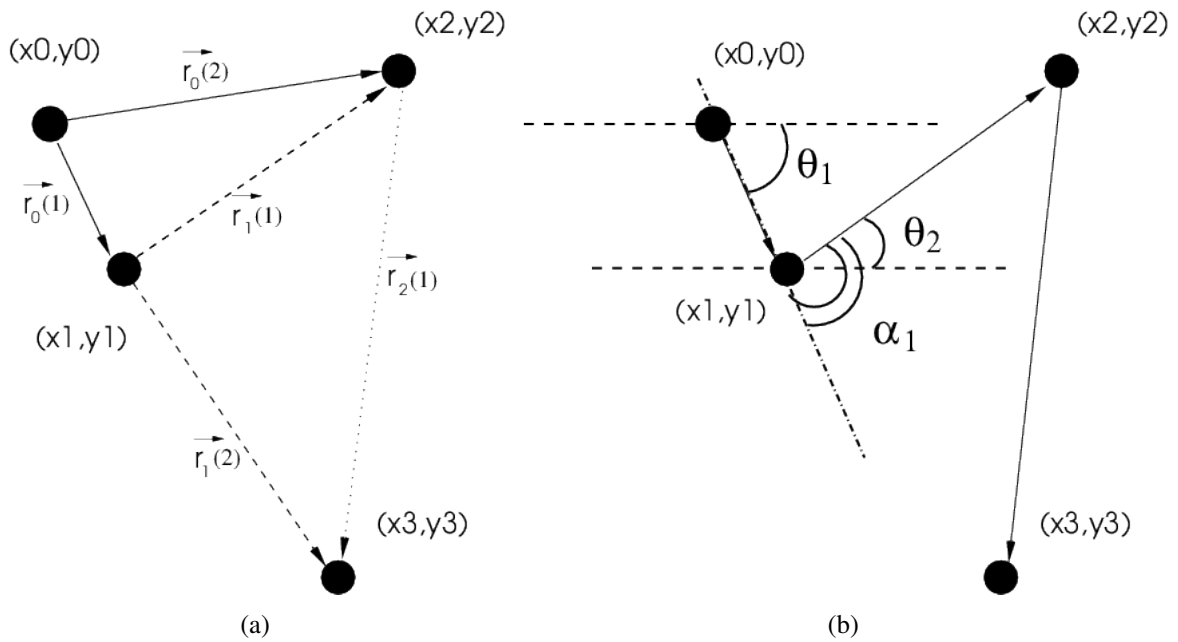


Figura 2.3: Representação da trajetória de uma célula. Cada ponto possui um par de coordenada (x,y) . a) Os sub-índices i,j dos vetores \vec{r} representam os instantes de tempo t_i e $t_j = n \times \Delta t$. Os vetores com linhas cheias representam os $\vec{r}(t)$ atribuindo a origem ao primeiro ponto. Os vetores com linhas tracejadas representam os vetores $\vec{r}(t)$ atribuindo a origem ao segundo ponto e assim sucessivamente. b) Os ângulos de deslocamento θ são calculados tomando a linha horizontal como referência. Neste caso, o ângulo θ_1 é negativo (abaixo da linha horizontal) e o ângulo θ_2 é positivo. O ângulo α_1 corresponde à diferença entre os ângulos $(\theta_2 - \theta_1)$.

- Desvios angulares da direção de movimento (ângulos de giro)

Os desvios de direção de movimento foram obtidos da seguinte forma:

$$\alpha_i = \theta_{i+1} - \theta_i, \quad (i = 1, 2, 3, \dots, N-1) \quad (2.16)$$

onde os ângulos θ_i representam as direções de movimento das células em relação à linha horizontal, como ilustra a figura 2.3(b). Assumimos que θ recebe valores positivos quando o movimento acontece para cima da linha horizontal, e negativos quando o movimento acontece para baixo da linha horizontal.

Os histogramas das direções de movimento (θ_i) e dos ângulos de desvio (α_i) nos ajudam a identificar a existência de direções preferenciais de movimento. Uma vez que o desvio padrão destas duas grandezas foi muito elevado no nosso conjunto de dados, os histogramas foram construídos com caixas de largura fixa e igual a $(\theta_{max} - \theta_{min})/50$ (analogamente, $(\alpha_{max} - \alpha_{min})/50$).

Inspirados na referência [17], os ângulos α foram utilizados para identificar a existência de modos de migração direcionais (que acontecem quando uma sequência de movimentos é executada dentro de uma região limitada de variação angular dada por α^*) ou de reorientação (quando uma sequência de movimentos é executada com desvios angulares acima

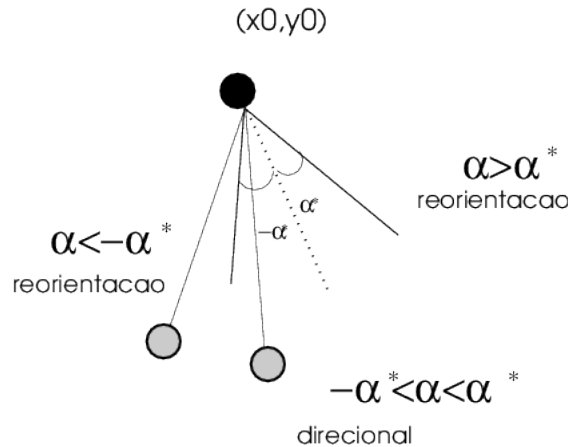


Figura 2.4: Ilustração para os limites entre os modos de orientação direcionais e de reorientação. A linha pontilhada demarca o desvio $\alpha = 0^\circ$ em relação à direção de movimento anterior, enquanto as linhas contínuas delimitam as regiões de migração direcional ($\alpha \leq \alpha^*$) ou de reorientação ($\alpha > \alpha^*$)

deste valor limite), como ilustra a figura 2.4. Para isso, o primeiro ângulo de desvio α_1 de uma trajetória demarca o início de um modo de migração direcional. Durante a migração, quando α_i e os próximos α_{i+n} desvios são maiores que α^* , há uma mudança para o modo de migração de reorientação. Haverá uma mudança para o modo direcional quando α_j e os próximos n desvios α_j ($i < j \leq i+n$) forem menores ou iguais a α^* . Nas nossas análises, adotamos $\alpha^* = 45^\circ$ e $n = 1$, diferente do que foi adotado por Potdar e colaboradores na referência [17] (os autores utilizaram $\alpha^* = 45^\circ$, $n = 2$ para o modo direcional e $n = 3$ para o modo de reorientação). Incluímos nas nossas análises outros valores de α^* : $\alpha^* = 5^\circ, 15^\circ, 30^\circ$, e 60° , mantendo fixo $n=1$. Resolvemos ampliar a faixa de α^* visando investigar se haveriam alterações no resultado em função do valor deste ângulo limite. Além disso, fixamos $n = 1$ para ambos os casos tendo em vista que mudanças entre os diferentes modos podem ser identificadas com valores de $n > 1$. Nesta análise de migração direcional e de reorientação foram analisados os histogramas dos desvios angulares de cada modo (direcional e reorientação) bem como a distância total percorrida em cada um destes modos.

- Autocorrelação de velocidade

A função de autocorrelação de velocidades instantâneas, definida como

$$c_v(\tau) = \frac{\langle \vec{v}(t+\tau) \cdot \vec{v}(t) \rangle}{\langle v^2(t) \rangle}, \quad (2.17)$$

com $\tau = i\Delta t$ ($i = 0, 1, 2, \dots$), foi calculada a partir dos dados experimentais usando-se a seguinte equação ([6]):

$$c_v(\tau) = \frac{1}{N-n-1} \sum_{i=1}^{N-n} \left(\vec{v}_i - \frac{1}{N-n} \sum_{j=1}^{N-n} \vec{v}_j \right) \cdot \left(\vec{v}_{i+n} - \frac{1}{N-n} \sum_{j=n+1}^N \vec{v}_j \right) / \left[\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\vec{v}_i - \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \vec{v}_j \right)^2 \right], \quad (2.18)$$

visando minimizar tendências devido ao limitado número de dados (estatística finita). A equação acima, portanto, nos fornece uma medida de correlação entre as velocidades registradas nos tempos t_i e j passos de tempo depois. Assim como procedemos para o cálculo do deslocamento quadrático médio, a técnica do *overlap* também foi utilizada para melhorar a estimativa da autocorrelação de velocidades.

O comportamento da autocorrelação em função do tempo também auxilia na identificação da existência de direções preferenciais de movimento ou correlações de outra natureza. Numa caminhada do tipo passeio aleatório não existem correlações de curto ou longo alcance e, portanto, o valor médio da autocorrelação é igual a zero. No entanto, se a autocorrelação no tempo τ ($c_v(\tau)$) é positiva, significa que movimentos separados por um intervalo de tempo τ serão, com maior chance, realizados na mesma direção. Caso contrário, se $c_v(\tau)$ for negativa, eles irão acontecer, em média, em sentidos opostos.

2.5 Resultados

As trajetórias típicas das células de cada linhagem, registradas num intervalo de 6h, estão apresentadas na figura 2.5. O erro posicional associado a estas trajetórias é de aproximadamente $0,022\mu\text{m}$ (ver discussão do anexo A). As velocidades médias, ao longo de toda trajetória, foram de $0,73 \pm 0,4\mu\text{m}/\text{min}$ para a linhagem B16F10, $0,72 \pm 0,4\mu\text{m}/\text{min}$ para a linhagem B16F10 infectadas e $1,02 \pm 0,4\mu\text{m}/\text{min}$ para a linhagem Melan A. Levando em consideração as barras de erro, não existem diferenças entre as velocidades médias das três linhagens.

Na figura 2.6 apresentamos a distribuição da densidade de probabilidade das velocidades v para cada uma das linhagens. Observamos que os dados foram bem ajustados com funções distribuições q -gaussianas (representadas pela linha contínua vermelha), sugerindo que estas células obedecem um regime de difusão anômala. Para fins comparativos, incluímos nas figuras o ajuste com a distribuição de probabilidade gaussiana (linhas pontilhadas azuis), no entanto, a cauda não foi bem ajustada com esta distribuição. A distribuição de probabilidade q -gaussiana é dada pela expressão:

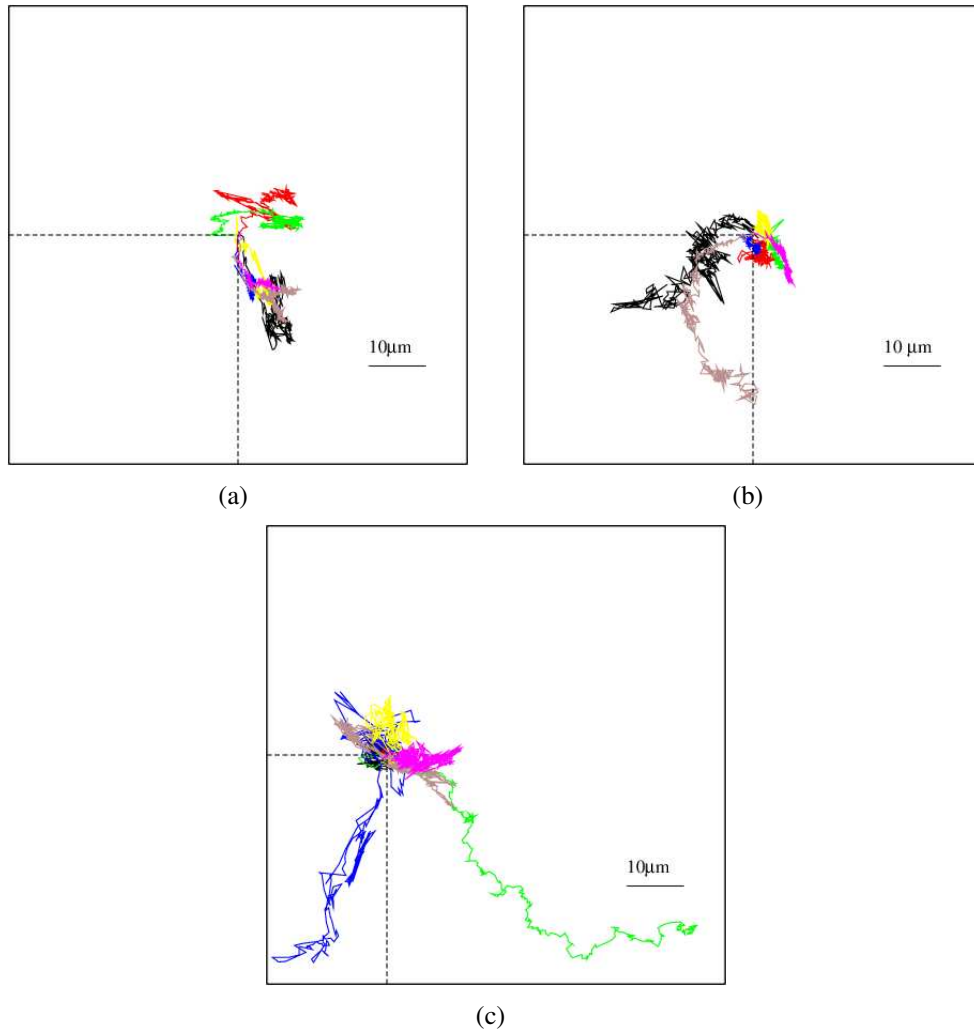


Figura 2.5: Trajetórias típicas das três linhagens. As posições foram registradas a cada intervalo regular $\Delta t = 1$ min e as cores representam as trajetórias individuais das células de cada linhagem. a) B16F10; b) B10F10 infectadas e c) Melan A. O encontro das linhas tracejadas demarca a origem de cada uma das trajetórias. A dimensão de cada figura é $80\mu\text{m} \times 80\mu\text{m}$.

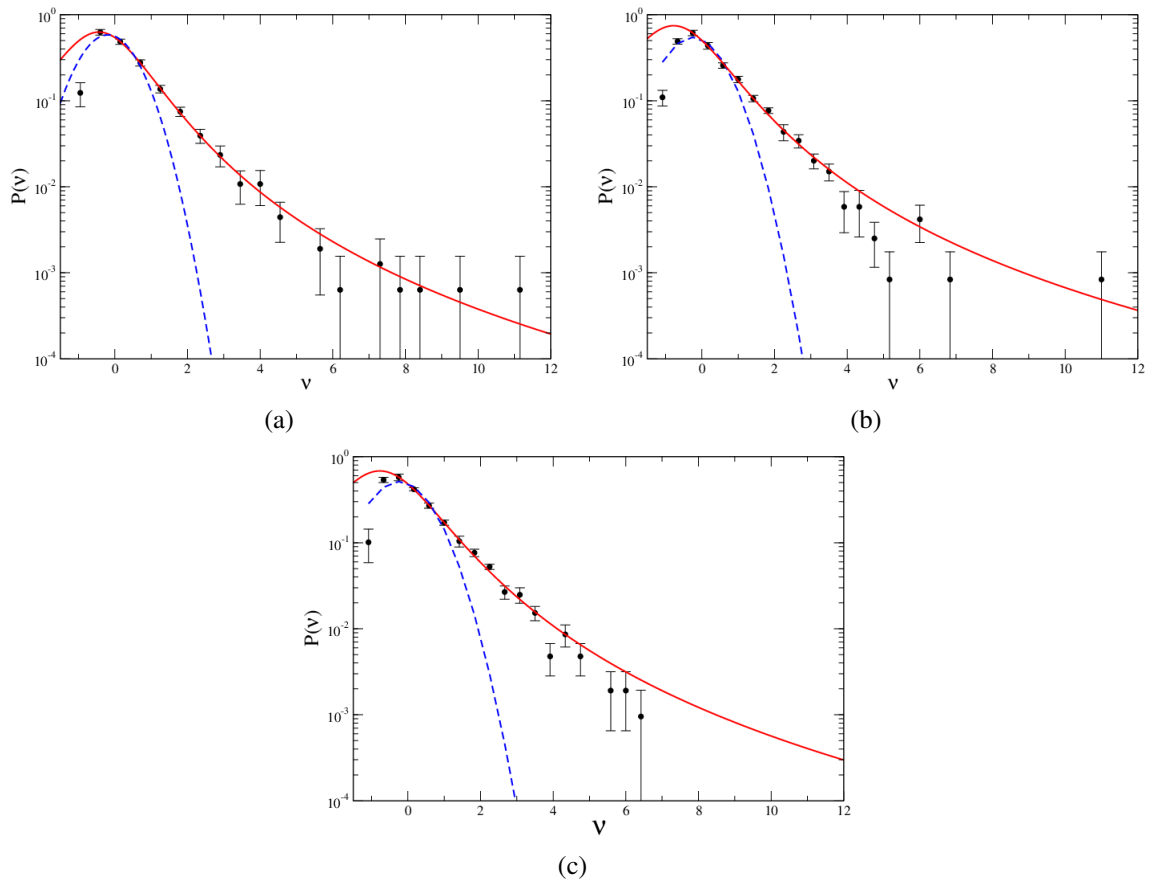


Figura 2.6: Distribuições das densidades de probabilidade das velocidades v calculadas através das posições consecutivas registradas em intervalos de tempo de $\Delta t = 1$ minuto. Os símbolos pretos representam os valores experimentais e as linhas contínuas os ajustes utilizando as distribuições de probabilidade q -gaussianas. As linhas tracejadas representam as tentativas de ajuste com distribuições gaussianas, para efeito comparativo. a) B16F10; b) B16F10 infectadas e c) Melan A.

$$p(x) = p_0 \times \left(1 - (1 - q) \times \frac{(x - \bar{x})^2}{x_0} \right)^{\frac{1}{1-q}}. \quad (2.19)$$

Na equação 2.19, \bar{x} corresponde ao valor médio de x , x_0 está associado à variância e p_0 é o valor máximo da probabilidade, que ocorre quando $x = \bar{x}$. Nesta expressão, o valor do parâmetro q está associado à largura da curva: valores elevados de q resultam em curvas mais largas (e portanto valores mais elevados para o desvio padrão). Os valores de q obtidos nos ajustes de cada curva com a equação 2.19 estão apresentados na tabela 2.1. Observamos que as distribuições de densidade de probabilidade das velocidades calculadas através de posições registradas em intervalos de tempo $\Delta t = 5$ minutos ainda são bem ajustadas com distribuições q -gaussianas, no entanto, os valores de q sofrem pequenas variações ($\pm 20\%$) - dados não mostrados.

O comportamento dos deslocamentos quadráticos médios em função do tempo são apresentados na figura 2.7. Nesta figura, os deslocamentos quadráticos médios de cada célula

Linhagem celular	q_v	γ_e	γ_t	μ_1	λ_s	s
B16F10	1.52	1.32	1.35	-0.0150	0.1748	0.5311
B16F10 infectada	1.55	1.63	1.38	-0.0014	0.1175	0.5123
Melan A	1.52	1.23	1.35	-0.0011	0.3772	0.2518

Tabela 2.1: Valores dos parâmetros q e γ (experimental γ_e e teórico γ_t) obtidos através dos ajustes dos histogramas de velocidades e deslocamentos quadráticos médios com funções q -gaussianas e lei de potência, respectivamente.

foram divididos pelas respectivas velocidades médias ao quadrado, visando colapsar as curvas e observar os comportamentos de r^2 independentemente das velocidades individuais, que podem diferir significativamente entre as células da mesma amostra estudada. Na escala $\log - \log$

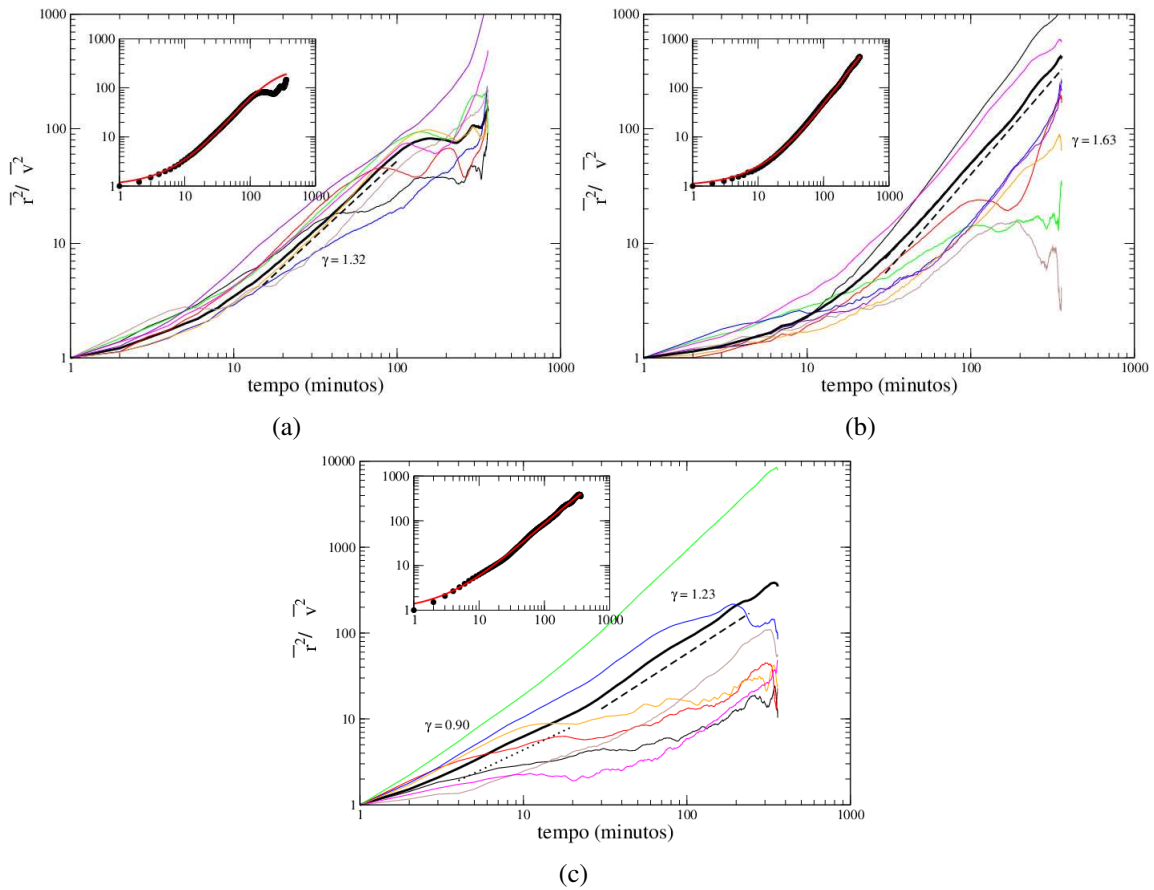


Figura 2.7: Comportamento da razão entre os deslocamentos quadráticos médios e as velocidades médias ao quadrado em função do tempo. a) B16F10; b) B16F10 infectadas e c) Melan A. As linhas coloridas mostram os comportamentos de $\langle r^2 \rangle / v^2$ para as células individuais e a curva preta escura é a curva média. Nos *insets* mostramos os ajustes com a equação 2.21 (linha vermelha contínua), sugerindo que o comportamento do deslocamento quadrático médio apresenta um *crossover* entre dois regimes de migração.

observamos que, em certas regiões e para intervalos de tempo longos ($t > 30$ min), $\langle r^2 \rangle$ apresenta um comportamento do tipo lei de potência, como mostram as linhas tracejadas nas figuras 2.7(a), 2.7(b) e 2.7(c). Os ajustes destes pontos experimentais com funções do tipo lei de potência nestas regiões retornaram $\gamma_e > 1$ nos três casos (ver tabela 2.1), sugerindo que, para

intervalos de tempo longos, as três linhagens seguem um regime de migração superdifusivo. Apenas para a linhagem B16F10 infectada, o valor do expoente γ é inconsistente (distante) com o valor previsto pela relação teórica $\gamma_t = \frac{2}{3-q}$ [25], cujos valores para as três linhagens também estão listados na tabela. O valor de γ_e para a linhagem Melan A é menor em relação à linhagem B16F10, sugerindo que as células Melan A difundem mais lentamente. Do ponto de vista biológico, este resultado sugere que as transformações que geraram as células tumorais possam ter conferido uma melhor capacidade migratória em comparação às células normais.

Embora para regimes de tempos longos o comportamento do deslocamento quadrático médio mostra-se do tipo lei de potência, os *insets* de cada figura mostram que as curvas $\langle r^2 \rangle \times t$ como um todo foram bem ajustadas usando um cenário da mecânica estatística não-extensiva, no qual pressupõe-se que há um *crossover* entre duas leis de potência dado por:

$$\frac{d\tilde{r}}{dt} = \mu_1 \tilde{r} + (\lambda_s - \mu_1) \tilde{r}^s, \quad (2.20)$$

com $\tilde{r} \equiv \bar{r}^2$ e $\mu_1 < \lambda_s$. A equação 2.20 descreve um crescimento no tempo, que passa de um regime linear para um regime não linear. Os parâmetros μ_1 e λ_s são taxas de crescimento, sendo que μ_1 está associado ao crescimento linear enquanto o segundo termo $(\lambda_s - \mu_1)$ está associado ao crescimento não linear, que domina à medida que \tilde{r} cresce. O parâmetro s é o expoente que descreve o crescimento não linear, que no caso é uma lei de potência. A solução da equação 2.20 é:

$$\tilde{r} = \left[1 - \frac{\lambda_s}{\mu_1} + \frac{\lambda_s}{\mu_1} e^{(1-s)\mu_1 t} \right]^{\frac{1}{1-s}}. \quad (2.21)$$

De acordo com esta expressão, e para intervalo de tempo curto ($0 \leq t \ll t_s^*$, onde $t_s^* \equiv \frac{1}{(1-s)\lambda_s}$), temos que $\tilde{r} \sim 1 + \lambda_s t$. Para intervalo de tempo intermediário ($t_s^* \ll t \ll t_1^*$, onde $t_1^* \equiv \frac{1}{(1-s)\mu_1}$), temos que $\tilde{r} \sim \left\{ 1 - \frac{\lambda_s}{\mu_1} + \frac{\lambda_s}{\mu_1} [1 + (1-s)\mu_1 t] \right\}^{\frac{1}{(1-s)}}$. Por fim, para intervalo de tempo longo ($t \gg t_1^*$), $\tilde{r} \sim \left(\frac{\lambda_s}{\mu_1} \right)^{\frac{1}{1-s}} e^{\mu_1 t}$ ⁹. Os valores dos parâmetros de ajuste do deslocamento quadrático médio em função do tempo, utilizando a equação 2.21 também estão apresentados na tabela 2.1. Os resultados novamente sugerem que a linhagem Melan A apresenta menor difusividade (para intervalo de tempo intermediário), tendo em vista que o valor do parâmetro s obtido com o ajuste é menor em relação ao obtido para a linhagem B16F10.

A autocorrelação entre velocidades consecutivas decai rapidamente em função do tempo, como mostram os gráficos da figura 2.8. A linha vermelha mostra um ajuste com uma função

⁹Estes resultados foram obtidos seguindo os mesmos passos definidos na referência [26], na qual a expressão 2.20 é ligeiramente diferente.

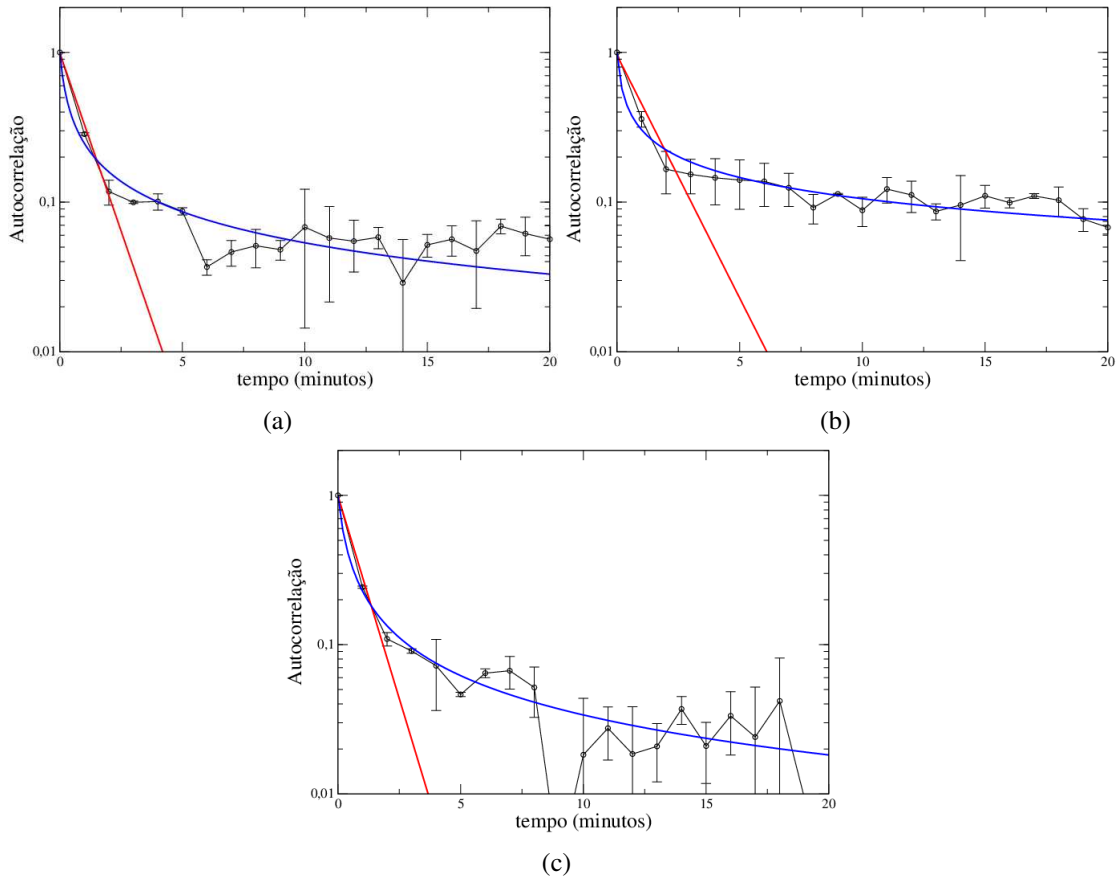


Figura 2.8: Autocorrelação de velocidades em função do tempo. a) B16F10; b) B16F10 infectadas e c) Melan A.

exponencial ($c_v \sim e^{-t/t^*}$), cujos tempos característicos são muito curtos, entre 0,8 e 1 minuto. As linhas azuis mostram ajustes com funções q -exponenciais dadas por:

$$p_{qe}(x) = p_0 \times [1 - (1 - q) \times (x/x_0)]^{\frac{1}{(1-q)}}. \quad (2.22)$$

Na equação 2.22, o parâmetro x_0 representa o comprimento característico da distribuição, enquanto p_0 corresponde ao valor máximo da probabilidade. Os valores de q estão no intervalo 2.4216 (Melan A) e 2.3920 (B16F10 infectada). Este resultado mostra que autocorrelação entre velocidades consecutivas é, nos três casos, de curto alcance e decaem mais lentamente que as funções exponenciais.

Os histogramas dos ângulos de giro (α) mostram que desvios angulares próximos de $+\pi$ e $-\pi$ são mais frequentes, como mostram as figuras 2.9(a), 2.9(c) e 2.9(e). Ou seja, se a direção do movimento no tempo t_i ocorre na direção θ_i , é mais provável que o próximo passo seja dado na direção $\theta_i \pm \pi$, sugerindo que movimentos consecutivos são anticorrelacionados. É interessante notar que os histogramas da direção de movimento das três linhagens apresentam máximos locais cuja diferença entre eles, em radianos, é próxima do valor de π , como mostram

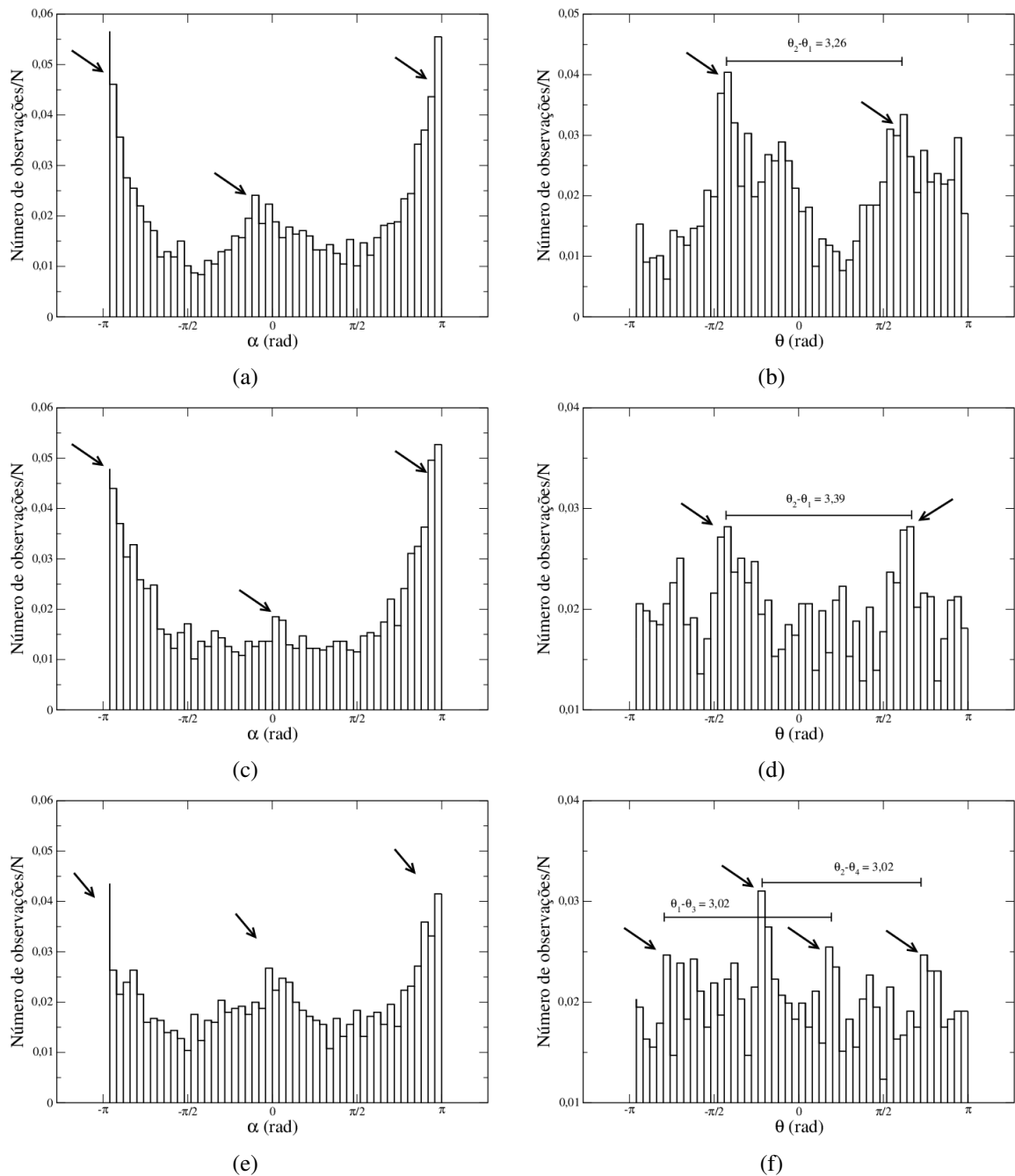


Figura 2.9: Histogramas normalizados dos ângulos de giro (coluna da esquerda) e direções de movimento (coluna da direita). As setas indicam os valores mais prováveis. a) e b) B16F10; c) e d) B16F10 infectadas; e) e f) Melan A.

as setas nas figuras 2.9(b), 2.9(f) e 2.9(d). Este resultado reforça a hipótese de que ao executar um movimento numa dada direção (θ_1 por exemplo), há uma tendência do próximo movimento do centróide ocorrer no sentido contrário ($\theta_2 = \theta_1 \pm \pi$). Contudo, levando em conta que os resultados referem-se a movimentos migratórios de células em amostras de culturas diferentes, não podemos afirmar que estes máximos locais revelam a existência de uma mesma direção preferencial de movimento em todas as amostras. Estes resultados apenas evidenciam que há uma tendência dos movimentos consecutivos serem executados em sentidos opostos.

Ainda explorando os resultados apresentados na figura 2.9, notamos que os histogramas de ângulos de giro das linhagens B16F10 (sem infecção) e Melan A (figuras 2.9(a) e 2.9(e), respectivamente) apresentam um máximo central, o qual é menos expressivo no histograma da linhagem B16F10 infectada (figura 2.9(c)). A existência deste máximo central sugere que também há uma tendência de movimentos consecutivos serem realizados no mesmo sentido, porém com menor probabilidade que de serem realizados em direções opostas. Sendo assim, os resultados da figura 2.9 sugerem que as células B16F10 sob infecção realizam poucos movimentos numa mesma direção (máximo central pouco expressivo) enquanto este tipo de movimento é mais frequente entre as células das linhagens Melan A e B16F10 não infectadas. Levando em consideração que o movimento de migração das células ocorre pela formação de pseudópodos, estes resultados nos levam a sugerir que se no tempo t_i a célula se desloca numa dada direção devido a formação de um pseudópodo, nos instantes seguintes haverá uma tendência da membrana celular restaurar o seu formato. Esta restauração do formato celular pode resultar, no instante de tempo t_{i+1} , no deslocamento do centro de massa no sentido contrário ao que ocorreu no tempo t_i . Quanto mais lentamente a célula restaurar o seu formato após o estiramento do pseudópodo, maior a tendência de movimentos consecutivos ocorrerem na mesma direção; mais próximos de zero estarão os ângulos de desvio α , levando a formação de máximos centrais nos histogramas de ângulos de giros. Por outro lado, quanto mais rápido a célula restaurar o seu formato após o estiramento do pseudópodo, torna-se menor a probabilidade de passos consecutivos serem dados numa mesma direção.

Os resultados decorrentes da análise dos modos de migração direcionada e de reorientação reforçam esta interpretação. Na figura 2.10 mostramos os histogramas normalizados dos ângulos de giro nos modos de migração direcionais (preto) e de reorientação (vermelho), usando $\alpha^* = 45^\circ$. Observamos que o modo de reorientação é predominante nas três linhagens, como mostram os valores em parênteses na legenda de cada figura. Em números, a fração de passos no modo direcional 17% para B16F10 infectada, 22% para B16F10 não infectada e 25% para Melan A. Este resultado é qualitativamente semelhante quando utilizamos os outros valores de α^* mencionados anteriormente (α^* variando no intervalo de 5° a 60°). Ou seja, a frequência de passos no modo direcional é ligeiramente maior entre as células da linhagem Melan A em relação às células da linhagem B16F10. Isto nos leva a sugerir que (segundo a nossa hipótese) a restauração do formato das células da linhagem Melan A (normais) ocorre mais lentamente, possivelmente por possuírem membranas mais rígidas ou uma dinâmica de polimerização-despolimerização mais lenta do citoesqueleto (estas hipóteses podem ser testadas através de técnicas de microscopia de desfocalização). Diferente destas, as células da linhagem B16F10 (tumorais) restauram o seu formato mais rapidamente, talvez por possuírem membranas mais

flexíveis ou uma dinâmica de polimerização-despolimerização mais rápida. É possível que estas alterações possibilitem a célula a migrar mais rápido e portanto apresentar maior difusividade. Esta interpretação poderia explicar o fato do valor do expoente γ ser maior para a linhagem B16F10 em relação à linhagem MelanA. Seguindo esta interpretação, a infecção das amostras de B16F10 levaria a um aumento na flexibilidade destas membranas, conferindo a estas uma melhor capacidade migratória, que é coerente com o fato de $\gamma_{B16F10_{infectada}} > \gamma_{B16F10}$.

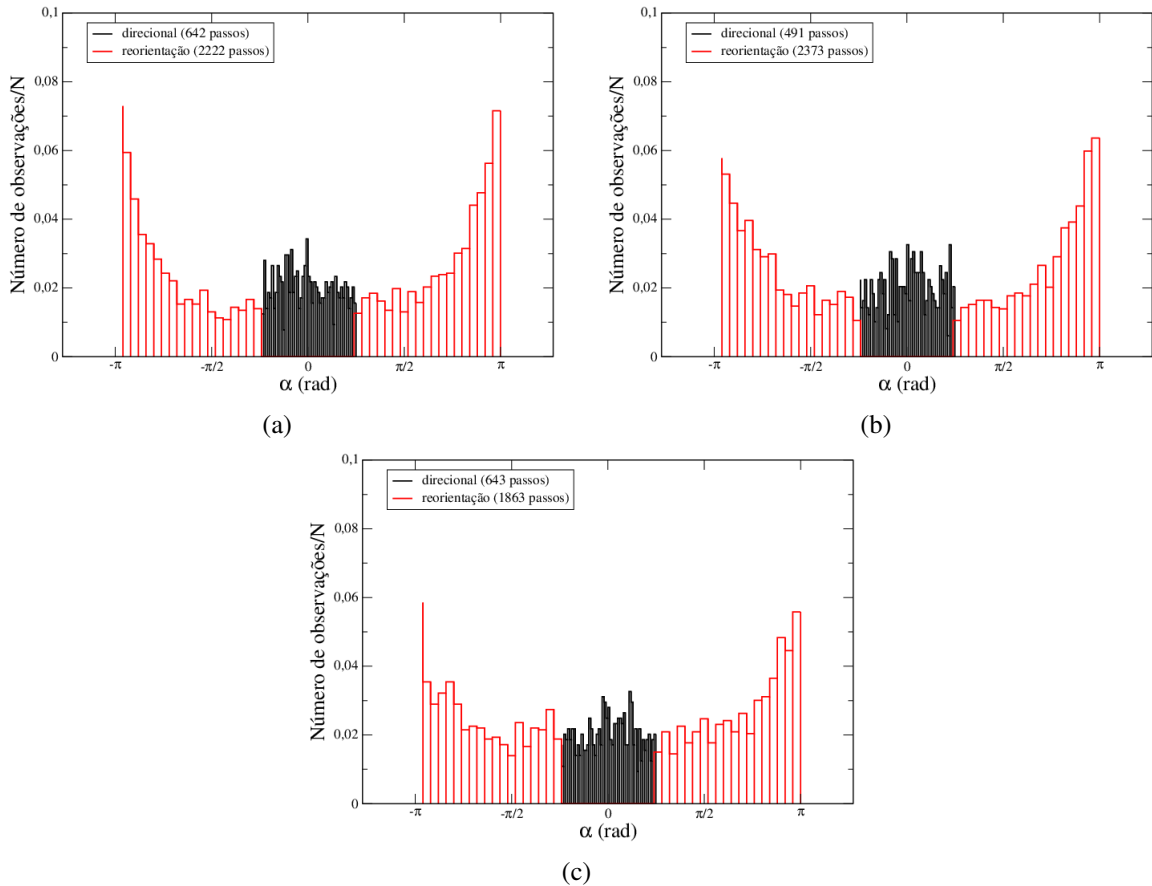


Figura 2.10: Histogramas normalizados dos ângulos de giro dos modos de migração direcional (preto) e reorientação (vermelho). a) B16F10; b) B16F10 infectadas e c) Melan A.

As funções distribuição de densidade acumulada complementar para as distâncias percorridas em cada modo de migração (ainda utilizando $\alpha^* = 45^\circ$), definidas como

$$P(l) = 1 - \sum_{i=1}^n p(l_i) \quad (2.23)$$

(onde l_i é o comprimento de cada passo dos n consecutivos em cada modo de migração) mostram que a distribuição das distâncias totais percorridas nos modos de migração direcional e reorientação são do tipo exponenciais ($P(l) \sim e^{-l/l^*}$), como mostra a figura 2.11. Os valores de l^* obtidos com estes ajustes estão apresentados na tabela 2.2. Para as três linhagens os comprimentos característicos l^* são menores para os modos de migração direcionais, o que sugere

que as distâncias totais percorridas neste modo são mais curtas em relação às que ocorrem na migração de reorientação. Resultados similares foram obtidos quando variamos o valor de α^* . Observamos que os valores de l^* tornam-se decrescentes à medida que α^* cresce (ver anexo A). Isto ocorre porque à medida que α^* cresce, a migração direcional passa a ser menos interrompida pelos movimentos de reorientação. Desta forma, as distâncias totais percorridas muito curtas tendem a desaparecer e distâncias totais mais longas tenderem a ser mais frequentes; porém, ainda assim, os comprimentos característicos tornam-se decrescentes à medida que α^* cresce. Para o modo de reorientação, a redução do valor de l^* pode estar associado ao encurtamento da cauda, uma vez que as distâncias percorridas menores tornam-se mais frequentes e as longas distâncias desaparecem à medida que α^* aumenta.

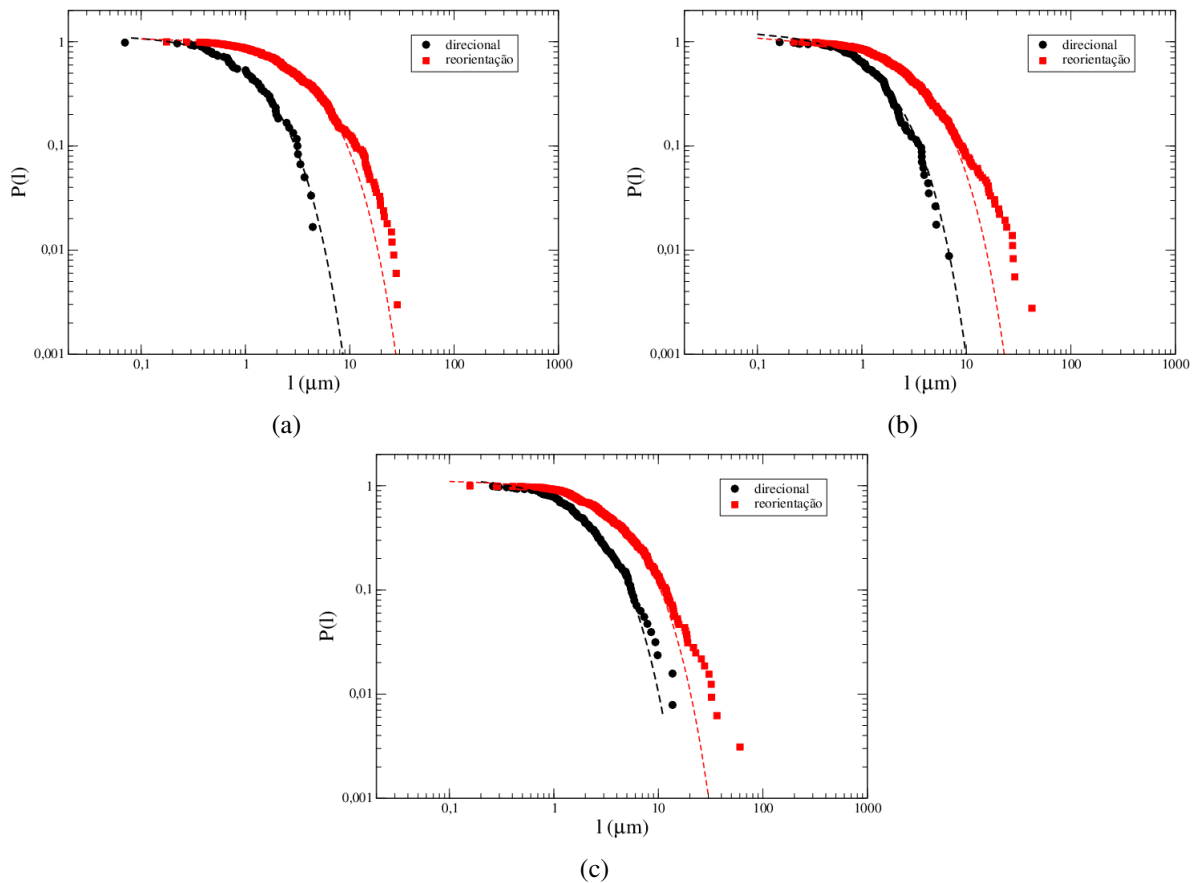


Figura 2.11: Distribuições de densidade acumulada complementar para as distâncias percorridas nos modos de migração direcional (preto) e reorientação (vermelho). As linhas tracejadas representam ajustes com distribuições exponenciais. a) B16F10; b) B16F10 infectadas e c) Melan A.

Com a finalidade de identificar se existem diferenças entre estas três linhagens do ponto de vista estatístico, aplicamos o teste estatístico T^2 Hotelling ao nosso conjunto de dados. Para isto, as distribuições de velocidade instantânea e deslocamento quadrático médio de cada célula foram analisados. Os valores médios e respectivos desvios padrões destas medidas estão apresentados na tabela 2.3. Neste teste, os valores de q_v e γ obtidos com os ajustes das distribuições

Linhagem celular	l^* (direcional)	l^* (reorientação)
B16F10	$1,39\mu\text{m}$	$3,28\mu\text{m}$
B16F10 infectada	$1,21\mu\text{m}$	$3,95\mu\text{m}$
MelanA	$2,10\mu\text{m}$	$4,31\mu\text{m}$

Tabela 2.2: Valores para o comprimento característico l^* obtidos nos ajustes da distribuição densidade acumulada complementar $P(l)$ com a função exponencial, para modos de migração direcional e reorientação, usando $\alpha^* = 45^\circ$.

de velocidades e de deslocamento quadrático de cada célula de uma dada linhagem (por exemplo, Melan A) são comparados com os valores médios destas mesmas quantidades de uma linhagem diferente (por exemplo, B16F10). Se os valores individuais destes parâmetros de uma dada linhagem i são bem representados pelos valores médios da linhagem j , o teste nos diz que não existem diferenças significativas entre as linhagens i e j , dentro de uma dada margem de erro (chamada de nível de significância). De acordo com este teste, e limitando a margem de erro a 5%, não existem diferenças significativas entre as três linhagens em relação aos parâmetros q e γ .

Linhagem celular	\bar{q}_v	$\bar{\gamma}$
B16F10	$1,55 \pm 0,38$	$1,21 \pm 0,19$
B16F10 infectada	$2,12 \pm 0,25$	$1,44 \pm 0,40$
MelanA	$2,05 \pm 0,48$	$1,23 \pm 0,34$

Tabela 2.3: Valores médios e respectivos desvios padrão para os parâmetros q e γ obtidos com os ajustes das distribuições de velocidade e deslocamento quadrático médio de cada célula, individualmente.

2.6 Modelo de uma caminhada q -Gaussiana com persistência de curto alcance

Visando melhor compreender os movimentos de migração destas linhagens celulares, nós propusemos um modelo de caminhada em um reticulado bidimensional. Neste modelo, o tamanho de cada passo é escolhido a partir de uma distribuição q -gaussiana, sendo que o primeiro passo é dado em uma direção escolhida aleatoriamente. Sob uma probabilidade p_{dir} , podem ser dados n_{dir} passos na mesma direção do n -ésimo passo, sendo que n_{dir} é sorteado a partir de uma distribuição exponencial $P(n_{dir}) \sim e^{-n_{dir}/n_{dir}^*}$, onde n_{dir}^* é definido como o número característico de passos dados numa mesma direção. O ângulo de desvio é escolhido obedecendo uma distribuição gaussiana centrada na direção do passo anterior (ou seja, o ângulo de giro preferencial $\alpha_{pref} = 0^\circ$). Após estes n_{dir} passos, o número total de passos é incrementado por uma quantidade $\Delta n = n_{dir}$. Já os passos de reversão são escolhidos com probabilidade p_{rev} , também seguindo uma distribuição exponencial $P(n_{rev}) \sim e^{-n_{rev}/n_{rev}^*}$, onde n_{rev}^* é definido como

o número característico de passos dados numa direção oposta à realizada no tempo t . Neste caso, os ângulos de giro também são escolhidos de acordo com uma distribuição gaussiana, porém centrados na direção oposta à direção n -ésimo passo (ou seja, $\alpha_{pref} = 180^\circ$). Após estes n_{rev} passos, número total de passos é incrementado por uma quantidade $\Delta n = n_{rev}$. Por fim, sob uma probabilidade $p_{reor} = 1 - p_{dir} - p_{rev}$ pode ser dado um único passo em qualquer direção, escolhida aleatoriamente entre $\pm\pi$. O número total de passos é incrementado por uma quantidade $\Delta n = 1$.

Realizamos simulações deste modelo utilizando diferentes valores de n^* para o número de passos de reversão: $n_{rev}^* = 3$, $n_{rev}^* = 2$ e $n_{rev}^* = 1$. Os demais parâmetros foram mantidos fixos: $p_{rev} = 0,2$, $p_{dir} = 0,08$ e $n_{dir}^* = 0,5$. As larguras das distribuições gaussianas são $\sigma_\alpha = 30^\circ$ e limitadas a $\alpha_{lim} = 90^\circ$. Os parâmetros da simulação foram escolhidos para fins comparativos (do ponto de vista qualitativo) entre os resultados do modelo e os resultados experimentais. Para cada conjunto de parâmetros, 1000 caminhadas foram simuladas e as médias das quantidades físicas que as caracterizam foram obtidas.

Na figura 2.12 apresentamos o deslocamento quadrático médio em função do número de passos N para os três valores de n_{rev}^* . Todas as curvas mostram um comportamento de $\langle r^2 \rangle$ do tipo lei de potência ($\langle r^2 \rangle \sim N^\gamma$), mas com diferentes escalas em diferentes regiões do gráfico. Para intervalo de tempo curto (até $N = 40$ passos), $\gamma \approx 1$, o que indica difusão normal neste regime de tempo. À medida que o número de passos cresce, o expoente γ torna-se maior que 1, indicando superdifusão. Para intervalos de tempo longo ($N > 1000$ passos), a difusão tende ao regime balístico ($\gamma \rightarrow 2$), enquanto para intervalos de tempo intermediários, $1,2 \leq \gamma \leq 1,6$ para n_{rev} variando de 1 a 3. Contudo, observamos que quanto maior o valor de n_{rev}^* , mais lenta é a difusão, uma vez que para $n_{rev} = 3$ os valores de gama são mais baixos para os intervalos de tempo intermediário e longo, em relação aos que foram obtidos com $n_{rev} = 1$.

As linhas contínuas em vermelho mostram que as curvas como um todo são ajustadas com um *crossover* de duas leis de potência, do tipo:

$$r^2 = aN^b \times (1 + cN^d). \quad (2.24)$$

Os parâmetros b e d assumem valores próximos de 1,0 enquanto c é muito pequeno. Sendo assim, para valores grandes de N a difusão tende ao regime balístico ($b + d \approx 2,0$).

As trajetórias obtidas em algumas simulações do nosso modelo de caminhada q-Gaussiana estão apresentadas na figura 2.13. Nesta figura, as regiões maiores possuem dimensão $800 \times 800u$ ($u =$ unidade arbitrária) e mostram as trajetórias após 5000 passos de três amostras

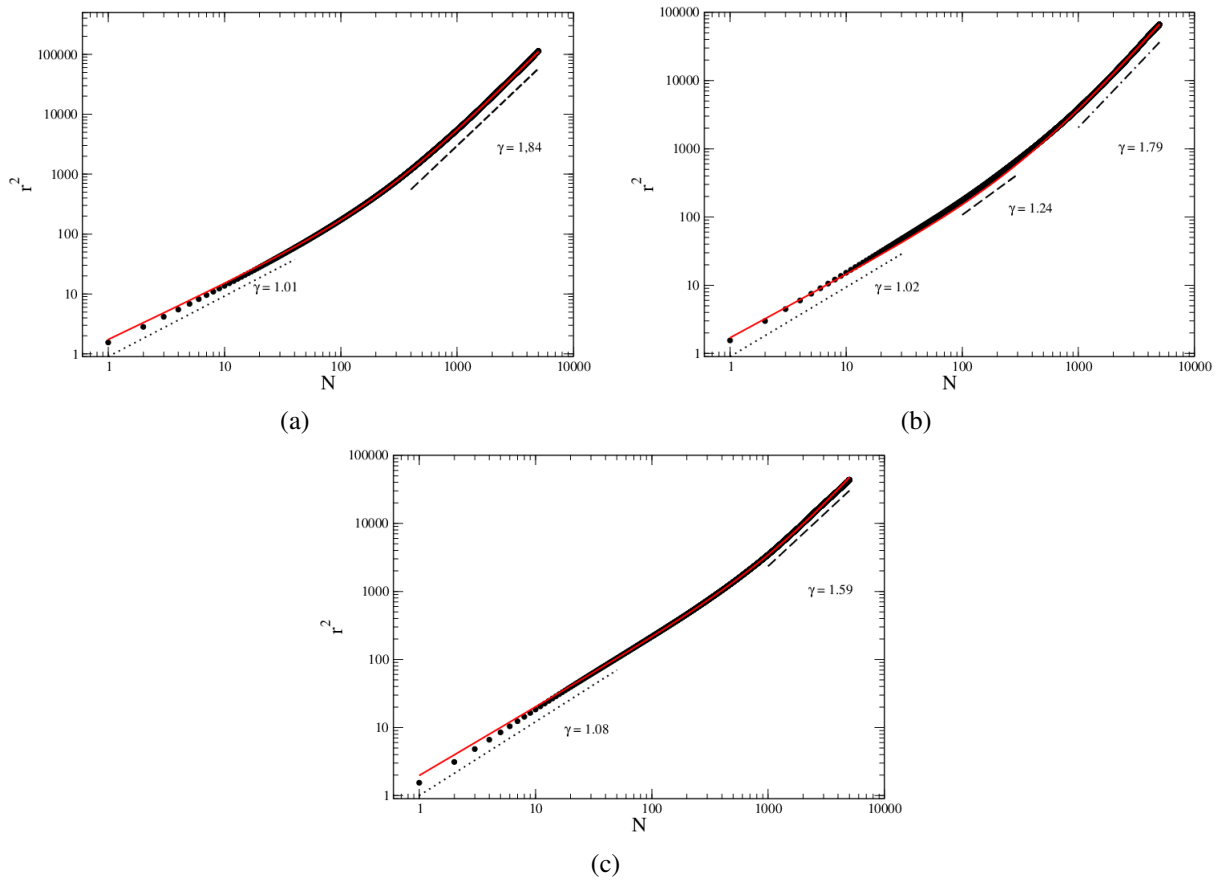


Figura 2.12: Comportamento de $\langle r^2 \rangle \times N$ para as simulações de caminhadas q -Gaussianas. a) $n^* = 1$; b) $n^* = 2$ e c) $n^* = 3$. As linhas vermelhas contínuas são ajustes com a equação 2.24.

distintas. Embora nos três casos seja possível perceber que há uma tendência de movimento para uma dada direção, observamos que quanto menor for o número de passos de reversão (n_{rev}^*), mais rapidamente a célula se afasta da origem, o que é coerente com o valor mais alto de γ no regime de tempo longo para $n_{rev}^* = 1$. Além disso, é interessante notar que esta tendência de migração numa direção preferencial não é observada após 360 passos; os *insets* na figura 2.13 mostram que para 360 passos a caminhada assemelha-se ao *random walk*, tal como foi observado nas trajetórias celulares apresentadas na figura 2.5. Ou seja, é possível que as trajetórias celulares não mostrem direções preferenciais de movimento devido ao reduzido tempo de filmagem (6h).

A altura do pico central observado nos histogramas dos ângulos de giro das trajetórias celulares também estão relacionados com o valor de n_{rev}^* , como mostra a figura 2.14. Quanto maior é o valor de n_{rev}^* , mais pronunciado é o pico central, indicando a persistência do movimento numa mesma direção.

Comparando os resultados do modelo com os resultados experimentais, podemos associar o histograma dos ângulos de giro obtido através das simulações usando $n_{rev}^* = 1$ (figura

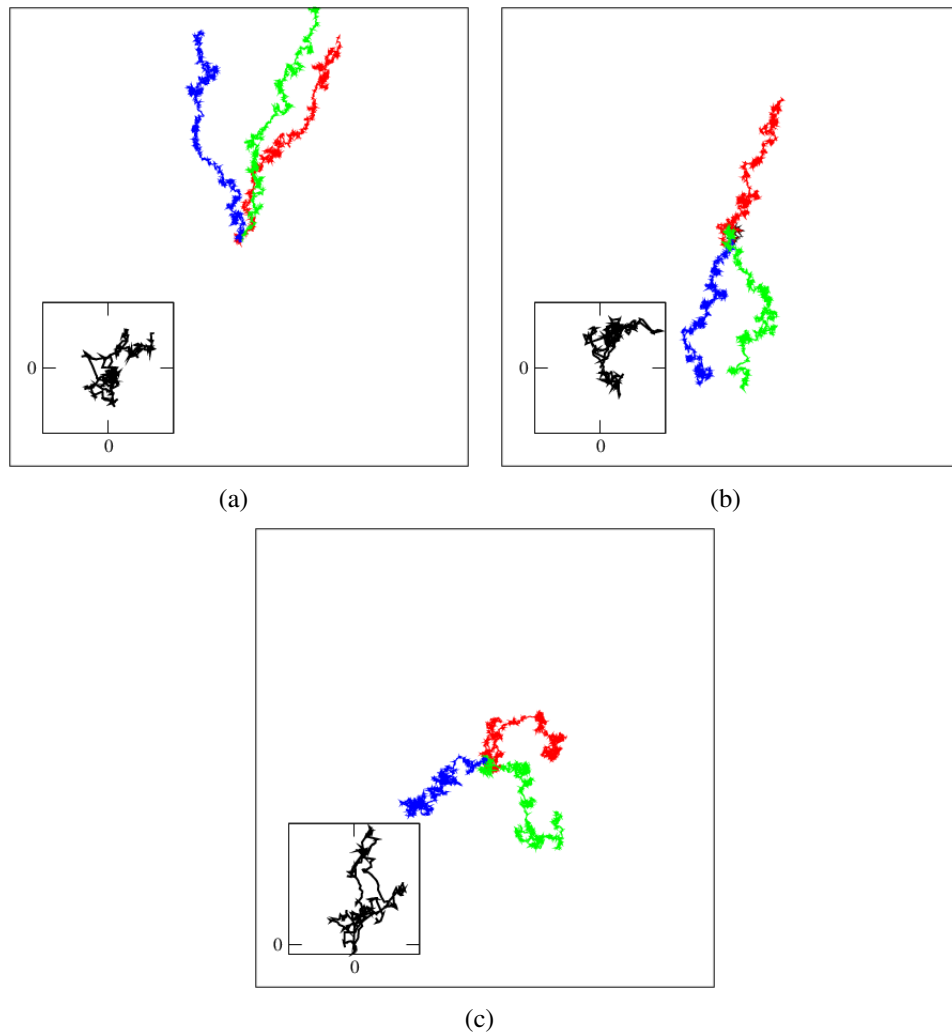


Figura 2.13: Trajetórias observadas em diferentes simulações do nosso modelo de caminhadas q -Gaussianas. As cores representam as trajetórias obtidas em diferentes simulações do modelo. a) $n^* = 1$; b) $n^* = 2$ e c) $n^* = 3$.

2.14(a)) ao histograma dos ângulos de giro da linhagem B16F10 infectada, apresentada na figura 2.9(c), ambas com o máximo central menos pronunciado. Já os histogramas de ângulos obtidos com $n_{rev}^* = 2$ (2.14(b)) e $n_{rev}^* = 3$ (2.14(c)) podem ser associados, respectivamente, aos histogramas de ângulos das linhagens B16F10 (2.9(a)) e Melan A (2.9(e)), respectivamente, que apresentam um pico central mais pronunciado. Ou seja, os resultados das simulações do modelo reforçam a hipótese de que as células da linhagem B16F10 infectadas realizam menos movimentos de reversão em relação às demais linhagens. Estes resultados também são consistentes quando comparamos os comportamentos do deslocamento quadrático obtidos nas simulações e experimentalmente: o comportamento de $\langle r^2 \rangle$ da linhagem B16F10 infectada sugere maior difusividade, o que também foi observado nos resultados do modelo para $n_{rev}^* = 1$. Por outro lado, o comportamento de $\langle r^2 \rangle$ sugere que a linhagem Melan A difunde mais lentamente, o que também está de acordo com o resultado do modelo para $n_{rev}^* = 3$. Ou seja, os resultados do modelo reforçam a hipótese de que aparentemente há uma tendência das células da linhagem Melan

A realizarem um número maior de movimentos de reversão em comparação às células da linhagem B16F10, o que pode estar relacionado à restauração mais lenta do formato da membrana celular ou com uma dinâmica mais lenta de polimerização-despolimerização do citoesqueleto. Já as células da linhagem B16F10 aparentemente realizam estas ações mais rapidamente, o que confere uma maior capacidade migratória das mesmas.

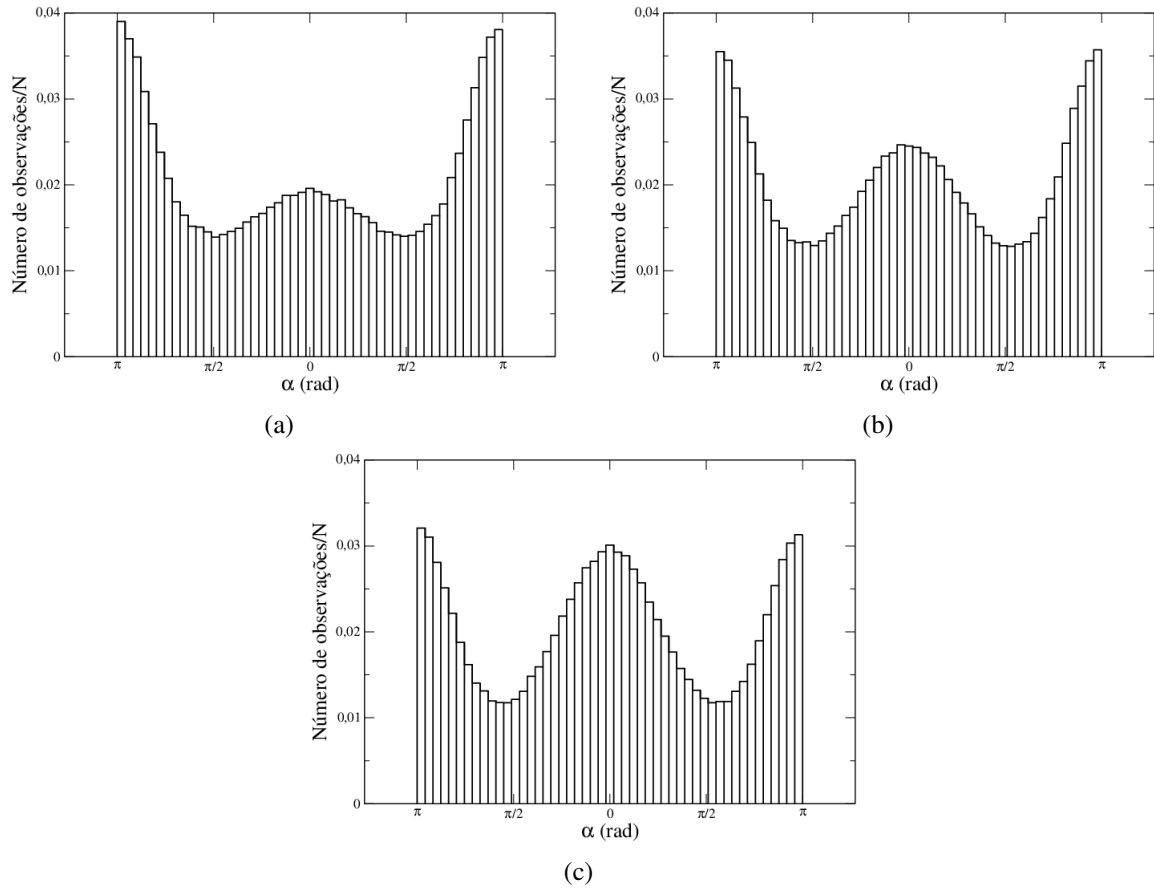


Figura 2.14: Histogramas dos ângulos de giro obtidos via simulações do nosso modelo de caminhadas q -Gaussianas. a) $n^* = 1$; b) $n^* = 2$ e c) $n^* = 3$.

O comportamento da autocorrelação de velocidades decresce rapidamente, oscilando em torno de zero a partir de $N = 1$ ou $N = 2$, como mostra a figura 2.15. Ou seja, embora a autocorrelação dos resultados experimentais também decresça rapidamente (abaixo de 0,2 para $t = 2\text{min}$), a autocorrelação obtida nas simulações decai mais bruscamente. O comportamento é similar para os diferentes valores de n_{rev}^* . No entanto, acreditamos que o aumento nos valores de p_{rev} e p_{dir} leva a um aumento na correlação entre os movimentos consecutivos, mas estes efeitos precisam ser investigados.

Os resultados deste trabalho foram publicados na referência [27], que encontra-se em anexo no apêndice B.

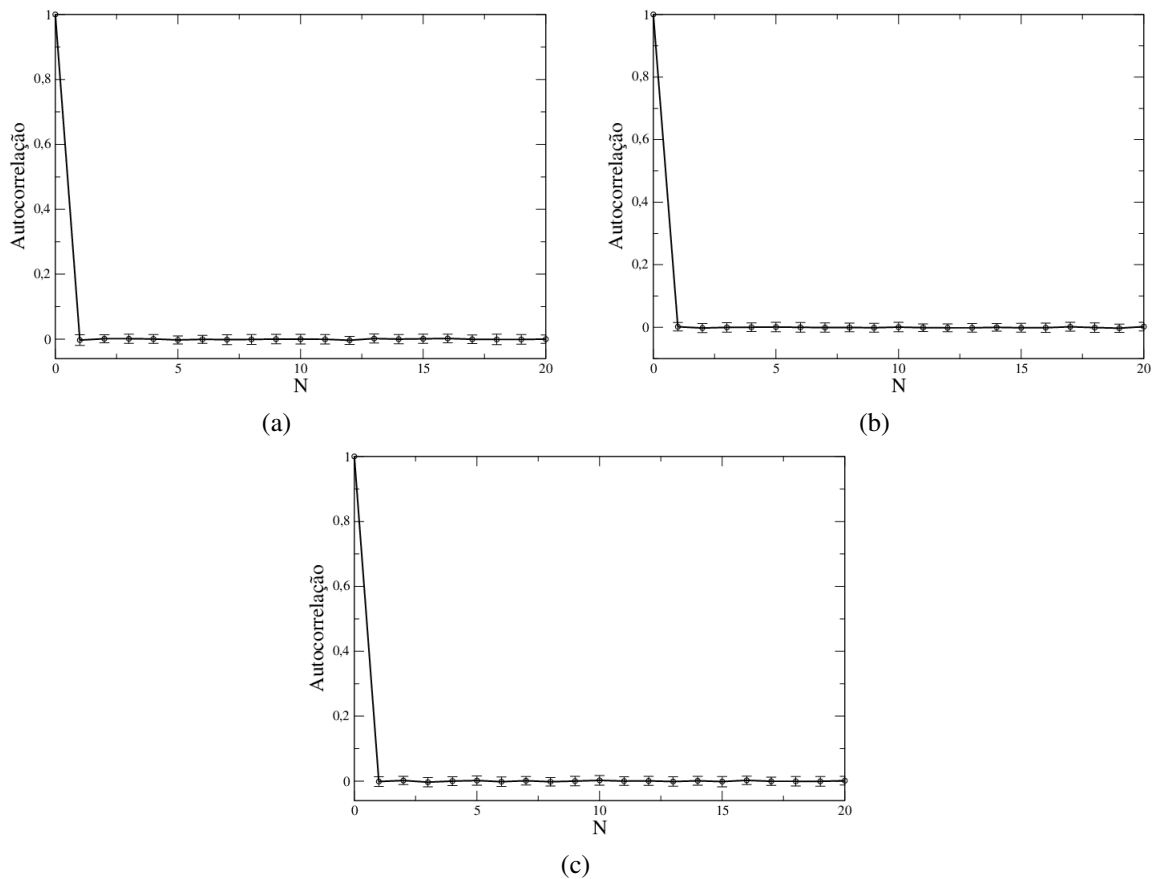


Figura 2.15: Autocorrelação de velocidades obtidas através das simulações do nosso modelo de caminhadas q -Gaussianas. a) $n^* = 1$; b) $n^* = 2$ e c) $n^* = 3$.

2.7 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho nós analisamos a migração de melanócitos murinos, normais e tumorais, plaqueados em superfícies plásticas bi-dimensionais, livres de gradientes de sinalização externos, conferindo condições de mobilidade aleatória. Toda a análise foi feita em torno das leis de escala dos deslocamentos quadráticos médios, distribuições das velocidades celulares e ângulos de giro entre movimentos consecutivos. Sob estas condições de mobilidade aleatória, estas células apresentaram um movimento de migração translacional, superposto ao significativo movimento de flutuação de membrana. Durante o desenvolvimento deste trabalho não foi possível desassociar os dois tipos de movimento, os quais influenciam na posição do centróide (este tipo de investigação está sendo realizado atualmente pelo nosso grupo de pesquisa). Entretanto, qualquer que seja a intensidade da contribuição destes movimentos separadamente, os resultados deste trabalho mostram que estas células exibem uma migração superdifusiva, com velocidades que seguem uma distribuição q -Gaussiana, sem correlações de longo alcance.

Assim como foi registrado nos trabalhos de outros autores utilizando outras linhagens

de células, os nossos resultados sugerem que as velocidades instantâneas das linhagens B16F10 e Melan A obedecem uma distribuição de probabilidades do tipo q -gaussiana. Os valores do parâmetro q foram obtidos através de ajustes e ficaram no intervalo de 1,52 (Melan A e B16F10) a 1,55 (B16F10 infectada), indicando superdifusão. O regime superdifusivo foi confirmado pelo comportamento do deslocamento quadrático médio em função do tempo. Estes foram bem ajustados com funções do tipo lei de potência para $t > 30$ min, fornecendo valores de γ no intervalo 1,23 (Melan A) a 1,68 (B16F10 com infecção), em todos os casos maiores que 1, também indicando superdifusão. Tendo em vista que os maiores valores de γ foram obtidos nos ajustes da linhagem B16F10, sugerimos que as células B16F10 difundem mais rápido do que as células da linhagem Melan A.

Apesar do comportamento em lei de potência para intervalos de tempo longos, o comportamento do deslocamento quadrático médio como um todo sugere que há um *crossover* entre dois regimes de lei de potência. Nos três casos, as curvas $\langle r^2 \rangle$ foram ajustada com a equação 2.21, cujos comportamentos para tempo curto e intermediário escalam com t e $t^{\frac{1}{1-s}}$. Ou seja, para intervalo de tempo curto, as células apresentam difusão normal, e para intervalos de tempo intermediário o regime é superdifusivo. Os ajustes dos deslocamentos quadrático médio com a equação 2.21 mostram que no caso específico da linhagem B16F10, esta difusão é balística para tempos intermediários com $\langle r^2 \rangle \sim t^{\frac{1}{1-0,50}} \approx t^{2,00}$. Já para a linhagem Melan A, a lei de escala é $\langle r^2 \rangle \sim t^{\frac{1}{1-0,25}} \approx t^{1,33}$, superdifusivo. Entretanto, os resultados do modelo sugerem que a linhagem Melan A também atinge o regime de difusão balístico, mas mais lentamente. Aparentemente não há nenhum mecanismo biológico que esteja relacionado com o surgimento do *crossover*, uma vez que nas nossas simulações o *crossover* entre duas leis de potência também foi observado. Possivelmente, para um número pequeno de deslocamentos, a difusão através de passos que seguem uma distribuição q -Gaussiana é muito semelhante à que ocorre seguindo uma distribuição Gaussiana de passos. Sendo assim, apenas para intervalos de tempo longo as diferenças entre regimes de difusão normal e anômala são observadas.

A autocorrelação de velocidades decai segundo uma distribuição q -exponencial, com valores de $q > 1$, o que implica um decaimento mais lento que a função exponencial. No entanto, para $t > 2$ min os valores da autocorrelação são próximos de 0,1, indicando que as correlações são fracas e de curto alcance. Possivelmente estes movimentos fracamente correlacionados em virtude da condição experimental de baixa densidade de células no plaqueamento. A correlação de movimentos pode ser decorrente da sinalização célula-célula, e uma vez que a densidade de células é muito baixa, o efeito da sinalização entre células pode ser muito fraco, o que reduz a correlação entre movimentos consecutivos.

Os histogramas dos ângulos de desvio (α) entre movimentos consecutivos mostram que os desvios de $\pm\pi$ são mais frequentes. Porém os histogramas de ângulo de desvio das linhagens B16F10 (sem infecção) e Melan A apresentaram também um máximo central, indicando que também há uma tendência dos movimentos consecutivos acontecerem na mesma direção (persistência), porém com menor frequência. O fato deste máximo central estar menos pronunciado no histograma dos ângulos α da linhagem B16F10 infectada sugere que, neste caso, os movimentos no mesmo sentido são pouco frequentes. Tendo em vista que a difusão da linhagem Melan A é mais lenta, é possível que este máximo central observado no histograma dos ângulos α dessa linhagem esteja associado a uma certa persistência durante a reversão do movimento, ao invés de uma persistência ao seguir uma direção preferencial. Os resultados do nosso modelo para caminhadas com persistência de curto alcance reforçam esta hipótese, uma vez que quanto maior é o número de passos de reversão em relação a um dado movimento, mais lenta é a difusão.

Estes resultados nos levam a acreditar que as alterações que geram os melanócitos cancerosos da linhagem B16F10 possuem vantagens migratórias em relação aos melanócitos normais da linhagem Melan A. É possível que alterações no nível genético tenham influenciado na dinâmica de polimerização-despolimerização do citoesqueleto (que é a responsável pelo movimento da célula), tornando-a mais rápida nas células B16F10 em relação à linhagem Melan A, ou que as membranas da linhagem B16F10 tenham se tornado mais flexíveis. Sendo assim, e supondo que após a formação do pseudópodo há um recuo do centro de massa para que a célula restaure o seu formato inicial, tal reestabelecimento de forma deve ocorrer mais rapidamente entre as células B16F10, o que leva à diminuição dos movimentos numa mesma direção.

O efeito da infecção da linhagem B16F10 com micoplasma não altera o tipo de migração em relação às células sem infecção. No entanto, aparentemente há um aumento na capacidade migratória das células infectadas, possivelmente pela diminuição de movimentos de reversão do centro de massa.

Como perspectivas futuras, este trabalho incita a comparação das linhagens B16F10 e Melan A num nível genético. Especificamente, deve-se investigar se existem diferenças nos níveis de expressão entre os genes que estejam associados direta ou indiretamente à mobilidade celular. Comparações entre flutuações de membrana de ambas linhagens também podem ser feitas, visando a análise de flexibilidade delas entre as diferentes linhagens. Por fim, pretendemos estudar um método que permita desassociar os deslocamentos do centro de massa em função dos movimentos migratórios propriamente ditos dos deslocamentos que ocorrem em função da mudança do formato celular.

3 *Caracterização da dinâmica de agregação celular in vitro*

3.1 Motivação

Existem evidências que a progressão do câncer é dirigida inicialmente pela seleção de fenótipos celulares que conferem vantagens proliferativas em relação às células normais [1]. Além disso, variações epigenéticas são parte dos eventos críticos nos estágios iniciais da carcinogênese, e a expressão de tais estados transformados são favoráveis ao aumento da capacidade de crescimento sob condições inibitórias. Em busca de uma melhor compreensão destes fenômenos, o nosso grupo (em colaboração com outros pesquisadores) vem realizando ensaios experimentais com diferentes linhagens celulares, analisando propriedades de agregação e possíveis transições fenotípicas/genotípicas destas células [1, 11].

A agregação de células é um processo dinâmico e complexo. Ele ocorre na morfogênese, desde organismos que estão no limiar entre formas de vida unicelulares e multicelulares (como é o caso da *Dyctyostelium discoideum*) [28] até mamíferos cujos tecidos são formados pela união de células migratórias e semelhantes, formando grupos coesos. Numerosas doenças estão associadas à desordens neste processo de agregação. A agregação exagerada de glóbulos vermelhos, induzida por proteínas anormais do plasma, é observada na diabetes [29]. A Trombostenia de Glanzmann é uma síndrome hemorrágica caracterizada por um déficit de agregação plaquetária [30]. No que se refere ao câncer, a agregação heterotípica ao endotélio microvascular nos sítios de tumor primário e a agregação homotípica de células tumorais nestes sítios são os principais passos para o processo de metástase [31]. Por outro lado, promover e regular a agregação celular é essencial no contexto da medicina regenerativa, cujo principal objetivo é criar tecidos artificiais e órgãos através da colonização de biomateriais pelas células [32].

A maneira mais clássica de investigar o comportamento celular *ex vivo* é fornecida através de experimentos com culturas de células em monocamadas. Estes ensaios permitem medir com precisão a cinética da agregação celular (posições, velocidades, taxas de agregação,

morfologia dos agregados, correlações célula-célula, etc.) e investigar os mecanismos biológicos (processos de adesão, atividades do citoesqueleto, sinalização e polarização celular, etc.) que afetam a agregação celular. Além disso, estes parâmetros cinéticos podem ajudar a identificar diferenças na mobilidade e agregação de diversas linhagens celulares, que podem ter valor prognóstico em oncologia. Algumas linhagens de células tumorais exibem uma capacidade de agregação aumentada e demonstram um potencial de metástase significativamente alto [33]. É interessante que, apesar deste potencial, relativamente pouca atenção tem sido direcionada à caracterização experimental e modelagem teórica dos padrões de agregação celular em cultura.

Do ponto de vista de um físico, a agregação celular é um exemplo de processo de crescimento longe do equilíbrio [34]. Modelos cinéticos baseados na teoria de Smoluchowsky foram usados para determinar taxas de agregação e coeficientes de difusão de esferóides multicelulares de câncer da próstata [35,36]. O modelo de agregação *agregado-agregado* (CCA) [12,13] com diferentes probabilidades de adesão, taxas de difusão independente do tamanho e relaxações internas foram aplicados para simular a reestruturação dos esferóides de células DU 145 e LNCaP (câncer de próstata). Além disso, os padrões espaciais de agregados celulares e as funções distribuição de tamanhos de culturas de células cardíacas de camundongos neonatais foram determinados [37]. Por fim, cistos alveolares formados em culturas matrigel 3D por células epiteliais alveolares do tipo II foram simulados através de um modelo CCA estendido no qual partículas interagem entre elas (adesão/rearranjo) e com o ambiente ao redor (quimiotaxia) [38]. Desta forma, descrições macroscópicas integradas com mecanismos microscópicos subjacentes à motilidade, colisão, adesão e processos de polarização irão constituir uma abordagem da biologia de sistemas para a agregação celular.

Ao longo dos anos, o nosso grupo de pesquisa, em colaboração com pesquisadores de outros departamentos, tem investigado sobre fenômenos de agregação de células *in vitro*. Neste sentido, vários experimentos foram conduzidos no Departamento de Biologia Animal da UFV e os resultados referentes às dinâmicas de agregação de linhagens celulares tumorais (HN-5, Hep-2, MCF-7 e MDA-MB-231) e normais (MDCK e MCF-10A) foram publicados previamente [1, 11, 39]. Nestes experimentos, as células foram plaqueadas em lamínulas de 13mm de diâmetro, numa densidade de 3000 células por lamínula para as linhagens HN-5, HEp-2 e MDCK (aproximadamente 2300 células/cm²) e 1000 células por lamínula para as linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A (aproximadamente 750 células/cm² (detalhes específicos referentes às condições de cultura estão descritos nas referências [1] e [39])). Após intervalos múltiplos de 24 horas de plaqueamento, três lamínulas foram removidas, fixadas e coradas com Giemsa para a contagem dos agregados.

As curvas de distribuição de tamanhos de agregados são tipicamente utilizadas no estudo da dinâmica de agregação celular. A densidade de agregados de tamanho s , n_s é definida como:

$$n_s = \frac{N_s}{N}, \quad (3.1)$$

onde N_s é o número total de agregados de tamanho s e N é o número total de agregados em um dado instante de tempo. Na figura 3.1(a) mostramos as curvas de distribuição de densidade de agregados de tamanho s em diferentes instantes de tempo que foram obtidas por Vilela *et al* [1] através da contagem do número de agregados em diferentes instantes nas culturas celulares da linhagem MDA-MB231 (carcinoma de mama). O resultado sugere que a distribuição de tamanhos dos agregados é do tipo lei de potência ($n_s \sim s^{-\tau}$) em qualquer instante de cultura, com expoente τ decrescente no tempo. Comportamento semelhante foi observado na distribuição dos tamanhos dos agregados nas culturas da linhagem HN-5 (carcinoma de cabeça e pescoço), apresentado na figura 3.1(b) [39], e MCF-10 (normal da mama) [1], como mostra a figura 3.1(c). De acordo com este resultado (e considerando os instantes de tempo analisados), agregados de todos os tamanhos são observados, sendo os agregados maiores os menos prováveis. Além disso, à medida que a cultura “envelhece”, a probabilidade de encontrar um agregado pequeno de tamanho s_p diminui enquanto a de um agregado grande de tamanho s_g aumenta.

Por outro lado, as curvas de distribuição de tamanhos dos agregados observados nas culturas celulares da linhagem MDCK (normais de rim de cão) e HEP-2 (carcinoma de laringe) em diferentes instantes de tempo sugerem que há uma transição de uma distribuição do tipo exponencial ($n_s \sim e^{-s/s^*}$) para lei de potência [39], tal como mostram as figuras 3.1(d) e 3.1(e). Nestes casos, os agregados possuem um tamanho característico s^* nos instantes iniciais da cultura e, em seguida, agregados de todos os tamanhos são observados. De modo diferente destes casos, as curvas de distribuição de tamanhos dos agregados observados nas culturas da linhagem MCF-7 (carcinoma de mama) sugerem uma transição no sentido inverso: do tipo lei de potência para exponencial [1], como mostra a figura 3.1(f). Neste caso, agregados de todos os tamanhos podem ser encontrados nos instantes iniciais, mas posteriormente, os agregados passam a ter um tamanho característico.

Contudo, todos estes dados que foram publicados previamente pelo nosso grupo em colaboração com os pesquisadores do Departamento da Biologia Animal da UFV foram analisados após a realização de procedimentos que visam a minimização das flutuações decorrentes do número reduzido de amostras experimentais. Um deles consiste na técnica do encaixotamento (do inglês, *binning*) dos dados¹; o outro, consiste na escolha de um valor de corte acima

¹A técnica do *binning* consiste em construir um histograma atribuindo o valor p_{k_i} como resultado do valor

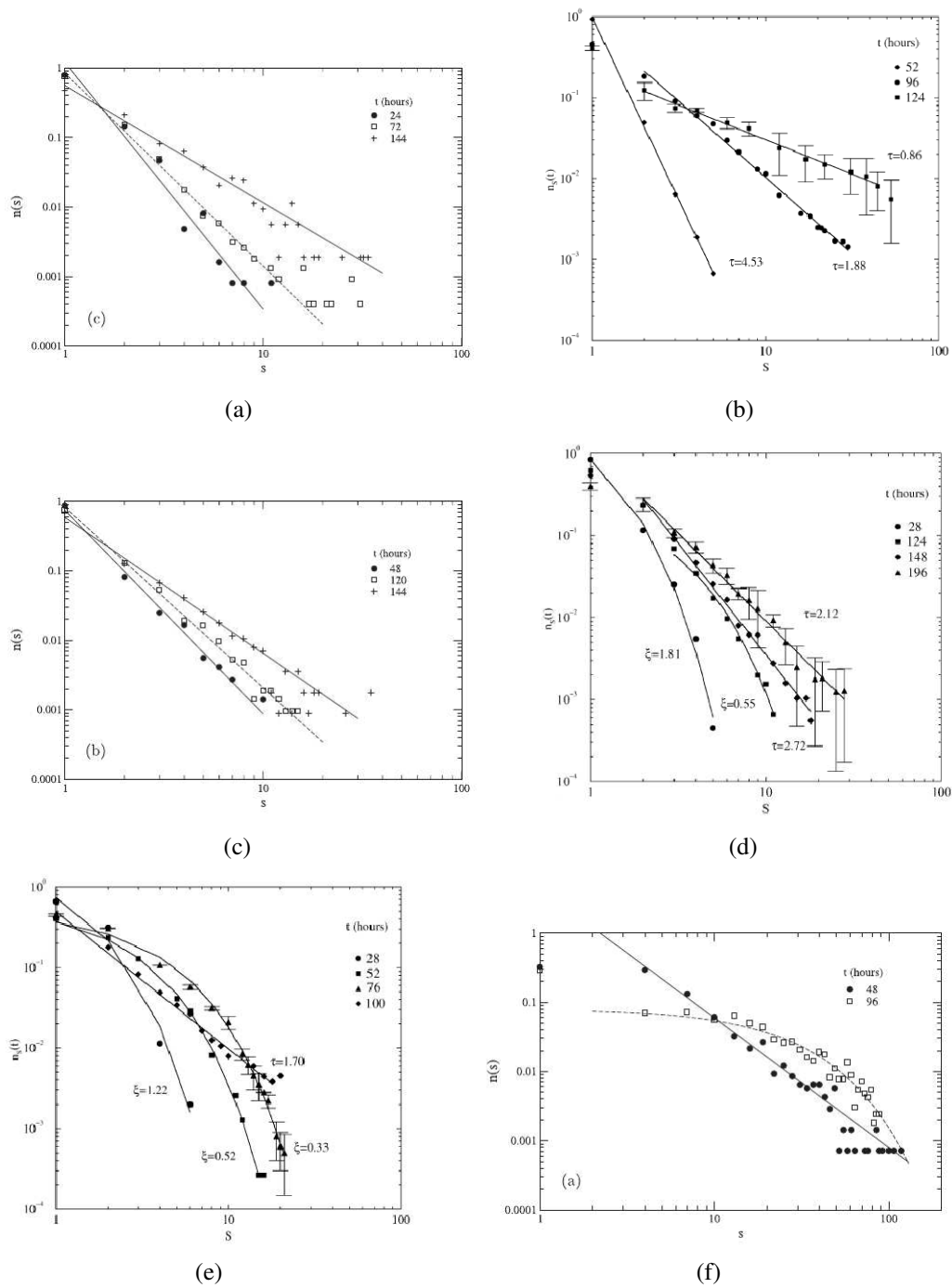


Figura 3.1: Densidade de tamanho dos agregados n_s nas culturas celulares em diferentes instantes de tempo para as linhagens: a) MBA-231; b) HN-5; c) MCF-10; d) MDCK; e) HEP-2; f) MCF-7. As figuras foram retiradas das referências [1] e [39].

do qual os pontos experimentais são desconsiderados em função do aumento das flutuações estatísticas. No entanto, tais procedimentos podem resultar em deformações nos dados reais, e assim, descaracterizar as funções de distribuição. Para ilustrar um exemplo, apresentamos na figura 3.2(a) os mesmos dados utilizados por Vilela e colaboradores referentes à distribuição do médio de $p_{k_i}, p_{k_{i+1}}, \dots, p_{k_{i+n}}$. Os autores comumente utilizaram $n = 3$.

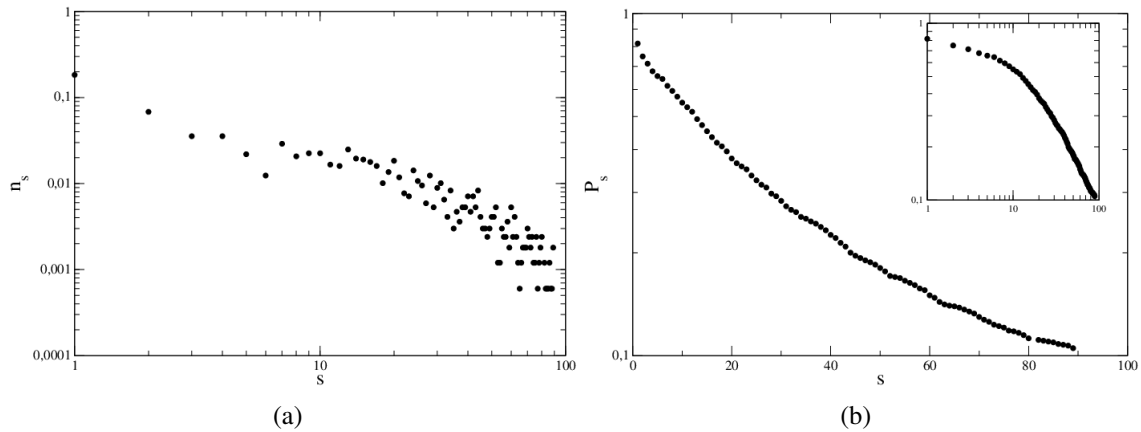


Figura 3.2: a) Densidade de agregados de tamanho s para a linhagem MCF-7 após 96 horas de cultivo, sem encaixotamento de dados e corte. b) Função distribuição acumulada complementar dos dados apresentados em a), mostrando o efeito de minimização dos ruídos.

tamanho dos agregados da linhagem MCF-7 após 96 horas de cultura, porém sem encaixotamento e sem corte. Comparando esta com a figura 3.1(f) (nela, os símbolos quadrados representam os dados referentes à 96h de cultura) pode-se notar que, no artigo publicado, o encaixotamento mascarou o aparente decaimento em lei de potência dos pontos iniciais ($s < 10$).

Nos casos em que as distribuições de densidade apresentam flutuações, recomenda-se o uso da função de distribuição acumulada complementar² (FDAC), definida como

$$P_s = 1 - \sum_{i < s} n_i, \quad (3.2)$$

para minimizar tais efeitos. Uma vez que conhecemos a função distribuição P_s , podemos conhecer a distribuição n_s . No caso particular em que n_s é do tipo lei de potência (ou exponencial), a função P_s também será do tipo lei de potência (ou exponencial).

Para ilustrar a utilidade da função distribuição acumulada complementar, apresentamos na figura 3.2(b) a distribuição $P_s \times s$ referente aos dados originais da linhagem MCF-7 (96h). Nela podemos observar que de fato há uma minimização das flutuações. Além disso, é importante destacar que o comportamento da distribuição $P_s \times s$ mostra que os tamanhos dos agregados não apresentam distribuição do tipo exponencial, tal como foi interpretado inicialmente por Vilela e colaboradores. Neste cenário surgiu a segunda proposta deste trabalho: revisar os dados de contagem de agregados (os mesmos utilizados por Vilela e colaboradores) buscando caracterizar as distribuições de tamanho dos agregados, das diferentes linhagens em diferentes instantes de tempo, através das funções de densidade acumulada complementar P_s .

Novos experimentos referentes à dinâmica de agregação foram realizados com as lin-

²Do inglês, *Complementary Cumulative Distribution Function* (CCAD).

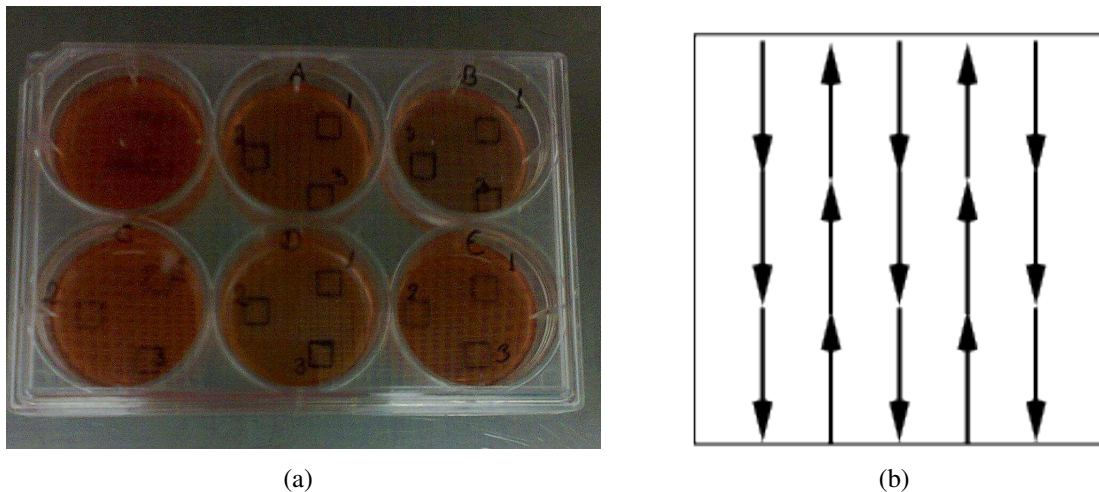


Figura 3.3: a) Exemplo da placa de seis poços onde as células das linhagens B16F10 e NIH3T3 foram cultivadas nos novos experimentos de agregação celular. Cada placa foi nomeada e marcada com quadrados de 7cm^2 para a contagem dos agregados. b) Sentido da varredura para a obtenção das imagens.

hagens B16F10 (melanoma) e NIH3T3 (fibroblastos normais). No entanto, diferente do procedimento experimental adotado nos experimentos anteriores, estas células foram plaqueadas em placas de 6 poços de 35mm de diâmetro, numa densidade de 2500 células por poço. Cada poço foi nomeado de A a E e em cada um deles foram desenhados quadrados de $0,7\text{cm}^2$, como mostra a figura 3.3(a). Sendo assim, o crescimento dos agregados (tanto em número quanto em quantidade de células) foi analisado considerando apenas os agregados de cada quadrado. Após o plaqueamento das células, as placas foram conduzidas para uma estufa à 37°C e 5% de CO_2 e a cada intervalo de 24h as placas eram conduzidas ao microscópio NIKON modelo TS 100, com uma objetiva de ampliação de $10\times$ (NIKON) e câmera CCD analógica JAI CM 140 GE para aquisição das imagens. Para a obtenção das imagens, a varredura foi realizada seguindo a sequência indicada na figura 3.3(b). Em seguida, a imagem do poço foi construída para a contagem dos agregados. Na figura 3.4 apresentamos duas imagens obtidas em um dos experimentos com a linhagem B16F10 após 72h e 120h de plaqueamento. Através deste acompanhamento contínuo de uma mesma cultura acreditamos que há uma minimização das flutuações em comparação à metodologia anterior, na qual a contagem era feita em diferentes realizações experimentais.

Além das análises das dinâmicas de agregação, também propusemos um novo modelo de migração e agregação celular buscando uma melhor compreensão dos fenômenos relacionados a estes processos. Num modelo que foi proposto previamente pelo nosso grupo de pesquisa [15], as células são representadas por partículas localizadas numa rede regular, as quais podem replicar e migrar seguindo uma sinalização quimioatratora (aspectos envolvidos na biologia celular e que não foram incluídos no modelo CCA proposto originalmente por

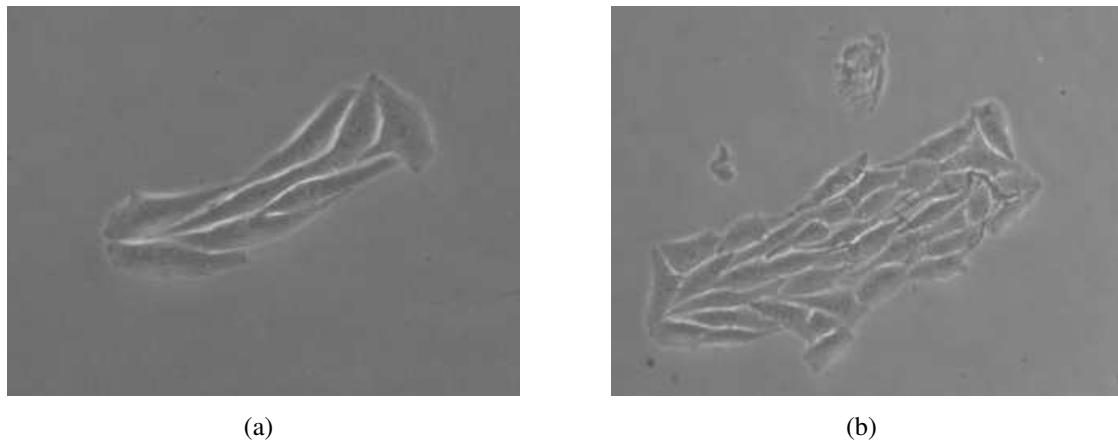


Figura 3.4: Imagens de agregados da linhagem B16F10 após a) 72h e b) 120h de plaqueamento.

Meakin [12] e Kolb e colaboradores na década de 80 [13, 14, 40]). Nesta nova proposta, pretendemos incluir além da replicação e migração guiada por quimiotaxia, a fragmentação dos agregados, tendo em vista que: 1) imagens de microscopia eletrônica mostram que há uma progressiva perda de contato célula-célula à medida que a cultura envelhece [1], o que pode contribuir para a fragmentação dos agregados no decorrer do tempo; 2) investigações do nível de expressão de proteína revelaram que podem haver mudanças na expressão de proteínas relacionadas à adesão celular, como a redução na expressão de calreticulina na linhagem MCF-7 [1] e o aumento na expressão de desmogleína na linhagem MDCK [41], o que pode resultar em transições entre diferentes dinâmicas de agregação; 3) diferentes linhagens podem expressar diferentes isoformas de proteínas de adesão, tal como foi observado num estudo comparativo entre as linhagens HN-5, MDCK e HEp-2 [39]; 4) experimentos recém conduzidos no laboratório de Física Biológica do Departamento de Física da UFV mostram que as células “mãe” e “filha” não necessariamente ficam aderidas uma à outra após a replicação.

O restante deste capítulo está organizado da seguinte forma. Iniciaremos pela análise e discussão das curvas de distribuição acumulada complementar das linhagens analisadas previamente por Vilela e colaboradores, bem como curvas de crescimento para o número e tamanho médio dos agregados. Posteriormente, apresentaremos os resultados obtidos nos experimentos de agregação que foram realizados recentemente no nosso laboratório com as linhagens B16F10 e NIH3T3 usando a nova metodologia. Em seguida, faremos uma breve apresentação dos modelos de agregação propostos anteriormente e apresentaremos a nossa proposta de modelo de agregação celular. Os resultados das nossas simulações são comparados com as observações experimentais e, por fim, discutiremos as conclusões deste trabalho.

3.2 Revendo nossos dados experimentais relativos à agregação celular observada *in vitro*

3.2.1 Distribuições de densidade acumulada complementar dos tamanhos dos agregados

Na figura 3.5 apresentamos as curvas de distribuição P_s para as linhagens MDCK (coluna da esquerda) e MCF-10 (coluna da direita). Os dados experimentais estão representados pelos símbolos pretos e referem-se aos mesmos instantes de tempo que foram publicados nas referências [1] e [39]. Observamos que para a linhagem MDCK, a distribuição de $P_s \times s$ após 28h e 124h do plaqueamento pode ser ajustada por uma distribuição exponencial, representada pela linha tracejada azul na figura 3.5(a), tal como foi observado originalmente por Vilela e colaboradores. Entretanto, estes dados são melhor ajustados por uma distribuição exponencial esticada, representada pela linha contínua vermelha. As funções exponenciais esticadas são definidas como:

$$P_s \sim e^{a_0 s^{a_1}} \quad (3.3)$$

onde a_0 é o parâmetro relacionado à forma da distribuição e a_1 é o parâmetro de escala [42]. Para os instantes de tempo posteriores, as distribuições continuaram a ser melhor ajustadas com as exponenciais esticadas, como mostram as figuras 3.5(c) e 3.5(e). No anexo C apresentamos as distribuições de $P_s \times s$ correspondentes aos instantes de tempo $t = 54h, 80h, 98h, 169h, 196h, 218h$ e $242h$ após o plaqueamento (estes instantes de tempo não foram mencionados por Vilela e colaboradores no trabalho original), bem como os parâmetros obtidos nos ajustes.

Já para a linhagem MCF-10, a distribuição $P_s \times s$ no instante $t = 48h$ teve o ajuste com a exponencial simples sobreposto ao ajuste com a exponencial esticada, como mostra a figura 3.5(b). Posteriormente, as distribuições passaram a ser melhor ajustadas com funções do tipo exponencial esticada, como mostram as figuras 3.5(d) e 3.5(f). No anexo C apresentamos as distribuições $P_s \times s$ nos instantes de tempo $t = 72h$ e $96h$, que não foram publicados no artigo original, bem como os valores obtidos nos ajustes. Estes resultados sugerem que a distribuição densidade acumulada complementar para o tamanhos dos agregados das linhagens MDCK e MCF-10 segue uma distribuição exponencial esticada em qualquer instante de cultura (ou muda de exponencial para exponencial esticada no caso particular da MCF-10). Esta interpretação diverge da que foi dada originalmente por Vilela e colaboradores. Segundo os autores, a distribuição de tamanhos dos agregados da linhagem MCF-10 seria do tipo lei de potência em qualquer instante de tempo após o plaqueamento, enquanto que da MCDK muda de um regime

exponencial para lei de potência.

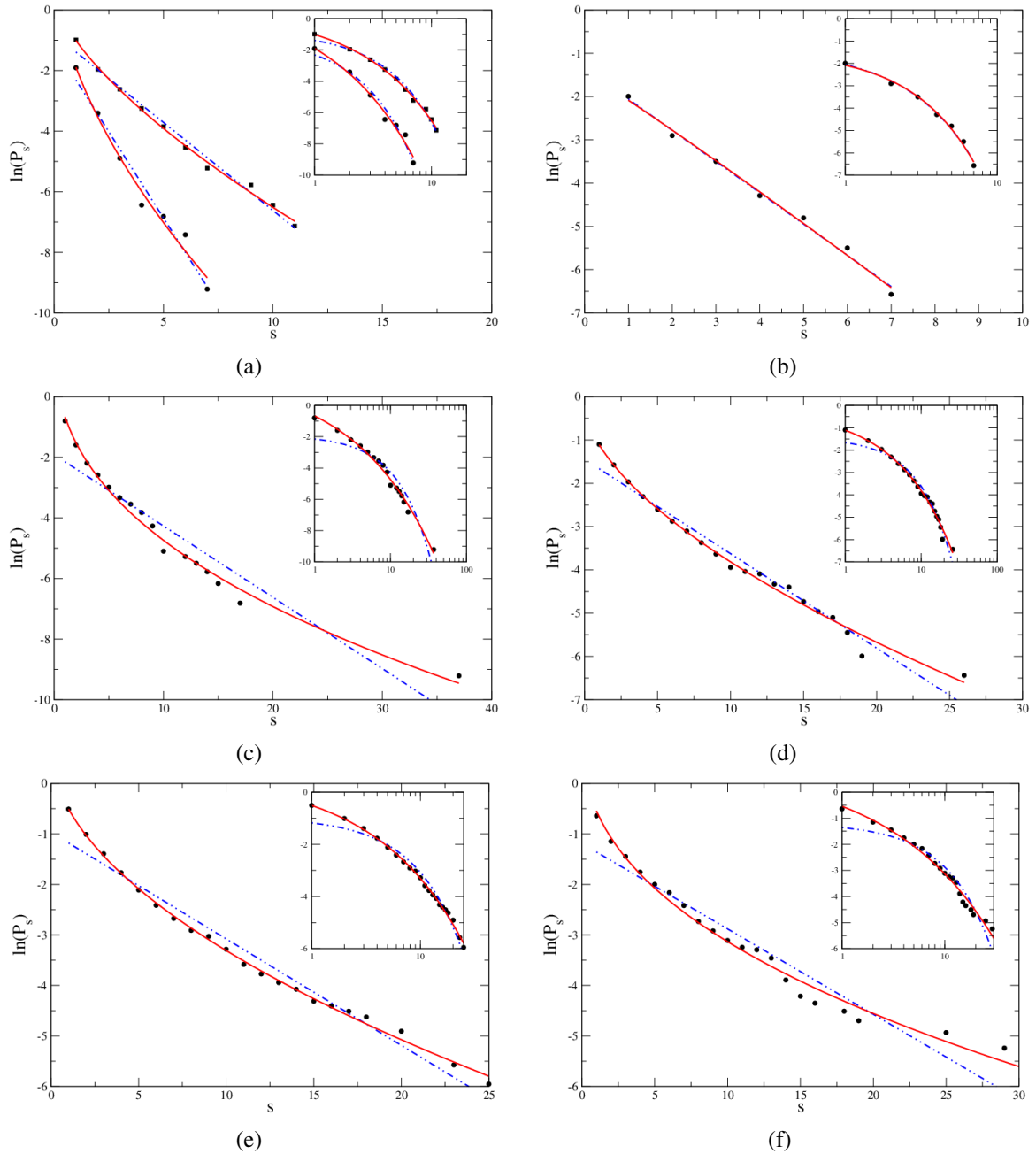


Figura 3.5: Funções densidade acumulada complementar para diferentes linhagens em diferentes instantes após o plaqueamento das células. a) MDCK após 28h (círculos) e 124h (quadrados); b) MCF-10 após 48h; c) MDCK após 148h; d) MCF-10 após 120h; e) MDCK após 196h; f) MCF-10 após 144h. Os símbolos pretos representam os dados experimentais. As linhas tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

Apresentamos na figura 3.6 as funções de distribuição acumulada complementar dos tamanhos dos agregados das linhagens HEP-2 (coluna da esquerda) e MDA-MB231 (coluna da direita), referentes aos mesmos dados publicados previamente por Vilela e colaboradores. Na figura 3.6(a) apresentamos a distribuição $P_s \times s$ para a linhagem HEP-2 após 28 horas de plaqueamento. Nela observamos que a distribuição $P_s \times s$ pode ser ajustada por uma lei de potência,

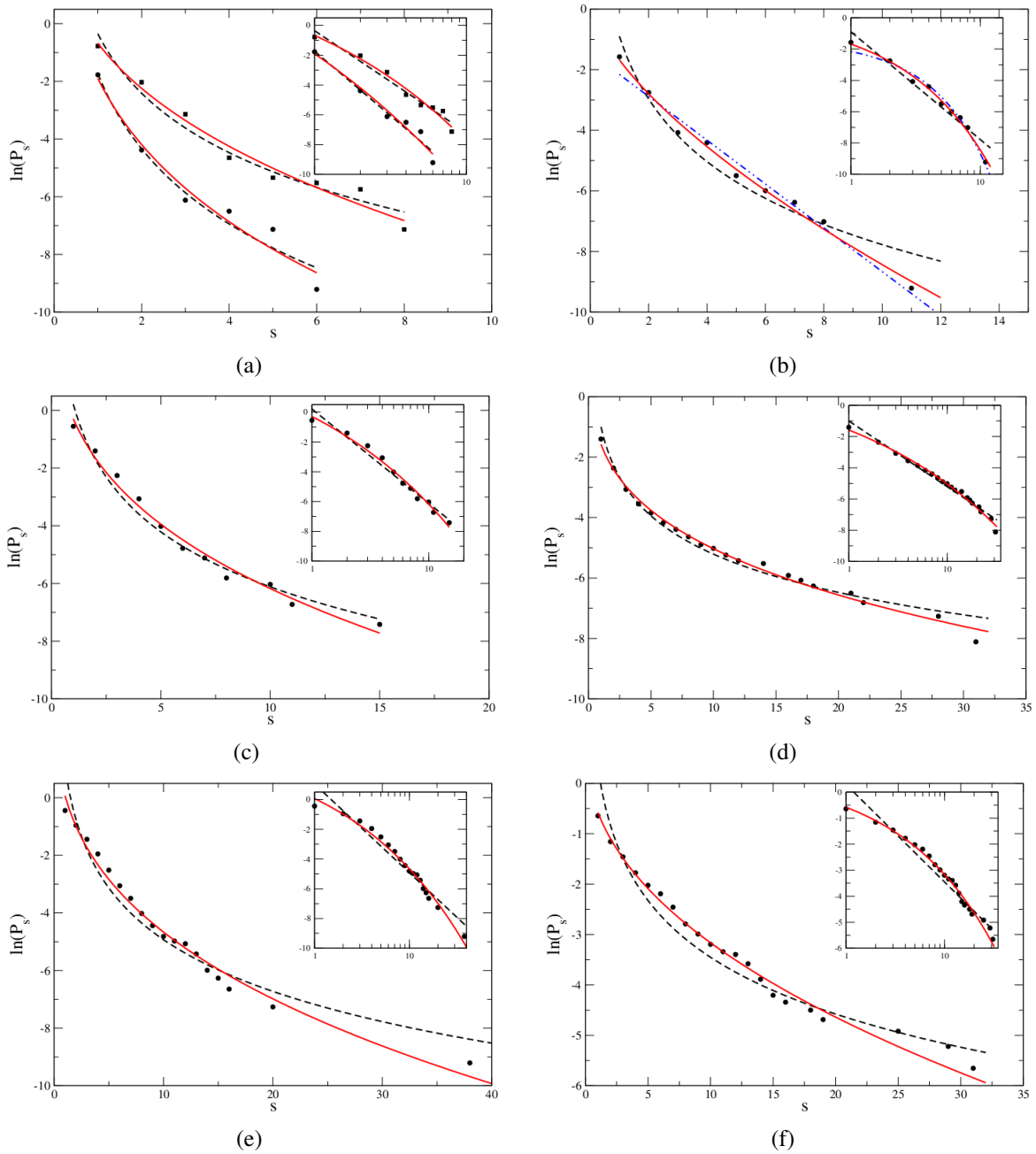


Figura 3.6: Funções densidade acumulada complementar para diferentes linhagens em diferentes instantes após o plaqueamento das células. a) HEP-2 após 28h (círculos pretos) e 52h (quadrados pretos); b) MBA-231 após 24h; c) HEP-2 após 76h; d) MBA-231 após 72h; e) HEP-2 após 100h; f) MBA-231 após 144h. Os símbolos pretos representam os dados experimentais. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas. A linha tracejada azul na figura 3.6(b) representa o ajuste com a exponencial simples.

porém, o melhor ajuste é obtido com uma distribuição exponencial esticada. Para instantes de tempo posteriores, a função que melhor ajustou os pontos experimentais foi a exponencial esticada, como mostram as figuras 3.6(c) (76h) e 3.6(e) (100h). Apresentamos no anexo C as distribuições para instantes de tempo maiores do que 100h (não foram publicados no artigo original). Para $t = 120h$ o ajuste da distribuição $P_s \times s$ com a distribuição exponencial simples ficou

sobreposto à exponencial esticada. Porém, para $t = 144\text{h}$ e $t = 168\text{h}$ as distribuições de densidade acumulada complementar foram bem ajustadas apenas com a função exponencial esticada.

Resultado semelhante foi observado para a distribuição $P_s \times s$ da linhagem MDA-MB231. Após 24 horas de cultura, a função que melhor ajustou a distribuição $P_s \times s$ foi a exponencial esticada, como mostra a figura 3.6(b), o que também foi observado nos instantes de tempo posteriores, em $t = 72\text{h}$ (figura 3.6(d)) e $t = 144\text{h}$ (figura 3.6(f)). Apresentamos no anexo C as distribuições $P_s \times s$ nos instantes de tempo intermediários (48h, 96h e 120h), que não foram publicados no artigo original. Observamos que nos instantes $t = 96\text{h}$ e $t = 120\text{h}$ os ajustes das distribuições de densidade acumulada complementar com a lei de potência ficam sobrepostos ao ajuste com a exponencial esticada. Como resultado geral, sugere-se que as distribuições das linhagens HEP-2 e MDA-MB231 são do tipo exponencial esticada em qualquer instante de cultura, sendo que nos instantes intermediários, aparentemente há uma sobreposição com o regime exponencial para a linhagem HEP-2, enquanto que para a linhagem MDA-MB231 a sobreposição é com a lei de potência. Estes resultados divergem do que foi registrado originalmente por Vilela e colaboradores. Para eles, a distribuição de tamanho dos agregados da linhagem Hep-2 era do tipo exponencial nos instantes iniciais após o plaqueamento, transitando para um decaimento do tipo lei de potência para intervalos de tempo longos. Já para a linhagem MDA-MB231, os autores interpretaram que a distribuição seguiria um decaimento do tipo lei de potência em qualquer instante após o plaqueamento.

Por fim, apresentamos na figura 3.7 as curvas de distribuição das linhagens HN-5 (coluna da esquerda) e MCF-7 (coluna da direita), também nos mesmos instantes de tempo das curvas n_s publicadas nas referências [1] e [39]. O ajuste da distribuição $P_s \times s$ para os tamanhos dos agregados da linhagem HN-5 após 4h com a distribuição do tipo lei de potência foi sobreposto ao ajuste com a distribuição exponencial esticada, como mostra a figura 3.7(a). No instante $t = 96\text{h}$ a distribuição foi melhor ajustada com a exponencial esticada, como mostra a figura 3.7(c). No instante $t = 124\text{h}$ (figura 3.7(e)) a distribuição foi ainda melhor ajustada com a exponencial esticada. No entanto, este ajuste ficou sobreposto ao ajuste com a exponencial simples. No anexo C mostramos as distribuições de densidade acumulada complementar para instantes diferentes dos que foram publicados no artigo original. Observamos que até $t = 52,5\text{h}$ os ajustes com lei de potência e exponencial esticada ficaram sobrepostos (exceto em $t = 28\text{h}$). Para instantes de tempo superiores a 96h os dados experimentais foram melhor ajustados com as funções exponenciais esticadas, exceto em $t = 124\text{h}$ e $t = 168\text{h}$, em que houve sobreposição com o ajuste usando exponenciais simples. Para a linhagem MCF-7, a distribuição $P_s \times s$ foi melhor ajustada com a função exponencial esticada em qualquer instante de cultura, como mostram as figuras 3.7(b) ($t = 48\text{h}$) e 3.7(d) ($t = 96\text{h}$). No anexo C apresentamos as distribuições $P_s \times s$ nos

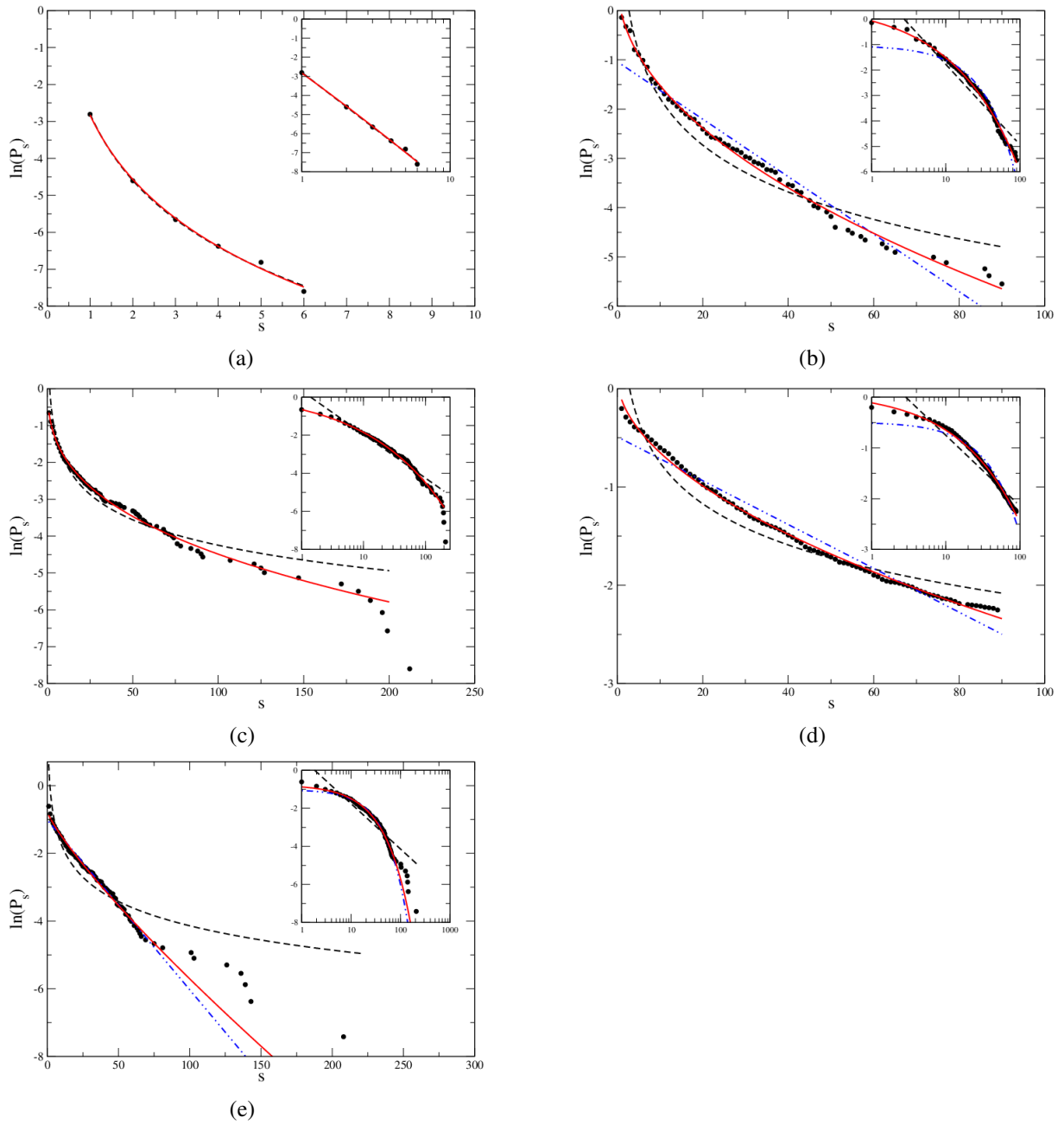


Figura 3.7: Funções densidade acumulada complementar para diferentes linhagens em diferentes instantes após o plaqueamento das células. a) HN-5 após 4h; b) MCF-7 após 48h; c) HN-5 após 96h; d) MCF-7 após 96h; e) HN-5 após 124h. Os símbolos pretos representam os dados experimentais. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

instantes de tempo que não foram mencionados no artigo original, confirmando que em todos os instantes as curvas foram melhor ajustadas com exponenciais esticadas. Estes resultados, em resumo, também surgem que as distribuições são do tipo exponencial esticada em qualquer instante de cultura (ou que mudam de um decaimento em lei de potência para exponencial esticada no caso particular da HN-5). Isto diverge da conclusão de Vilela e colaboradores: para eles, a distribuição para o tamanho dos agregados seria do tipo lei de potência em qualquer

instante para a linhagem HN-5. Por sua vez, para a linhagem MCF-7, a distribuição seria do tipo lei do potência nos instantes iniciais de cultura, passando para exponenciais à medida que o tempo de plaqueamento avança.

Finalmente cabe mencionar que, baseados nos resultados apresentados nesta seção, é possível que as distribuições do tamanho dos agregados n_s sejam descritas por distribuições do tipo Weibull após 72h de cultura (em média). Para instantes de tempo menores, as distribuições também podem ser ajustadas com as distribuições de Weibull, no entanto, em alguns casos, a distribuição de Weibull fica sobreposta à exponencial ou leis de potência. As funções de distribuição de Weibull são funções do tipo:

$$p(x) = \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{x}{\alpha}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{x}{\alpha}\right)^\beta} \quad (3.4)$$

e sua função de distribuição acumulada complementar é do tipo exponencial esticada para $x > 0$ (tal como observado para as distribuições acumuladas complementares para os tamanhos dos agregados que foram apresentadas nesta seção). A função distribuição de Weibull foi inicialmente identificada por Fréchet em 1927 e é amplamente empregada em estudos e pesquisas no campo da engenharia. No entanto, a sua primeira aplicação foi dada por Rosin & Rammler em 1933, para descrever distribuição de tamanho de partículas a partir dos dados de trituração de carvão e outros materiais [42]. Recentemente foi observado que a simulação de modelos de sistemas replicativos e de crescimento de agregados levam à formação de agregados cujos tamanhos seguem distribuições de Weibull [43,44].

3.2.2 Comportamento do tamanho médio dos agregados em função do tempo

Na figura 3.8 apresentamos o comportamento do tamanho médio dos agregados em função do tempo. O tamanho médio dos agregados foi definido como:

$$S_{m\u00e9dio} = \frac{N_{c\u00e9lulas}}{N_{agregados}} \quad (3.5)$$

Observamos que em todos os casos o tamanho médio dos agregados é crescente em função do tempo (exceto para os instantes $t = 148h$ e $t = 172h$ da HN-5 e $t = 124h$ da MCF-7). Contudo, o tamanho médio dos agregados das linhagens HN-5 e MCF-7 cresce mais rapidamente em comparação com as demais linhagens. Nestes dois casos, $S_{m\u00e9dio} \approx 10$ células por agregado no instante $t = 120h$, enquanto nos demais casos o tamanho médio está em torno de 3

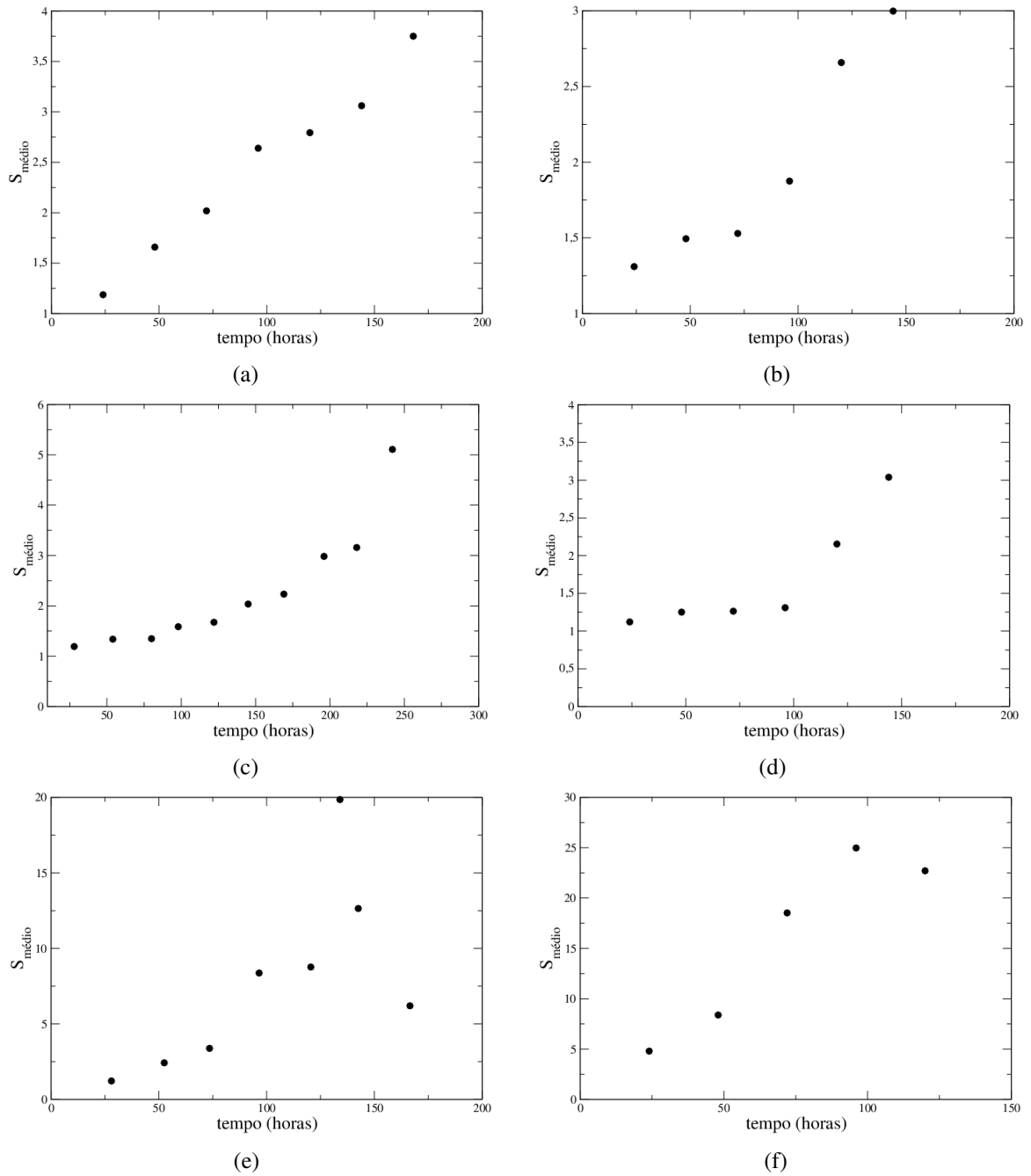


Figura 3.8: Comportamento do tamanho médio dos agregados em função do tempo para das linhagens a) HEP-2; b) MDA-MB231; c) MDCK; d) MCF-10; e) HN-5; f) MCF-7.

células por agregado neste mesmo instante de tempo. Isto pode estar relacionado com uma taxa de replicação celular maior para estas linhagens, ou à uma dinâmica de agregação mais rápida.

3.2.3 Comportamento do número médio dos agregados em função do tempo

Apresentamos na figura 3.9 o comportamento do número de agregados em função do tempo. Nestes gráficos, adotamos a razão entre o número de agregados e o número de células

como um indicador da tendência de agregação das células à medida que elas se replicam; uma vez que estes experimentos foram realizados através da contagem de realizações experimentais em diferentes lamínulas, as flutuações no número de células por lamínula (para mais ou para menos) influenciam na contagem dos agregados.

Em todos os casos, o número de agregados é decrescente em função do tempo (novamente, exceto para os instantes $t = 148\text{h}$ e $t = 172\text{h}$ da HN-5 e $t = 124\text{h}$ da MCF-7), mostrando que as células tendem a se agregarem umas às outras à medida que o tempo de cultivo avança. Em particular, para as linhagens HN-5 e MCF-7 o decaimento do número de agregados é ligeiramente mais rápido em relação às demais linhagens, reforçando que a dinâmica de agregação para estas duas linhagens é aparentemente mais rápida.

3.3 Novos resultados para a dinâmica de agregação - linhagens B16F10 e NIH3T3

Nesta seção apresentaremos os resultados obtidos nos novos experimentos realizados no laboratório de Física Biológica da UFV. Para efeitos comparativos com a análise realizada na seção anterior, determinamos as distribuições de densidade acumulada complementar para o tamanho dos agregados e as evoluções temporais do tamanho médio dos agregados e do número de agregados.

3.3.1 Distribuições de densidade acumulada complementar dos tamanhos dos agregados

No instante $t = 24\text{h}$ após o plaqueamento, a distribuição $P_s \times s$ para as células B16F10 foi bem ajustada tanto com a distribuição exponencial simples quanto com a exponencial esticada (ajustes sobrepostos), como mostra a figura 3.10(a). O mesmo foi observado no instante $t = 48\text{h}$ (3.10(a)). No instante 72h, a distribuição foi bem ajustada apenas à exponencial esticada, o que foi observado nos demais instantes de tempo posteriores, como mostram as figuras 3.10(c) (72h), 3.10(d) (120h) e 3.10(e) (144h) (a distribuição $P_s \times s$ no instante $t = 96\text{h}$ e os parâmetros de ajuste estão listados no anexo C). No instante $t = 168\text{h}$ (figura 3.10(f)) apesar de ainda ser melhor ajustada com a exponencial esticada, perde-se um pouco do ajuste nos pontos extremos da distribuição (agregados pequenos e grandes). Observamos que há uma tendência dos agregados pequenos obedecerem uma distribuição do tipo lei de potência, como mostram as linhas pontilhadas nos *insets* das figuras 3.10(e) e 3.10(f). Os expoentes γ são decrescentes no tempo: $\gamma = -0,18$ no instante $t = 144\text{h}$ e $\gamma = -0,22$ no instante $t = 168\text{h}$.

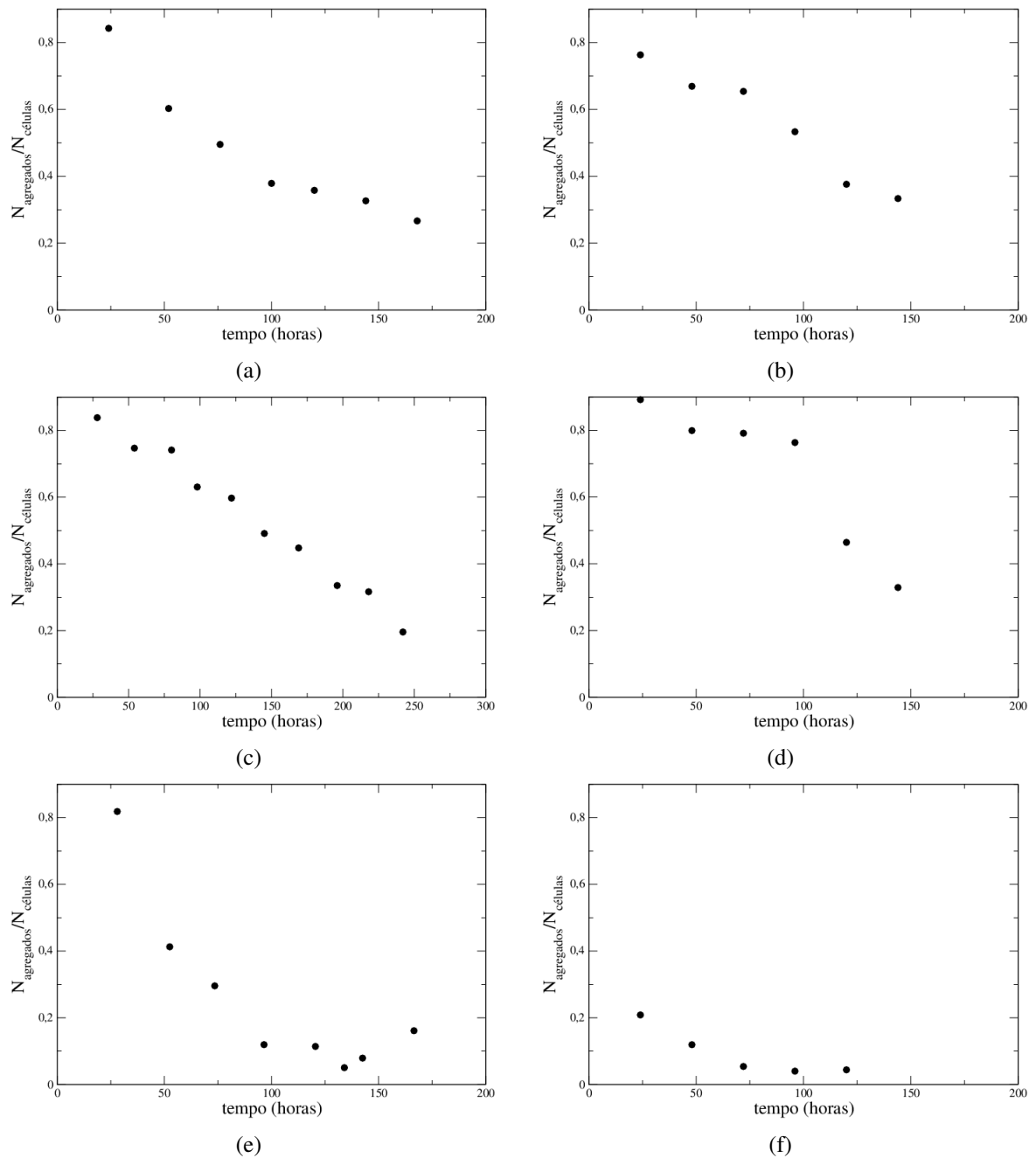


Figura 3.9: Comportamento do número médio de agregados em função do tempo para das linhagens a) HEp-2; b) MDA-MB231; c) MDCK; d) MCF-10; e) HN-5; f) MCF-7.

Já para a linhagem NIH-3T3, nos instantes $t = 24\text{h}$ e $t = 48\text{h}$, foram observados nas culturas agregados de tamanho $s = 1$, $s = 2$ e $s = 3$ apenas, e por isso não foram analisados os gráficos de $P_s \times s$ nestes instantes. Nos instantes $t = 72\text{h}$ (figura 3.11(a)) e $t = 96\text{h}$ (figura 3.11(b)) os agregados maiores começaram a se formar e a distribuição densidade acumulada complementar destes agregados foi bem ajustada com distribuições exponenciais simples, sendo que estas ficaram sobrepostas às exponenciais esticadas. Nos instantes posteriores, em $t = 120\text{h}$ (figura 3.11(c)), $t = 144\text{h}$, (figura 3.11(d)) e $t = 168\text{h}$ (figura 3.11(e)), embora a distribuição

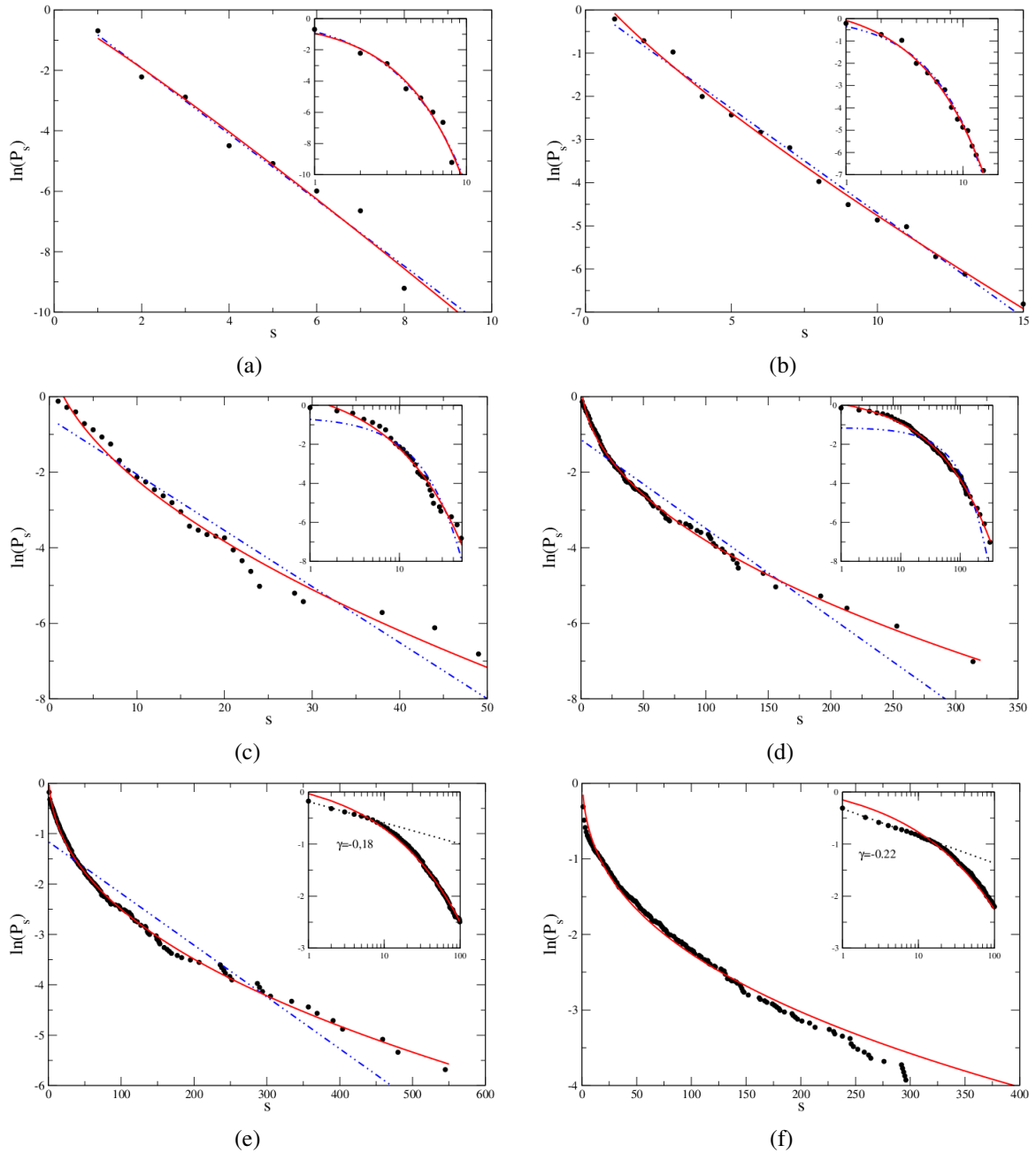


Figura 3.10: Funções densidade acumulada complementar dos tamanhos dos agregados das células da linhagem B16F10 após a) 24h; b) 48h; c) 72h; d) 120h; e) 144h; f) 168h. Os símbolos pretos representam os dados experimentais. As linhas tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas. As linhas pontilhadas pretas nos *insets* são ajustes com leis de potência considerando apenas os agregados pequenos.

$P_s \times s$ ainda estivesse sendo bem ajustada com a distribuição exponencial esticada, esta ficou sobreposta com uma lei de potência, sugerindo uma mudança no perfil de distribuição dos agregados. No instante $t = 192\text{h}$ a distribuição $P_s \times s$ não foi bem ajustada à nenhuma das três funções testadas. No entanto, para agregados pequenos observamos um decaimento do tipo lei de potência, como mostra o *inset* da figura 3.11(f), com expoentes decrescentes em função do tempo. Os parâmetros de ajustes estão listados no anexo C.

3.3.2 Comportamento do tamanho e do número dos agregados em função do tempo

O tamanho médio dos agregados da linhagem B16F10 é uma função crescente do tempo, como mostra a figura 3.12(a). Diferentemente do que foi observado nos casos discutidos na seção anterior, o crescimento pode ser ajustado com uma função exponencial, representada pela linha tracejada azul na figura. Já o tamanho médio dos agregados na linhagem NIH-3T3 cresce muito lentamente, chegando ao valor máximo $S_{\text{médio}} = 2$ no instante $t = 168\text{h}$ após o plaqueamento, como mostra a figura 3.12(b).

Para o número dos agregados em função do tempo, novamente observamos comportamentos diferentes em relação à estas duas linhagens: a figura 3.12(c) mostra que o número de agregados da linhagem B16F10 permanece aproximadamente constante em função do tempo (≈ 30 agregados/reticulado), enquanto o número de agregados da linhagem NIH-3T3 é exponencialmente crescente, como mostra a figura 3.12(d). Quando dividimos o número de agregados em função do número de células, observamos que a curva é exponencialmente decrescente para a linhagem B16F10 (figura 3.12(e)), enquanto que para a linhagem NIH-3T3 o decaimento é lento (figura 3.12(f)). Em conjunto estes resultados sugerem dinâmicas distintas de agregação nestas duas linhagens: as células B16F10 tendem a ficar aderidas umas às outras e a tendência de coalescência via migração é pequena ($S_{\text{médio}}$ crescente; $N_{\text{agregados}}$ constante). Já as células da linhagem NIH-3T3 tendem a formar novos agregados à medida que replicam e fragmentam ($S_{\text{médio}}$ cresce lentamente; $N_{\text{agregados}}$ crescente).

3.4 Modelos de Agregação *agregado-agregado*

A construção de modelos para a investigação dos fenômenos de migração e agregação celular pode ajudar na compreensão destes fenômenos. Modelos simples de agregação *agregado-agregado* foram inicialmente propostos por Meakin [13] e Kolb e colaboradores [13, 14, 40] na década de 80. Na versão bidimensional do modelo original, N_0 partículas são distribuídas

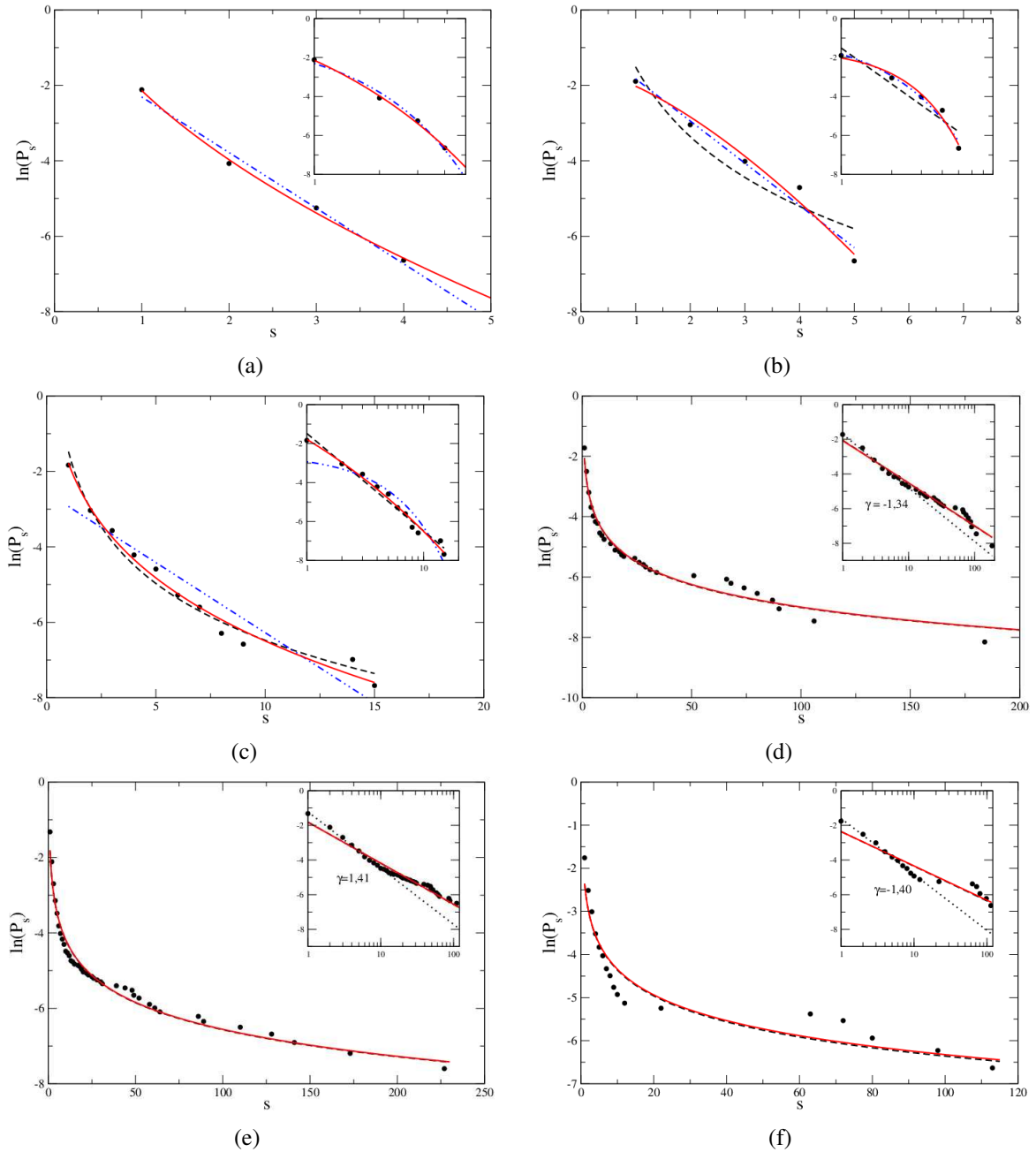


Figura 3.11: Funções densidade acumulada complementar dos tamanhos dos agregados das células da linhagem NIH-3T3 após a) 72h; b) 96h; c) 120h; d) 144h; e) 168h; f) 192h. Os símbolos pretos representam os dados experimentais. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas. As linhas pontilhadas pretas nos *insets* são ajustes com leis de potência considerando apenas os agregados pequenos.

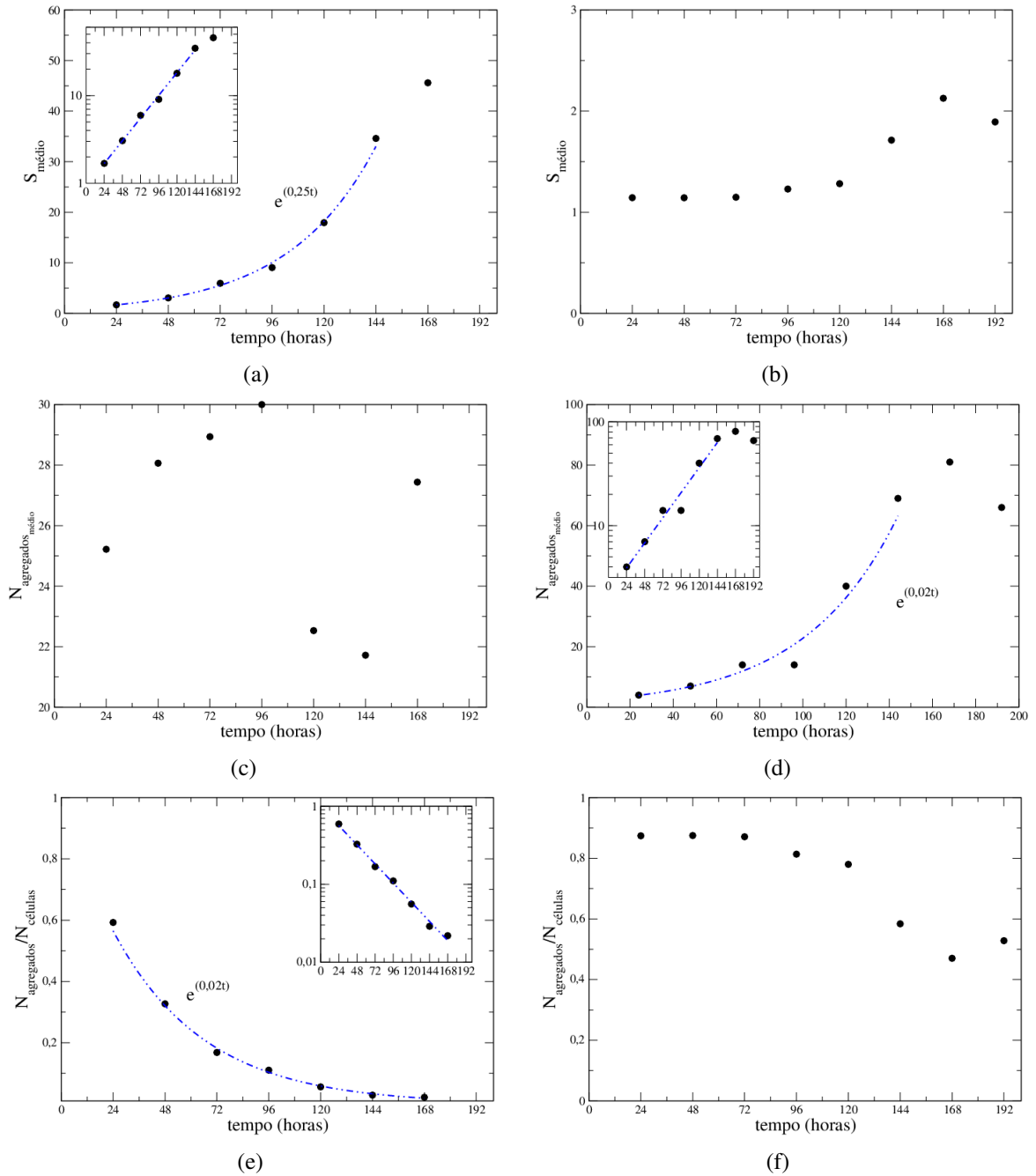


Figura 3.12: Comportamento do tamanho dos agregados em função do tempo para as linhagens a) B16F10 e b) NIH-3T3; Comportamento do número médio de agregados em função do tempo c) B16F10 e d) NIH-3T3; Comportamento do número médio de agregados (pelo número de células) em função do tempo e) B16F10 e f) NIH-3T3. Os símbolos pretos representam os dados experimentais. As linhas tracejadas azuis são ajustes com exponenciais simples.

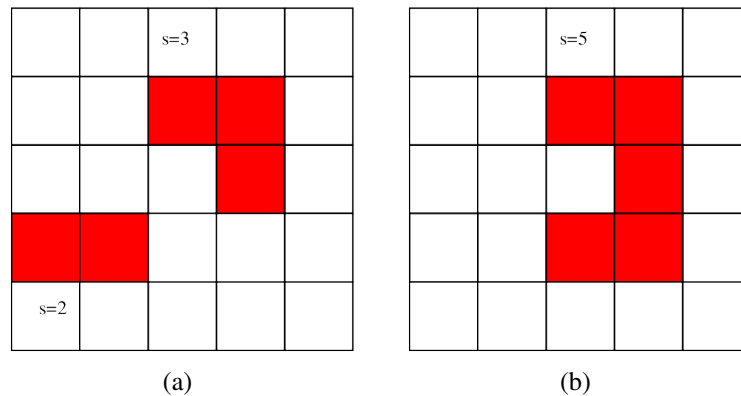


Figura 3.13: Representação de um reticulado bidimensional. a) Os sítios ocupados estão marcados com a cor vermelha, e observa-se a presença de dois grupos de tamanhos $s = 2$ e $s = 3$. b) Após a migração do agregado de tamanho $s = 2$ para a direita, ocorre a formação de um único agregado de tamanho $s = 5$.

aleatoriamente num reticulado de tamanho $L \times L$. Cada partícula representa uma célula de diâmetro unitário, e cada sítio só pode ser ocupado por uma única partícula. Partículas que ocupam sítios vizinhos (usando a condição de vizinhança de Neumann³) são ligadas umas às outras e passam a pertencer ao mesmo agregado, como ilustra a figura 3.13(a); o tamanho do agregado é definido pelo número de partículas interconectadas. A cada atualização da rede, um agregado é escolhido ao acaso (com igual probabilidade) para se mover em qualquer um dos quatro sentidos (também com igual chance): para cima, para baixo, para direita ou para esquerda. A cada atualização, o “tempo”⁴ é incrementado por uma quantidade $\Delta t = 1/N(t)$, sendo $N(t)$ o número total de agregados presentes na rede no tempo t . Os agregados podem aumentar de tamanho à medida que os mesmos se movem e partículas pertencentes a agregados distintos ocupam sítios adjacentes. Por exemplo, na figura 3.13(b) ilustramos a formação de um agregado de tamanho $s = 5$ decorrente da coalescência de dois agregados após a movimentação do agregado de tamanho $s = 2$ duas vezes para a direita. Condições de contorno periódicas são utilizadas para minimizar o efeito de tamanho finito do reticulado.

As curvas de distribuição dos tamanhos dos agregados resultante da evolução temporal deste modelo (denominado aqui como CCA original) exibem um comportamento do tipo lei de potência após um certo tempo de simulação, como mostra a figura 3.14. Após este intervalo, o expoente τ permanece constante. O resultado apresentado na figura 3.14 corresponde à 5% de ocupação dos sítios do reticulado no instante inicial e difusão dos agregados independente da massa. Este padrão de decaimento é diferente do que foi observado nas culturas das linhagens

³A vizinhança de Neumann de um sítio localizado na linha i coluna j de um reticulado é definida por 4 sítios localizados nas seguintes posições: acima $(i - 1, j)$, abaixo $(i + 1, j)$, à direita $(i, j - 1)$ e à esquerda $(i, j + 1)$ do mesmo.

⁴Neste contexto, o tempo é calculado em passos de Monte Carlo (MCS, do inglês, *Monte Carlo Steps*). Uma unidade de tempo corresponde a uma varredura completa na rede, ou seja, em média, todos os agregados são sorteados para executar uma ação.

celulares discutidas anteriormente.

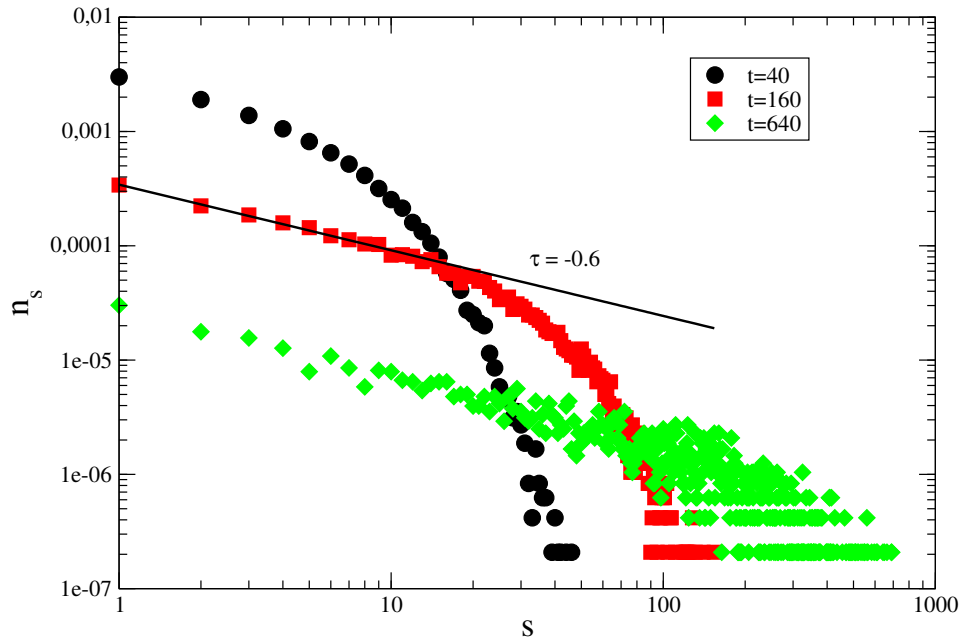


Figura 3.14: Curva de distribuição de tamanhos de agregados em diferentes instantes de tempo obtidos através do modelo de agregação *agregado-agregado* proposto inicialmente por Meakin [12] e Kolb e colaboradores [13]). Neste modelo não há replicação de partículas e os agregados se movem aleatoriamente.

Alguns aspectos relacionados à biologia celular não estão incorporados neste modelo CCA original. Por exemplo, sabe-se da existência do ciclo celular, e que numa destas etapas as células são capazes de gerar células filhas após a divisão. Além disso, as células são capazes de sintetizar e liberar quimiocinas que funcionam como sinalizadoras para outras células, denominadas quimioatratores, e estes, por sua vez, podem alterar as funções e algumas características de determinadas células. Pensando nestes aspectos, nosso grupo propôs uma primeira extensão do modelo CCA, incluindo a replicação de partículas e migração guiada por quimiotaxia [15]. Segundo esta proposta, a cada atualização da rede, apenas um agregado é escolhido, porém este pode realizar uma de duas ações com igual chance: 1) migração ou 2) replicação das partículas da periferia do agregado.

- Migração

Se a ação escolhida é a migração, o agregado poderá se mover com probabilidade

$$p_{mov,s} = \frac{D_s}{D_{max}} = \left(\frac{s}{s_{max}} \right)^\gamma, \quad (3.6)$$

onde s é o tamanho do agregado e s_{max} é o tamanho do maior agregado presente na rede no tempo t . Ou seja, a mobilidade de um agregado é dependente do seu tamanho, e esta dependência é controlada pelo expoente γ . No caso em que $\gamma = 0$, todos os agrega-

dos apresentam a mesma capacidade migratória (difusão independente da massa). Diferentemente do modelo CCA original, o movimento ocorre na direção em que há maior concentração de quimioatratores; caso haja sobreposição de células, o movimento é desconsiderado. Para descrever a quimiotaxia, consideramos que as células sintetizam um sinal quimioatrator difusivo, cuja concentração C obedece a seguinte equação de difusão:

$$\frac{dC}{dt} = D\nabla^2 C + (\lambda\Gamma_{i,j} - \nu)C, \quad (3.7)$$

onde D representa a taxa de difusão, λ a taxa de produção, ν a taxa de degradação natural do quimioatrator e $\Gamma_{i,j}$ é a função delta de Kronecker, que recebe o valor zero se o sítio está vazio e 1 se o sítio está ocupado. A equação acima foi resolvida considerando o estágio estacionário ($\frac{dC}{dt} = 0$) e utilizando o método das diferenças finitas para discretizar a equação. Isto porque a difusão das quimiocinas ocorre muito mais rapidamente do que a proliferação e migração celular. Por fim, utilizamos o método da iteração de Newton para obter a expressão da concentração C a cada atualização do sistema.

- Replicação

Quando a replicação é a ação escolhida, sorteia-se “ r ”-vezes (tantas quantas forem as partículas da borda do agregado) uma entre as partículas da periferia, e estas podem se replicar e gerar uma partícula filha com probabilidade p_{rep} . A partícula filha, por sua vez, passa a ocupar um dos sítios vizinhos (Neumann) vazios da partícula mãe, sendo este sítio escolhido ao acaso. A figura 3.15 ilustra um exemplo: os sítios em amarelo representam as partículas do centro do agregado e os sítios em verde representam as partículas da borda (que podem replicar); a partícula hachurada representa uma partícula sorteada para replicação e os sítios demarcados com um “ok” representam os sítios que podem ser ocupados pela partícula filha. Após a replicação, a lista das partículas da borda é atualizada e um novo sorteio é realizado.

As distribuições de tamanho dos agregados que foram obtidas com este modelo seguem uma lei de potência com expoente τ decrescente com o tempo, como mostra a figura 3.16. Tendo em vista que estes decrescimentos foram semelhantes àqueles observados por Vilela e Colaboradores nas distribuições $n_s \times s$ das linhagens HN-5, MCF-10 e MDA-MB-231, este modelo seria adequado, *a priori*, para descrever a dinâmica de agregação destas linhagens. No entanto, como vimos, a análise das distribuições $P_s \times s$ mostrou que estas distribuições foram bem ajustadas com exponenciais esticadas em qualquer instante após o plaqueamento, e não com leis de potência em qualquer instante. No caso das linhagens MCF-10 e MDA-MB231,

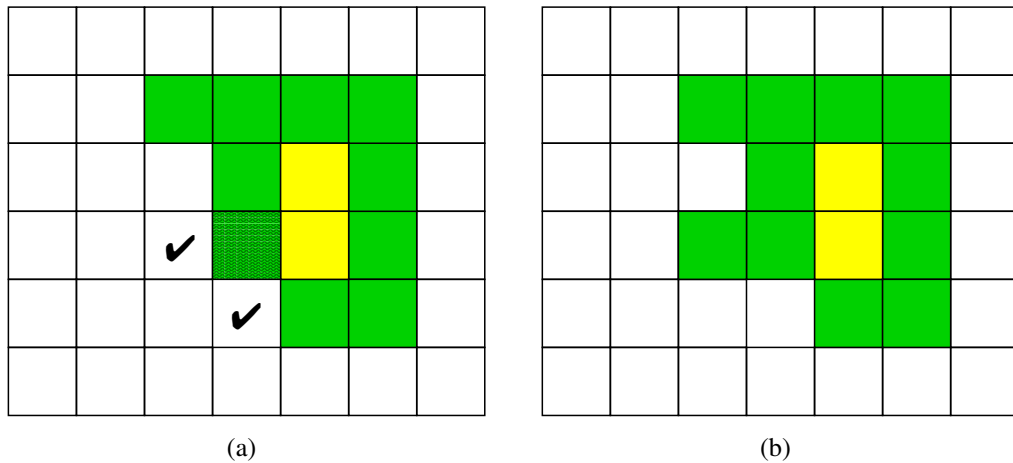


Figura 3.15: Exemplo da regra de replicação das partículas. a) A partícula hachurada representa a partícula selecionada e os sítios para os quais a replicação é permitida aparecem demarcados com um “ok”. b) Configuração do agregado após a replicação da partícula. Após a replicação, a lista de partículas pertencentes à borda é atualizada.

estas ficaram sobrepostas às leis de potência apenas em alguns instantes de tempo, mas não em todos.

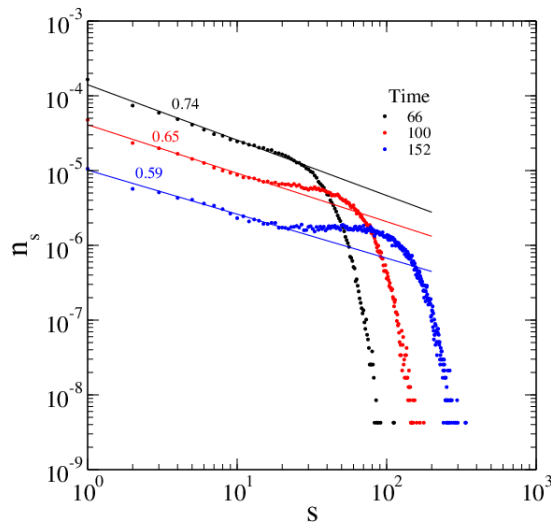


Figura 3.16: Curva de distribuição de tamanhos de agregados em diferentes instantes de tempo obtidos através do modelo de agregação *agregado-agregado* proposto por Alves e Martins [15], com replicação de partículas e agregados com motilidade guiada por quimiotaxia.

É válido levantar uma observação. Neste modelo, as partículas obrigatoriamente permanecem aderidas umas às outras após a replicação. No entanto, as análises das imagens que foram coletadas durante os experimentos com as linhagens B16F10 e NIH-3T3 mostram que nem sempre estas células ficam ligadas umas às outras após a replicação. Na figura 3.17(a) mostramos uma célula da linhagem NIH-3T3 no início da captura das imagens (8 horas após o plaqueamento). Aproximadamente 3 horas depois, a célula iniciou a replicação (figura 3.17(b)). Após 1 hora (4 horas após o início da coleta das imagens) a replicação foi finalizada (3.17(c)) e a célula filha se separou da célula mãe (figura 3.17(d)). Já as figuras 3.17(e) e 3.17(f) mostram

imagens de uma célula da linhagem B16F10 no início das filmagens (4 horas após o plaqueamento) e desta mesma célula após a replicação; diferentemente do caso anterior, as células permaneceram aderidas após a replicação. Considerando estes aspectos, uma nova extensão deste modelo foi proposta neste projeto de doutorado. Segundo este novo modelo, as partículas da periferia ao se replicarem podem gerar “partículas filhas” diferenciadas que, ao invés de continuarem aderidas à “partícula mãe”, podem se soltar do agregado. Os detalhes e resultados deste modelo serão descritos na próxima seção.

3.5 Construção do modelo CCA com quimiotaxia, replicação e diferentes perfis de adesão celular

Como foi mencionado anteriormente, a proposta deste novo modelo inclui alterações relacionadas à adesão celular nas células filhas após a replicação. Como no modelo anterior [15], a cada passo de tempo apenas um agregado é selecionado ao acaso (equiprovavelmente) e escolhe-se uma de duas ações possíveis: 1) migração, com uma probabilidade p_{mov} ou 2) replicação/fragmentação dos agregados, com probabilidade $(1-p_{mov})$.

- Replicação/fragmentação do agregado

Quando a ação replicação/fragmentação é escolhida, sorteamos “ r ”-vezes (tantas quantas forem as partículas da borda) uma partícula que realizará um de dois eventos:

- replicação (com probabilidade p_{rep}), dando origem a uma nova partícula com características iguais às dela, que permanecerá aderida ao agregado;
- fragmentação do agregado, que pode acontecer de duas formas:

- caso a partícula seja normal quanto à adesão celular (estado 1), ela pode passar para um estado em que a adesão celular é enfraquecida (estado 2) com probabilidade p_{trans} . Esta transformação representa uma redução na capacidade de adesão tal como foi observado experimentalmente. Ao adquirir este perfil diferenciado, esta partícula pode ser soltar do agregado com probabilidade $(1 - p_{stick})$, onde p_{stick} é a probabilidade dela continuar aderida ao agregado apesar do enfraquecimento da adesão celular. Caso se solte, a partícula se move para qualquer um dos seus sítios vizinhos desocupados cuja vizinhança não contenha partículas pertencentes ao agregado. Na figura 3.18 apresentamos um exemplo: a partícula hachurada só tem dois sítios vizinhos desocupados, entretanto, a vizinhança de um deles (marcado com um “x”) contém partículas do agregado e, portanto, a ocupação dele pela partícula

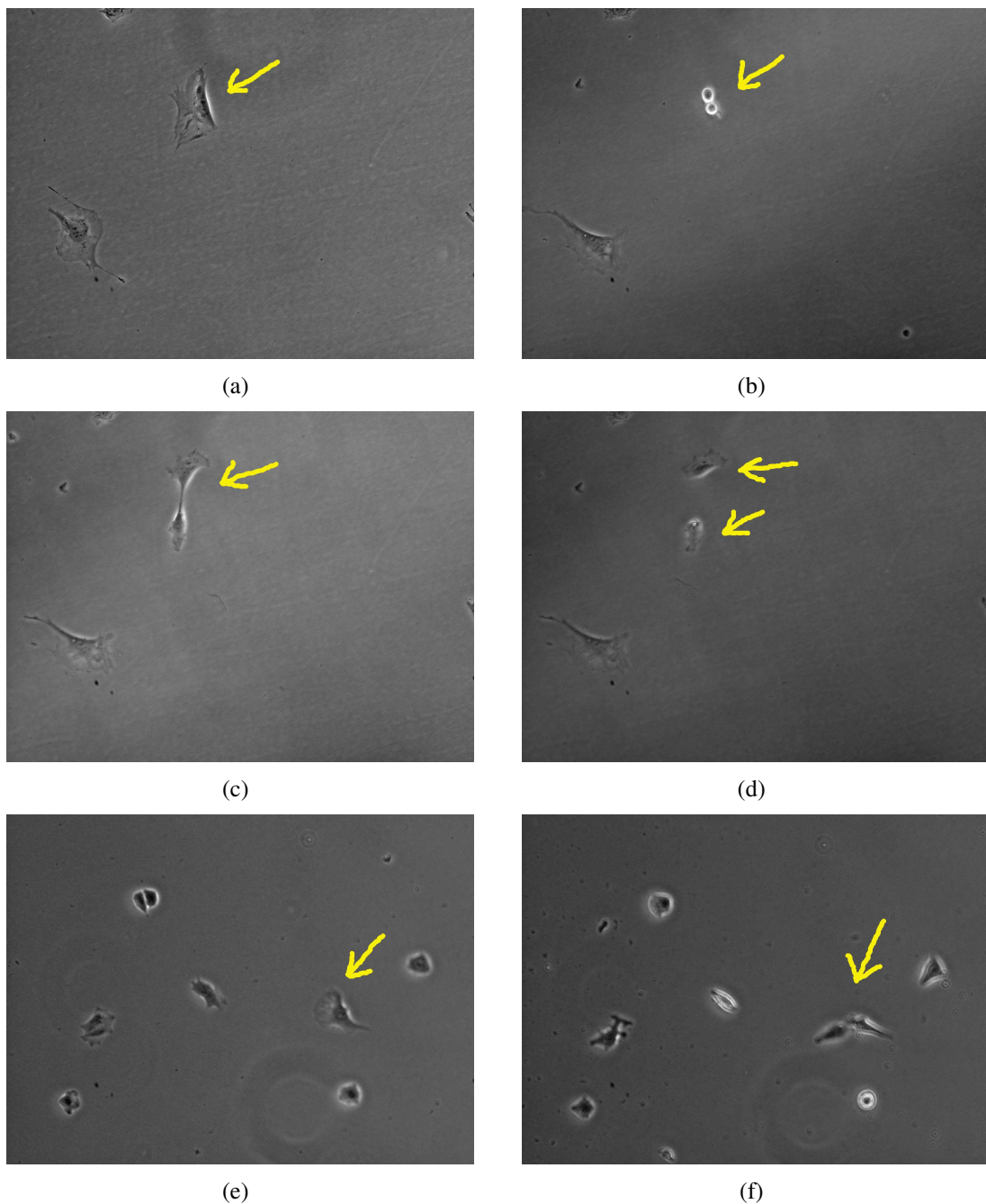


Figura 3.17: Exemplos de replicação celular das linhagens NiH-3T3 e B16F10. A coleta das imagens foi iniciada 8 e 4 horas após o plaqueamento, respectivamente. Os instantes de tempo mencionados a seguir referem-se ao início das filmagens. a) NIH-3T3 no instante $t = 2$ min; b) NIH-3T3 em $t = 180$ min; c) NIH em $t = 225$ min; d) NIH-3T3 em $t = 226$ min; e) B16F10 em $t = 3$ min; f) B16F10 em $t = 843$ min

transformada é proibida. O outro sítio (marcado com um “ok”) não possui vizinhos pertencentes ao agregado. Portanto, a sua ocupação é permitida pela partícula transformada. Se a partícula hachurada adquire um fenótipo diferenciado (representado pela cor vermelha) ela se move para o sítio permitido. Caso a partícula transformada não tenha vizinhos para onde migrar, ela permanece ligada ao agregado, como ilustra a figura 3.19. Caso ela tenha mais de um sítio para onde possa migrar, um deles

é escolhido com igual probabilidade. A cada passo de tempo, atualizamos a lista de partículas pertencentes à borda e o número total de agregados existentes na rede.

- caso a partícula sorteada seja diferenciada quanto à adesão celular e tenha vizinhos vazios desvinculados do agregado (tal como mostrado na figura 3.18), ela poderá soltar com probabilidade $(1 - p_{stick})$.

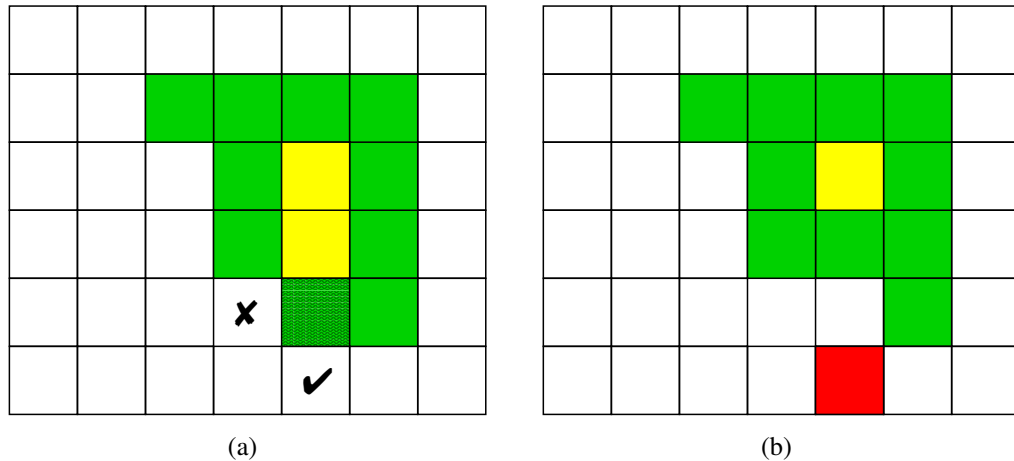


Figura 3.18: Exemplo da mudança na adesão celular de uma partícula filha, resultando na fragmentação do agregado. a) A partícula hachurada representa a partícula selecionada. O sítio para o qual a migração da partícula hachurada é permitida aparece demarcado com um “ok” e para onde a migração é proibida está demarcado com um “x”. b) Nova configuração da rede após a fragmentação do agregado. Atualiza-se a lista de partículas pertencentes à borda (verde) bem como o número de agregados.

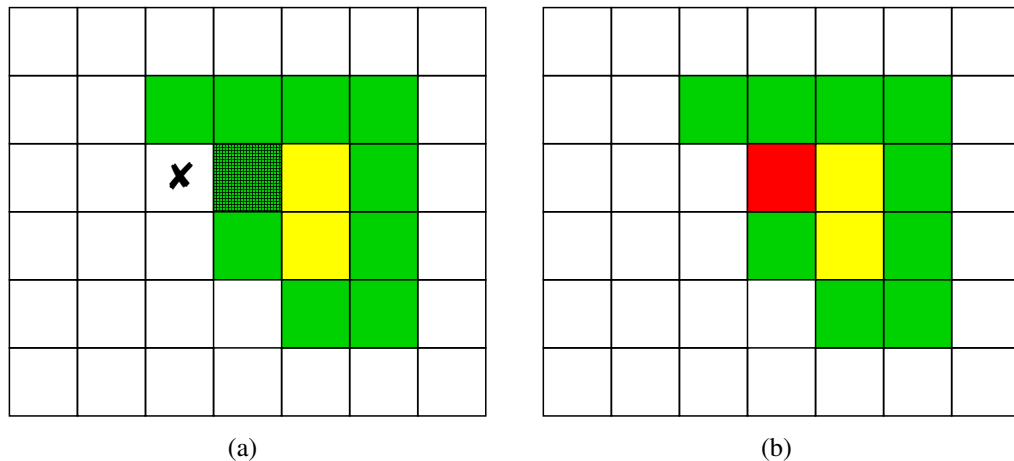


Figura 3.19: Exemplo da mudança na adesão celular de uma partícula filha, resultando na fragmentação do agregado. a) A partícula hachurada representa a partícula selecionada, que no caso tem apenas um vizinho vazio. Como um dos vizinhos deste sítio tem partículas pertencentes ao agregado, a migração da partícula transformada para este sítio é proibida, e portanto continua aderida ao agregado. b) Configuração do agregado após a atualização da rede.

- Migração

As regras para migração são semelhantes às do modelo CCA proposto anteriormente, ou seja, continuam sendo guiadas pela quimiotaxia. No entanto, o sentido do movi-

mento depende do balanço entre partículas normais quanto à adesão e diferenciadas presentes no agregado. Os agregados que têm predominância de partículas normais para a adesão movem-se na direção de maior concentração dos quimioatratores, buscando aderir à outros agregados e formar agregados maiores. Já os agregados que têm predominância de partículas diferenciadas movem-se na direção contrária da maior concentração dos quimioatratores, evitando assim que ocorra adesão com outras partículas.

Quando as partículas de dois ou mais agregados ficam dispostas lado a lado (após a migração ou replicação), ocorre a coalescência entre estes agregados. Neste caso, todas as partículas da borda de ambos os agregados são analisadas quanto à sua propriedade de adesão. Os agregados vizinhos coalescem com certeza quando todas as partículas que tornam-se vizinhas são normais quanto à adesão. Caso uma delas seja diferenciada, os agregados coalescerão com probabilidade p_{stick} . Caso formem um único agregado, realizamos, então, a contagem das partículas de cada um dos tipos (normais e diferenciadas para a adesão celular) para que seja definida a direção de movimento deste novo agregado.

3.6 Resultados

Nesta seção apresentaremos alguns dos resultados obtidos com a simulação deste modelo. Nestas simulações, a taxa de ocupação inicial da rede (r_0) foi de 0,00075 e a difusão independente da massa ($\gamma = 0$). Com relação à produção do quimioatratador, assumimos a taxa de produção $\lambda = 0,25$ e a taxa de degradação natural $\nu = 0,05$. Consideramos que os eventos de migração são pouco prováveis, e portanto, utilizamos o valor $p_{mov} = 0,05$. Isto corresponde biologicamente a células com baixa mobilidade em cultura. Em todos os casos apresentados aqui, as redes possuem tamanho 200×200 e realizamos 400 simulações para cada conjunto de parâmetros.

Iniciaremos a nossa discussão apresentando os resultados referentes às simulações em que adotamos $p_{div} = 0,05$ e $p_{trans} = 0,00025$. Nestes casos, uma partícula mãe tem mais chance de gerar uma célula filha idêntica e que permaneça aderida ao agregado do que gerar uma partícula diferenciada. Além disso, adotamos $p_{stick} = 0,8$, ou seja, mesmo que a partícula filha seja diferenciada, a probabilidade dela continuar aderida ao *cluster* é alta.

Na figura 3.20 são apresentadas as distribuições da densidade acumulada complementar P_s em função do tamanho dos agregados obtidas através destas simulações. Nos instantes iniciais, as distribuições foram bem ajustadas com funções exponenciais esticadas, e estas ficaram sobrepostas às distribuições exponenciais simples, tal como mostram as figuras 3.20(a) ($t = 5$

MCS), 3.20(b) ($t = 11$ e $t = 21$ MCS). No instante $t = 55$ MCS começamos a perder o ajuste com a função exponencial para valores pequenos de s (figura 3.20(c)), ficando este afastamento mais evidente nos instantes de tempo mais avançados da simulação ($t = 175$ MCS), como mostra a figura 3.20(d). As setas na figura 3.20(e) indicam que, à medida que os agregados pequenos formam-se, a distribuição P_s para os agregados pequenos também se desvia da exponencial esticada. Este distanciamento ficou ainda mais evidente nos instantes finais da simulação (figura 3.20(f)). A distribuição destes agregados pequenos segue uma lei de potência, com expoentes decrescentes, como mostram os ajustes nos *insets* das figuras 3.20(e) ($t = 356$) e 3.20(f). Os parâmetros de ajustes estão listados no anexo C.

Na figura 3.21(a) apresentamos o comportamento do tamanho médio dos agregados em função do tempo. Nos instantes iniciais, o tamanho médio é crescente no tempo, sendo que o crescimento inicial (até aproximadamente $t = 100$ MCS) foi ajustado com uma função exponencial simples, como destaca o *inset* da figura. Posteriormente, $S_{médio}$ atinge um valor máximo e torna-se decrescente. Já o crescimento do número de agregados em função do tempo (apresentado na figura 3.21(b)) permanece aproximadamente constante até $t = 200$ MCS aproximadamente, e depois passa a crescer rapidamente, também pelo surgimento de novos agregados. Ao dividirmos o número de agregados pelo número de células, observamos que o decaimento também é do tipo exponencial nos instantes iniciais da simulação, como mostra a figura 3.21(c). É importante destacar que, de acordo com este modelo, à medida que o tamanho dos agregados cresce, aumenta o número de partículas que serão sorteadas para gerar partículas filhas que poderão soltar do agregado com probabilidade p_{trans} . Sendo assim, à medida que o tempo de simulação avança, aumenta o número de partículas que soltam do agregado, aumentando assim o número de agregados no reticulado. Por isto observamos o crescimento do número de agregados na figura 3.21(b) e o decaimento do tamanho médio dos mesmos, uma vez que aumentando o número de agregados, a razão $\frac{N_{células}}{N_{agregados}}$ tende a diminuir.

Em conjunto, estes resultados assemelham-se qualitativamente ao que foi observado nos experimentos de agregação com a linhagem B16F10. Naquele caso, o tamanho médio dos agregados apresentou um crescimento exponencial (figura 3.12(a)), o número médio de agregados permaneceu aproximadamente constante (com flutuações pequenas - figura 3.12(c)) e ao dividirmos o número de agregados pelo número de células também observamos um decaimento do tipo exponencial simples em função do tempo (figura 3.12(e)). É interessante mencionar que existe uma semelhança nos valores dos parâmetros dos ajustes das curvas experimentais e simuladas, embora não haja uma correspondência entre o tempo em cultura e o número de passos de Monte Carlo, tampouco o uso de valores biologicamente adequados para os parâmetros do modelo. Para a distribuição densidade acumulada complementar, observamos que, tanto nos re-

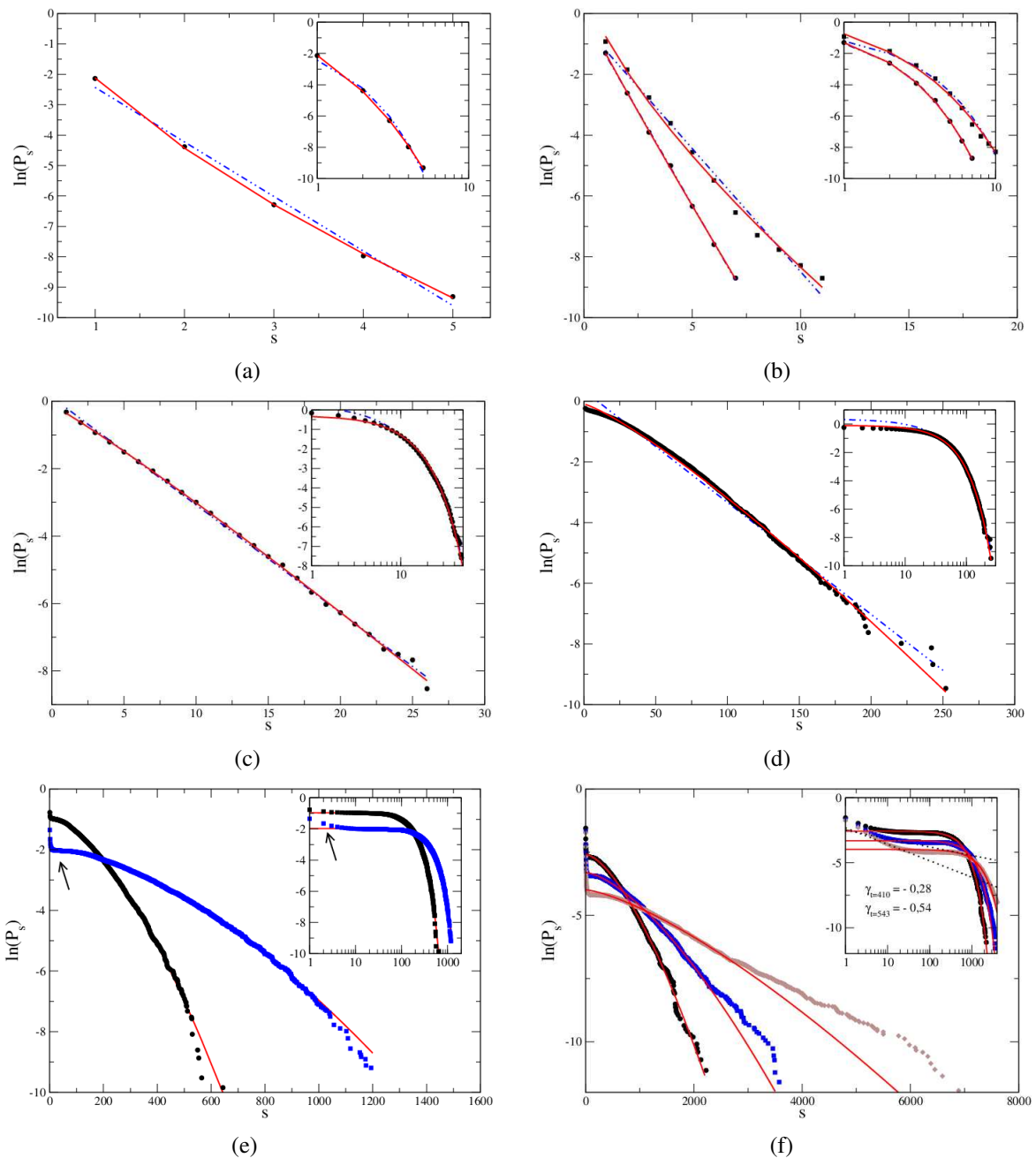


Figura 3.20: Função distribuição acumulada complementar para o tamanho dos agregados obtidos através da simulação dos modelo de agregação *agregado-agregado* com migração guiada por quimiotaxia, replicação e fragmentação dos agregados ($p_{div} = 0,05$ e $p_{trans} = 0,00025$). Os símbolos pretos representam os pontos obtidos através da simulação, as linhas contínuas vermelhas são ajustes com exponenciais esticadas e as linhas tracejadas azuis com exponenciais. As linhas pontilhadas pretas que aparecem nos *insets* são ajustes com leis de potência considerando apenas os agregados pequenos. a) $t = 5$ MCS; b) $t = 11$ e 21 MCS; c) $t = 55$ MCS; d) $t = 175$ MCS; e) $t = 268$ e $t = 356$ MCS; f) $t = 410$, $t = 472$ e $t = 543$ MCS.

sultados experimentais quanto nas simulações, as distribuições nos instantes iniciais foram bem ajustadas com exponenciais esticadas, que se sobrepõem às exponenciais simples. À medida que o tempo avança, os melhores ajustes são obtidos com exponenciais esticadas. Contudo, é válido destacar que nos intervalo de tempo de simulação em que há semelhança no comporta-

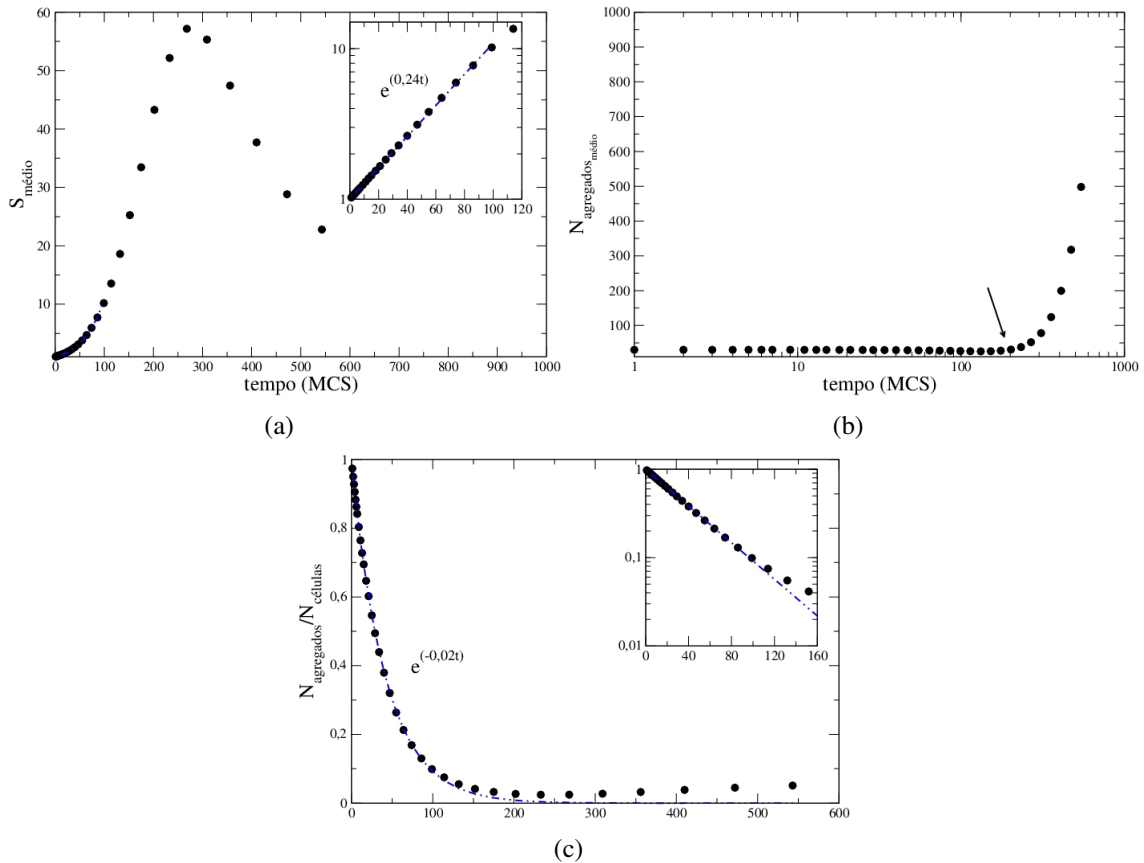


Figura 3.21: a) Tamanho médio dos agregados em função do tempo; b) Número médio de agregados em função do tempo; c) Número de agregados (pelo número de células) obtidos através da simulação dos modelo de agregação *agregado-agregado* com migração guiada por quimiotaxia, replicação e fragmentação dos agregados ($p_{div} = 0,05$ e $p_{trans} = 0,00025$). Os símbolos pretos representam os pontos obtidos através da simulação, as linhas contínuas vermelhas são ajustes com exponenciais esticadas e as linhas tracejadas azuis com exponenciais.

mento do tamanho médio (exponencialmente crescente) e do número de agregados em função do tempo (aproximadamente constante) existem diferenças no tipo do decaimento de $P_s \times s$. Para os resultados experimentais o decaimento é do tipo lei de potência para agregados pequenos com cauda exponencial esticada. Nas simulações, este padrão só foi observado para instates de tempo superiores a 200 MCS, num regime em que o número de agregados tende a ser crescente e $S_{médio}$ não apresenta crescimento exponencial.

Uma hipótese plausível é que o decaimento em lei de potência dos agregados pequenos observado nos experimentos esteja relacionado ao surgimento de novos agregados à medida que o meio de cultura envelhece, o que gera estresse e aumenta a possibilidade de transformação celular. Isto foi observado experimentalmente nas culturas da linhagem celular 4T1 (carcinoma de mama): células unitárias e sub-esferóides se soltam dos eferóides primários após um certo tempo de cultivo. A fragmentação destes esferóides primários foi associado ao aumento na expressão de MMP-9⁵ nestas células em função do tempo de cultura, que está

⁵Matriz de Metaloproteinase - 9.

associada a degradação da matriz extracelular, facilitando o escape das células dos esferóides primários [45]. Sendo assim, analisamos o efeito de mudanças no parâmetro p_{trans} nos resultados discutidos acima. Os valores adotados nestas novas simulações foram $p_{trans} = 0,0001$ e $p_{trans} = 0,05$, mantendo-se fixo $p_{div} = 0,05$ e os demais parâmetros de simulação mencionados no início desta seção.

Na figura 3.22 são apresentados os comportamentos do tamanho médio e do número

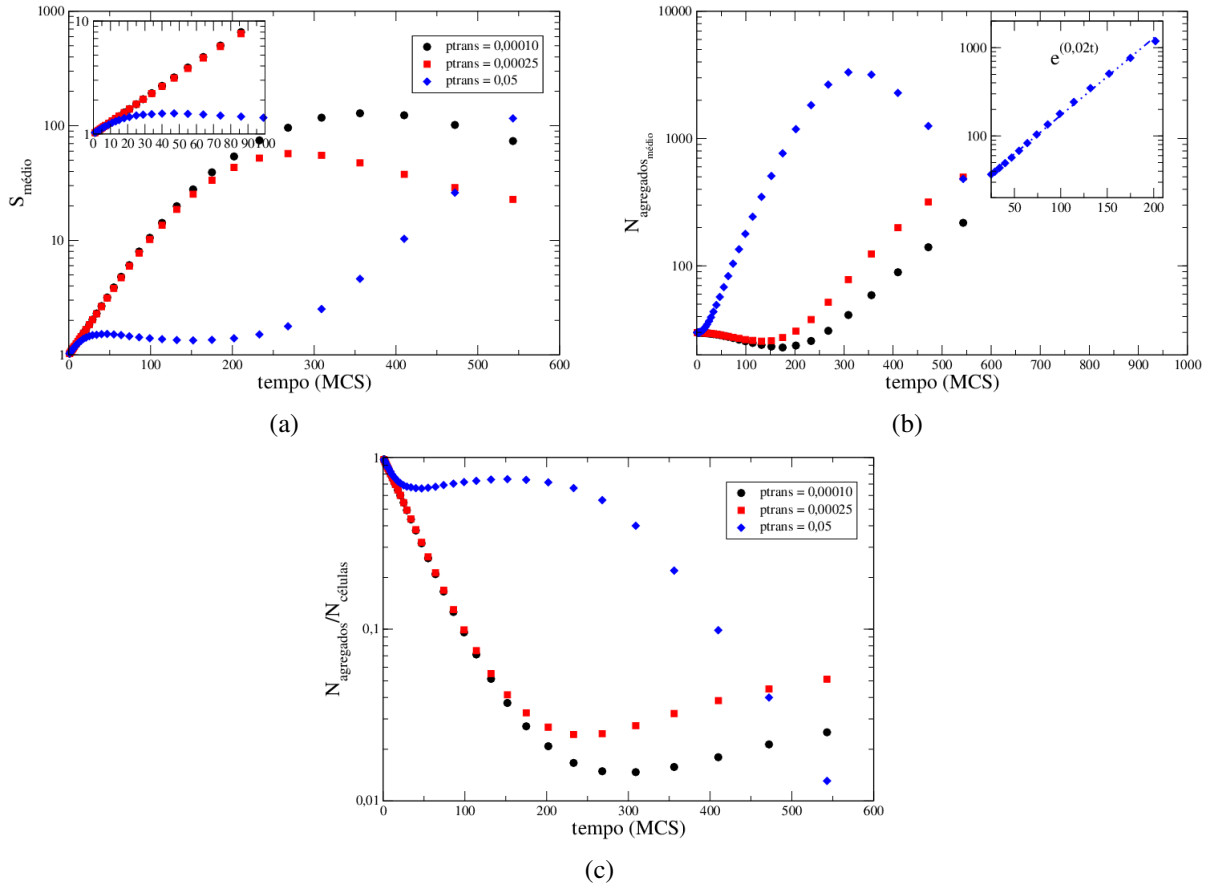


Figura 3.22: Comparação do comportamento do tamanho médio e do número de agregados em função do tempo para simulações do modelo de agregação *agregado-agregado* com migração guiada por quimiotaxia, replicação e fragmentação dos agregados. Manteve-se o parâmetro $p_{div} = 0,05$ fixo (e os demais mencionados no início da seção), e os efeitos das modificações nos valores de p_{trans} foram analisados. a) Tamanho médio dos agregados; b) Número médio de agregados; c) Número médio de agregados dividido pelo número médio de células.

de agregados em função do tempo. Observamos que o tamanho médio dos agregados (figura 3.22(a)) cresce exponencialmente nos três casos, atingindo um valor máximo após um certo intervalo de tempo. Os resultados da simulação mostram que à medida que o valor de p_{trans} cresce, menor é o intervalo de tempo para que este valor máximo seja atingido, bem como torna-se menor o tamanho médio dos agregados. Em particular, quando adotamos o valor $p_{trans} = 0,05$, observamos que após atingir este valor máximo, o valor de $S_{médio}$ se mantém aproximadamente constante, passando a aumentar posteriormente (aproximadamente em

$t = 300$ MCS). Podemos compreender esta diferença no comportamento de $S_{\text{médio}} \times t$ da seguinte maneira: à medida que aumentamos p_{trans} , aumentamos a chance de formar partículas filhas com menor aderência à partícula mãe e que podem se soltar do agregado com probabilidade $(1 - p_{\text{stick}})$. Sendo assim, com um número maior de partículas soltando dos agregados, o tamanho médio dos agregados tende a permanecer constante ou crescer muito lentamente. Contudo, à medida que o tempo de simulação avança, o número de partículas no reticulado cresce e consequentemente os agregados tendem a encostar um no outro, coalescendo com probabilidade p_{stick} . Desta forma, o tamanho médio dos agregados cresce, não somente pela replicação das partículas mas principalmente pela coalescência.

O comportamento do número de agregados em função do tempo (figura 3.22(b)), por sua vez, mostra que, à medida que o valor do parâmetro p_{trans} cresce, ocorre uma redução no intervalo de tempo em que o número de agregados se mantém constante; posteriormente, o número de agregados torna-se crescente no tempo. No caso particular das simulações realizadas com o parâmetro $p_{\text{trans}} = 0,05$, houve uma mudança no comportamento do número de agregados em função do tempo no instante $t \approx 300$ MCS, que passou a ser decrescente no tempo. Este resultado reforça a hipótese que após um certo tempo de simulação, os agregados coalescem, resultando numa redução do número total e em um aumento no tamanho médio dos mesmos.

Por fim, o número de agregados dividido pelo número de partículas mostra-se exponencialmente decrescente durante um certo intervalo de tempo nos três casos, como mostra a figura 3.22(c). Porém, posteriormente esta razão atinge um valor mínimo, voltando a crescer lentamente em seguida. No entanto, à medida que p_{trans} aumenta, mais precocemente a razão $\frac{N_{\text{agregados}}}{N_{\text{células}}}$ atinge este mínimo, e menor é o valor deste mínimo. No caso particular do $p_{\text{trans}} = 0,05$, a razão $\frac{N_{\text{agregados}}}{N_{\text{células}}}$ volta a diminuir a partir do instante $t \approx 300$ MCS, possivelmente pela diminuição do número de agregados.

Analisamos as distribuições $P_s \times s$ simuladas utilizando-se $p_{\text{trans}} = 0,05$. Observamos que nos instantes iniciais da simulação a distribuição foi bem ajustada à distribuição exponencial esticada, e esta ficou sobreposta à exponencial simples, como mostra a figura 3.23(a) ($t = 11$ e $t = 34$ MCS). À medida que o tempo de simulação avança, os pontos correspondentes aos agregados pequenos afastam-se da distribuição exponencial simples, como mostra a figura 3.23(b) ($t = 114$ MCS). Nos instantes $t = 132$ e $t = 202$ MCS (figuras 3.23(c) e 3.23(d)) notamos que, apesar da distribuição exponencial esticada ser a que melhor descreve o decaimento, a distribuição de tamanhos dos agregados pequenos segue uma lei de potência. Inicialmente os expoentes são decrescentes, porém tornam-se crescentes nos instantes de tempo posteriores, como mostram as figuras 3.23(e) ($t = 268$ MCS) e 3.23(f) ($t = 356$ MCS). É possível que esta

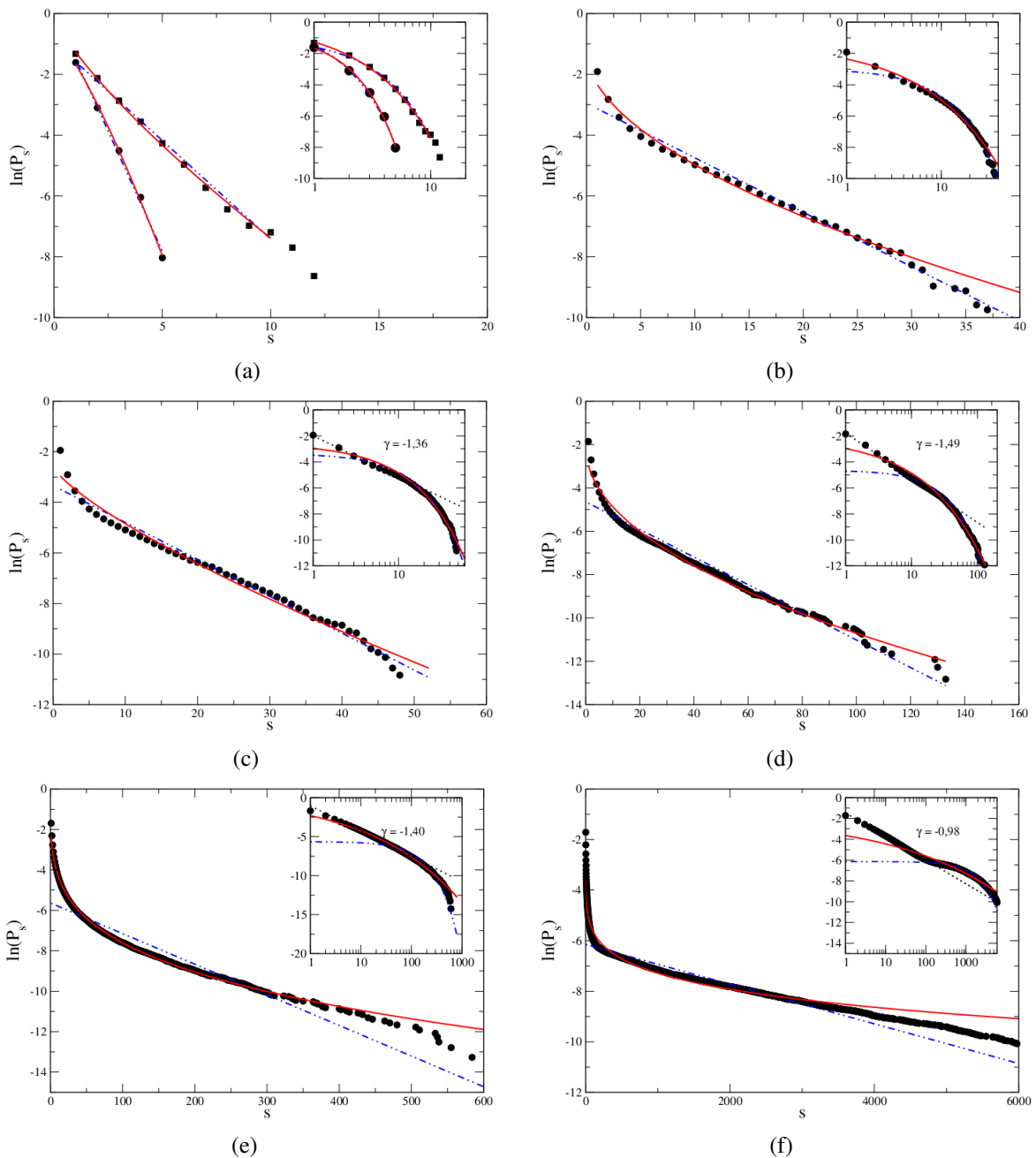


Figura 3.23: Função distribuição acumulada complementar para o tamanho dos agregados obtidos através da simulação dos modelo de agregação *agregado-agregado* com migração guiada por quimiotaxia, replicação e fragmentação dos agregados ($p_{div} = 0,05$ e $p_{trans} = 0,05$). Os símbolos pretos representam os pontos obtidos através da simulação, as linhas contínuas vermelhas são ajustes com exponenciais esticadas e as linhas tracejadas azuis com exponenciais. a) $t = 11$ e 34 MCS; b) $t = 114$ MCS; c) $t = 132$ MCS; d) $t = 202$ MCS; e) $t = 268$ MCS; f) $t = 356$ MCS.

mudança seja decorrente da coalescência de agregados: à medida que eles tornam-se mais presentes, a inclinação da distribuição tende a diminuir. É válido destacar também que apesar desta transição, o intervalo de tamanhos de agregados que pode ser descrita pela lei de potência também aumenta em função do tempo: até $s \approx 10$ em $t = 134$; $s \approx 30$ em $t = 202$; $s \approx 100$ em $t = 268$. Ou seja, estes resultados sugerem que, quando a probabilidade de novos agregados

serem formados é alta, a tendência é que agregados de todos os tamanhos sejam observados.

Os resultados da simulação deste modelo utilizando $p_{trans} = 0,05$ assemelham-se aos resultados que foram obtidos através dos experimentos com a linhagem NIH-3T3. Apesar do tamanho médio dos agregados ser crescente nos instantes iniciais da simulação, este manteve-se aproximadamente igual a 2 durante um longo tempo da simulação (figura 3.22(a)). O mesmo foi observado experimentalmente (3.12(b)). Além disso, embora o número de agregados tenha se mantido contante nos instantes iniciais da simulação, o crescimento no intervalo $t = 20$ a $t = 200$ MCS foi bem ajustado com uma distribuição exponencial, como mostrado na figura 3.22(b); isto também foi observado experimentalmente com a linhagem NIH-3T3 (figura 3.12(d)). Embora nos instantes iniciais o número de agregado dividido pelo número de células tenha apresentado um decaimento exponencial (até $t \approx 10$ MCS), a razão manteve-se aproximadamente contante entre 0,7 e 0,9 até $t \approx 300$ MCS, passando a decrescer em seguida. Resultado similar foi observado com a linhagem NIH-3T3 (figura 3.12(f)). Por último, as distribuições $P_s \times s$ obtidas nas simulações também foram do tipo exponencial esticada (sobreposta à exponencial) nos instantes iniciais da simulação, que passaram a apresentar decrescimentos similares ao da lei de potência (principalmente para os agregados menores) nos instantes mais avançados da simulação. A mesma transição foi observada na distribuição $P_s \times s$ experimental da linhagem NIH-3T3.

Resumindo, os resultados da simulação sugerem que, *in vitro*, as células da linhagem B16F10 tendem a permanecer aderidas após a replicação celular, sendo pequena a probabilidade das células mãe e filha não ficarem aderidas uma à outra. Diferentemente destas, as células da linhagem NIH-3T3 tendem a não permanecerem aderidas uma à outra após a replicação, resultando na formação de muitos agregados de células individuais. É possível que estas duas linhagens possuam características diferentes quanto à adesão celular, ou que as células B16F10 (melanócitos tumorais) possuam um fenótipo mais aderente em relação aos fibroblastos NIH-3T3 normais, conferindo um ambiente propício para o crescimento tumoral. Tais respostas podem ser obtidas através de investigações num nível de expressão de proteínas de junções celulares, tal como foi realizado por Vilela e Colaboradores na referência [1].

Novas simulações deste modelo precisam ser realizadas, buscando uma melhor compreensão das mudanças em relação à estes resultados ao alterarmos os demais parâmetros da simulação (por exemplo, p_{stick} e p_{div}). Além disso, efeitos de tamanho finito do reticulado precisam ser investigados. Contudo, os resultados apresentados aqui são qualitativamente consistentes com o comportamento das duas linhagens cuja metodologia experimental esteve menos sujeita às flutuações de amostras.

3.7 Conclusões e perspectivas futuras

Neste segundo trabalho realizamos uma nova análise dos experimentos de agregação de células em cultura. Nos concentramos na caracterização das distribuições de tamanho dos agregados através das funções distribuição acumulada complementar, que por sua construção, reduzem as flutuações devido ao número limitado de amostras. Observamos que a distribuição acumulada complementar (P_s) em função do tamanho dos agregados (s) de todas as linhagens analisadas foram bem ajustadas com funções exponenciais esticadas: $P_s \sim e^{-a_0 x^{a_1}}$. Em alguns casos, nos instantes iniciais de cultura, os ajustes com exponenciais esticadas ficaram sobrepostos às exponenciais simples (HEp-2, MDA-MB-231, MDCK, MCF-10, B16F10 e NIH-3T3) ou com leis de potência (HN-5); a linhagem MCF-7 foi melhor ajustada à exponencial esticada em todos os instantes de cultura. Uma vez que a distribuição de Weibull tem como distribuição acumulada complementar a exponencial esticada, as distribuições da densidade dos tamanhos dos agregados $n_s \times s$ destas oito linhagens serão do tipo $s^a e^{-bs^c}$. Ou seja, os resultados deste trabalho sugerem um comportamento universal para a distribuição dos tamanhos dos agregados celulares observados em cultura. Os nossos resultados estão de acordo com outras referências relacionadas à dinâmica de agregação de células e bactérias [46–48].

Dentre as oito linhagens analisadas, observamos comportamentos distintos quando o tamanho e o número médio dos agregados em cultura foram analisados. Na maioria dos casos o tamanho médio dos agregados é crescente. Contudo, o tamanho dos agregados das linhagens HN-5, MCF-7 e B16F10 cresce mais rápido, atingindo o tamanho médio de aproximadamente 30 células por agregados após 24h de plaqueamento. Para as demais linhagens, o tamanho médio dos agregados não ultrapassou 10 células por agregado após este intervalo de tempo. A razão entre o número médio de agregados e o número de células mostrou-se decrescente em função do tempo. No caso das linhagens HN-5, MCF-7 e B16F10 o decaimento foi mais rápido em relação às demais linhagens, sugerindo que estas células tendem à manter-se aderidas umas às outras à medida que se replicam. Por sua vez, essa razão manteve-se aproximadamente contante e próxima de 0,8 para as linhagem MCF-10 e NIH-3T3, sugerindo que estas tendem a formar novos agregados à medida que replicam.

Vimos que uma versão estendida do modelo CCA, que inclui motilidade guiada por quimiotaxia, replicação e enfraquecimento na adesão celular após a transição fenotípica, leva à formação de agregados cujas distribuições P_s são bem ajustadas às exponenciais esticadas. Nos instantes iniciais da simulação, os ajustes destas distribuições ficam sobrepostas exponenciais simples, no entanto, à medida que o tempo de simulação avança, perde-se este ajuste com as exponenciais simples. Além disso, a distribuição de tamanhos dos agregados pequenos passa a

ser bem ajustada com leis de potência, cujos expoentes são decrescentes no tempo. Observamos que à medida que aumentamos a probabilidade das células replicadas saltarem dos agregados, antecipa-se o instante em que os agregados menores começam a surgir e seus tamanhos serem descritos por estas leis de potência. Os resultados destas simulações sugerem, na verdade, que para intervalos de tempo longos, todos os agregados obedecem uma distribuição do tipo lei de potência.

Comparando os resultados das simulações com os resultados experimentais das linhagens B16F10 e NIH-3T3, sugere-se que as células da linhagem B16F10 tenham maior capacidade de permanecerem unidas após as replicações. Já as células da linhagem NIH-3T3 tendem a soltar umas das outras após a replicação.

Como perspectivas futuras, pretendemos (na parte experimental deste trabalho) realizar novos experimentos com outras linhagens, utilizando a técnica de videomicroscopia, que produz resultados menos sujeitos às flutuações. Atualmente, novos experimentos com a linhagem MCF-7 estão sendo realizados e em breve estarão em fase de análise. No tocante ao modelo computacional, pretendemos aprofundar as análises no que diz respeito às mudanças nos parâmetros das simulações. Com isto, buscamos uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes às dinâmicas de agregação das células em cultura.

4 *Considerações Finais*

Os resultados do estudo da migração de células *in vitro* sugerem que as linhagens B16F10 e Melan A possuem velocidades instantâneas que seguem distribuições de probabilidade do tipo q -gaussiana. Além disso, há um *crossover* entre uma difusão normal e uma superdifusão, uma vez que para intervalos longos de tempo os deslocamentos quadráticos médios foram bem ajustados com funções do tipo lei de potência com expoente $\gamma > 1$. Os maiores valores de γ foram obtidos nos ajustes da linhagem B16F10, sugerindo que esta linhagem difunde mais rapidamente em relação a linhagem Melan A. Movimentos consecutivos tendem a ocorrer em direções opostas, no entanto, estes são fracamente correlacionados. Estes movimentos de reversão são menos frequentes durante a migração da linhagem B16F10 (principalmente sob infecção), o que aparentemente contribui para difusão mais rápida desta linhagem. Um modelo de caminhada cujo comprimento dos passos segue uma q -Gaussiana e com persistência de curto alcance foi proposto, e os resultados do modelo são qualitativamente consistentes com os resultados experimentais. Em particular, as simulações mostram que quanto maior é o número reversões do centro de massa após um movimento numa dada direção, mais lenta é a difusão.

Os resultados deste primeiro trabalho nos levam a sugerir que as células da linhagem B16F10 apresentam vantagens migratórias em relação às células da linhagem Melan A. É possível que a dinâmica de polimerização-despolimerização no citoesqueleto das células B16F10 seja mais rápida (ou que estas apresentem membranas mais flexíveis), reduzindo assim possíveis movimentos persistentes do centróide devido ao reestabelecimento do formato celular. Investigações num nível genético podem revelar se existem diferentes padrões de expressão dos genes relacionados à migração celular entre estas duas linhagens.

No segundo trabalho, realizamos novos ensaios e revisitamos os resultados dos experimentos de agregação de células em cultura, buscando uma caracterização melhor das distribuições dos tamanhos dos agregados celulares em cultura. Observamos que o encaixotamento de pontos nas distribuições de n_s bem como o truncamento destas curvas (visando reduzir as flutuações devido ao número reduzido de experimentos) pode alterar o comportamento destas distribuições. O uso das distribuições acumuladas complementares P_s para o tamanho dos

agregados mostra-se mais adequado nestas análises, tendo em vista que elas reduzem as flutuações sem que haja necessidade de manipulações prévias no conjunto de dados. Os resultados destas análises sugerem um comportamento universal para a distribuição densidade acumulada complementar para o tamanho dos agregados, do tipo exponencial esticada. Uma vez que a distribuição acumulada complementar da distribuição de Weibull é a exponencial esticada, possivelmente os tamanhos de todos os agregados celulares, independente da linhagem, são descritos pela distribuição de Weibull. Embora a distribuição de Weibull seja amplamente empregada para descrever falhas em processos de engenharia, uma das suas primeiras aplicações foi observada na descrição de distribuição de tamanhos de partículas.

Buscando uma melhor compreensão destes resultados experimentais, um novo modelo de agregação *agregado-agregado* foi proposto. Neste novo modelo incluímos a replicação de partículas, mobilidade guiada por quimiotaxia e fragmentação dos agregados, que representa um enfraquecimento da adesão celular após uma transição fenotípica das células. Para um determinado conjunto de parâmetros, as curvas de distribuição acumulada para o tamanho dos agregados nos instantes iniciais da simulação foram bem ajustadas com funções exponenciais esticadas desde os instantes iniciais da simulação, tal como foi observado nos experimentos. Além disso, os comportamentos do número médio e do tamanho médio dos agregados em função do tempo assemelham-se ao que foi observado nos experimentos com as linhagens B16F10 (tumoral) e NIH-3T3 (normal). Sugere-se que a capacidade de adesão das células da linhagem B16F10 seja maior que a da linhagem NIH-3T3. Este trabalho levanta o questionamento se esta diferença na propriedade de adesão é decorrente da mudança do fenótipo normal para tumoral destes melanócitos. Investigações num nível de expressão de proteínas de adesão célula-célula podem contribuir neste estudo.

Como perspectivas futuras para este trabalho, buscaremos a validação destes resultados com experimentos mais recentes que estão sendo desenvolvidos no laboratório de Física Biológica do DPF/UFV. Já estão sendo realizados novos experimentos tanto de migração quanto de agregação em cultura com novas linhagens que, brevemente, entrarão na fase de análise.

ANEXO A – Determinação do erro posicional e análises complementares dos modos de migração direcional e de reorientação

A.1 Determinação do erro posicional

Desde que toda descrição da migração celular repousa sobre a trajetória definida pelos centróides das células, é de extrema importância determinar a magnitude do ruído introduzido na determinação do centróide pelas análises das imagens (erros de arredondamento de *pixels*). Uma maneira objetiva de estimar o ruído na determinação da posição do centróide foi proposto por Li, Cox e Flyvbjerg [6]. Segundo este método, o erro posicional é estimado pelo espectro de potência das velocidades. Especificamente, o espectro de potência experimental é a soma de três contribuições: o espectro teórico, que tem usualmente um comportamento $1/f^\alpha$; o espectro de *aliasing*, o qual pode naturalmente distorcer o expoente $1/f^\alpha$ e o ruído posicional devido ao tamanho finito dos *pixels* da câmera utilizada. Como proposto por Kirchner e O ruído $1/f^\alpha$ é obtido pelo ajuste através de uma lei de potência na porção linear do gráfico log-log do espectro experimental em uma frequência distante da frequência de Nyquist ($f_{Nyq} = 0,5f_s$), onde f_s é a frequência de amostragem. O *aliasing* distorce da lei de potência $1/f^\alpha$ (onde $\alpha = 2$, no nosso caso) em:

$$P(f) \sim \frac{1}{1 - \cos(\pi f / f_{Nyq})} \quad (\text{A.1})$$

e a contribuição do erro posicional para o espectro de potência tem a forma:

$$P_{\text{erro posicional}}(f) \sim \frac{4\sigma_{pos}^2}{\Delta t} \{1 - \cos(\pi f / f_{Nyq})\} \quad (\text{A.2})$$

Desta forma, através do ajuste obtido pela soma das equações ao espectro de potência médio dos dados experimentais, foi possível estimar o valor do σ_{pos} . Na figura A.1, o

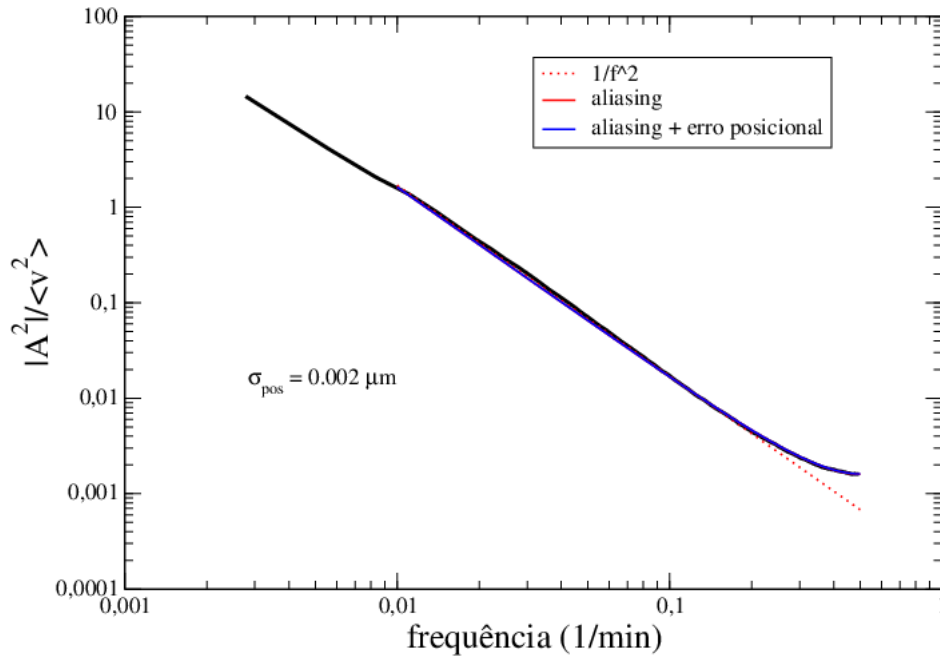


Figura A.1: Erro posicional estimado a partir das células B16F10 utilizando a correção de *aliasing* proposta por Li e colaboradores. A curva preta representa o espectro médio para as células B16F10. Esta curva média foi ajustada usando a combinação do espectro $1/f^2$ acrescido do termo de *aliasing* e o termo referente ao erro posicional (curva azul). A curva vermelha tracejada representa o ajuste com o termo $1/f^2$ e a curva vermelha contínua representa o ajuste de $1/f^2$ acrescido ao termo de *aliasing*.

valor médio do espectro das células B16F10 foi ajustado com o *aliasing* para o espectro $1/f^2$ somado ao termo associado ao erro posicional, para frequências dentro do intervalo $0,003 \text{ min}^{-1}$ até a frequência de Nyquist $f_{Nyq} = 0,5 \text{ min}^{-1}$. Através deste procedimento, obtivemos o valor $\sigma_{pos} = 0,002 \mu\text{m}$ para o erro na determinação do centróide. Valores semelhantes a este foram obtidos nos valores estimados nos espectros médios das células das linhagens Melan A e B16F10 infectadas.

Na figura A.1 notamos que apenas a inclusão do termo de *aliasing* gera um bom ajuste com o espectro de potência experimental. Consequentemente, a contribuição do erro posicional é muito pequeno. Por comparação, nós também utilizamos a correção de *aliasing* ao espectro $1/f^2$ proposto por Kirchner [49]. Como pode ser visto na figura A.2, a contribuição do *aliasing* possui menor curvatura no final do espectro em comparação ao que foi obtido utilizando o termo proposto por Li e colaboradores. É por isso que o valor estimado para o erro posicional é maior neste segundo caso, mas ainda assim, a magnitude ainda é muito pequena. Além disso, o erro posicional estimado através do espectro de velocidade está fora do intervalo teórico $[0,022 \mu\text{m}, 0,098 \mu\text{m}]$, que é obtido através dos argumentos descritos por Li, Cox e Flyvbjerg na seção de informações complementares do artigo [6]. Desta forma, outras fontes de erro podem ser dominantes, por exemplo, o erro associado à definição do contorno da célula na análise das imagens, que não têm um baixo contraste entre o fundo e a célula em questão. Desta forma,

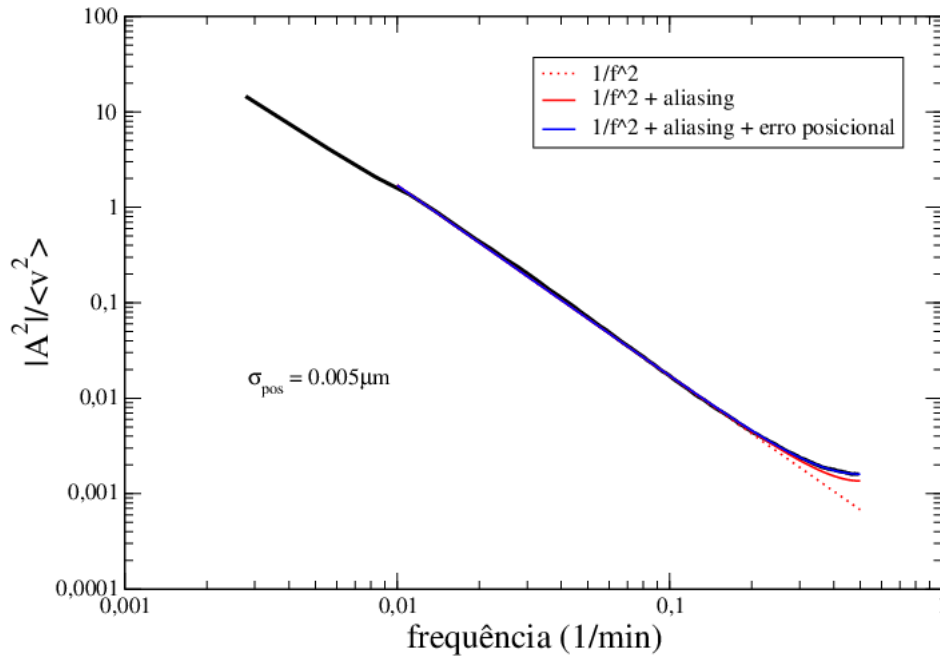


Figura A.2: Erro posicional estimado a partir das células B16F10 utilizando a correção de *aliasing* proposta por Kirchner. A curva preta representa o espectro médio para as células B16F10. Esta curva média foi ajustada usando a combinação do espectro $1/f^2$ acrescido do termo de *aliasing* proposta por Kirchner e o termo referente ao erro posicional (curva azul). A curva vermelha tracejada representa o ajuste com o termo $1/f^2$ e a curva vermelha contínua representa o ajuste de $1/f^2$ acrescido ao termo de *aliasing*.

nós resolvemos considerar que o erro posicional corresponde ao limite inferior obtido pelos argumentos teóricos, ou seja, $\sigma_{pos} = 0.022 \mu\text{m}$.

A.2 Modos de migração direcional e de reorientação

Os comprimentos característicos l^* para as distribuições das distâncias totais percorridas nos modos direcionais e de reorientação são decrescentes como mostra a tabela abaixo. É interessante notar que o comprimento característico da distância total percorrida no modo direcional é maior para linhagem Melan A, confirmando a hipótese que estas realizam um número maior de movimentos consecutivos na mesma direção, dentro de um dado intervalo α^* . Para o modo de migração de reorientação, o comprimento característico é maior para a linhagem B16F10 infectada, o que sugere que estas realizam um número maior de movimentos consecutivos em direções distintas, fora do intervalo α^* .

Linhagem celular	l^* (direcional)	l^* (reorientação)
$\alpha^* = 5^\circ$		
B16F10	-	19,98 μm
B16F10 infectada	-	28,41 μm
MelanA	-	22,24 μm
$\alpha^* = 15^\circ$		
B16F10	1,69 μm	7,70 μm
B16F10 infectada	1,95 μm	10,30 μm
MelanA	2,99 μm	9,78 μm
$\alpha^* = 30^\circ$		
B16F10	1,46 μm	4,28 μm
B16F10 infectada	1,39 μm	5,21 μm
MelanA	2,12 μm	5,70 μm
$\alpha^* = 45^\circ$		
B16F10	1,39 μm	3,28 μm
B16F10 infectada	1,21 μm	3,95 μm
MelanA	2,10 μm	4,31 μm
$\alpha^* = 60^\circ$		
B16F10	1,30 μm	2,57 μm
B16F10 infectada	1,19 μm	3,27 μm
MelanA	2,09 μm	3,57 μm

Tabela A.1: Valores dos comprimentos característicos para a distribuição densidade acumulada complementar das distâncias totais percorridas nos modos de direcional e de reorientação, usando diferentes valores de α^* .

ANEXO B – Artigo publicado referente ao trabalho de caracterização e modelagem de migração de melanócitos in vitro.

Neste anexo apresentamos a publicação referente à primeira parte desta tese, na qual apresentamos os resultados da caracterização e modelagem da migração *in vitro* de melanócitos em cultura.

Normal and Tumoral Melanocytes Exhibit q-Gaussian Random Search Patterns

Priscila C. A. da Silva¹, Tiago V. Rosembach¹, Anésia A. Santos², Márcio S. Rocha¹, Marcelo L. Martins^{1,3*}

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



Abstract

In multicellular organisms, cell motility is central in all morphogenetic processes, tissue maintenance, wound healing and immune surveillance. Hence, failures in its regulation potentiates numerous diseases. Here, cell migration assays on plastic 2D surfaces were performed using normal (Melan A) and tumoral (B16F10) murine melanocytes in random motility conditions. The trajectories of the centroids of the cell perimeters were tracked through time-lapse microscopy. The statistics of these trajectories was analyzed by building velocity and turn angle distributions, as well as velocity autocorrelations and the scaling of mean-squared displacements. We find that these cells exhibit a crossover from a normal to a super-diffusive motion without angular persistence at long time scales. Moreover, these melanocytes move with non-Gaussian velocity distributions. This major finding indicates that amongst those animal cells supposedly migrating through Lévy walks, some of them can instead perform q-Gaussian walks. Furthermore, our results reveal that B16F10 cells infected by mycoplasmas exhibit essentially the same diffusivity than their healthy counterparts. Finally, a q-Gaussian random walk model was proposed to account for these melanocytic migratory traits. Simulations based on this model correctly describe the crossover to super-diffusivity in the cell migration tracks.

Citation: da Silva PCA, Rosembach TV, Santos AA, Rocha MS, Martins ML (2014) Normal and Tumoral Melanocytes Exhibit q-Gaussian Random Search Patterns. PLoS ONE 9(9): e104253. doi:10.1371/journal.pone.0104253

Editor: Friedrich Frischknecht, University of Heidelberg Medical School, Germany

Received: August 26, 2013; **Accepted:** July 11, 2014; **Published:** September 9, 2014

Copyright: © 2014 da Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors thank the Brazilian supporting agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, and Fundação de Apoio à Universidade Federal de Viçosa (FUNARBE-UFV). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* Email: mmartins@ufv.br

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. Particularly, in metastatic solid cancers which are responsible for most disease mortalities, tissue cohesion is lost and both single and collective cell motility are enabled. Transformed, migrating cells rupture of basement membrane layers, invade adjacent tissues and migrate through interstitial matrices towards blood and lymph vessels [3]. On the other hand, creating artificial tissues and organs through the colonization of biomaterials by cells, requires the control of cellular organization, communication and movements [4]. So, to achieve the major goal of regenerative medicine it is imperative to characterize how cells move *in vivo* and understand the mechanisms that govern cell motile behavior.

Observations from a variety of cell types and experimental models reveal that cells move employing a continuum of migration modes, individual or collective. Mode selection is dictated by structural and molecular determinants of both tissue environment and cell response. Furthermore, motile cells can adapt and switch

the modes of migration to distinct physiological and pathological contexts [5]. The switching can either be stochastic or elicited by extracellular factors, including therapeutic agents. The majority of these observations refers to single or densely organized cells moving on two-dimensional (2D) rigid surfaces *in vitro* [6]. Thus 2D cell motility assays provided us with most of our current understanding of cell migration. However, differences in cell motile behavior on 2D substrata versus within three-dimensional (3D) matrices were observed [7,8]. The analysis of 3D cell migration is mainly based on fluorescence microscopy with optical sectioning capability. Nonetheless, this technique poses specific challenges related to cell labelling, fluorescence detection, and cell tracking [9]. Also, 3D cell motility assays have several limitations concerning the systematic comparison of the major 3D matrix models, control of their physicochemical features, resolution in the z-axis imaging, and standardization of quantification routines [10]. In particular, the automatic recognition of distinct migratory phenotypes is a challenge for functional genomic screening approaches [11] to cell migration.

From the physicists stand point, individual cell migration can be mapped on a search process for targets (e. g., nutrients, growth factors and chemokines), detectable by the cell only within a limited spatial range [12]. 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 of adhesion molecules, cytoskeleton remodeling and generation of traction forces [13] will constitute the systems biology of cell motility.

In this context, the movement of several cell types, from unicellular to multicellular organisms, were characterized. It has been found that cells commonly migrate with a directional persistence generating correlated random walk patterns [14]. This is the case, for instance, of *Dictyostelium* [15,16], Hydra [17], human mammary epithelial cells [18], fibroblasts and keratinocytes [19]. In contrast to the Ornstein-Uhlenbeck process [21], maybe the simplest and most popular model for persistent random walks, some of these cells [15,19,20] exhibit non-Gaussian velocity distributions. 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 [22]. So, for example, the dinoflagellate *Oxyrrhis marina* executes Lévy flights when its prey decreases in abundance [23]. Also, the movement of CD8⁺ T cells in the brains of mice infected by *Toxoplasma gondii* is well described by an intermittent Lévy walk [24]. However, T and B cells migrate within intact lymph nodes by a normal random walk [25]. Summarizing, the motion of cells is rich in variety and no single universal search strategy applies to all cell types and environmental conditions.

In the present paper, we performed cell migration assays on plastic 2D surfaces using normal and tumoral murine melanocytes plated at low densities. Experimental time series for individual trajectories of migrating cells were recorded by time-lapse microscopy. From these trajectories, velocity and turn angle distributions as well as velocity autocorrelation functions were determined. Our major finding is that murine melanocytes perform q-Gaussian walks. This result raises the possibility that some cells, previously considered as Lévy wanderers, can instead migrate through q-Gaussian walks. Additionally, we investigated the effects of mycoplasma contamination on the motility of B16F10 melanocytes. Our motivation was the observation made by Murooka *et al.* that HIV induces a reduction in the motility of infected T cells [26]. By tuning the migratory and interactive behavior of T lymphocytes, the HIV viruses enforce T cells to serve as vehicles for efficient local and systemic viral dissemination. Concerning mycoplasma infection, the consequences for the host cells vary widely, from no apparent effect to inhibition of metabolism and growth up to induction of apoptosis or malignant transformation [27,28]. But mycoplasma impair the motility of infected cells? Our main result is that the murine melanocytic migration mode is not affected by mycoplasma infection. Maybe, similar studies can provide valuable insights about the use of viral or bacterial agents to impair cancer cell motility and invasion or identify molecular targets against metastatic cells.

Materials and Methods

Cell culture

Melan A cells, a murine immortalized melanocyte line (São Paulo State Cancer Institute, São Paulo, SP, Brazil), B16F10 cells, derived from a murine melanoma (Pharmacology Department, Minas Gerais Federal University, Belo Horizonte, MG, Brazil), and B16F10 cells contaminated by mycoplasma were used. These cells were cultured in 25cm², 60 ml flasks (Techno Plastic Products AG 90025) at 37°C with 5% of CO₂ in Dulbecc's Minimum Essential Medium (Sigma Aldrich) 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, 2 mM glutamine, 2 mM sodium pyruvate, and 1 mM non-essential amino acids. For Melan A cells, 200 nM 12-o-tetradecanoyl forbol 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) was added.

Cells, with a typical length (major axis) of 19 µm, were sparsely seeded at a small number ($N = 2500$ cells) on the plastic surface of the flasks, corresponding to a very low density of 100 cells per cm². All migration assays had 3 to 4 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) with an electronic magnification of approximately 3× and a 10×0.3 NA air objective. Data were collected at a resolution of 1 pixel = 0.48 µm from a fixed imaged field with 1392 × 1040 pixels. Imaging started 8 hours after cell plating with a video-microscopy sampling interval of $\Delta t = 1$ min and typically last for 12 h. 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. As a result, the number of cells filtered for tracking procedure was $n = 7$ for Melan A, $n = 8$ for B16F10 and $n = 8$ for contaminated B16F10 cells. Supposedly, these tracked cells have intermediate migratory capacities. Indeed, neither the lower nor the higher motile cells are sampled by the criteria considered for tracking procedure. However, accordingly our qualitative observations, the migratory cells visualized in our assays exhibit rather homogeneous behaviors.

For each cell trajectory $\vec{r}(t)$, the positions \vec{r}_i of the cell contour centroid at the times $t_i = i\Delta t$ ($i = 1, 2, 3, \dots$) 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.

Data analysis

The speed distribution $p(v)$ was defined as the fraction of velocity data points with speed v binned between $k\Delta v$ and $(k+1)\Delta v$. The value of Δv was chosen as described below and k was varied from $\dots, -2, -1, 0, 1, 2, \dots$. In order to fix the same average and standard deviations for the speed distributions exhibited by distinct cells within a cell line, instead of v , $v = (v - \langle v \rangle)/\sigma_v$ was used. Here $\langle v \rangle$ and σ_v are the speed average and its standard deviation for each cell tracked, respectively. Then, the distribution $p(v)$ was built as a histogram with a fixed bin size $\Delta v = (v_{max} - v_{min})/30$. The number $n = 30$ was empirically chosen aiming to generate the largest number of bins, each one containing statistically significant sample of data points.

The velocity autocorrelation function was defined as

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

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 reference [15], $c_v(\tau)$ was calculated for each trajectory as

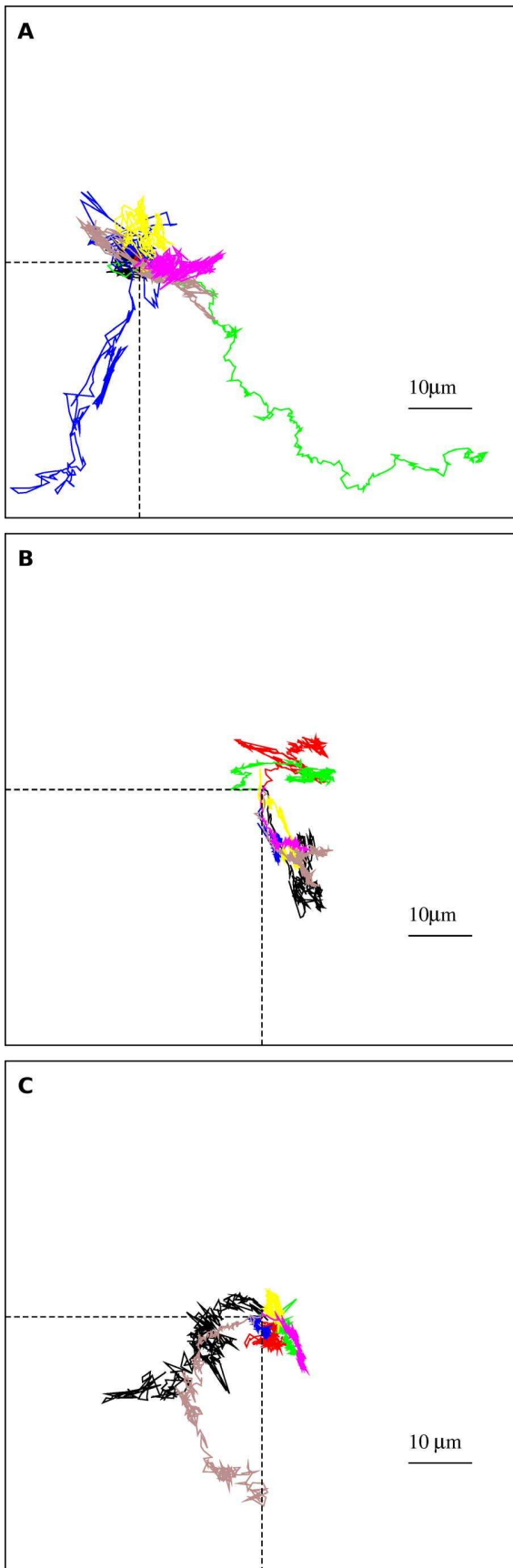


Figure 1. Typical migration tracks on 2D plastic substrates. (a) Melan A (normal), (b) B16F10 (tumoral), and (c) contaminated B16F10 cells. The trajectories were produced by time-lapse recording of cells every 1 min and plotted from the origin. The error σ due to pixel round-off errors on our estimates of the centroid positions is $\sim 0.022 \mu\text{m}$, corresponding to about 1/20 of a pixel width (see Text S1, Figure S1 and Figure S2).

doi:10.1371/journal.pone.0104253.g001

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

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

The instantaneous turn angle α_i was defined as follows. If 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, then α_i is given by $\alpha_i = \theta_i - \theta_{i-1}$. So, the turn angle distribution $p(\alpha)$ was defined as the fraction of trajectory steps for which their instantaneous directions changed by an angle α between $k\Delta\alpha$ and $(k+1)\Delta\alpha$ relative to their previous steps ($k = \dots, -2, -1, 1, 0, 1, 2, \dots$). A histogram for the turn angles with a bin size $\Delta\alpha = (\alpha_{max} - \alpha_{min})/50$ were built. Again, $n = 50$ was empirically chosen to generate a large number of bins, each one containing a significant sample of data points.

As done in reference [18], we analyzed if the cellular migration exhibits alternating modes (directional and re-orientation phases). Here, we adopted the following mode definition. 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 $\alpha^* = 5^\circ, 15^\circ, 30^\circ, 45^\circ,$ and 60° 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.

Statistical analysis and simulations

A multivariate analysis based on Hotelling T^2 test [29] was used to compare the vector of means $(\bar{q}_v, \bar{\gamma})$ for the indexes q_v and γ (see the next section) characterizing each cell lines considered. In addition, experimental cell tracks, displacement and turn angle distributions, and mean-squared displacements were qualitatively compared with those data obtained from computer simulations of q-Gaussian walks. In such walks, a first randomly oriented step is followed by stochastic sequences of directional flights punctuated by single re-orientation jumps. These re-orientation steps, performed with a probability p_{reor} , have their directions randomly chosen independently from those of the previous steps. In turn, a directional flight, performed with a probability $1 - p_{reor}$, is comprised of n successive correlated steps. The value of n is drawn from an exponential distribution $P(n) \sim \exp(-n/n^*)$. Each step in a flight randomly deviates from the orientation of the last step performed before the flight starting by at most $\pm \varphi^*$. Two senses of direction are possible for the flight: either anti-parallel (reversion), chosen with a probability p_{rev} , or parallel

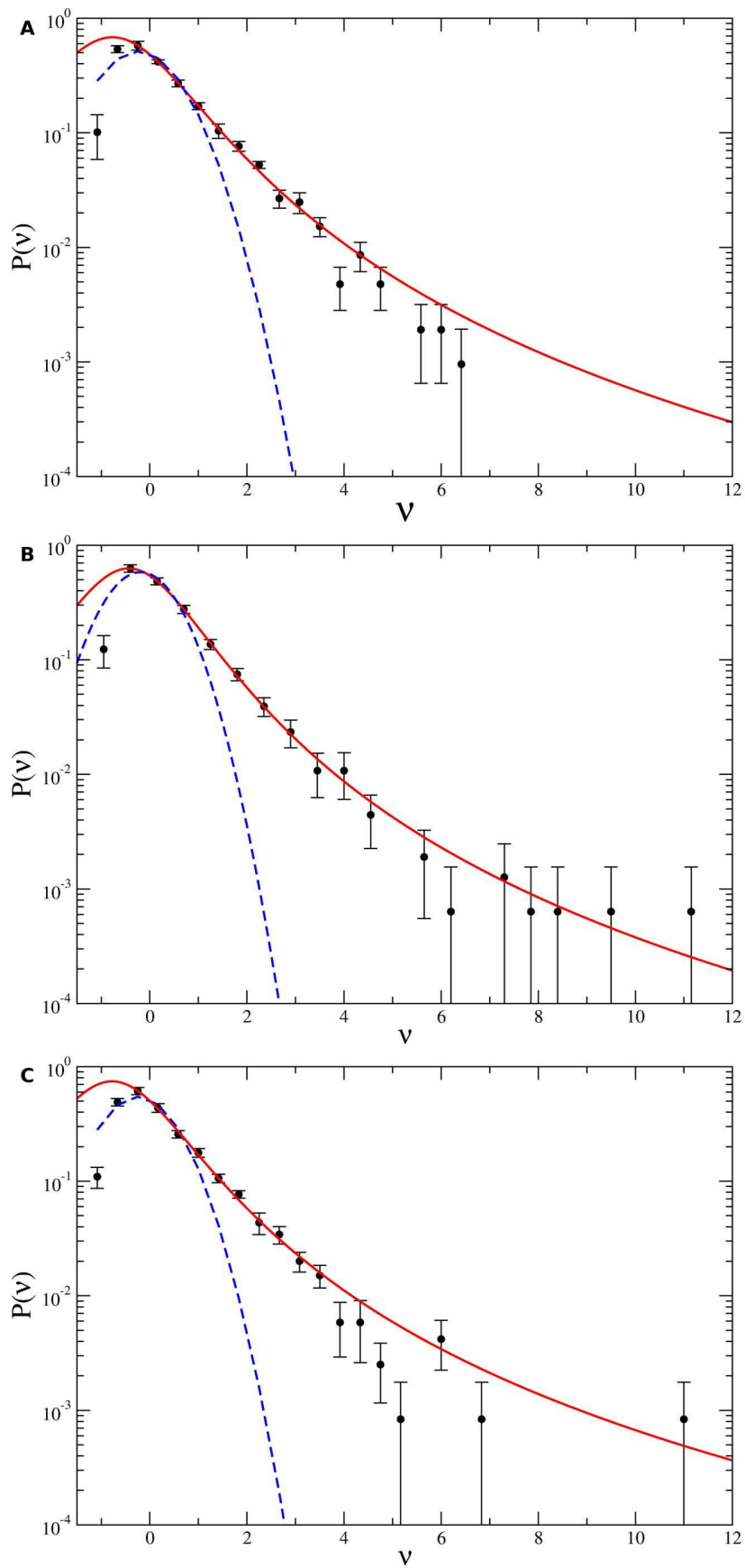


Figure 2. Experimentally measured ensemble speed distributions. (a) Melan A, (b) B16F10, and (c) contaminated B16F10 cells. The distributions were plotted with log- v axis and the solid curves are q-Gaussian fits to data. For comparison, Gaussian distributions fitted to data are shown (dashed curves). The velocities for every individual cell of a given type were merged to form single large data sets. doi:10.1371/journal.pone.0104253.g002

(persistence), chosen with a probability $p_{per} = 1 - p_{reor} - p_{rev}$, to the direction of the last step performed before the flight starting. Finally, every step has a length randomly chosen from a q-Gaussian distribution [30].

Results

In Figure 1 typical trajectories for each of the cell lines tested are shown. The positional errors associated to these trajectories were discussed and estimated in the Supporting Information (see Text S1, Figure S1 and Figure S2). We found that Melan A, B16F10, and contaminated B16F10 cells migrate at average speeds of $1.02 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$, $0.73 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$, and $0.72 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$, respectively. The speed distributions are depicted in Figure 2. The random migration of normal and tumoral melanocytic cells are characterized by q-Gaussian distributions [31] expressed by the formula

$$P_q(x) = \frac{1}{Z_q} [1 - (1 - q)\beta x^2]^{1/(1-q)}, \tag{3}$$

with $\beta > 0$ and

$$Z_q = \sqrt{\frac{\pi}{\beta(q-1)} \frac{\Gamma\left[\frac{3-q}{2(q-1)}\right]}{\Gamma\left(\frac{1}{q-1}\right)}}$$

where $\Gamma(x)$ is the Gamma function. The q-values characterizing the speed distributions are listed in Table 1.

The anomalous (non-Brownian) character of these migrations is confirmed by the scaling in time of the mean-squared displacement given by

$$\langle r^2 \rangle \sim t^\gamma \tag{4}$$

with $\gamma \neq 1$. In Figure 3 are shown log-log plots of mean-squared displacements for distinct individual cells of the three cell lines 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 were indicated. In the insets, we have fitted the whole set of experimental data for the average mean-squared

displacements over all cells within a cell line. The fits assume a crossover between two different power-laws [32]. Specifically, if $x \equiv \langle r^2 \rangle$ satisfy the equation

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

$\mu_1 < \lambda_s$, its solution

$$x = \left[1 - \frac{\lambda_s}{\mu_1} + \frac{\lambda_s}{\mu_1} e^{(1-s)\mu_1 t} \right]^{\frac{1}{1-s}} \tag{5}$$

provides the parameters μ_1 , λ_s , and s 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.

In order to check the presence of correlations in the migration patterns of these cells, we also measured the velocity autocorrelation function through eq. (2) and the probability distributions of the turn angles between successive time steps. Figure 4 shows our experimental results for the velocity autocorrelation functions. The cell lines tested exhibit correlations decaying exponentially in time with very short characteristic time scales, typically $\sim 0.8 - 1$ min.

Furthermore, the turn angle distributions, illustrated in Figure 5, are “ ω -shaped” curves with local maximums at small (around 0°) and large angles (around $\pm 180^\circ$). Despite these preferences for small and large turns, it must be observed that intermediate turn angles have significant probabilities. The shapes of the turn angle distributions suggest a bimodal analysis in which every individual cell track is 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 [18]. Our results reveal that both flight types are exponentially distributed for turn angle thresholds α^* ranging from $5^\circ - 60^\circ$, supporting the robustness of these findings (see Text S1, Figure S3, Figure S4, Figure S5 and Figure S6). The directional flights have a small characteristic number of steps and, consequently, short characteristic contour lengths l^* . For instance, Melan A cells exhibit l^* varying from $2.99 \mu\text{m}$ for $\alpha^* = 15^\circ$ to $2.09 \mu\text{m}$ for $\alpha^* = 60^\circ$. Furthermore, turn angle

Table 1. q-indexes, exponents and fitting parameters to cell diffusion data.

Cell type	q_v	γ_e	γ	μ_1	λ_s	s
Melan A	1.52	1.23	1.35	-0.0011	0.3772	0.2518
B16F10	1.52	1.32	1.35	-0.0150	0.1748	0.5311
B16F10 contaminated with mycoplasma	1.55	1.63	1.38	-0.0014	0.1175	0.5123

Ensemble q_v values and γ exponents characterizing the q-Gaussian cell speed distributions and the scaling in time of the mean-squared cell’s displacements. The exponents γ_e are the slopes of the empirical power-law fittings to average $\langle r^2 \rangle$ curves. The γ values were predicted from the speed distributions through the expression $\gamma = 2/(3 - q_v)$. Also, the parameters μ_1 , λ_s , and s used for fitting the experimental data for average $\langle r^2 \rangle$ s are listed. doi:10.1371/journal.pone.0104253.t001

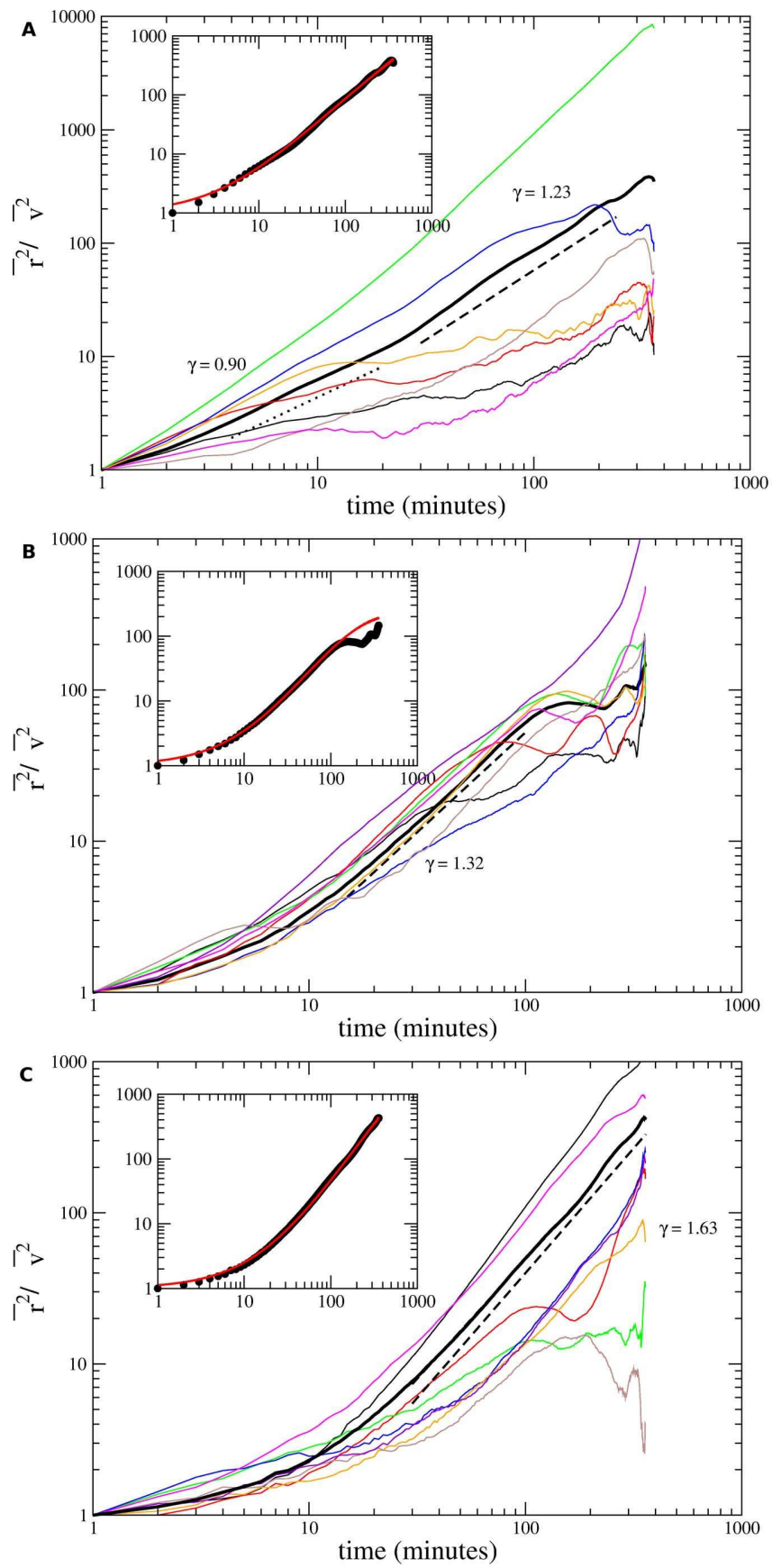


Figure 3. Experimentally measured mean-squared displacements $\langle r^2 \rangle$ as functions of time. (a) Melan A, (b) B16F10, and (c) contaminated B16F10 cells plotted with log-log axis. The colour curves correspond to distinct cell trajectories. The thick black curve is the average of all trajectories. 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 Equation 5. A crossover from a normal to a superdiffusive regime is indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0104253.g003

distributions for reorientation flights have maxima at $\pm 180^\circ$ and the widths of directional flights increases as the threshold α^* increases (see supporting information). It was found that an increase in α^* increases (decreases) the number of directional (reorientation) flights and their average traversed distances. However, for both flight types their characteristic contour lengths decrease. For instance, l^* 's decreases from $9.78 \mu\text{m}$ for 15° to $3.57 \mu\text{m}$ for 60° in reorientation flights of Melan A cells.

Finally, the results of our simulations are shown in Figure 6. As can be noticed, the simulated tracks, turn angle distributions, and velocity autocorrelation functions are qualitatively consistent with the experimental results. In particular, the velocity autocorrelation is a delta function in agreement with the very short correlations in cell's velocities experimentally observed. Also, the correct shapes of cell turn angle distributions demand the occurrence of short persistent or anti-persistent directional flights in the simulated walks. These flights asymptotically lead to ballistic trajectories characterized by mean-squared displacements scaling as n^2 for large number of steps n . Nevertheless, as observed for the cells tested, at intermediate time scales the mean-squared displacement scales as t^γ with $1.2 \leq \gamma \leq 1.6$ for n^* ranging from 2 to 4. This variation in time of the exponent γ is, indeed, the result of a crossover between normal and ballistic diffusion regimes, as the fitting of the simulational results for $\langle r^2 \rangle$ demonstrates (see Figure 6 (b)). Thus, supported by our simulations, we hypothesize that this crossover, neatly observed in the experimental data for B16F10 cells, also occurs in Melan A cells, but slowly.

Discussion

We examined the migration (or search strategies) of normal and tumoral murine melanocytes plated on plastic 2D surface free from any external signaling gradients (random motility conditions). Indeed, cells were plated at very low density so that the average distances between them are more than 100 cell diameters. Our analysis was focused on the scaling of the cell's mean-squared displacements and the statistics of cell's speed and turn angle distributions. Under random motility conditions, these epithelial cell lines demonstrate a rather constrained translational migration superimposed with significant cell shape fluctuations, as can be seen in Movie S1. Currently, we are performing a quantitative analysis of such cell shape fluctuations. Whatever is the relative strength of these contributions, we found that the centroids of the cells exhibit a super-diffusive motion without angular persistence at long time scales and with non-Gaussian speed distributions. Also, our statistical analysis showed that there is no significant difference at any level of significance equal or greater than 5% between Melan A, contaminated and non-contaminated B16F10 cells.

Concerning cell's velocities, apart from very short initial anticorrelations they are uncorrelated at long-term and distributed as q-Gaussians. Their q indexes are in the range [1.52, 1.55] indicating, because $q > 1$, super-diffusion. Thus, the normal and tumoral murine melanocytic cell lines tested perform super-diffusion ($q > 1 \rightarrow \gamma > 1$). Furthermore, our results demonstrate that there is place for q-Gaussian anomalous diffusion of the kind reported on reference [20]. We hypothesize that the ubiquity of

persistent random walks in cell migration is a consequence of cell density. If such densities are not too small, each cell is subjected to chemotactic gradients generated by other cells not so far away. This cell-cell signaling can lead to correlated random walk patterns as observed in reference [18]. In this study, cells were plated at a density of approximately 5000 cells per cm^2 , fifty times the density used in our experiment. However, at very low densities, normal diffusion can dominate at the longest time scales as found in reference [15]. In this experiment, the initial average distances between individual cells are more than 1000 cell diameters. In the literature anomalous cell diffusion, primarily associated to correlated random walks, is also often attributed to Lévy motion wherein long steps (flights) are intercalated by shorter jumps. These walks are characterized by power law distributions for the displacements [24]. Strictly speaking, this is abusive because a power law tail does not imply a Lévy distribution. Indeed, if $q > 5/3$ where it is possible to compare q-Gaussian and Lévy distributions, both exhibit asymptotic power law decays given by $p_q(x) \sim 1/|x|^{2/(q-1)}$ and $L(|x|) \sim 1/|x|^{1+\beta}$, respectively. Even worse, if the indexes q and β are related through $q = (\beta + 3)/(\beta + 1)$ the tail of both distributions decay with the same power-law exponent [31]. Hence, for $q > 5/3$, it may become experimentally very difficult to distinguish between these two distributions. Thus, it is possible that amongst those animal cells supposedly migrating through Lévy walks, some can instead perform q-Gaussian walks.

Regarding the mean-squared displacement as a function of time, the theoretical expression $\gamma = 2/(3-q)$, relating the mean-squared displacement exponent γ and the q index [31], leads to exponents γ in the range [1.35, 1.38]. Such values are in good agreement with those provided by the empirical power-law fittings at intermediate times ($\sim 20-100$ min) for Melan A and B16F10 cells. However, for contaminated B16F10 cells, the theoretical value deviates significantly from the corresponding power-law fit to the data. Moreover, as suggested by the insets of Figure 3 and the fits to short- and intermediate-time regions for Melan A, a crossover between two different power-laws is consistent with the experimental data. Hence, we have fitted the whole set of data by using equation 5. This equation exhibits short- and intermediate-time regions whose asymptotic behaviors respectively are $\langle r^2 \rangle \sim t$ and $\sim t^{1/q}$. Thus, the short-time regime corresponds to a normal diffusion ($\gamma \sim 1$), whereas in the intermediate-time scale the diffusion is anomalous (non-Brownian). Specifically, it is ballistic ($\gamma \sim 2$) for B16F10 cells, contaminated or not, and superdiffusive ($\gamma = 1.34$) for Melan A cells. Supported by our simulations, we hypothesize that Melan A cells will also reach a ballistic regime, but slowly.

This crossover occurs around $t \sim 10-20$ min and can also be observed in our simulations of q-Gaussian walks at the same scale. It seems that this crossover simply reflects the fact that for small displacements a q-Gaussian is almost identical to a Gaussian. So, apparently there is no biological mechanism related to cell motility acting as the source of this crossover. However, it is tempting to attribute such crossover to chemotaxy. Accordingly, the plated cells should initially perform random searches until they start to detect signalling gradients progressively established in the culture

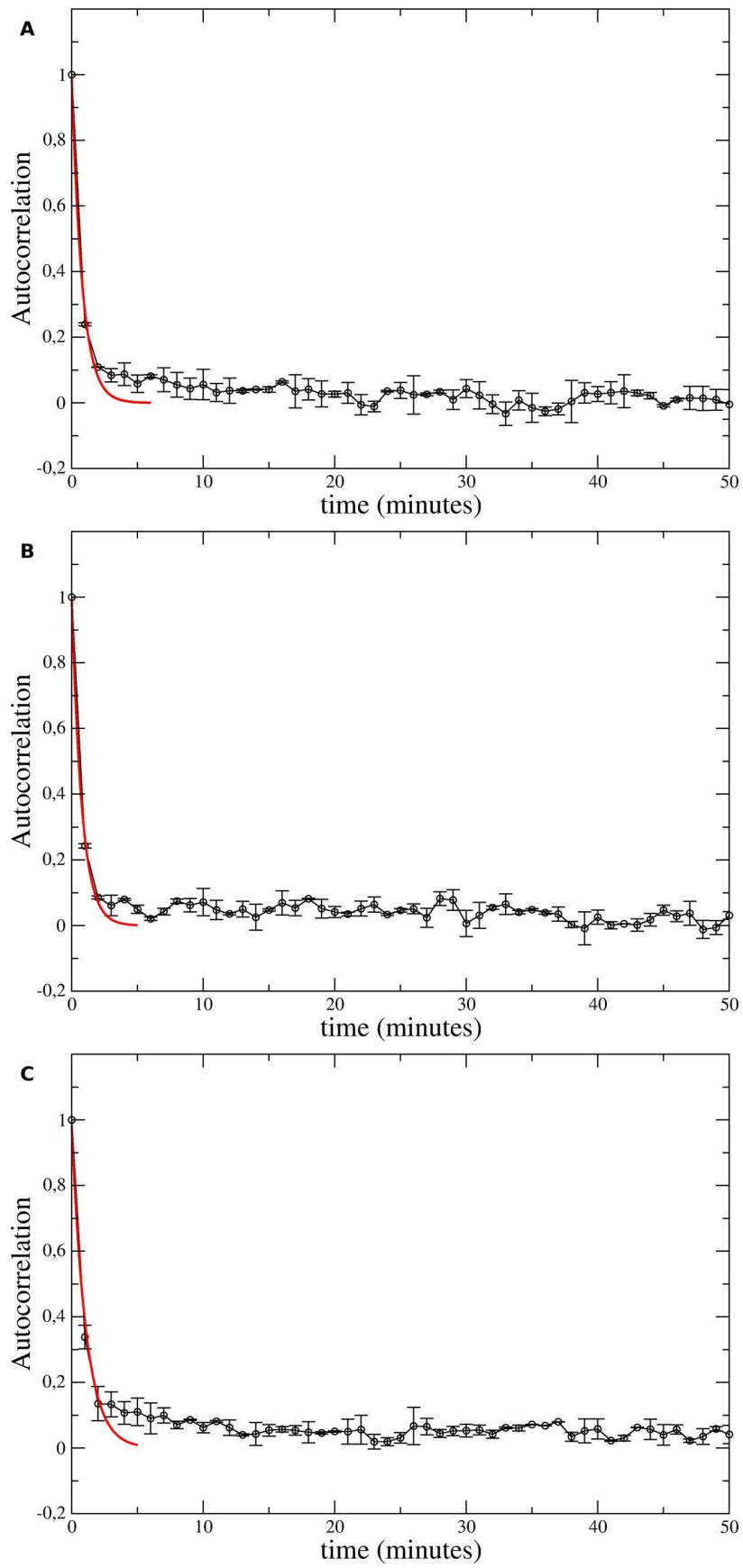


Figure 4. Typical velocity autocorrelation functions. (a) Melan A, (b) B16F10, and (c) contaminated B16F10 cells. Velocities were defined as (displacement vector)/(time-lapse) for each 1 min time-lapse of each cell's trajectory. The red curves correspond to exponential fittings to the data at short-time regions.
doi:10.1371/journal.pone.0104253.g004

plate. Once chemotactic gradients have been established, the cells in response turn to a directed migration mode. At long-term, our simulations generate an asymptotic ballistic regime in which $\langle r^2 \rangle \sim t^2$ providing additional support to our experimental findings. Such long time scales are reached in our experiments, and this asymptotic behavior is consistent with the turn angle distributions observed for the cells tested. Indeed, the turn angle analysis reveal that Melan A and B16F10 cell lines exhibits a slight preference for either persistent (directional) motion or reversions (tumbles). This preference generates local maxima in the turn angle distribution centered around 0° and $\pm 180^\circ$. However, intermediate values of the turn angle are also very probable, leading to a significant, almost uniform distribution inbetween these three peaks. In addition, the sequences of persistent jumps are very short with displacements exponentially distributed and small characteristic lengths. In comparison with tumbles and reorientation sequences, persistent flights are rare (see Text S1).

The directional flights, responsible for either revertive or progressive motions, shape the experimentally observed turn angle distributions $P(\alpha)$ as the simulations demonstrate. Furthermore, the characteristic lengths n^* of these directional flights determine the heights of $P(\alpha)$ central peaks. The larger is n^* , higher is the peak of $P(\alpha)$ centered in 0° . Also, the simulations confirm that persistent flights lead asymptotically to a ballistic migration. These persistent flights can be associated to large cell elongations forward and backward along directions that change slowly and randomly. The Movie S1 attached to the supporting information illustrates the dynamics of cell shape alteration and pseudopod protrusion under random motility conditions. It seems that under very weak chemotactic gradients, long-term cell polarization and stable focal contacts are not established, consequently impairing migratory persistence.

For contaminated B16F10 cells, we find that the persistent flights are absent and, in consequence, the peak centered around 0° in the corresponding turn angle distribution vanishes. In addition, the average empirical exponent γ for contaminated B16F10 cells is larger than that characterizing the mean-squared displacement of healthy B16F10 cells. This indicates that contaminated B16F10 cells reach the ballistic regime slightly faster than their normal counterparts. So, their effective diffusivity remains unaffected, just the opposite effect of HIV virus on infected T cells. Finally, mycoplasma contamination leads to decreasing frequencies of highest velocities in comparison with those predicted by the associated q-Gaussians. It is known that the interaction of mycoplasma with target cells trigger cytoskeletal rearrangement in these host cells [33]. The belief is that this reorganization of the eukaryotic cell cytoskeleton promotes mycoplasma internalization. Our findings suggest that this reorganization can also enhances cell motility by suppressing persistent flights which, for B16F10 cells, mainly include revertive movements. This scenario is confirmed by our simulations (see Text S1, Figure S7 and Figure S8). Further, this mechanism overcomes the smaller average speeds of contaminated cells due to lighter tails exhibited by their velocity distributions.

Biological implications of our findings

In this subsection we will situate our results obtained from the analysis of melanocyte migration within the conceptual scenario for cell motility.

Previous studies, mainly focused on highly motile cells (lymphocytes, fibroblasts, keratinocytes, and amoebae), revealed essentially two individual migration modes: correlated random walks (CRW) [14] and Lévy walks [35]. Once external directional signals (chemotactic or mechanical gradients) have been sensed, motile cells adopt biased CRW. Such walks exhibit long-ranged directional persistence that produces quasi-ballistic trajectories. These straight-line movements with variable low amplitude random behavior minimize the average distance travelled by the cells before first encountering the targets. Hence, highly efficient cellular mechanisms for sensing chemical gradients were selected through evolution.

However, before cells sense a graded signal or in the absence of such cues, in what individual migration mode they engage? In addition to their own characteristics, the performance of a search algorithm depends on extrinsic factors such as the dimensionality and spatiotemporal scales of the search landscape, density and dispersion pattern of the targets, and encounter dynamics. Lévy search seems to be the most efficient strategy to find revisitable targets, i. e., targets that stand for future searches [36,37]. Accordingly, effector lymphocytes, recruited to the site of an inflammation, chase for pathogens by performing Lévy walks [24].

Nevertheless, in two and three dimensions, Lévy walks and ballistic movements can be equally effective for imperfect destructive searches of randomly and sparsely distributed targets [38]. A search is destructive when the targets are not revisited due to either depletion or rejection, and it is imperfect when there are target detection errors. Further, Lévy walks outperform ballistic motions in imperfect destructive searches when targets can occasionally evade capture once detected [38]. So, based on these theoretical evidences, it should be expected that in environments with low cell densities and free from external chemotactic gradients (random motility conditions), cells will perform either ballistic or Lévy searches.

The experiments on cell migration under random motility conditions indicate the following.

- The amoeba *Dictyostelium discoideum* and *Polysphondylium pallidum* perform CRWs with persistent times $\tau \sim 10$ min and non-Gaussian (Cauchy) speed distributions [15,16,39]. Specifically, these amoebae exhibit a crossover from an oscillatory random motion at short times to a purely diffusive Brownian motion on the longest time scales ($t \gg \tau$). They move forwarded in a zig-zag manner fluctuating around the cell polarity directions that turn every 1–2 min away from the last polarization vectors: a left turn tends to be followed by a right turn. Combined with persistence, this turn-run-turn migration results in a fairly straight motion of the amoebae, significantly improving their search efficiencies. See Figure 7 (a). Indeed, *Dictyostelium* cells are approximately half as efficient as ballistic search, and 1.6 to 2.4 fold more efficient than random walk searching [16].
- Transformed human keratinocytes (HaCaT cells) and normal human dermal fibroblasts (NHDF cells) perform CRWs with non-Gaussian velocity distributions and accelerations that, instead to be uncorrelated Gaussian noises, exhibit small correlations own to the memory of past velocities [19]. This memory relies on the direction of a moving cell encoded in the polarity of its cytoskeleton, and it lasts longer than individual

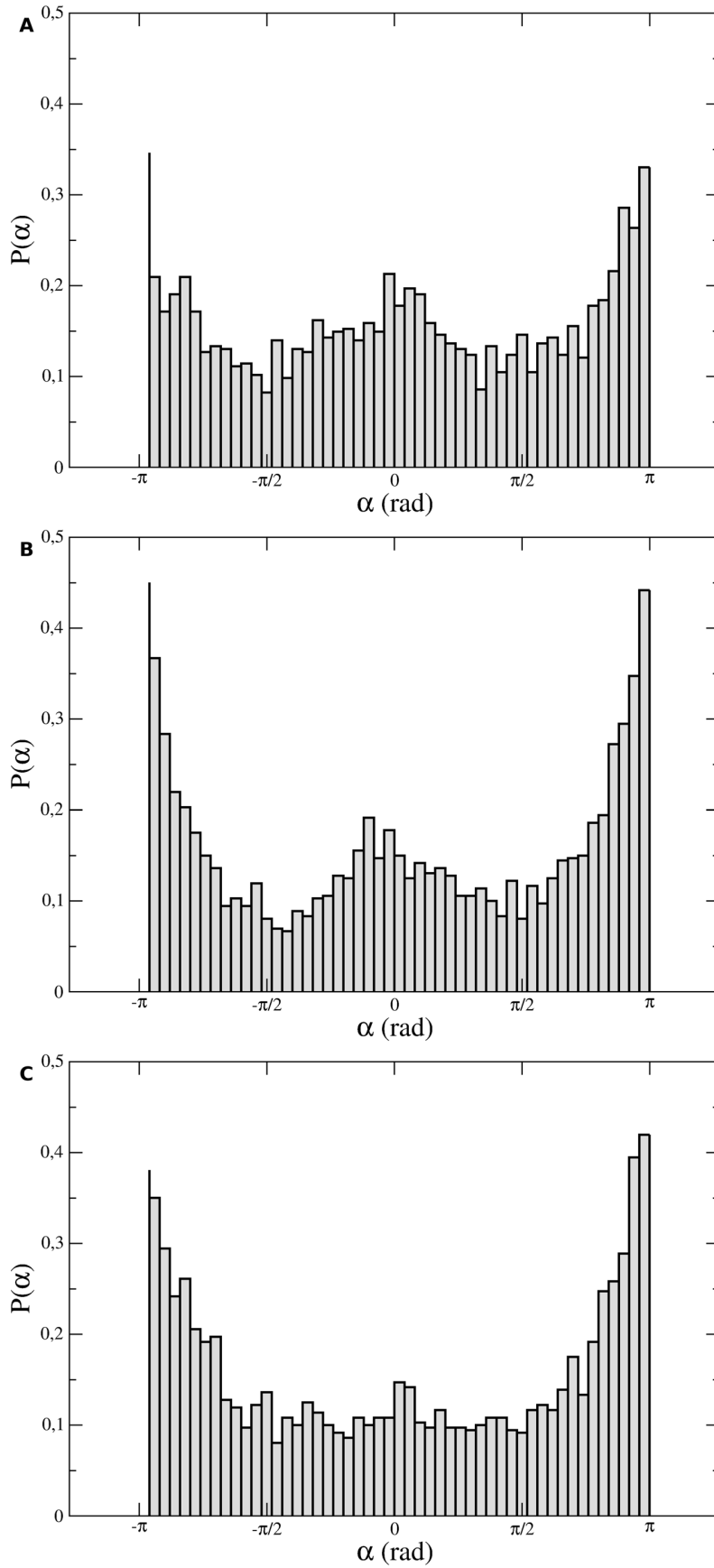


Figure 5. Turn angle distributions. (a) Melan A, (b) B16F10, and (c) contaminated B16F10 cells. The instantaneous turn angle was defined as the difference between successive displacement orientations for each 1 min time-lapse of each cell's trajectory. doi:10.1371/journal.pone.0104253.g005

transient pseudopods. It was suggested that such cell motions can be described by a model that realizes Lévy walks as Markovian stochastic processes [39]. Thus, since Lévy walks are optimal when searching in the absence of external cues and without prior knowledge of target locations, these movements should be strongly selected by evolution.

- Our findings for transformed (Melan A) and tumoral (B16F10) melanocytes indicate that these low motile epithelial cells migrate through CRWs with broad turn angle distributions peaked in 0° and 180° , therefore favoring progressive and revertive steps. In consequence, melanocytes move via random sequences of exponentially distributed re-orientation and directional runs. The persistence time in directional (revertive/progressive) runs are short. The speeds of the cells at search steps follow q-Gaussian distributions that have lower decay rates in comparison to a Gaussian ("fat" tail). The overall result is a crossover from normal diffusion at short time scales to a ballistic motion at long times. For B16F10 cells,

revertive steps are less frequent and they migrate faster than Melan A cells. This migratory advantage may be relevant for cancer progression. Also, such a crossover has a biologically appealing insight as ballistic walks can optimize random searches. Perhaps, this is the case with epithelial cells that quest for and adhere to one another in order to form a new tissue. Similarly to the amoebae, our observations indicate that melanocytes do not sustain stable cell polarity directions. They protrude lamellipodia in random directions. These structures lives for short stochastic periods and promote persistent displacements of the cell's centroids around their axes. After the retraction of a lamellipodium, another one is protruded in a new direction randomly chosen, but preferentially either parallel or opposite to the previous polarity axis. A cartoon describing the melanocyte motion is shown in Figure 7 (b). Its worth to notice that these melanocyte's broad histograms of turn angles support the simulational results obtained by Bartumeus *et al.* [40], according to which excessively sharp

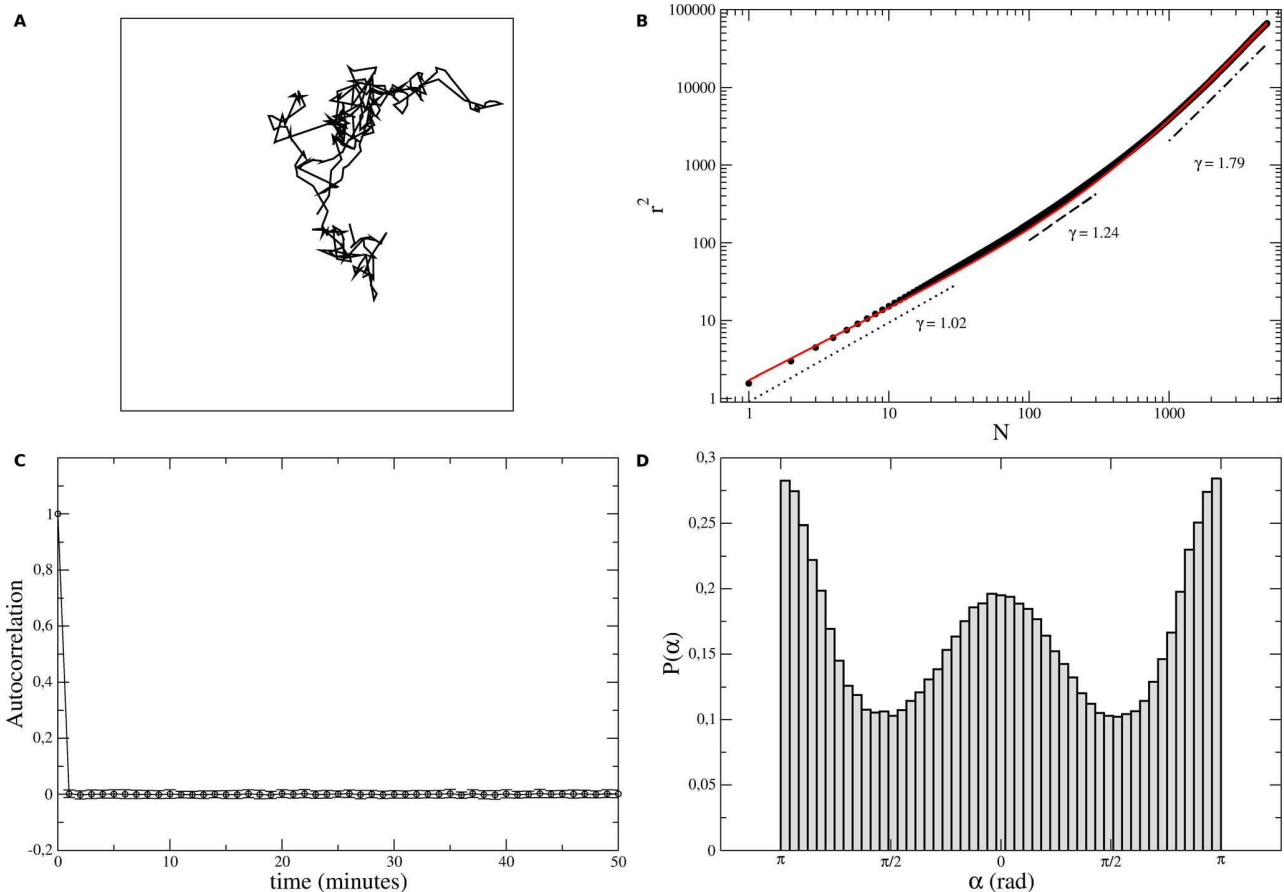


Figure 6. Simulation results. (a) Typical track, (b) mean-squared displacements as functions of time, (c) velocity autocorrelations functions, and (d) turn angle distributions obtained from the simulations of cell walks. The parameter values used were $p_{reor} = 0.72$, $p_{rev} = 0.20$, $p_{per} = 0.08$, $n_{rev}^* = 2$, $n_{per}^* = 0.5$, and $\varphi^* = 30^\circ$. For comparison with cell tracks, the simulated walk in (a) contain around 360 steps, but 100 independent samples with $N = 5000$ steps were averaged to determine the statistical properties of the simulated walks. In (b), the red curve is a fitting to the data given by $\langle r^2 \rangle \sim t^r(1 + at^s)$. We find $r = 0.9221$ and $s = 1.003$, thus corresponding to a crossover between a Brownian and a ballistic walk. doi:10.1371/journal.pone.0104253.g006

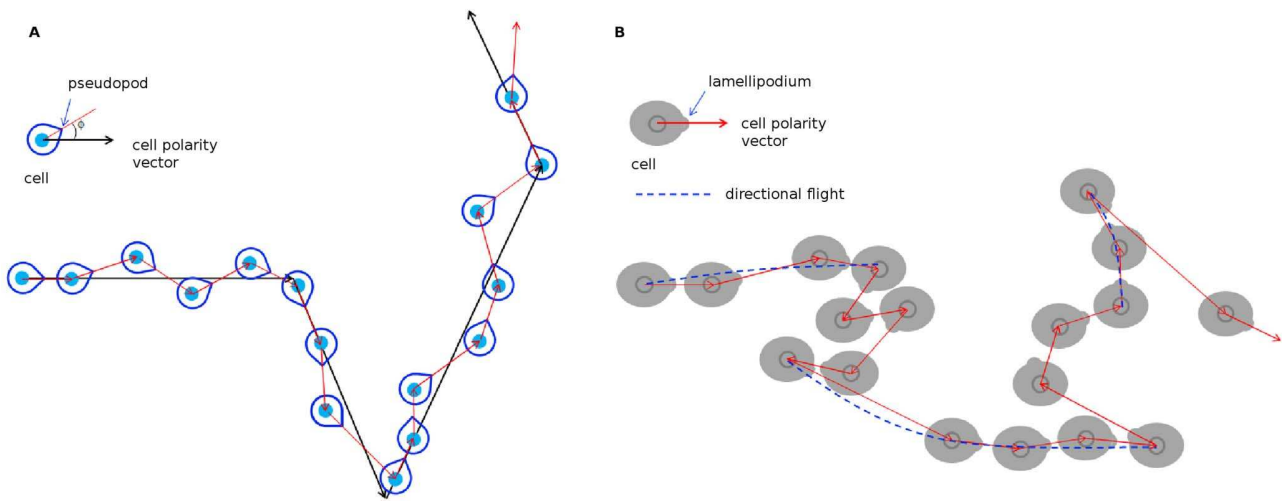


Figure 7. Models for cell migration. (a) The CRW model for *Dictyostelium* migration [16]. Successive pseudopods are protruded in a left-right-left-right fashion around the cell's polarity direction, propelling the cell forward in zig-zag. In turn, the direction of cell polarization changes randomly (with uniform distribution), but slowly over time. (b) The CRW model for melanocyte motion. The cell's polarity changes randomly, but with preferred directions, either 0° or 180° , generating progressive and revertive runs. Also, because the cell speed distribution is a q-Gaussian, the histogram of step lengths is heavy-tailed. So, melanocyte exploited stochastic factors related to both displacement lengths and turn angle distributions to enhance their search capabilities.
doi:10.1371/journal.pone.0104253.g007

distributions generate inefficient searches in landscapes where the target densities fluctuate largely in space.

In summary, the trajectories of normal and tumoral murine melanocytic cells were tracked through time-lapse microscopy. The speed and turn angle distributions associated to such trajectories, as well as their velocity autocorrelations and the scaling of their mean-squared displacements were analyzed. We find that these cells exhibit a super-diffusive motion with non-Gaussian velocity distributions and without angular persistence at long time scales. In addition, we find that B16F10 cells infected by mycoplasmas exhibits essentially the same diffusivity than their healthy counterparts. A q-Gaussian random walk model was proposed to account for these cell search patterns. Its simulation provided results that correctly describes the super-diffusivity in the cell migration tracks. From an evolutionary stand point, our results give support to the hypothesis that life organisms, from individual cells to animals, employ correlated random motions in order to maximize their success in non-oriented searches. In particular, melanocytes have adapted their movements exploiting displacement lengths and turn angle distributions to approach ballistic trajectories under random motility conditions.

Supporting Information

Figure S1 Positional error estimate for B16F10 cells using Li *et al* aliasing correction. Average spectrum for B16F10 cells (black curve). It was fitted with the aliased $1/f^2$ spectrum plus the positional noise spectrum (blue curve). The power-law fitting $1/f^2$ is the dashed red line and the aliased $1/f^2$ behavior is the red curve.
(TIFF)

Figure S2 Positional error estimate for B16F10 cells using Kirchner aliasing correction. Average spectrum for B16F10 cells (black curve). It was fitted with the aliased $1/f^2$

spectrum suggested by Kirchner [34] plus the positional noise spectrum (blue curve). The power-law fitting $1/f^2$ is the dashed red line and the aliased $1/f^2$ behavior is the red curve.
(TIFF)

Figure S3 Flight length distributions for Melan A cells. Probability of flights having lengths greater than l as function of l for Melan A cells. The turn angle thresholds used were (a) $\alpha^* = 15^\circ$, (b) $\alpha^* = 30^\circ$, and (c) $\alpha^* = 45^\circ$. The dashed curves are exponential fittings to the data. The characteristics lengths respectively are $l^* = 2.99$ (9.78), 2.12 (5.70), and 2.10 (4.31) μm for directional (re-orientation) flights. A similar qualitative behavior is exhibited by B16F10 cells.
(TIFF)

Figure S4 Turn angle histograms within directional and re-orientation flights performed by Melan A cells. The turn angle thresholds used were (a) $\alpha^* = 30^\circ$, (b) $\alpha^* = 45^\circ$, and (c) $\alpha^* = 60^\circ$. The same qualitative behavior is exhibited by B16F10 cells.
(TIFF)

Figure S5 Flight length distributions contaminated for B16F10 cells. Probability of flights having lengths greater than l as function of l for contaminated B16F10 cells. The turn angle thresholds used were (a) $\alpha^* = 30^\circ$, (b) $\alpha^* = 45^\circ$, and (c) $\alpha^* = 60^\circ$. The dashed curves are exponential fittings to the data. The characteristics length are $l^* = 1.39$ (5.21), 1.21 (3.95), and 1.19 (3.27) μm for directional (re-orientation) flights.
(TIFF)

Figure S6 Turn angle histograms within directional and re-orientation flights performed by contaminated B16F10 cells. Again, the thresholds used were (a) $\alpha^* = 30^\circ$, (b) $\alpha^* = 45^\circ$, and (c) $\alpha^* = 60^\circ$. The distribution for directional flights is sharper than those for Melan A and B16F10 cells.
(TIFF)

Figure S7 Turn angle distributions generated by simulated q-Gaussian walks. The directional flights have characteristic number of steps (a) $n^* = 1$ and (b) $n^* = 3$. Neatly, the height of the central maximum of $P(\alpha)$ increases with increasing n^* . (TIFF)

Figure S8 Scaling in time of the mean-squared displacement for simulated q-Gaussian walks. The directional flights have characteristic number of steps (a) $n^* = 1$ and (b) $n^* = 3$. The exponent γ grows faster towards its asymptotic value $\gamma = 2$ (ballistic diffusion) as n^* decreases. (TIFF)

Movie S1 B16F10 dynamics of cell shape alteration and pseudopod protrusion. (MP4)

Text S1 Supporting information text file. (TEX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AAS MSR MLM. Performed the experiments: TVR AAS MSR. Analyzed the data: PCAS MSR MLM. Wrote the paper: MLM. Performed the simulations: PCAS.

References

- Bray D (2001) Cell movements: from molecules to motility. New York: Garland Publishing.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Angela Nieto M (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871–890.
- Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE (2012) Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biol.* 14(8): 777–783.
- Blitterswijk CV, Thomsen P, Hubbell J, Cancedda R, deBruijn J, eds., et al. (2008) Tissue engineering. London: Academic Press.
- Friedl P, Wolf K (2009) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188(1): 11–19.
- Ashby WJ, Zijlstra A (2012) Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integr. Biol.* 4: 1338–1350.
- Fraley SI, Feng Y, Krishnamurthy R, Kim DH, Celedon A, et al. (2010) A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nature Cell Biol.* 12(6): 598–604.
- Meyer AS, Hughes-Alford SK, Koy JE, Castillo A, Wells A, et al. (2012) 2D protrusion but not motility predicts growth factor-induced cancer cell migration in 3D collagen. *J. Cell Biol.* 197(6): 721–729.
- Maska M, Ulman V, Svoboda D, Matula P, Matula P, et al. (2014) A benchmark for comparison of cell tracking algorithms. *Bioinformatics* 30: 1609–1617.
- Friedl P, Sahai E, Weiss S, Yamada KM (2012) New dimensions in cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 743–747.
- Simpson KJ, Seflors LM, Bui J, Reynolds A, Leake D, et al. (2008) Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nature Cell Biol.* 10(9): 1027–1038.
- Viswanathan GM, da Luz MGE, Raposo EP, Stanley HE (2011) The Physics of Foraging (Cambridge University Press, Cambridge).
- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 633–643.
- Codling EA, Plank MJ, Benhamou S (2013) Random Walk models in biology. *J. R. Soc. Interface* 5: 813–834.
- Li L, Cox EC, Flyvberg H (2011) ‘Dicty dynamics’: *Dictyostelium* motility as persistent random motion. *Phys. Biol.* 8: 046006.
- Li L, Nørrelykke SF, Cox EC (2008) Persistent cell motion in the absence of external signals: a search strategy for eukaryotic cells. *PLoS ONE* 3(5): e2093.
- Rieu JP, Upadhyaya A, Glazier JA, Ouchi NB, Sawada Y (2000) Diffusion and deformations of single Hydra cells in cellular aggregates. *Biophys. J.* 79: 1903–1914.
- Potdar AA, Jeon J, Weaver AM, Quaranta V, Cummings PT (2010) Human mammary epithelial cells exhibit a bimodal correlated random walk pattern. *PLoS One* 5(3): e9636.
- Selmeczi D, Mosler S, Hagedorn PH, Larsen NB, Flyvbjerg H (2005) Cell motility as persistent random motion: theories from experiments. *Biophys. J.* 89: 912–931.
- Updhyaya A, Rieu JP, Glazier JA, Sawada Y (2001) Anomalous diffusion and non-Gaussian velocity distribution of Hydra cells in cellular aggregates. *Phys. A* 293: 549–558.
- Uhlenbeck GE, Ornstein S (1930) On the theory of Brownian motion. *Phys. Rev.* 36: 823–841.
- Lévy P (1937) Théorie de l’addition des variables aléatoires. Paris: Gauthier-Villars.
- Bartumeus F, Peters F, Pueyo S, Marrase C, Catalan J (2003) Helical Lévy walks: adjusting searching statistics to resource availability in microzooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 12771–12775.
- Harris TH, Banigan EJ, Christian DA, Konradt C, Tait Wojno ED, et al. (2012) Generalized Lévy walks and the role of chemokines in migration of effector CD8⁺ T cells. *Nature* 486: 545–548.
- Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD (2002) Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296: 1869–1873.
- Murooka TT, Deruaz M, Marangoni F, Vrbanac VD, Seung E, et al. (2012) HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature* 490: 283–287.
- Sokolova IA, Vaughan AT, Khodarev NN (1998) Mycoplasma infection can sensitize host cells to apoptosis through contribution of apoptosis-like endonuclease(s). *Immunol. Cell Biol.* 76: 526–534.
- Tsai S, Wear DJ, Shih JW, Lo SC (1995) Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10197–10201.
- Johnson RA, Wichern DW (1998) Applied Multivariate Statistical Analysis, 4th ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- Thistleton W, Marsh JA, Nelson K, Tsallis C (2007) Generalized Box-Muller method for generating q-Gaussian random deviates. *IEEE Trans. Infor. Theory* 53: 4805–4810.
- Tsallis C (2009) Introduction to Nonextensive Statistical Mechanics. New York: Springer.
- Tsallis C, Bemsiki G, Mendes RS (1999) Is re-association in folded proteins a case of nonextensivity? *Phys. Lett. A* 257: 93–98.
- Girón JA, Lange M, Baseman JB (1996) Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by Mycoplasma penetrans. *Infect. Immun.* 64(1): 197–208.
- Kirchner JW (2005) Aliasing in $1/f^\alpha$ noise spectra: Origins, consequences, and remedies. *Phys. Rev. E* 71: 066110.
- Bartumeus F (2007) Lévy processes in animal movement: an evolutionary hypothesis. *Fractals* 15(2): 1–12.
- Viswanathan GM, Buldyrev SV, Havlin S, da Luz MG, Raposo EP, et al. (1999) Optimizing the success of random searches. *Nature* 401: 911–914.
- Bartumeus F, Catalan J, Fulco UL, Lyra ML, Viswanathan GM (2002) Optimizing the encounter rate in biological interactions: Lévy versus Brownian strategies. *Phys. Rev. Lett.* 88: 097901.
- Reynolds AM, Bartumeus F (2009) Optimizing the success of random destructive searches: Lévy walks can outperform ballistic motions. *J. Theor. Biol.* 260: 98–103.
- Reynolds AM (2009) Can spontaneous cell movements be modelled as Lévy walks? *Phys. A* 389: 273–277.
- Bartumeus F, Catalan J, Viswanathan GM, Raposo EP, da Luz MGE (2008) The influence of turning angles on the success of non-oriented animal searches. *J. Theor. Biol.* 252: 43–55.

ANEXO C – Informações complementares referentes às distribuições de densidade acumulada complementar e parâmetros de ajustes com distribuições teóricas

C.1 Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MDCK

Na figura C.1 apresentamos as distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MDCK nos instantes de tempo que não foram publicados originalmente na referência [39]. Os parâmetros obtidos através dos ajustes das distribuições $P_s \times s$ com leis de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas são listados na tabela C.1.

C.2 Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MCF-10

Na figura C.2 apresentamos as distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MCF-10 após 24h, 72h e 96h de cultivo, respectivamente, que não foram apresentados no artigo original [1]. Na tabela C.2 os parâmetros obtidos através dos ajustes das distribuições $P_s \times s$ com leis de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas são listados. Em particular, para $t = 24h$, existem apenas 3 pontos, e portanto, não realizamos ajuste com a exponencial esticada.

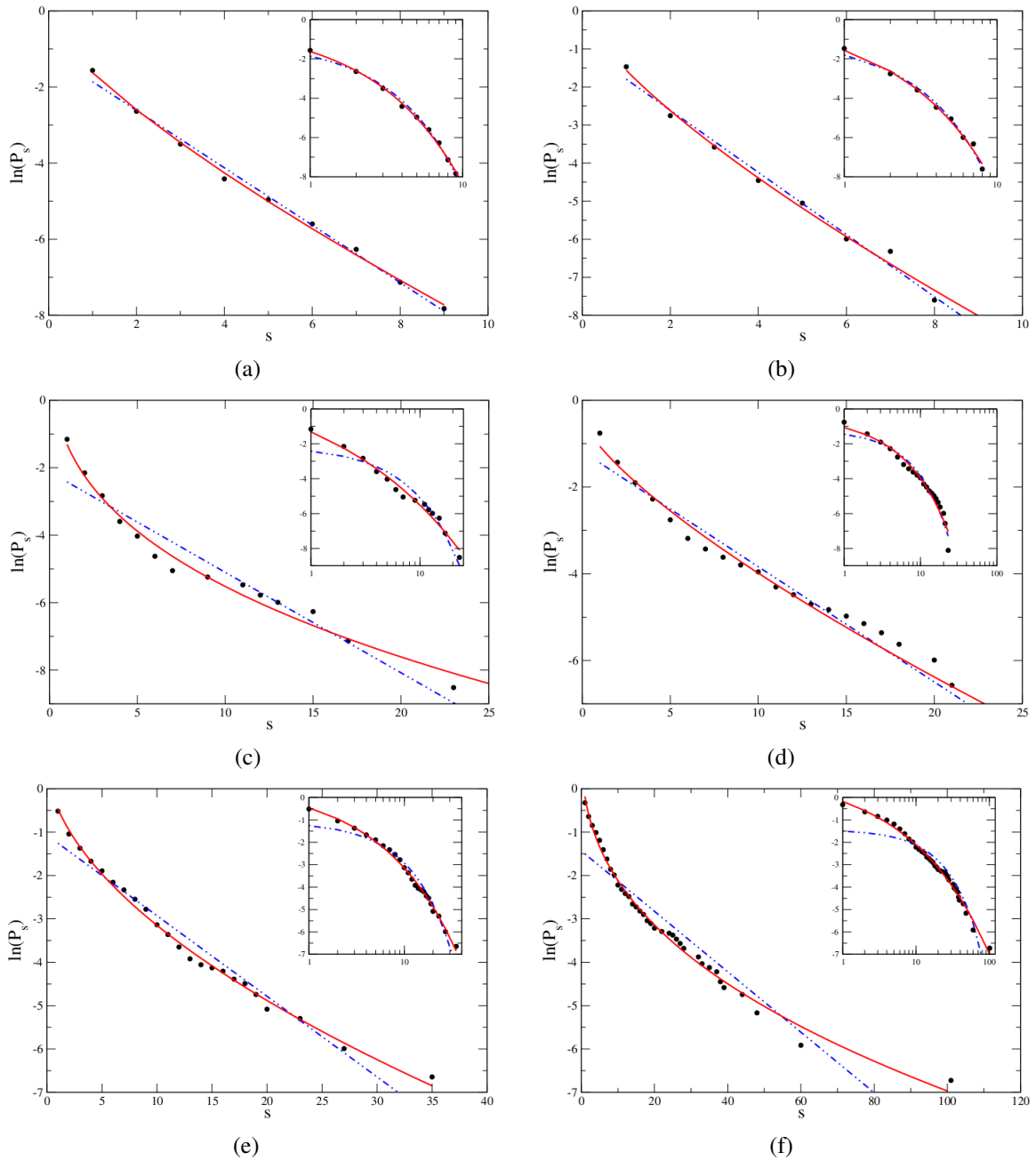


Figura C.1: Funções densidade acumulada complementar para a linhagem MCDK após a) 54h; b) 80h; c) 98h; d) 169h; e) 218h; f) 242h de plaqueamento. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

C.3 Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem Hep-2

Na figura C.3 apresentamos as distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem Hep2 nos instantes de tempo que não foram publicados na referência [39]. Os parâmetros obtidos através dos ajustes das distribuições $P_s \times s$ com leis

parâmetro	$t = 28h$			$t = 54h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-1.38892	-1.1755	1.40774	-0.897049	-1.10799	-0.230926
a_1	-3.56144	-1.13771	-3.30187	-2.79844	-0.753927	-1.39242
a_2	-	-	0.58196	-	-	0.766126
r^2	0.977452	0.984985	0.990707	0.971761	0.996818	0.998790
parâmetro	$t = 80h$			$t = 98h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-0.959986	-0.978162	0.0257038	-0.660701	-2.12405	2.07228
a_1	-2.78575	-0.816564	-1.58587	-2.18214	-0.297631	-3.38443
a_2	-	-	0.738683	-	-	0.350813
r^2	0.973491	0.993705	0.995970	0.980630	0.960301	0.990512
parâmetro	$t = 124h$			$t = 148h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-0.262139	-0.807718	0.472461	0.329038	-1.91317	1.9501
a_1	-2.53821	-0.580874	-1.48455	-2.32386	-0.235348	-2.61559
a_2	-	-	0.672467	-	-	0.407823
r^2	0.971365	0.993248	0.997915	0.965077	0.943293	0.994609
parâmetro	$t = 169h$			$t = 196h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.329038	-1.1796	-0.410288	0.346172	-0.969546	0.660679
a_1	-2.32386	-0.265754	-0.651223	-1.70561	-0.210854	-1.16923
a_2	-	-	0.739577	-	-	0.530839
r^2	0.965077	0.980006	0.983040	0.918395	0.976394	0.970431
parâmetro	$t = 218h$					
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.593274	-1.07019	0.599321	0.902973	-1.43339	1.11133
a_1	-1.77871	-0.185785	-1.06209	-1.4256	-0.0696547	-1.28889
a_2	-	-	0.547825	-	-	0.398592
r^2	0.959116	0.977813	0.997501	0.961879	0.936409	0.995937

Tabela C.1: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem MCDK em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas são listados na tabela C.3.

C.4 Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MDA-MB-231

Na figura C.4 apresentamos as distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MDA-MB-231 nos instantes de tempo que não foram publicados originalmente no artigo [1]. Os parâmetros obtidos através dos ajustes das distribuições $P_s \times s$ com leis de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas são apre-

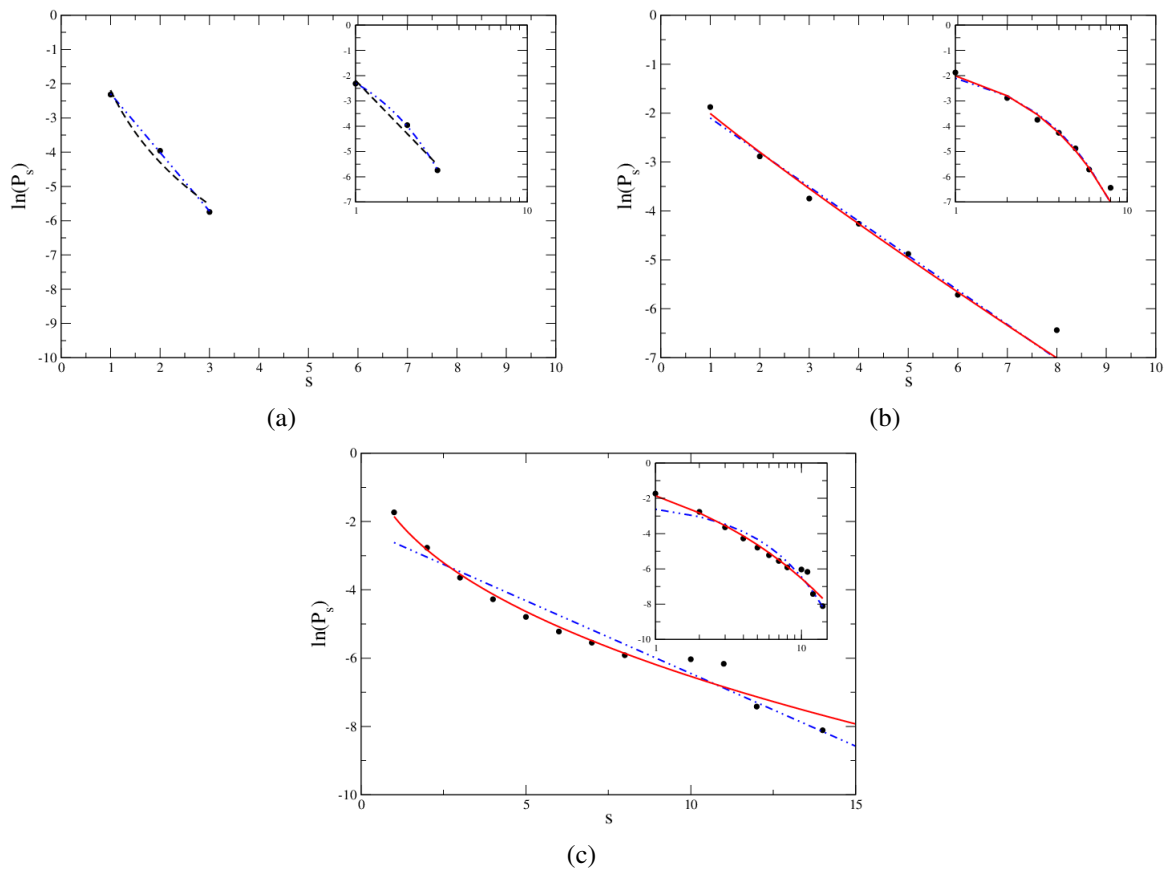


Figura C.2: Funções densidade acumulada complementar para a linhagem MCF-10 após a) 24h; b) 72h e c) 96h de plaqueamento. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

sentados na tabela C.4.

C.5 Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem HN-5

Na figura C.5 apresentamos as distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem HN-5 nos instantes de tempo que não foram publicados na referência [39]. Na tabela C.5 apresentamos os valores dos parâmetros obtidos nos ajustes.

parâmetro	$t = 24h$			$t = 48h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-2.19034	-0.57718	-	-1.55244	-1.33484	-1.43953
a_1	-3.04021	-1.71447	-	-2.19277	-0.722032	-0.645481
a_2	-	-	-	-	-	1.04917
r^2	0.984846	0.999706	-	0.959273	0.996403	0.996470
parâmetro	$t = 72h$			$t = 96h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-1.2394	-1.39788	-1.09874	-1.29818	-2.19043	1.08448
a_1	-2.57893	-0.70339	-0.910108	-2.2536	-0.425686	-2.93733
a_2	-	-	0.899393	-	-	0.413917
r^2	0.952544	0.988927	0.989278	0.975315	0.966767	0.985322
parâmetro	$t = 120h$			$t = 144h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-0.224475	-1.44658	-0.191916	0.105312	-1.18875	1.01898
a_1	-1.67916	-0.217995	-0.918148	-1.49154	-0.169134	-1.55984
a_2	-	-	0.596367	-	-	0.425187
r^2	0.960355	0.983204	0.995193	0.958939	0.969242	0.990338

Tabela C.2: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem MCF-10 em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

C.6 Distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MCF-7

Na figuras C.6 apresentamos as distribuições da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem MCF-7 nos instantes de tempo que não foram reportados na referência [1]. Na tabela C.6 apresentamos os valores obtidos nos ajustes com leis de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas.

C.7 Distribuições da densidade acumulada complementar para o tamanho dos agregados da linhagem B16F10

A figura C.7(a) mostra a distribuição da densidade acumulada complementar para os tamanhos dos agregados da linhagem B16F10 após 96h de cultivo. Na tabela C.7 são listados os parâmetros de ajustes com leis de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas.

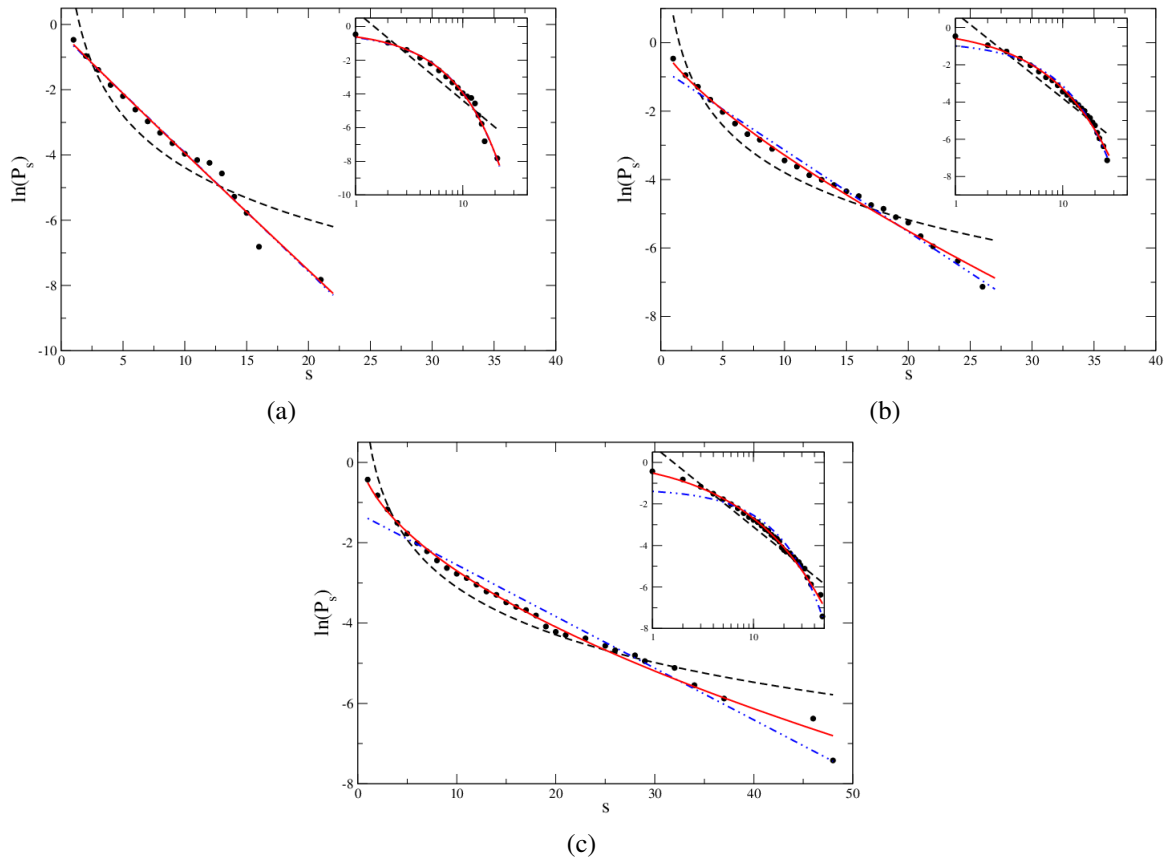


Figura C.3: Funções densidade acumulada complementar para a linhagem HEp-2 após a) 120h; b) 144h; c) 168h de plaqueamento. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

C.8 Distribuições da densidade acumulada complementar para o tamanho dos agregados da linhagem NIH-3T3

Na tabela C.8 são listados os parâmetros obtidos através dos ajustes das distribuições $P_s \times s$ com leis de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas. Nos instantes $t = 24h$ e $t = 48h$ existem apenas 2 pontos nas distribuições $\ln(P_s \times s)$; por este motivo, não realizamos ajustes com nenhuma função.

C.9 Parâmetros de ajuste das distribuições $P_s \times s$ - simulações

Nas tabelas C.9 e C.10 são listados os parâmetros obtidos através dos ajustes das distribuições $P_s \times s$ com leis de potência, exponenciais simples e exponenciais esticadas, obtidos nas simulações do modelo, usando $p_{trans} = 0,00025$ e $p_{trans} = 0,05$, respectivamente

parâmetro	$t = 28h$			$t = 52h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-1.734	-1.27065	11.5913	-0.353264	-0.492272	4.85339
a_1	3.75617	-1.30919	-13.4934	-2.97042	-0.844112	-5.5317
a_2	-	-	0.225921	-	-	0.359422
r^2	0.980563	0.964906	0.981805	0.981537	0.971328	0.987802
parâmetro	$t = 76h$			$t = 100h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.213582	-0.984184	5.35435	1.04103	-1.61136	4.03392
a_1	-2.7494	-0.504859	-5.64714	-2.5924	-0.252408	-3.9634
a_2	-	-	0.30998	-	-	0.341339
r^2	0.984342	0.954555	0.992715	0.970702	0.925354	0.992343
parâmetro	$t = 120h$			$t = 144h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.917027	-0.285362	-0.213347	0.797158	-0.749613	0.006283
a_1	-2.30171	-0.364107	-0.396578	-1.99422	-0.238862	-0.594895
a_2	-	-	0.973243	-	-	0.742905
r^2	0.922564	0.992164	0.992203	0.951145	0.992794	0.996209
parâmetro	$t = 168h$					
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.815567	-1.26421	0.383864			
a_1	-1.70488	-0.128639	-0.889659			
a_2	-	-	0.539736			
r^2	0.957028	0.977787	0.995671			

Tabela C.3: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem HEp-2 em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

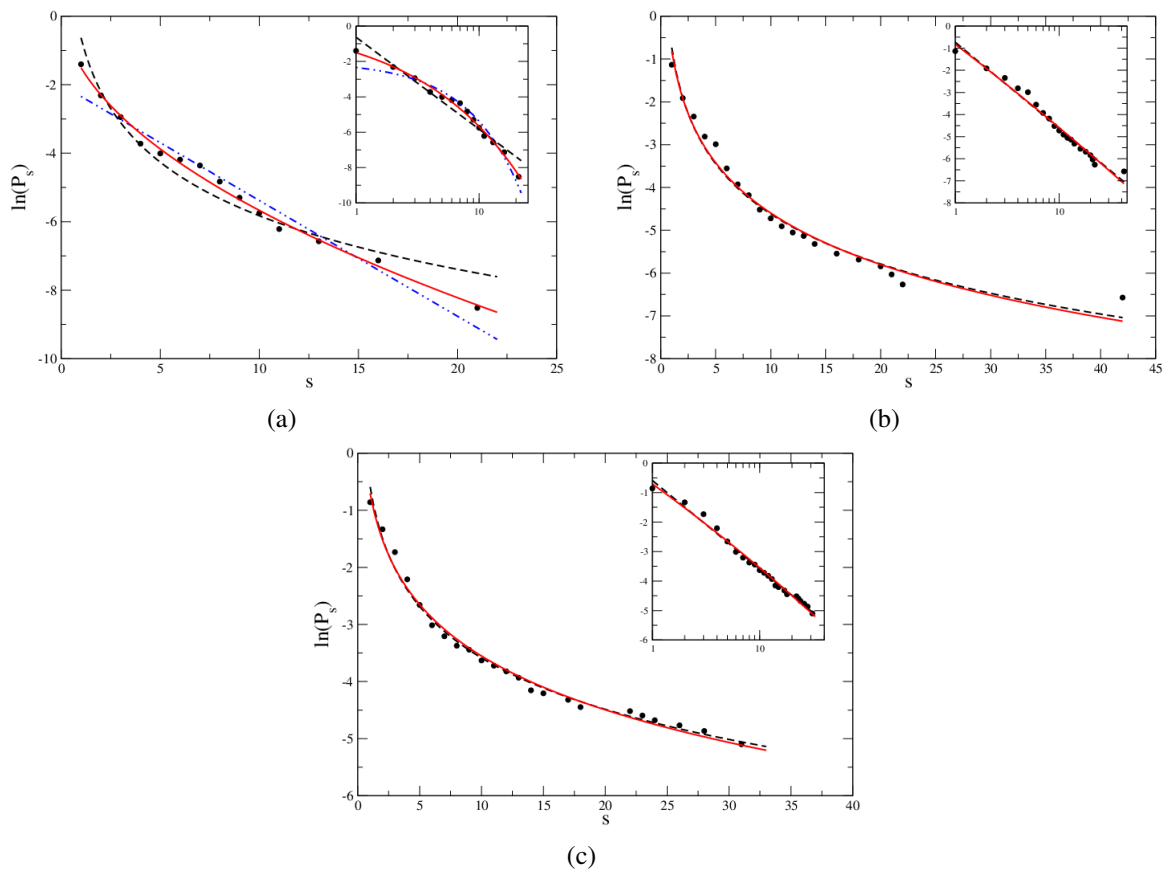


Figura C.4: Funções densidade acumulada complementar para a linhagem MDA-MB-231 após a) 48h; b) 96h; c) 120h de plaqueamento. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

parâmetro	$t = 24h$			$t = 48h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-0.895388	-1.43576	0.306231	-0.630424	-2.00302	0.379861
a_1	-2.98706	-0.722891	-1.98499	-2.25653	-0.337867	-1.88123
a_2	-	-	0.64376	-	-	0.507287
r^2	0.970496	0.989133	0.995495	0.970435	0.977495	0.996232
parâmetro	$t = 72h$			$t = 96h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-1.00024	-2.74712	2.46157	-0.734068	-2.75353	40.5415
a_1	-1.8277	-0.185818	-4.03933	-1.68706	-0.136781	-41.3601
a_2	-	-	0.268291	-	-	0.0379606
r^2	0.988386	0.951876	0.996201	0.988795	0.845656	0.989037
parâmetro	$t = 120h$			$t = 144h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-0.590519	-1.9857	16.9525	0.29167	-1.31706	0.811768
a_1	-1.30067	-0.119463	-17.6592	-1.62562	-0.158197	-1.3924
a_2	-	-	0.0648824	-	-	0.455588
r^2	0.994943	0.904753	0.994851	0.964249	0.966221	0.991928

Tabela C.4: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem MDA-MB-231 em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

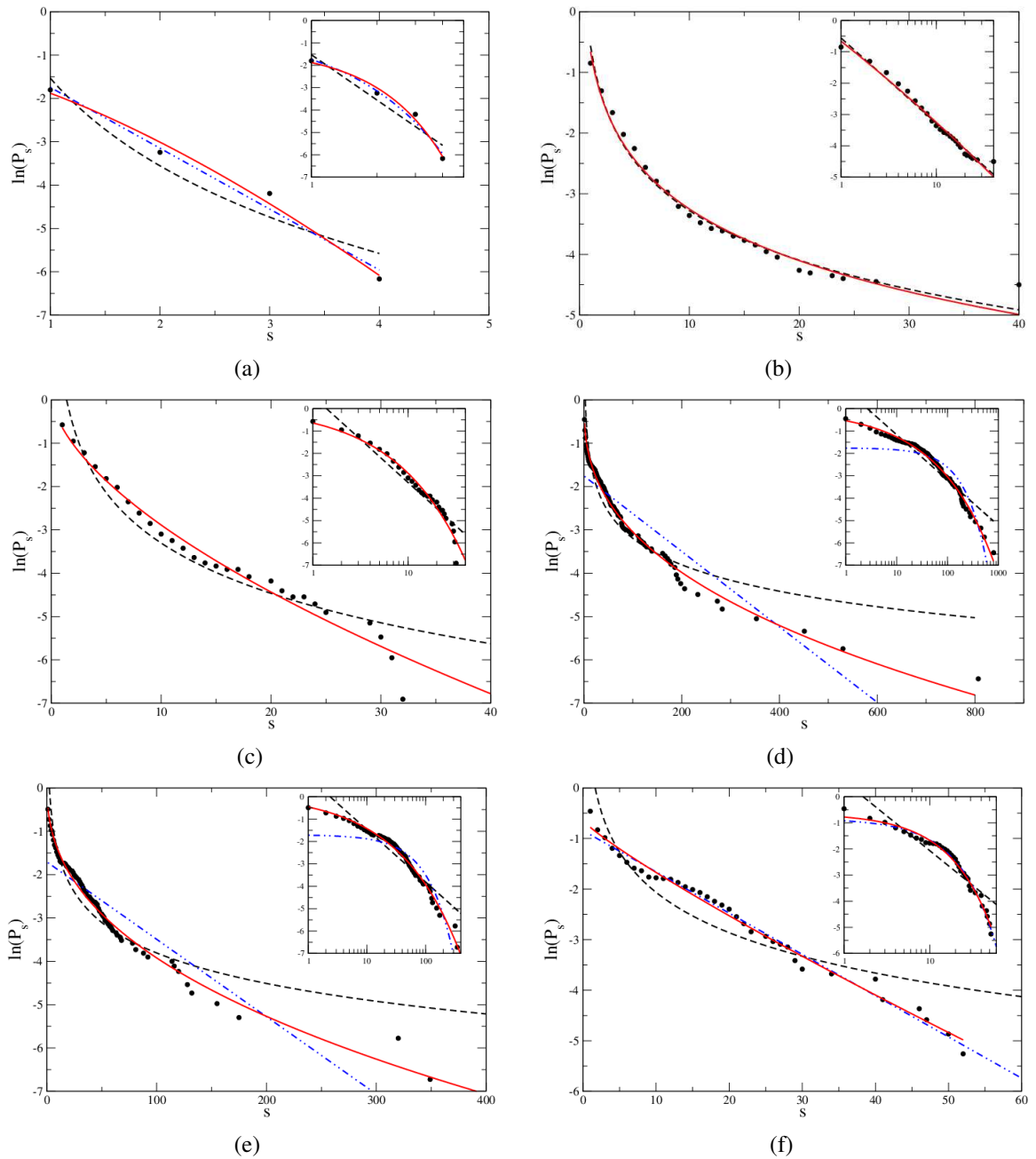


Figura C.5: Funções densidade acumulada complementar para a linhagem HN-5 após a) 28h; b) 52,5h; c) 73,5h; d) 138h; e) 142,5h; f) 166h de plaqueamento. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

parâmetro	$t = 4h$			$t = 28h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-2.79481	-2.51144	37.3222	-1.53299	-0.340998	-1.22526
a_1	-2.59734	-0.894704	-40.1483	-2.9178	-1.40409	-0.654874
a_2	-	-	0.0612179	-	-	1.44572
r^2	0.998308	0.970887	0.998423	0.958705	0.990724	0.993774
parâmetro	$t = 52,5hh$			$t = 73,5h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-0.560555	-1.96633	16.9706	0.553353	-1.10379	0.114215
a_1	-1.18004	-0.0982503	-17.6311	-1.6751	-0.160573	-0.753662
a_2	-	-	0.0595265	-	-	0.600125
r^2	0.990297	0.865804	0.990188	0.952476	0.974073	0.985562
parâmetro	$t = 96h$			$t = 124h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.334198	-1.80388	0.351687	0.627448	-1.01509	-0.768604
a_1	-0.994924	-0.0272718	-1.00066	-1.03555	-0.050161	-0.106576
a_2	-	-	0.342337	-	-	0.833051
r^2	0.944184	0.954182	0.986678	0.917267	0.962184	0.980011
parâmetro	$t = 138h$			$t = 142,5h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.861537	-1.75611	-0.039685	0.868471	-1.70602	0.148883
a_1	-0.880891	-0.00870453	-0.498627	-1.01534	-0.0178598	-0.607968
a_2	-	-	0.390251	-	-	0.412869
r^2	0.937410	0.901356	0.995044	0.933670	0.913249	0.992589
parâmetro	$t = 166h$					
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.588221	-0.842813	-0.639803			
a_1	-1.15178	-0.0816257	-0.138462			
a_2	-	-	0.87208			
r^2	0.910718	0.991947	0.993026			

Tabela C.5: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem HN-5 em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

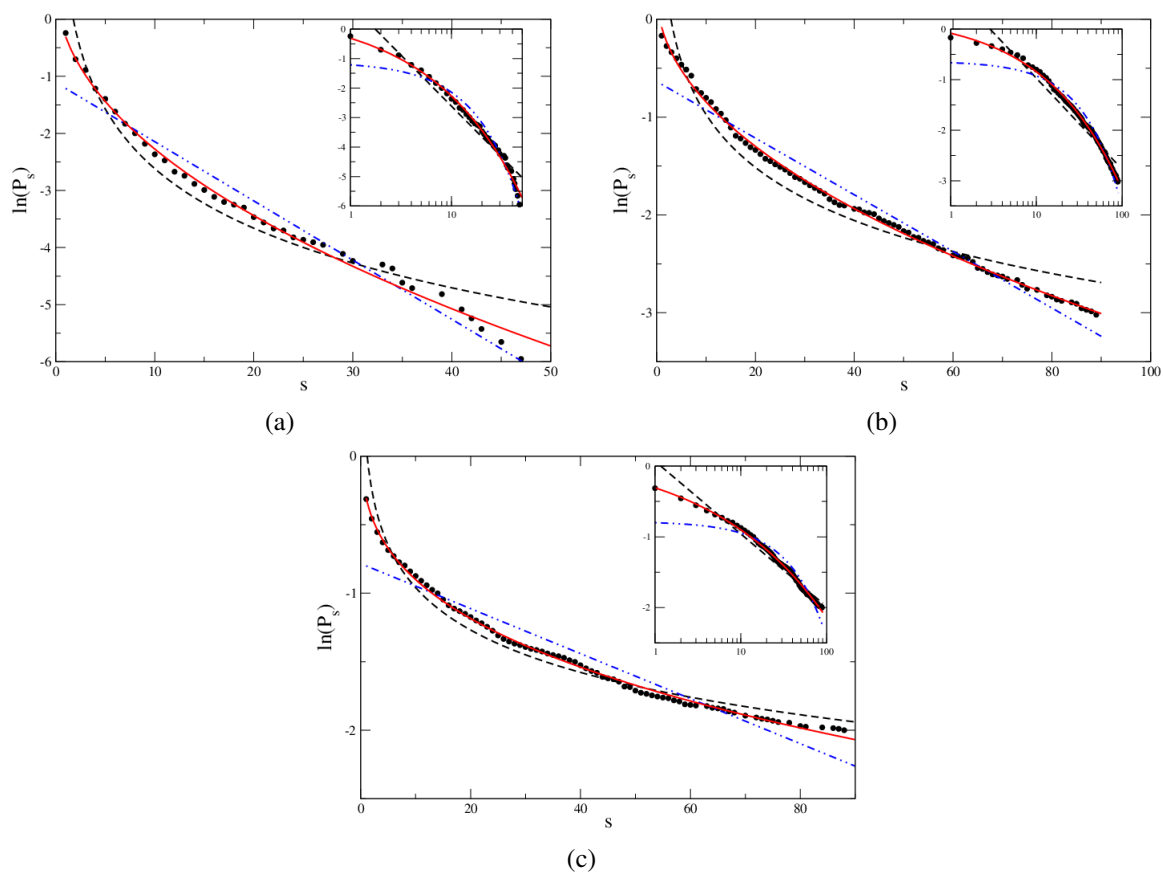


Figura C.6: Funções densidade acumulada complementar para a linhagem MCF-7 após a) 24h; b) 72h; c) 120h de plaqueamento. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

parâmetro	$t = 24h$			$t = 48h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.850609	-1.10838	0.652852	1.38058	-1.03699	0.629293
a_1	-1.50604	-0.103705	-0.960273	-1.37226	-0.0583357	-0.699122
a_2	-	-	0.483987	-	-	0.487725
r^2	0.966636	0.977122	0.996066	0.956580	0.970652	0.996861
parâmetro	$t = 72h$			$t = 96h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.82752	-0.636187	0.292398	0.63982	-0.489436	0.113439
a_1	-0.781895	-0.0289359	-0.372432	-0.604471	-0.0223148	-0.224495
a_2	-	-	0.484871	-	-	0.531483
r^2	0.962827	0.978665	0.999038	0.954677	0.981008	0.998315
parâmetro	$t = 120h$					
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.0683955	-0.783896	0.23470			
a_1	-0.446267	-0.0164278	-0.540826			
a_2	-	-	0.322046			
r^2	0.981262	0.955359	0.998677			

Tabela C.6: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem MCF-7 em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

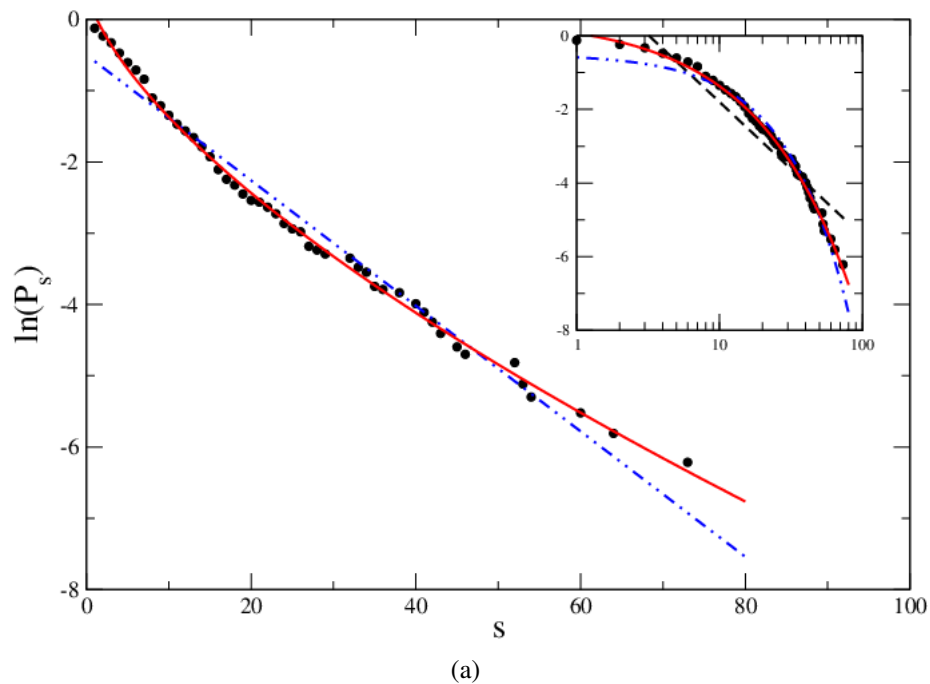


Figura C.7: Função densidade acumulada complementar dos tamanhos dos agregados da linhagem B16F10 após 96h de plaqueamento. As linhas tracejadas pretas são ajustes com distribuições do tipo lei de potência, as tracejadas azuis são ajustes com distribuições do tipo exponencial e as linhas vermelhas contínuas são ajustes com exponenciais esticadas.

parâmetro	$t = 24h$			$t = 48h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	0.172693	0.261092	-0.0796965	1.08459	0.136726	0.77764
a_1	-3.63942	-1.09172	-0.860435	-2.55572	-0.483849	-0.856962
a_2	-	-	1.10026	-	-	0.810563
r^2	0.943649	0.985745	0.986018	0.951771	0.995462	0.997284
parâmetro	$t = 72h$			$t = 96h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	1.76323	-0.572049	1.30668	1.84446	-0.49959	0.479392
a_1	-1.92577	-0.148502	-1.00126	-1.58206	-0.0880154	-0.408251
a_2	-	-	0.545971	-	-	0.656328
r^2	0.942831	0.963372	0.989997	0.936254	0.988138	0.998398
parâmetro	$t = 120h$			$t = 144h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	1.84573	-1.1378	0.573996	1.64043	-1.15763	0.37138
a_1	-1.20564	-0.0235227	-0.508246	-0.941562	-0.0102802	-0.402591
a_2	-	-	0.467862	-	-	0.426703
r^2	0.940355	0.951798	0.998269	0.943934	0.947773	
parâmetro	$t = 168h$					
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	1.15403	-1.29828	0.295382			
a_1	-0.771367	-0.00731617	-0.446422			
a_2	-	-	0.378673			
r^2	0.940435	0.901418	0.990255			

Tabela C.7: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem B16F10 em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

parâmetro	$t = 24h$			$t = 48h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-	-	-	-	-
a_1	-	-	-	-	-	-
a_2	-	-	-	-	-	-
r^2	-	-	-	-	-	-
parâmetro	$t = 72h$			$t = 96h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-2.00471	-0.832995	2.17532	-1.51077	-0.707022	-1.56224
a_1	-3.16457	-1.4744	-4.31424	-2.66639	-1.11894	-0.459235
a_2	-	-	0.510624	-	-	1.47315
r^2	0.993548	0.994074	0.998549	0.944097	0.985704	0.989736
parâmetro	$t = 120h$			$t = 144h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-1.47609	-2.55733	5.57814	-2.05509	-4.19112	158.218
a_1	-2.17179	-0.371922	-7.35856	-1.07612	-0.028437	-160.295
a_2	-	-	0.215077	-	-	0.00656427
r^2	0.987437	0.942421	0.991530	0.985886	0.840602	0.985749
parâmetro	$t = 168h$			$t = 192h$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-1.81059	-4.16124	539.935	-2.35864	-3.71392	2719.47
a_1	-1.03271	-0.020456	-541.754	-0.868611	-0.0274411	-2721.83
a_2	-	-	0.00189055	-	-	0.000315958
r^2	0.988728	0.798584	0.988616	0.953137	0.792641	0.953094
parâmetro	$t = 172h$					

Tabela C.8: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ da linhagem NIH-3T3 em diferentes instantes de tempo. L.P. = Lei de potência ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \ln(x)$), EXP = exponencial simples ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x$), EXP.STR. = exponencial esticada ($\ln(p_x) = a_0 + a_1 \cdot x^{a_2}$).

parâmetro	$t = 5\text{MCS}$			$t = 11\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-0.637422	2.4694	-	-0.125579	0.0732944
a_1	-	-1.79327	-4.58967	-	-1.23505	-1.38456
a_2	-	-	0.587862	-	-	0.950717
r^2	-	0.987559	0.999860	-	0.999727	0.999803
parâmetro	$t = 21\text{MCS}$			$t = 55\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-0.399007	1.08543	-	0.11895	-0.120476
a_1	-	-0.808895	-1.83576	-	-0.319504	-0.237349
a_2	-	-	0.710649	-	-	1.08612
r^2	-	0.993129	0.996993	-	0.999078	0.999412
parâmetro	$t = 175\text{MCS}$			$t = 268\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	0.349158	-0.0920891	-	-	0.970192
a_1	-	-0.0368754	-0.0118523	-	-	-0.000257364
a_2	-	-	1.20915	-	-	1.6184
r^2	-	0.995511	0.998461	-	-	0.998596
parâmetro	$t = 356\text{MCS}$			$t = 410\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-	-2.01767	-	-	-2.58174
a_1	-	-	-3.31042e-05	-	-	-6.03743e-05
a_2	-	-	1.72892	-	-	1.54409
r^2	-	-	0.998718	-	-	0.998631
parâmetro	$t = 472\text{MCS}$			$t = 543\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-	-3.30593	-	-	-3.98661
a_1	-	-	-3.81874e-05	-	-	-5.6057e-05
a_2	-	-	1.51103	-	-	1.3705
r^2	-	-	0.995476	-	-	0.987559

Tabela C.9: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ obtidos na simulação do modelo adotando $p_{trans} = 0,00025$.

parâmetro	$t = 11\text{MCS}$			$t = 34\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	0.0744352	-0.735208	-	-0.940313	-0.0160492
a_1	-	-1.57809	-0.931799	-	-0.647373	-1.24653
a_2	-	-	1.2728	-	-	0.771772
r^2	-	0.997633	0.999240	-	0.995800	0.998105
parâmetro	$t = 114\text{MCS}$			$t = 132\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-2.95512	-1.33303	-	-3.33609	-2.5643
a_1	-	-0.179024	-1.01837	-	-0.146	-0.395565
a_2	-	-	0.553226	-	-	0.760778
r^2	-	0.986992	0.984338	-	0.987112	0.987440
parâmetro	$t = 202\text{MCS}$			$t = 268\text{MCS}$		
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-4.64177	-2.05265	-	-5.63737	0.304103
a_1	-	-0.0637366	-0.914826	-	-0.0151385	-2.60198
a_2	-	-	0.487938	-	-	0.241451
r^2	-	0.973663	0.993853	-	0.936808	0.993628
parâmetro	$t = 356\text{MCS}$					
	L.P.	EXP	EXP.STR.	L.P.	EXP	EXP.STR.
a_0	-	-6.14925	-1.79337			
a_1	-	-0.000784797	-1.8425			
a_2	-	-	0.158122			
r^2	-	0.940872	0.952589			

Tabela C.10: Valores dos parâmetros de ajustes das distribuições $P_s \times s$ obtidos na simulação do modelo adotando $p_{trans} = 0,05$.

Referências Bibliográficas

- [1] VILELA, M. et al. Proteomic and fractal analysis of a phenotypic transition in the growth of human breast cells in culture. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, v. 2007, n. P12006, p. 1–18, 2007.
- [2] UPADHYAYA, A. et al. Anomalous diffusion and non gaussian velocity distribution of *Hydra* cells in cellular aggregates. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, v. 293, n. 3, p. 549–558, 2001.
- [3] DUNN, G.; BROWN, A. A unified approach to analysing cell motility. *Journal of Cell Science*, v. 81, n. Suppl. 8, p. 81–102, 1987.
- [4] MOMBACH, J.; GLAZIER, J. Single cell motion in aggregates of embryonic cells. *Physical Review Letters*, v. 76, n. 16, p. 3032–3035, 1987.
- [5] RIEU, J. P. et al. Diffusion and deformations of single hydra cells in cellular aggregates. *Biophysical Journal*, v. 79, p. 1903–1914, 2000.
- [6] LI, L.; COX, E.; FLYVBERG, H. Dicty dynamics: *Dictyostelium* motility as persistent random motion. *Physical Biology*, v. 8, n. 046006, p. 1–12, 2011.
- [7] LI, L.; NØRRELYKKE, S.; COX, E. Persistent cell motion in the absence of external signals: a search strategy for eukaryotic cells. *Plos ONE*, v. 3, n. e2093, p. 1–11, 2008.
- [8] SELMECZI, D. et al. Cell motility as persistent random motion: Theories from experiments. *Biophysical Journal*, v. 89, p. 912–931, 2005.
- [9] BARTUMEUS, F. et al. Animal search strategies: A quantitative random-walk analysis. *Ecology*, v. 86, p. 3078–3087, 2005.
- [10] HARRIS, T. et al. Generalized lévy walks and the role of chemokines in migration of effector cd8+ t cells. *Nature*, v. 486, p. 545–548, 2012.
- [11] MENDES, R. et al. Cluster size distribution of cell aggregates in culture. *Physica A: Statistical and its Applications*, v. 298, p. 471–487, 2001.
- [12] MEAKIN, P. Formation of fractal clusters and networks by irreversible diffusion-limited aggregation. *Physical Review Letters*, v. 51, n. 13, p. 1119–1122, 1983.
- [13] KOLB, M.; BOTET, R.; JULLIEN, R. Scaling of kinetically growing clusters. *Physical Review Letters*, v. 51, n. 13, p. 1123–1126, 1983.
- [14] KOLB, M.; HERRMANN, H. Surface fractals in irreversible aggregation. *Physical Review Letters*, v. 59, n. 4, p. 454–457, 1987.

- [15] ALVES, S.; MARTINS, M. Cluster-cluster aggregation with particle replication and chemotaxy: a simple model for the growth of animal cells in culture. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, v. 2010, n. P09012, p. 1–14, 2010.
- [16] BRAY, D. *Cell movements: from molecules to motility*. [S.l.]: NY: Garland Publishing, 2001.
- [17] POTDAR, A. et al. Human mammary epithelial cells exhibit a bimodal correlated random walk pattern. *Plos ONE*, v. 5, n. e9636, p. 1–10, 2010.
- [18] FRIEDL, P. et al. Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, v. 14, n. 8, p. 777–783, 2012.
- [19] BLEITTERSWIJK, C. V. *Tissue engineering*. [S.l.]: London: Academic Press, 2008.
- [20] SELMECZI, D. et al. Cell motility as random motion: A review. *The European Physical Journal Special Topics*, v. 157, p. 1–15, 2008.
- [21] VISWANATHAN, G. et al. *The Physics of Foraging*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2011.
- [22] PARSONS, J.; HORWITZ, A.; SCHWARTZ, M. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Review Molecular Cell Biology*, v. 11, p. 633–643, 2010.
- [23] MUROOKA, T. T. et al. Hiv-infected t cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature*, v. 490, p. 283–287, 2012.
- [24] KRAPIVSKY, P. V.; REDNER, S.; BEN-NAIM, E. *A kinetic view of statistical physics*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2010.
- [25] TSALLIS, C. *Introduction to Non Extensive Statistical Mechanics*. [S.l.]: Springer, 2009.
- [26] TSALLIS, C.; BEMSKI, G.; MENDES, R. S. Is re-association in folded proteins a case of nonextensivity? *Physics Letters A*, v. 251, p. 93–98, 1999.
- [27] SILVA, P. C. A. da et al. Normal and tumoral melanocytes exhibit q-gaussian random search patterns. *PLoS ONE*, v. 9, n. e104253, p. 1–13, 2014.
- [28] WEIJER, C. J. Dictyostelium morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 14, n. 4, p. 392–398, 2004.
- [29] SCHIMID-SCHONBEM, H.; VOLGER, E. Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes. *Diabetes*, v. 25, p. 897–902, 1976.
- [30] KANNAN, M.; SAXENA, R. Glanzmann's thrombasthenia: an overview. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, v. 15, p. 152–165, 2009.
- [31] GLINSKY, V. V. et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Research*, v. 63, p. 3805–3811, 2003.
- [32] BLITTERSWIJK, C. V. et al. *Tissue engineering*. [S.l.]: London: Academic Press, 2008.

- [33] UPDYKE, T. V.; L., N. G. Malignant melanoma cell lines selected in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potencial. *Clinical and Experimental Metastasis*, v. 4, p. 273–284, 1986.
- [34] MEAKIN, P. *Fractals, scaling and growth far from equilibrium*. [S.l.]: Cambridge University Press, 1998.
- [35] JR, R. M. E. et al. Dynamics of spheroid self-assembly in liquid-overlay culture of du 145 human prostate cancer cells. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 72, p. 579–591, 2001.
- [36] JR, R. M. E. et al. Aggregation kinetics of well and poor differentiated human prostate cancer cells. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 80, p. 580–588, 2001.
- [37] HARADA, T.; ISOMURA, A.; YOSHIKAWA, K. Contraction-induced cluster formation in cardiac cell culture. *Physics D*, v. 237, p. 2787, 2008.
- [38] KIM, S. H. J. et al. A computational approach to understand *in vitro* alveolar morphogenesis. *PLoS ONE*, v. 4, n. e4819, p. 1–17, 2009.
- [39] VILELA, M. et al. Determinação de padrões de crescimentos de células em cultura. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, p. 67–72, 2002.
- [40] JULLIEN, R.; KOLB, M. Hierarchical model for chemically limited cluster-cluster aggregation. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, v. 17, p. L639–L643, 1984.
- [41] FRANCA, A. A. P. D. *Análise da expressão de desmogleína e desmoplaquina nas linhagens de células epiteliais MDCK e MCF-7 antes e após uma transição fenotípica de crescimento*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- [42] DISTRIBUIÇÃO Weibull. http://en.wikipedia.org/wiki/Weibull/_distribution.
- [43] JO, J.; FORTIN, J.-Y.; CHOI, M. Y. Weibull-type limiting distribution for replicative systems. *Physical Review E*, v. 83, p. 031123, 2011.
- [44] GORDIENKO, Y. G. Generalized model of migration-driven aggregate growth - asymptotic distributions, power laws and apparent fractality. *International Journal of Modern Physics B*, v. 26, n. 1, p. 1250010, 2012.
- [45] GUNTHER, S. et al. Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells. *Cancer Letters*, v. 250, p. 25–35, 2007.
- [46] KHAIN, E. et al. Pattern formation of glioma cells: Effects of adhesion. *European Physics Journal*, v. 8, n. 28006, p. 28006p1–28006p6, 2009.
- [47] ZHANG, H. P. et al. Collective motion and density fluctuations in bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 31, p. 13626–13630, 2010.
- [48] PERUANI, F. et al. Collective motion and nonequilibrium cluster formation in colonies of gliding bacteria. *Physical Review Letters*, v. 108, n. 098102, p. 098102(1)–098102(5), 2012.
- [49] KIRCHNER, J. W. Aliasing in $1/f^\alpha$ noise spectra: Origins, consequences, and remedies. *Physical Review E*, v. 71, n. 066110, p. 066110(1)–066110(16), 2005.