

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Física

Um Modelo Estocástico para a Migração de Células Individuais

Ismael Fortuna

Tese de Doutorado

Porto Alegre
novembro de 2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Física

Um Modelo Estocástico para a Migração de Células Individuais

Ismael Fortuna

Tese realizada sob a orientação da Professora Doutora Rita Maria Cunha de Almeida apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Física.

Porto Alegre
novembro de 2020

Agradecimentos

Dedico os agradecimentos por esta tese, primeiramente, a Deus e à magnífica natureza que nos encanta e nos fascina com sua beleza e complexidade. Ser cientista é uma grande oportunidade de estar próximo da mente criativa do universo.

Faço grandes reverências aos mestres que me conduziram e me acompanharam nesta jornada de conhecimento e transformação, à Dra. Rita Maria Cunha de Almeida e ao Dr. Gilberto Lima Thomas, pelos anos de convívio e orientações valiosas que transcenderam os limites da vida acadêmica e me tornaram o cientista e a pessoa que tenho orgulho de ser hoje.

Agradeço ao Instituto de Física da UFRGS que, por muitos anos, foi a minha casa, me acolheu ainda jovem e inexperiente e me promoveu todas as fontes de conhecimento que foram produzidas pelas maiores mentes da história da humanidade. Muitos mestres fizeram parte desta jornada, desde a graduação, passando pelo mestrado e, agora, na conclusão do doutorado, a todos devo eterna gratidão. Ao CNPq e ao governo brasileiro que garantiram financeiramente a minha permanência nestes ambientes, assim como missões acadêmicas, congressos e diversos eventos científicos nacionais e internacionais.

Devo um agradecimento especial aos meus pais Rovílio Fortuna e Milda Formehl que, além de serem grandes exemplos de trabalho duro, respeito e dignidade, sempre estiveram ao meu lado, me apoiaram nos momentos difíceis e vibraram comigo nas conquistas, amo muito vocês. Também à minha irmã Patrícia Fortuna e ao meu irmão Fábio Fortuna por completarem esta família que tenho muito orgulho de fazer parte.

Minhas filhas Júlia Prokopp Fortuna e Sophia Lopes Fortuna são parte muito importante deste trabalho que, em muitos aspectos, se mistura com a minha vida, me ensinaram o que mestres não têm como ensinar: amor incondicional, carinho e muita alegria.

Encerro esta seção de agradecimentos dedicando a conclusão desta tese à minha amada esposa Larissa da Silva Lopes, que completa a minha vida. Nossos propósitos se unem e nosso futuro é cheio de alegrias, conquistas e sucesso. Você é uma pessoa especial e que eu admiro muito. Eu te amo, obrigado por estar ao meu lado sempre.

Resumo

O estudo de processos biológicos que produzem a dinâmica de sistemas vivos utilizando ferramentas matemáticas e computacionais é uma área de grande interesse da ciência moderna, e a mobilidade celular é um de seus temas principais, pois está presente em diversos processos de tecidos saudáveis e de doenças, como no desenvolvimento do câncer. A partir de dados experimentais de diversos laboratórios com diferentes tipos de células aplicando técnicas de análise estatística, foi proposta uma modificação na teoria canônica para ajustar o comportamento das células para escalas de tempo pequenas. Também foi desenvolvido um modelo computacional em ambiente virtual CompuCell3D para a simulação de migração de células eucariontes sobre substrato plano, utilizando método de Monte Carlo. Diferente de outros modelos apresentados na literatura, este modelo é tridimensional e simula o comportamento de uma célula composta pelas organelas intracelulares que estão envolvidas na biomecânica do movimento celular. As simulações reproduzem, espontaneamente, o processo de quebra de simetria que permite que a célula comece a migrar de forma persistente. Ainda assim, as simulações apresentaram baixo custo computacional, gerando a perspectiva de implementação para o estudo do movimento coletivo de células ou de engenharia de tecidos. São apresentados todos os passos necessários para a implementação de simulações de mobilidade celular em ambiente CompuCell3D. Os resultados da tese indicam um protocolo para a medida de mobilidade celular que possibilita a comparação entre os resultados de diferentes experimentos ou simulações apenas por um parâmetro adimensional. Este protocolo evita erros como na determinação da velocidade média das células. Os resultados das simulações indicam a existência de uma correlação entre a polarização da célula e o seu deslocamento futuro, no entanto, esta correlação ainda não está totalmente caracterizada.

Palavras-Chaves: Mobilidade Celular; Simulações Computacionais; Biologia Sistêmica; Sistemas Dinâmicos; Método de Monte Carlo.

Abstract

The study of biological processes that produce the dynamics of living systems using mathematical and computational tools is an area of great interest in modern science, and cell mobility is one of its main themes, as it is present in several healthy tissue processes and diseases, as in the development of cancer. Based on experimental data from different laboratories with different types of cells applying statistical analysis techniques, a modification in the canonical theory has been proposed to adjust the behavior of cells for small time scales. A computational model in a virtual environment CompuCell3D was also developed to simulate the migration of eukaryotic cells on a flat substrate, using the Monte Carlo method. Unlike other models presented in the literature, this model is three-dimensional and simulates the behavior of a cell composed of intracellular organelles that are involved in the biomechanics of cell movement. The simulations spontaneously reproduce the symmetry breaking process that allows the cell to start migrating persistently. Even so, the simulations showed low computational cost, generating the prospect of implementation for the study of the collective movement of cells or tissue engineering. All the necessary steps for the implementation of cell mobility simulations in a CompuCell3D environment are presented. The results of the thesis indicate a protocol for the measurement of cellular mobility that makes it possible to compare the results of different experiments or simulations using only one dimensionless parameter. This protocol avoids errors as in the determination of the average speed of the cells. The results of the simulations still indicate the existence of a correlation between the polarization of the cell and its future displacement; however, this correlation is not yet fully characterized.

Keywords: Cell Mobility; Computational Simulations; Systemic Biology; Dynamic Systems; Monte Carlo Method.

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Três tipos de filamentos que compõem o citoesqueleto.	17
Figura 2.2 – Processo cíclico de polimerização de actina promotora de protrusões.	19
Figura 2.3 – Formação de filopódios e polimerização direcional dos filamentos de actina...	20
Figura 2.4 – Estrutura do citoesqueleto de uma célula migrando.	21
Figura 2.5 – Foco de adesão entre filamentos de actina e o substrato.....	22
Figura 2.6 – Ligações entre proteínas transmembrânicas de adesão celular.	23
Figura 2.7 – Morfologias observadas em células migratórias, individuais e coletivas.	25
Figura 2.8 – Diferentes regimes de migração celular observados clinicamente.	25
Figura 2.9 – Morfologia e citoesqueleto de queratócitos de peixes em cultura.....	27
Figura 2.10 – Morfologia e citoesqueleto de um fibroblasto em cultura.....	28
Figura 2.11 – Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT), morfologia e características.	29
Figura 2.12 – Etapas do processo de rastejamento celular.	30
Figura 3.1 – A equação de Fürth não descreve os dados experimentais como esperado.	37
Figura 3.2 – Efeito da modificação na equação original de Fürth.	40
Figura 3.3 – Família de curvas da equação de Fürth modificada obtidas pelo parâmetro S . .	42
Figura 3.4 – Curvas MSD para diferentes células, tratamentos e laboratórios.	44
Figura 3.5 – MSD e velocidade média para experimentos de Metzner <i>et al.</i>	46
Figura 3.6 – Efeitos do intervalo de tempo nas medidas de autocorrelação de velocidade. .	46
Figura 3.7 – Trajetórias dos experimentos de migração celular em diferentes substratos. ...	48
Figura 3.8 – Efeitos do intervalo de tempo nas medidas de velocidade.	49
Figura 3.9 – Efeitos do intervalo de tempo assumindo erro de localização.....	50
Figura 3.10 – Efeitos do intervalo de tempo assumindo correção difusiva rápida.	50
Figura 4.1 – Segregação celular testada pela hipótese de velocidades diferenciadas.....	54
Figura 4.2 – Programa CompuCell3D® em uma simulação com dois tipos de células.	55
Figura 4.3 – Imagem de uma simulação de CompuCell3D® com células pixelizadas.....	58
Figura 4.4 – Esquema dos três regimes temporais do deslocamento celular.	60
Figura 4.5 – Esquema ilustrando o rastejamento de uma célula simulada.....	64
Figura 4.6 – Início da simulação de uma célula simulada em ambiente CC3D.....	67
Figura 4.7 – Gráficos de deslocamento médio para diferentes parâmetros de simulações...	68

Figura 4.8 – Trajetórias obtidas por simulações para diferentes valores de ϕ_l e $\lambda_{F-actina}$..	69
Figura 4.9 – MSD obtido pelas simulações para diferentes valores de ϕ_l e $\lambda_{F-actina}$	70
Figura 4.10 – Velocidade média $\langle \vec{u}(\tau, \delta) \rangle$ e da autocorrelação $\psi_\delta(\Delta\tau)$ nas simulações....	71
Figura 4.11 – Correlação entre S e D obtidos para simulações com diferentes parâmetros..	74
Figura 4.12 – Deslocamento da célula como uma função da Polarização celular.	75
Figura 5.1 – Posições dos centros de massas de célula não-polarizadas e polarizadas.....	78

Sumário

1	<i>Introdução</i>	9
1.1	Motivação	10
1.2	Como Utilizamos Matemática	12
1.3	Motivação para a Realização de Simulações Computacionais	14
2	<i>A Biomecânica do Movimento Celular</i>	16
2.1	Motrizes do Movimento Celular: O Citoesqueleto	16
2.2	Regimes de Mobilidade Celular	24
2.3	Rastejamento sobre Substrato Plano	29
2.4	Experimentos de Migração e Invasão Celular	31
3	<i>Modelos Matemáticos para Migração Celular</i>	33
3.1	O Modelo de Langevin	34
3.2	O que os Experimentos Mostram	37
3.3	Proposta para uma Modificação na Equação de Fürth	39
3.4	Protocolo para Ajuste dos Dados de Migração Celular	43
3.5	Por que a Hipótese de Erro de Localização não Funciona?	48
3.6	Discussões sobre a Equação de Fürth Modificada	51
4	<i>Modelos para Simulações de Migração Celular</i>	53
4.1	Modelos para Simulação de Mobilidade Celular	53
4.2	Construindo um Modelo de Migração Celular em Ambiente CC3D	58
4.3	Resultados das Simulações de Migração Celular	67
4.4	Discussões sobre os Resultados das Simulações	73
5	<i>Conclusões e Perspectivas</i>	77
5.1	Perspectivas	78
6	<i>Referências Bibliográficas</i>	80
	ANEXO 1	88
	ANEXO 2	94

1 Introdução

Caro leitor, espero que aprecie a leitura desta tese que discorre sobre um tema que estudamos com muito carinho pela sua beleza, complexidade e importância. O problema da mobilidade celular envolve a compreensão de complexos maquinários biomoleculares que compõem o ambiente intracelular e como a sua dinâmica emerge em comportamentos que variam desde movimentos difusivos irregulares até movimentos direcionais coordenados com alta previsibilidade, dependendo do tipo de célula e das condições experimentais.

Iniciamos a tese apresentando as ferramentas que utilizamos para a realização deste estudo respondendo as seguintes perguntas: 1) Por que estudar migração celular? 2) Por que é importante usar matemática? e 3) Por que é importante usar simulações computacionais para estudar mobilidade celular?

Em seguida apresentamos brevemente a natureza do problema que estamos estudando, tratando sobre a biomecânica do movimento celular, seus componentes e suas dinâmicas e como tudo funciona perfeitamente de forma complexa, porém organizada, possibilitando a formação de padrões específicos em meio à muitos processos estocásticos.

Reservamos o capítulo 3 para apresentar os fundamentos dos modelos matemáticos e estatísticos utilizados há várias décadas para a análise dos movimentos de células individuais rastejando sobre um substrato plano e apontamos uma falha importante desta teoria para descrever o movimento das células quando analisamos escalas de tempo pequenas. Apresentamos, então, uma modificação empírica à teoria para descrever o comportamento observado nos experimentos, mostramos como ela se ajusta aos dados experimentais e discorreremos sobre a sua importância nos estudos sobre mobilidade celular. Estes resultados levaram à publicação do artigo *Parameterizing cell movement when the instantaneous cell migration velocity is ill-defined* [1].

O foco de todo este trabalho está na construção de um modelo computacional para a simulação do comportamento migratório de células em um ambiente virtual controlável que possibilitasse, além de estudar o comportamento do sistema em si, servir base para modelos de simulação de migração coletiva, modelos de doenças e, também, de engenharia de tecidos.

Utilizamos o software CompuCell3D® para reproduzir o modelo de uma célula migratória, no qual exploramos várias combinações de parâmetros e reproduzimos os comportamentos observados nos experimentos com células biológicas. O modelo e os resultados foram publicados no artigo *CompuCell3D Simulations Reproduce Mesenchymal Cell Migration on Flat Substrates* [2].

Concluindo o texto, o leitor vai encontrar as considerações finais e perspectivas desta linha de investigação científica, como por exemplo, possíveis relações entre a polarização da célula e a migração celular, a partir da hipótese de que a geometria da célula carrega informações sobre a direção e a intensidade do deslocamento que a célula ainda vai realizar.

Para encerrar, no Anexo 1 apresentamos o passo-a-passo para implementar sua própria simulação de mobilidade celular em ambiente CompuCell3D® e utilizamos o Anexo 2 para apresentar figuras e tabelas adicionais com dados obtidos das simulações que complementam os resultados apresentados no capítulo 4.

Boa leitura!

1.1 Motivação

O desejo de compreender a natureza e a vida acompanha a humanidade desde que tomamos consciência da nossa existência e dos mecanismos que regem a nossa interação com o mundo no qual vivemos. A nossa curiosidade nos trouxe conhecimentos e desenvolveu tecnologias que mudaram a forma como vivemos de forma definitiva. E ainda carregamos o sentimento de que estamos apenas começando a compreender a Natureza e os seus mistérios.

Este trabalho é fruto deste desejo de compreender o nosso mundo, a nossa essência e, principalmente, os mecanismos que fundamentam a vida como a conhecemos. A vida é ação e interação, todo ser vivo tem mecanismos de movimentação, alguns mais sofisticados que outros, no entanto, mesmo o mecanismo mais primário ainda é bastante complexo.

Muitos cientistas dedicam seus esforços estudando o movimento coletivo de animais, como bandos de pássaros, cardumes de peixes, manadas, etc. Aqui não olharemos para o ser vivo como um todo, vamos mais a fundo e olhamos para o elemento mais fundamental que compõe um ser vivo e, conseqüentemente, o seu movimento: a célula.

Antes de compreender como o movimento de um tecido muscular acontece, percebemos que existem mecanismos ainda mais fundamentais dentro de cada célula. Estes mecanismos têm consequências importantes em diversos estágios da formação e manutenção da vida e ainda carecem de entendimentos e explicações mais precisas sobre o seu funcionamento.

O fato de células serem capazes de se mover não é tão interessante quanto o fato de estes movimentos serem resultado de mecanismos moleculares altamente complexos capazes de produzir padrões ordenados e deslocamentos direcionais (migração), mesmo em uma escala microscópica na qual flutuações termodinâmicas podem ser muito significativas.

Para estudar o movimento das células precisamos compreender como elas funcionam biomecanicamente e como diferentes padrões de migração surgem a partir de combinações moleculares bastante complexas.

Sabemos que a história da citologia inicia com os primórdios dos microscópios, ainda no século XVI, uma vez que o olho humano é incapaz de distinguir objetos menores de 0,2 mm. No ano de 1665 o físico e biólogo inglês Robert Hooke começou a observar e desenhar todo este mundo novo que estava explorando, foi o primeiro a observar uma célula.

Durante muitos anos a citologia se desenvolveu estudando e compreendendo diversos aspectos da composição e da dinâmica bioquímica que acontece dentro da célula. Mas foi somente no início do século XX que surgiram os primeiros estudos de migração celular, quando se desenvolveram as capacidades técnicas necessárias para cultivar células *in vitro* por tempo suficiente para observar os movimentos que a célula realiza.

Nesta época os cientistas ainda estavam começando a entender o movimento Browniano observado quando partículas de pólen são depositadas sobre uma gota de água.

Baseado em suas próprias descobertas experimentais, Fürth introduziu a noção de caminhada aleatória persistente na descrição do movimento de agentes biológicos em 1920 [3]. Fürth chegou independentemente ao mesmo resultado que Ornstein [4], que considerou o movimento inercial Browniano em equilíbrio térmico [5].

Ao longo do último século muitos trabalhos foram publicados explorando diferentes aspectos de células migratórias, por descrições estatísticas ou, apenas, análises de trajetória e velocidade. Porém, até hoje a equação estatística introduzida por Fürth é utilizada para

descrever o deslocamento quadrático médio das células e é a principal ferramenta matemática para analisar o movimento das células [3].

Hoje sabemos que a migração celular é um processo biológico importante em diversos contextos, como no desenvolvimento embrionário, na cura e cicatrização de ferimentos e no processo metastático do câncer [6, 7, 8, 9]. Diferentes condições ou tipos celulares produzem diferentes padrões de migração e analisar estes padrões é importante quando comparamos os efeitos genéticos ou as mudanças ambientais agindo sobre a célula [10, 11, 12, 13, 14].

Experimentos em mobilidade celular, tanto em $2D$ quanto em $3D$, são baseados em sequências de imagens que registram a mudança na posição do centro de massa de uma célula ou as posições do núcleo celular. No entanto, os estudos publicados nesta área não apresentam um protocolo de medida que seja bem definido e reproduzível.

Para medidas robustas da mobilidade de células migratórias é importante que estes experimentos sejam realizados e analisados a partir de um protocolo bem definido, com parâmetros controláveis, e que possibilitem a comparação entre os resultados obtidos por diferentes laboratórios em experimentos com diferentes tipos de células e condições experimentais.

O processo de migração celular pode acontecer de forma individual (uma única célula) ou coletiva (várias células migrando em conjunto) e os padrões migratórios mudam muito de um sistema para o outro. Tanto as descrições qualitativas quanto quantitativas precisam ser adaptadas para estes dois sistemas. Aqui neste trabalho iniciamos pelo estudo de células individuais e deixaremos o movimento coletivo de células para estudos futuros.

Neste trabalho, buscamos compreender a cinética do movimento celular. Para isso, utilizamos matemática para analisar os dados de diversos experimentos de diferentes laboratórios e desenvolvemos simulações em ambiente virtual tridimensional.

1.2 Como Utilizamos Matemática

Quando estudamos o processo de migração celular, além de uma descrição qualitativa, buscamos por medidas quantitativas que expressem de forma objetiva e precisa como é a natureza deste processo biomecânico. Para isto, precisamos determinar grandezas

físicas mensuráveis e que possam ser comparadas com um padrão suficientemente robusto, com parâmetros controláveis em um protocolo bem definido e reproduzível.

Para analisar o movimento de uma partícula ou objeto geralmente utilizamos o conceito de velocidade média $\vec{v}_{méd}$, que é apenas a razão entre o deslocamento $\Delta\vec{r}$ e o intervalo de tempo Δt , entre as medidas das posições inicial e final deste objeto em questão. Porém o movimento das células é bem mais complexo, pois envolve variações bruscas na velocidade graças às muitas flutuações internas que ocorrem dentro da célula.

A própria forma da célula se altera constantemente graças a estes processos biomecânicos intracelulares, o que impossibilita que utilizemos as ferramentas matemáticas típicas para analisar o seu movimento. Isso significa que simplesmente comparar as velocidades médias de diferentes culturas de células em diferentes condições experimentais pode levar a interpretações equivocadas sobre o comportamento migratório destas células.

Para estudar sistemas físicos sujeitos a grandes flutuações nas suas posições, como fazemos com o movimento Browniano, por exemplo, analisamos a curva do Deslocamento Quadrático Médio (do inglês, *Mean Square Displacement*, ou apenas *MSD*). Esta grandeza física é definida como uma medida da variação na posição em relação a um referencial ao longo do tempo, matematicamente definida como:

$$MSD(\Delta t) \equiv \langle |\Delta\vec{r}|^2 \rangle = \left\langle \frac{1}{N} \sum_{t=0}^{T-\Delta t} |\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)|^2 \right\rangle, \quad (1.1)$$

onde Δt é o tempo decorrido entre duas medidas da posição da célula $\vec{r}(t)$ e $\vec{r}(t + \Delta t)$, o deslocamento é definido por $\Delta\vec{r} = \vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)$, T é o número total de medidas no experimento e $\langle \cdot \rangle$ representa a média sobre diferentes trajetórias.

Juntamente com a curva da *MSD*, outra medida matemática para analisar o movimento de uma célula é a função auto-correlação de velocidade (*VACF*, do inglês *Velocity AutoCorrelation Function*):

$$VACF \equiv \langle \vec{v}(t) \cdot \vec{v}(t + \Delta t) \rangle = \left\langle \frac{1}{T - \Delta t} \int_0^{T-\Delta t} dt \vec{v}(t + \Delta t) \cdot \vec{v}(t) \right\rangle \quad (1.2)$$

onde $\langle \cdot \rangle$ representa médias sobre experimentos ou réplicas de simulação. Para uma caminhada aleatória persistente clássica no estado estacionário, *VACF* é uma medida útil que

pode ser obtida tomando a segunda derivada da curva *MSD* e nos dá uma medida de quanto o movimento é persistente ou descorrelacionado. Quando o movimento é estocástico, a função autocorrelação é uma exponencial decrescente.

Utilizaremos estas duas grandezas físicas como bases para nossas análises dos movimentos migratórios das células, não por serem as únicas medidas possíveis, mas por trazerem informações relevantes para a descrição da natureza deste movimento, com estas medidas poderemos analisar diferentes padrões de migração celular.

Um modelo estatístico para partículas que descrevem um movimento difusivo para alguma escala de tempo, como no caso do movimento Browniano de partículas pontuais, considera que sempre há um intervalo de tempo onde a partícula pontual teria sofrido apenas um evento de troca de momento com o meio e, entre dois destes eventos, o movimento deveria ser balístico, enquanto que para intervalos maiores observamos um movimento aleatório com pouca ou nenhuma correlação nas velocidades.

O modelo de Langevin que apresentaremos no próximo capítulo, considera exatamente isto e, por quase um século, tem sido utilizado para descrever o movimento difusivo das células. Porém, as células não são partículas pontuais e a estrutura de formação do lamelipódio é tal que muitas flutuações internas ocorrem simultaneamente, ocasionando múltiplas trocas de momento linear com o substratos, de tal maneira que nos experimentos não há intervalos de tempo suficientemente pequenos para os quais o movimento do centro de massa da célula descreva um movimento retilíneo uniforme.

1.3 Simulações Computacionais Aplicadas a Migração Celular

O desenvolvimento de modelos matemáticos para implementação computacional com a intenção de reproduzir comportamentos observados em sistemas naturais é uma ferramenta poderosa no estudo e no desenvolvimento de novas tecnologias em diferentes áreas do conhecimento.

Sistemas complexos como o movimento celular impõem dificuldades à execução de experimentos com controle das variáveis relacionadas ao seu comportamento. Nestes casos, a reprodução do comportamento natural em um ambiente virtual nos proporciona mais controle sobre o experimento e nos permite explorar diferentes configurações e realizar

medidas com maior precisão, medidas muitas vezes impossíveis no sistema físico experimental.

Por exemplo, o processo de projetar arranjos celulares e ambientes extracelulares para construção de tecidos para aplicações médicas e tecnológicas [15] requer simulações de tecidos virtuais capazes de prever arquiteturas finais de tecidos a partir das condições iniciais. Estas simulações nos possibilitam compreender a dinâmica do sistema como um todo.

Para que os modelos e suas simulações sejam úteis na engenharia de tecidos, eles devem fornecer previsões quantitativas verificáveis com dados experimentais. Para isso é importante identificar parâmetros e métricas do modelo que sejam comparáveis aos resultados do experimento. Após a validação do modelo podemos explorar configurações de parâmetros não usuais ou, até mesmo, não acessíveis experimentalmente, de acordo com nosso interesse de estudo ou de desenvolvimento de projetos para aplicações tecnológicas.

Sabemos que as células migram extensivamente durante a maturação dos tecidos manipulados em laboratório, mas que também é onipresente no desenvolvimento embrionário [16], cicatrização de feridas [17, 18], resposta inflamatória [19] e muitas patologias [20]. Assim, simulações de morfogênese, patologia e dinâmica de tecidos virtuais em múltiplas escalas requerem simulação do movimento de um grande número de células. Portanto é importante que, mesmo os modelos de migração para uma única célula, como discutiremos com maior profundidade nos próximos capítulos, também sejam robustos o suficiente para serem adaptados à simulação de muitas células.

2 A Biomecânica do Movimento Celular

Sabemos que a mobilidade celular acontece quando a dinâmica do citoesqueleto intracelular é estimulada a partir de cascatas bioquímicas que controlam o maquinário molecular da célula. Estas cascatas podem ser ativadas por vários tipos de sinalização (externa ou interna à célula) e as alterações no citoesqueleto podem acabar promovendo o deslocamento do corpo celular [21, 22, 23]. Esta é uma dinâmica essencial em vários processos biológicos, como a embriogênese, a ação do sistema imunológico, a cura de ferimentos e o processo de invasividade de células cancerosas nos tecidos saudáveis ao seu redor e que pode gerar metástases [24, 25].

Existem diferentes formas de migração celular mas, mesmo em organismos compostos com diversos tipos celulares, ainda é possível observar que há alguns poucos padrões de mobilidade, como discutido por Ruprecht *et al.* [5] e por Friedl *et al.* [26].

Os modos de migração dependem fortemente do contexto em que as células se encontram. Os estímulos do microambiente no qual estão submetidas, tanto biomecânicos, quanto bioquímicos, desencadeiam as cascatas bioquímicas responsáveis pelo fenótipo assumido pela célula, resultando nos diferentes regimes de mobilidade representados na Figura 2.8.

Células podem ser estimuladas a sofrer uma transição entre regimes [26], e estes estímulos podem depender do contato com outras células, da composição da matriz extracelular (ECM, do inglês *Extra Cellular Matrix*), ou ainda da disponibilidade de nutrientes, atratores químicos, hormônios, entre outros fatores.

2.1 Motrizes do Movimento Celular: O Citoesqueleto

Sabemos que a motriz do movimento celular está na dinâmica do citoesqueleto, que é um fenômeno complexo, que envolve muitas escalas de tempo e espaço, e é capaz de produzir diferentes padrões de morfologia e migração. Dentro de cada célula, seja qual for, existe um universo de fenômenos que trabalham de forma altamente sincronizada e resultam em toda a atividade celular, na sua morfologia e na sua dinâmica.

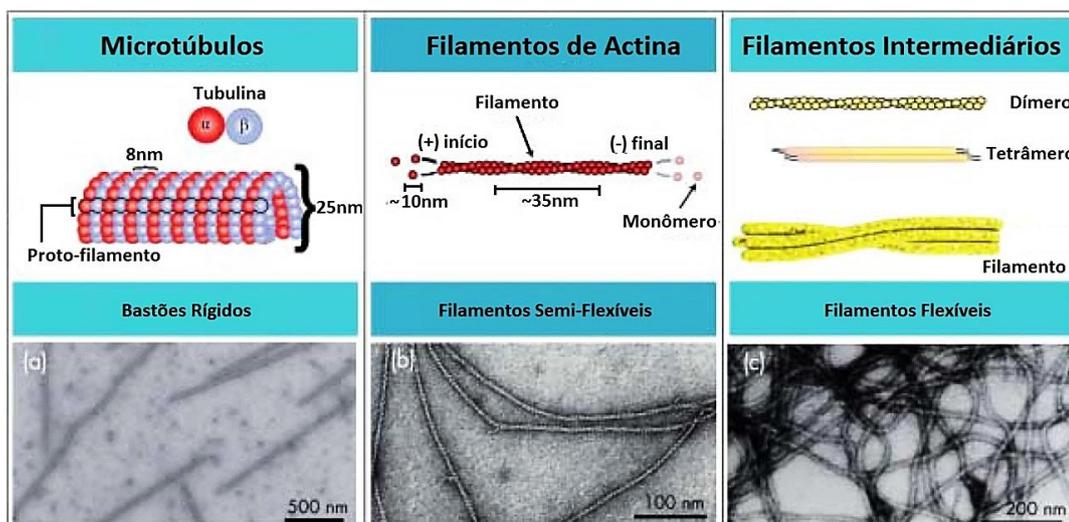


Figura 2.1 – Três tipos de filamentos que compõem o citoesqueleto.

A figura (a) mostra como os dímeros de tubulina α e β se polimerizam formando um tubo rígido, que é a estrutura molecular que compõem os microtúbulos com espessura de $\sim 25 \text{ nm}$. Na figura (b) temos os filamentos de actina, polimerizados direcionalmente formando filamentos semi-flexíveis de espessura $\sim 10 \text{ nm}$. E, na figura (c), os filamentos intermediários compostos por dímeros que formam tetrâmeros, na forma de bastões que formam filamentos flexíveis que interagem lateralmente formando feixes de espessura variável (adaptado da Ref. [27]).

O citoesqueleto celular é uma das organelas celulares que ficam contidos dentro da membrana celular e se estende por todo o volume celular. É um emaranhado de três tipos de filamentos: filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos (Figura 2.1). Estas três estruturas básicas estão em constante rearranjo [27, 28].

Além destas três estruturas básicas, existem vários complexos de proteínas complementares que se amarram e ligam diferentes estruturas do citoesqueleto, algumas produzem tensão a partir de proteínas contráteis e, como um todo, constituem um sistema muito dinâmico em constante remodelagem e reorganização, fundamentais para mobilidade e adesão celular [28].

2.1.1 Microtúbulos

Os microtúbulos são estruturas mais robustas, com diâmetro aproximado de 25 nm , compostas por dímeros de α - e β -tubulina, que se polimerizam em forma de espiral, formando um tubo, e proporcionam mais estabilidade e rigidez para o corpo celular, contra estresses de compressão [27].

2.1.2 Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários são formados por subunidades compostas por diferentes proteínas que podem variar dependendo do fenótipo celular. Tais subunidades têm forma de bastonete, agrupadas em 4 níveis.

Primeiramente, os monômeros formam dímeros que se unem formando tetrâmeros. Estes tetrâmetros então se organizam linearmente formando filamentos semi-flexíveis que, em última instância, se unem em feixes de 8 a 20 unidades [27].

Ao contrário dos filamentos de actina e dos microtúbulos, estes filamentos não dependem de ATP e GTP para se montar, e a troca de elementos ocorre ao longo de todo o seu comprimento [29].

Mecanicamente, estas estruturas fornecem resistência contra estresses de tensão, fundamental para a manutenção das estruturas de tecidos epiteliais [30].

2.1.3 A Dinâmica do Citoesqueleto de Actina

No interior das células há moléculas chamadas actinas que se arranjam na forma de filamentos com diâmetro aproximado de 8 nm [28]. O monômero da actina é uma molécula assimétrica de tal forma que, quando polimerizada, resulta em um filamento cujas pontas são diferentes: em uma das pontas acontece a agregação dos monômeros de actina fosfatada com ATP, enquanto que pela outra ponta acontece a dissociação destes monômeros com a liberação de ADP (Figura 2.2) [31].

De uma forma muito simplificada, podemos resumir o movimento celular pela formação de uma rede de filamentos de actina próximo ao front celular e que estão, de alguma forma, aderidos ao substrato. Os filamentos crescem em direção à parte frontal da célula, formando protrusões da membrana celular que podem exceder a extensão do corpo da célula.

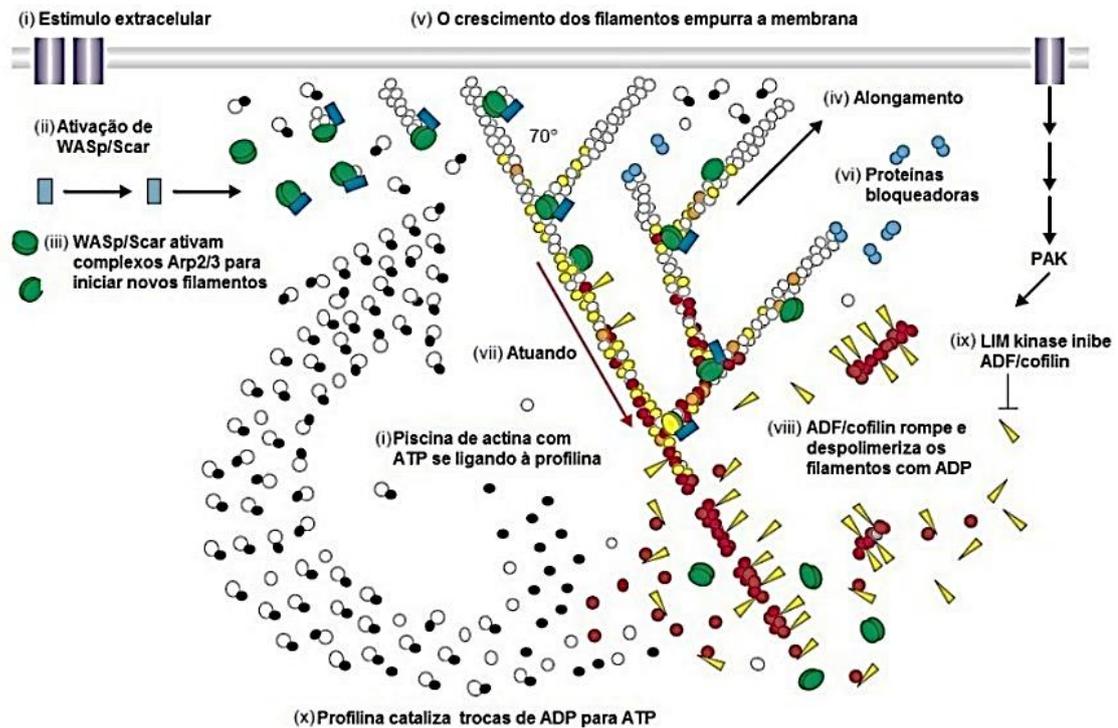


Figura 2.2 – Processo cíclico de polimerização de actina promotora de protrusões.

O esquema acima ilustra o processo de retroalimentação de actina liberada pela despolimerização de filamentos anteriores para a polimerização de novos filamentos, e o processo de ramificação que forma o lameliopódio, destacando a função do complexo protéico auxiliar Arp2/3 (adaptada da Ref. [31]).

Na sua ponta posterior os filamentos perdem monômeros, se encurtando. Como estão aderidos ao substrato, este processo promove o deslocamento do centro de massa do filamento. Quando isso acontece sincronicamente em uma rede de filamentos de actina, a protrusão pode ser mais larga, mas acaba por ter pouca altura: sobre substratos planos essa região é bastante achatada e é chamada de lameliopódio (com uma altura na ordem de uma fração de micrômetro, enquanto que a altura do corpo celular é da ordem de 5 a 10 μm de altura) [26, 27, 32].

Estes filamentos de actina podem ramificar-se com a associação de proteínas auxiliares e formar densas redes de filamentos com uma dinâmica que funciona como uma esteira que promove deslocamento do centro de massa de toda a célula.

Dependendo da atividade das moléculas auxiliares ao processo de polimerização da actina, ao invés de a protrusão formar uma estrutura como o lameliopódio, é possível ocorrer formação de filamentos perpendiculares à membrana celular, chamados filopódios, que estendem o corpo celular localmente, como membros que, por sua vez, podem aderir ao substrato e servir de âncora para que a célula possa se puxar [21, 27, 28, 33].

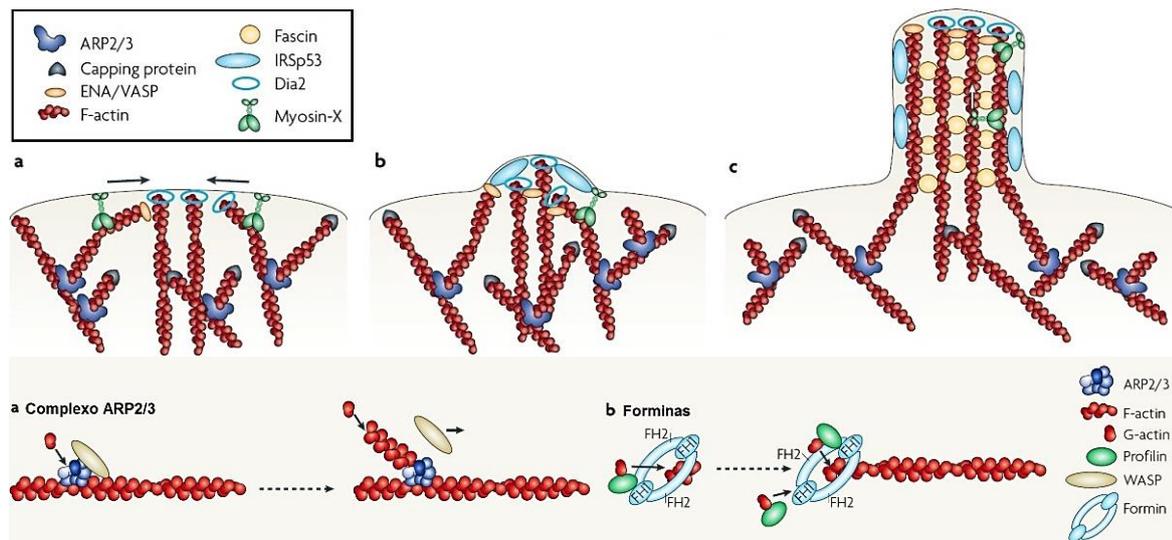


Figura 2.3 – Formação de filopódios e polimerização direcional dos filamentos de actina. O esquema ilustra os mecanismos de formação de filopódios e de construção dos filamentos de actina, em polimerização linear ou na forma de ramificações, destacando as principais proteínas auxiliares destes processos (adaptada da Ref. [34]).

Ao longo do corpo da célula o amadurecimento dos filamentos de actina evoluem para filamentos mais robustos e compostos. Os filamentos de actomiosina produzem e transmitem tensão a partir das contrações das miosinas-II. Juntamente com os microtúbulos, que estão conectados ao centróssomo, formam uma malha filamentosa que envolve todo o ambiente intracelular dando sustentação à célula e transmitindo o momentum necessário para o deslocamento do corpo celular [21, 27, 28, 33].

À medida que o lamelipódio avança os focos de adesão dos filamentos de actina com o substrato amadurecem e, conforme a célula se move acompanhando o lamelipódio, estas adesões focais se tornam complexos focais. Para que a célula prossiga seu deslocamento é necessário que estes complexos de adesão focais sejam desfeitos ou deixados para trás.

Podem também formar complexos de adesão por meio dos quais, com a ajuda de proteínas transmembrânicas (como as integrinas), podem aderir ao substrato. Ainda, na presença de Rho-A, uma proteína da família das pequenas GTP-ases, os filamentos de actina podem incorporar miosina, adquirindo a capacidade de auto-contracção. Este efeito de contracção nos filamentos de actomiosina (também conhecidos como fibras de estresse) atua nas células de maneira semelhante aos músculos em animais superiores [26, 27, 32].

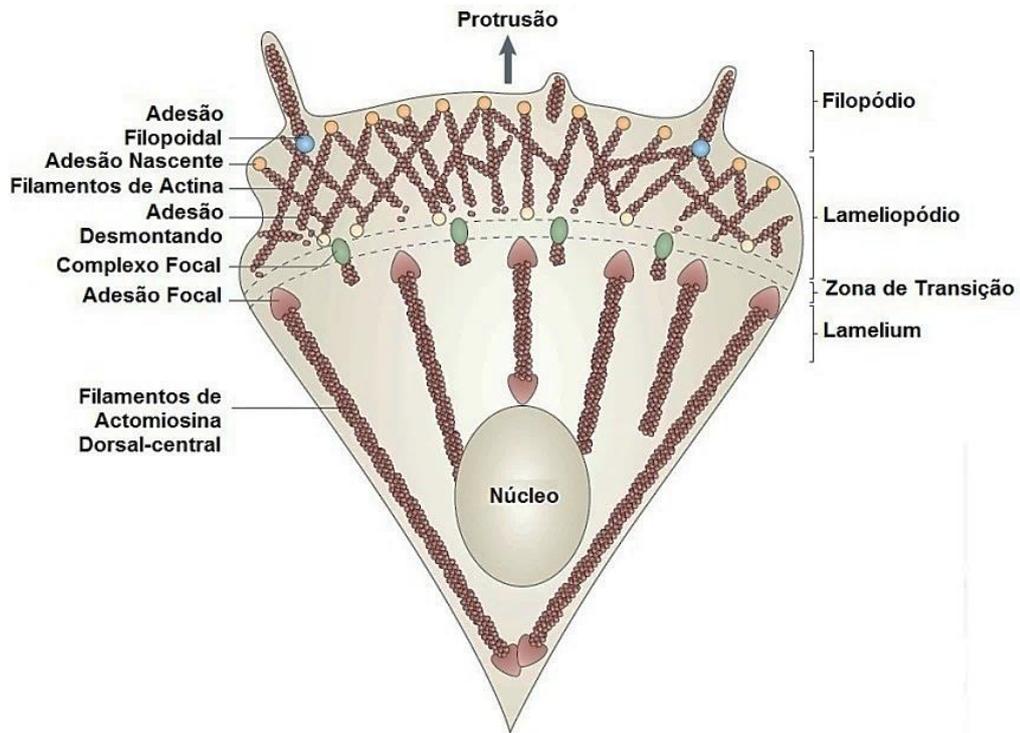


Figura 2.4 – Estrutura do citoesqueleto de uma célula migrando.

O esquema ilustra a estrutura dos filamentos de actina e actomiosina e sua distribuição espacial para um modelo de célula migrando, destacando a parte protrusiva em constante reconstrução, com surgimento e desaparecimento de adesões focais, e a parte traseira, bastante retrátil pela presença de filamentos de actomiosina maduras, promotoras de contração (adaptada da Ref. [33]).

2.1.4 Adesão Celular e Matriz Extracelular

Um aspecto fundamental em organismos pluricelulares é a necessidade de mecanismos de adesão para manter suas células conectadas entre si e com a matriz extracelular (ECM). Existem receptores de adesão que fazem conexões transmembrânicas entre a ECM e o citoesqueleto intracelular ou entre citoesqueletos de células adjacentes, e que também servem de transmissores de sinalização bioquímica [35].

As quatro principais famílias de moléculas de adesão encontradas em células eucariontes são Caderinas, Imunoglobulinas, Selectinas e Integrinas. Tais moléculas são caracterizadas por serem transmembrânicas, com sítios intracelulares capazes de interagir com complexos moleculares que as ancoram ao citoesqueleto, e sítios extracelulares, que selecionam a adesão. Essa seletividade se torna essencial na hora de modelar tecidos, com células com diferentes afinidades entre si e com os diferentes meios.

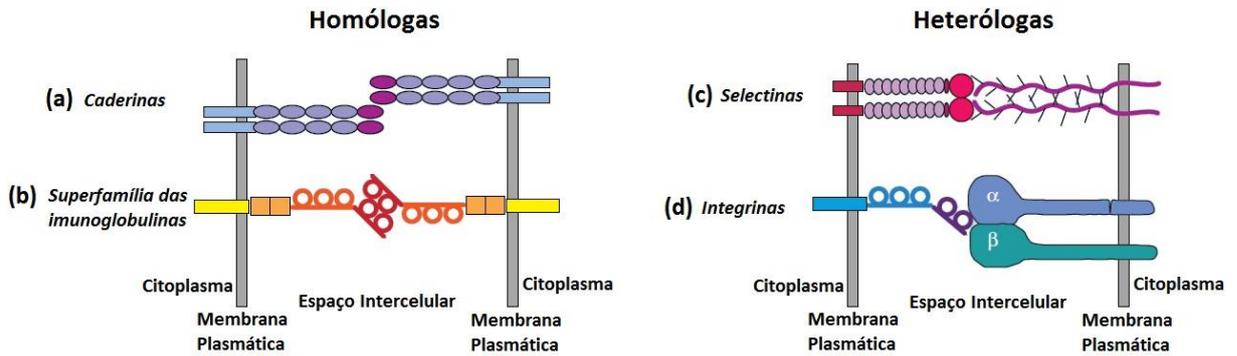


Figura 2.6 – Ligações entre proteínas transmembrânicas de adesão celular.

O esquema ilustra as ligações homólogas, característica de proteínas das famílias das caderinas (a) e das imunoglobulinas (b), e das ligações heterólogas, observadas entre selectinas (c) e integrinas (d) (adaptado da Ref. [35]).

Além das fibronectinas, outras proteínas que compõem a ECM também são fibrosas, podendo resultar em um ambiente extracelular com diferentes propriedades bioquímicas e biomecânicas, como porosidade, dureza, maleabilidade, etc. [44, 45]. Todos estes componentes exercem influência fundamental nos modos de mobilidade celular, que podem ser diferentes de tecido para tecido.

2.1.5 Família das Rho GTPases e Outras Proteínas Auxiliares

A família das Rho GTPases é um conjunto de proteínas pequenas (~21kDa), descobertas em 1983 [46], que se ligam a proteínas G, catalisando a troca entre GDP e GTP em importantes processos de sinalização celular. Os principais membros da família Rho GTPase são as proteínas Cdc42, Rac1 e RhoA e desempenham aspectos fundamentais da dinâmica de actina intracelular [47]. São encontradas em todos os organismos eucariotos, incluindo leveduras e algumas plantas [48].

Mais especificamente, muitos estudos demonstram que a Cdc42 está diretamente correlacionada com a formação de filopódio, a Rac1 com a formação de lameliopódio e a RhoA correlacionada com a presença e atividade de Miosinas-II dentro das fibras de estresse.

Em resumo, praticamente toda a dinâmica do citoesqueleto, promotora de movimento celular, está relacionada com a polarização da Cdc42 e da Rac1 na parte protrusiva do corpo celular, e com a polarização da RhoA na parte retrátil [49, 50].

Em contraponto, existem situações muito específicas em que células com altos níveis de atividade de RhoA e baixa atividade de Rac1 em substratos tridimensionais com

elasticidade não-linear apresentam migração direcional pelo surgimento de protrusões laterais cilíndricas chamadas lobopódios ou *blebs*.

Estas são formações hidrostáticas geradas por rompimentos locais do córtex celular, que é uma malha bidimensional de filamentos de actina que se liga e dá sustentação à membrana plasmática [51, 52]. Os motivos para que este tipo de movimento, sem a formação de lameliopódio pela polarização na concentração de Rac1 e Cdc42, seja direcional e não difusivo ainda não são bem compreendidos [51].

Além da correlação bem definida entre as atividades das Rho GTPases e alterações no citoesqueleto, as pesquisas mais recentes estão realizando importantes descobertas para elucidar com mais detalhes os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de polimerização de actina e contrações de actomiosina.

Na Figura 2.3 estão ilustrados os principais mecanismos que podem gerar formações de filopódios e de lameliopódios com o auxílio de proteínas como a ARP2/3, forminas e outras, que coordenam e direcionam as polimerizações de actinas [33, 34].

2.2 Regimes de Mobilidade Celular

Uma característica de células epiteliais saudáveis é a capacidade de adesão com outras células a partir de sinalizações bioquímicas que as estimulam a se manterem estacionárias e ancoradas à estrutura epitelial formada. Por outro lado, células cancerosas podem evadir estas sinalizações [53], o que estimula a reativação de mecanismos de mobilidade celular [54] e possibilita a invasão através do tecido circundante e a eventual entrada no sistema circulatório.

Ao alcançarem tecidos distantes, estas células podem gerar tumores secundários, conhecidos como metástases, piorando drasticamente os prognósticos e as chances de cura [25]. Estas características observadas em células cancerosas, somada à possibilidade de cultivá-las em laboratório, as tornam excelentes modelos para estudos de mobilidade celular.

2.2.1 Morfologias das Células Migratórias

Células em movimento podem apresentar diferentes morfologias como resultado de alterações nas concentrações e atividades das proteínas envolvidas em diferentes processos

de alterações do citoesqueleto. Estas alterações são resultado do processamento de diversos estímulos bioquímicos ou biomecânicos que as células podem sofrer durante sua migração [50].

O resultado é um processo sincrônico e, geralmente, pulsativo, de extensão da parte frontal da célula em forma de protrusões, acompanhadas de contrações do corpo celular, até a retração da parte traseira da célula, gerando alterações morfológicas de maneira oscilatória [22], podendo ocorrer de forma individual ou coletiva (Figura 2.7).

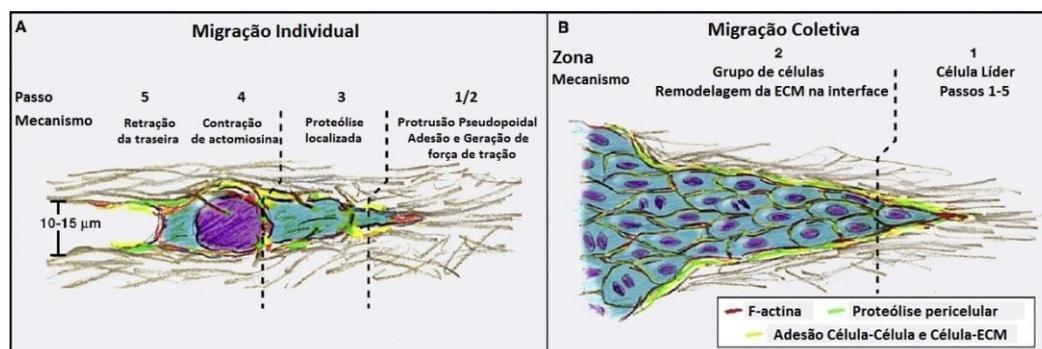


Figura 2.7 – Morfologias observadas em células migratórias, individuais e coletivas. As ilustrações acima destacam os principais processos e sua localização espacial observados durante o processo de migração celular, desde a protrusão frontal à retração e deslocamento do corpo celular, conciliada com a eventual proteólise das fibras da ECM, que possibilita a passagem das outras células (adaptada da Ref. [55]).

Normalmente, células que expressam baixos níveis de moléculas de adesão célula-célula (principalmente E-Caderinas) isolam-se de outras células, e migram individualmente, enquanto que as que mantêm adesões com suas vizinhas guiam ou são guiadas através do tecido circundante [56].

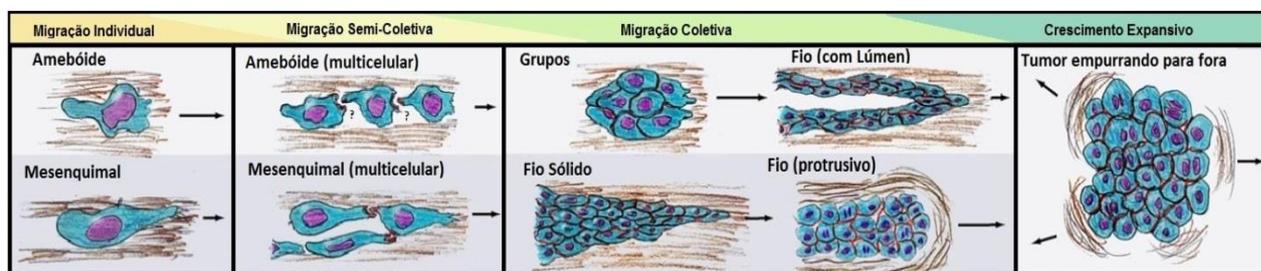


Figura 2.8 – Diferentes regimes de migração celular observados clinicamente. A figura destaca algumas morfologias observadas, tanto individual quanto coletivamente, em processos de migração de massas de células através da ECM (adaptada da Ref. [55]).

A Figura 2.8 ilustra os principais regimes de migração celular observados durante o processo de invasão através do tecido circundante, que pode ocorrer de maneira individual ou coletivamente, dependendo da remanescência de moléculas de adesão entre as células,

como as E-Caderinas, que mantêm as células juntas, e da possível atividade proteolítica, de quebra das proteínas da ECM abrindo caminho para a passagem das outras células [26].

Até aqui apresentamos um panorama geral sobre migração celular individual e coletiva, porém, como o foco deste trabalho é estabelecer modelos matemáticos e computacionais para a migração de células individuais, detalharemos os diferentes tipos de padrões migratórios observados, apenas, para migração individual. O movimento coletivo de células permanecerá como perspectiva de trabalhos.

2.2.2 Migração Ameboide

Células migratórias apresentam internamente uma competição entre os mecanismos de protrusão (extensão do corpo celular na frente da célula) e mecanismos de contração da actomiosina na parte traseira da célula, deslocando o corpo celular com todas suas organelas. Quando a contração é mais intensa que a formação de protrusões, a célula apresenta uma morfologia mais uniforme (esférica, em substrato tridimensional, ou circular, quando sobre substrato bidimensional), e sua migração é chamada ameboide em analogia ao padrão de movimento observado em amebas tais como *Dictyostelium discoideum* [57].

Outro tipo de formação ameboide acontece quando os sítios de adesão não são suficientemente fortes para gerar tração no substrato [58], o que pode acontecer devido às características do substrato. Por último, em circunstâncias muito específicas, também se observam movimentos ativados pela formação de *blebs*, que são pequenas protrusões hidrostáticas na lateral do corpo celular, sem a evidência de uma polarização molecular na atividade do citoesqueleto. Ainda não são bem compreendidos os mecanismos que definem a direção deste tipo de movimento [59, 60, 61].

Células tipo ameboides normalmente não utilizam mecanismos proteolíticos para quebrar e remodelar a ECM. Elas adequam seu corpo de acordo com os espaços disponíveis entre as fibras, passando pelos poros disponíveis, quando possível [62]. Este tipo de movimento celular é normalmente observado em tumores de origem hematopoiética ou neuroectodermal, como leucemias, linfomas e carcinomas de células pequenas do pulmão [63, 62, 26].

2.2.3 Caso Especial: Queratócito

Em especial, destaca-se a morfologia observada durante a migração de queratócitos de peixe (Figura 2.9). Queratócitos são células epiteliais presentes nas epidermes de diferentes organismos superiores, inclusive humanos, e são responsáveis pela formação da queratina, presente, por exemplo, nas unhas e pelos.

Quando em cultura, queratócitos de peixes apresentam um vasto lameliopódio com intensa atividade de citoesqueleto, caracterizado por um front uniformemente protrusivo, com fortes ancoragens e intensa atividade de contração das fibras internas. É a célula com maior velocidade de deslocamento observada em substratos bidimensionais, podendo deslocar-se o equivalente a 1 diâmetro celular ($\sim 10 \mu m$) em aproximadamente 2 minutos [64].

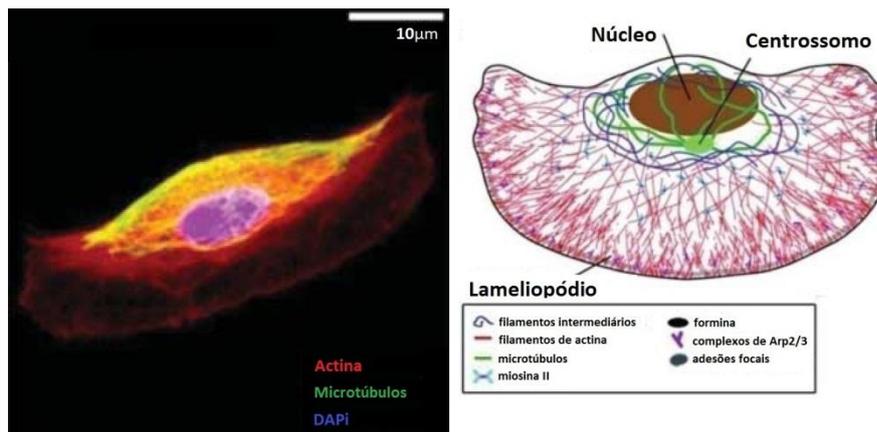


Figura 2.9 – Morfologia e citoesqueleto de queratócitos de peixes em cultura.

Na esquerda, uma imagen em fluorescência destacando a distribuição espacial dos componentes do citoesqueleto celular. Na direita, esquema destacando os filamentos de actina, representados em vermelho, formando uma densa rede próxima ao front de propagação. Essa rede está crescendo junto á membrana, empurrando-a para frente. Concomitantemente, os filamentos são desmontados na parte posterior do lameliopódio (adaptada da Ref. [27]).

2.2.4 Migração Mesenquimal

Quando as protrusões são polarizadas e bastante proeminentes, a retração do corpo celular não é muito intensa e existe a formação de sítios rígidos de adesão entre célula e ECM (normalmente por integrinas), a célula migratória apresenta uma morfologia mais alongada e fusiforme (Figura 2.10). Células com este padrão de migração, normalmente também apresentam atividade proteolítica, abrindo espaço para a manutenção do movimento [65].

A partir desta proteólise, a célula constrói túneis através dos quais, outras células podem segui-la [66]. Este fenótipo é observado em fibroblastos e em células do sistema imunológico que devem ser capazes de migrar em direção a um sítio infectado. Em patologias, tais mecanismos podem ser ativados, como em sarcomas e alguns outros tipos de tumores originários em tecidos conectivos, que normalmente apresentam esta morfologia migratória, caracterizada pela perda de adesão com outras células [67, 66, 68]. Quando isso acontece, as células cancerosas adquirem a capacidade de migrar, uma das condições necessárias para o processo metastático.

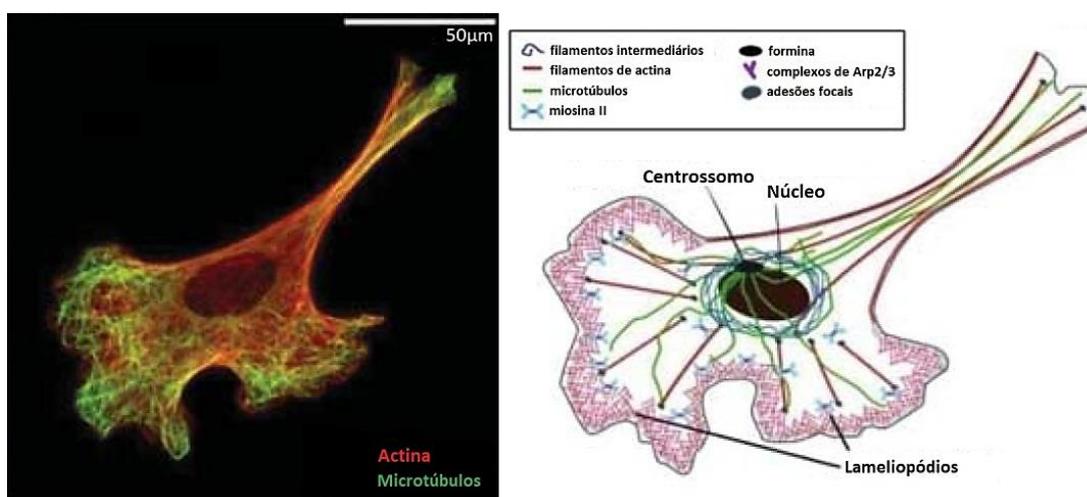


Figura 2.10 – Morfologia e citoesqueleto de um fibroblasto em cultura.

Na esquerda, uma imagen em fluorescência destacando a distribuição espacial dos componentes do citoesqueleto celular. Na direita, esquema destacando a forma alongada e com protrusões bastante destacadas, formando um corpo altamente assimétrico. Observe que o lameliopódio apresenta flutuações que podem ser caracterizadas como diferentes fronts de migração. A cauda posterior é causada pela persistência dos complexos de adesão. As linhas verdes representam microtúbulos, conectando os focos de adesão ao núcleo. As linhas marrons representam os filamentos de actomiosina, conhecidas como fibras de estresse (adaptada da Ref. [27]).

2.2.5 Transição entre Regimes

Transições entre os vários regimes de mobilidade são possíveis e observados em diferentes contextos. Vale destacar a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*), quando as células de um tecido epitelial bastante aderente com suas vizinhas, sofrem uma sequência de alterações metabólicas e fisiológicas, passando a apresentar uma morfologia mesenquimal.

O fenótipo epitelial apresenta assimetria no eixo apical-basal, diferentes junções com células vizinhas e um arranjo próprio do citoesqueleto, enquanto que o fenótipo mesenquimal

não apresenta junções entre células, mas focos de adesão com a ECM, além de serem capazes de produzir ECM e apresentarem capacidade de migração.

Um resumo das principais diferenças entre estes fenótipos é apresentado na Figura 2.11. Este processo de transição entre estes fenótipos é fundamental durante a embriogênese, mas também é considerado o principal mecanismo acionado por tumores que possibilita a invasão de células cancerosas no tecido circundante [69, 70].

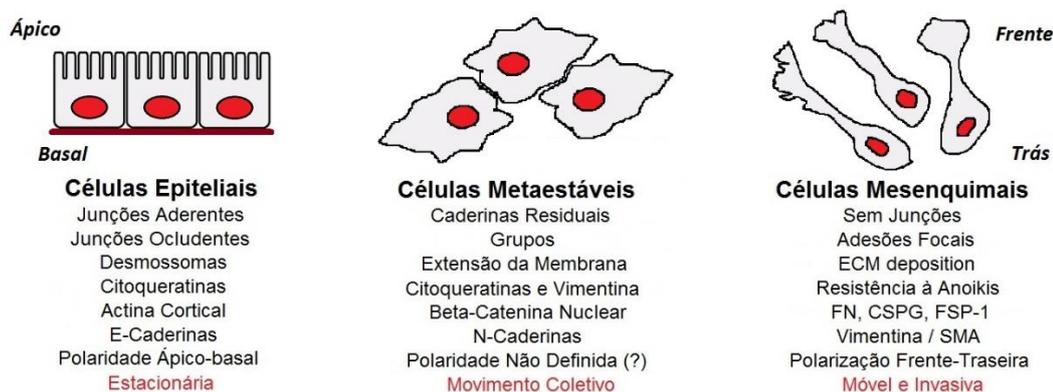


Figura 2.11 – Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT), morfologia e características. O esquema ilustra as principais diferenças entre as morfologias de células epiteliais e mesenquiais, e do estágio intermediário observado durante o processo de EMT (adaptado da Ref. [69]).

O processo de EMT passa por um estágio intermediário de transformação, e é marcado, principalmente, por atividade proteolítica regida pela secreção de metaloproteinases [70], que abrem caminho através da ECM clivando as fibras transversais ao movimento [69].

Observações experimentais sugerem que as células da interface entre tumor e ECM podem sofrer EMT parcialmente, o que inicia um processo proteolítico local que, eventualmente, pode resultar em morfologias observadas em invasões coletivas [26].

2.3 Rastejamento sobre Substrato Plano

O modo de mobilidade celular mais observado em células sobre substratos bidimensionais é o movimento tipo rastejamento. Este regime é caracterizado por 4 passos bem definidos e é o modelo básico para compreender alguns dos principais mecanismos utilizados pela célula durante sua translocação, principalmente, por sua reprodutibilidade experimental [66, 21, 71]:

1º Passo - (Protrusão) A polimerização dos filamentos de actina, catalisada pela presença de Cdc42 e de Rac1 em uma das extremidades da célula, força a membrana celular a se estender e formar uma protrusão, tanto por filopódios quanto por lameliopódios [34]. Como para a maioria das células esta protrusão é direcional, isto molda de maneira assimétrica a sua forma [72, 61];

2º Passo - (Ancoragem) Sítios de adesões focais, mediados pela presença de moléculas de adesão como as integrinas, podem ser formados ao longo desta protrusão, principalmente nas lameliopódios (não necessariamente somente na ponta da protrusão, como sugere a Figura 2.12 abaixo), ancorando a célula aos substratos extracelulares. Estas ancoragens geram sinalização celular e podem recrutar novos receptores de superfície e formar adesões focais mais robustas que, por sua vez, podem maturar para complexos focais [73];

3º Passo - (Contração) A presença da proteína RhoA, ao longo do corpo da célula, principalmente na parte retrátil, está fortemente correlacionada com a atividade de contração nas fibras de estresse pela ativação de miosina-II. Esta contração é responsável pelo deslocamento do corpo celular na direção do movimento.

4º Passo - (Retração) O processo de contrações nas fibras de estresse ao longo de toda a célula é seguido por uma gradual quebra de adesões na parte traseira da célula. Este processo libera a parte traseira de sua ancoragem com o substrato, gerada no 1º Passo, e retrai a parte traseira do corpo celular na direção do movimento.

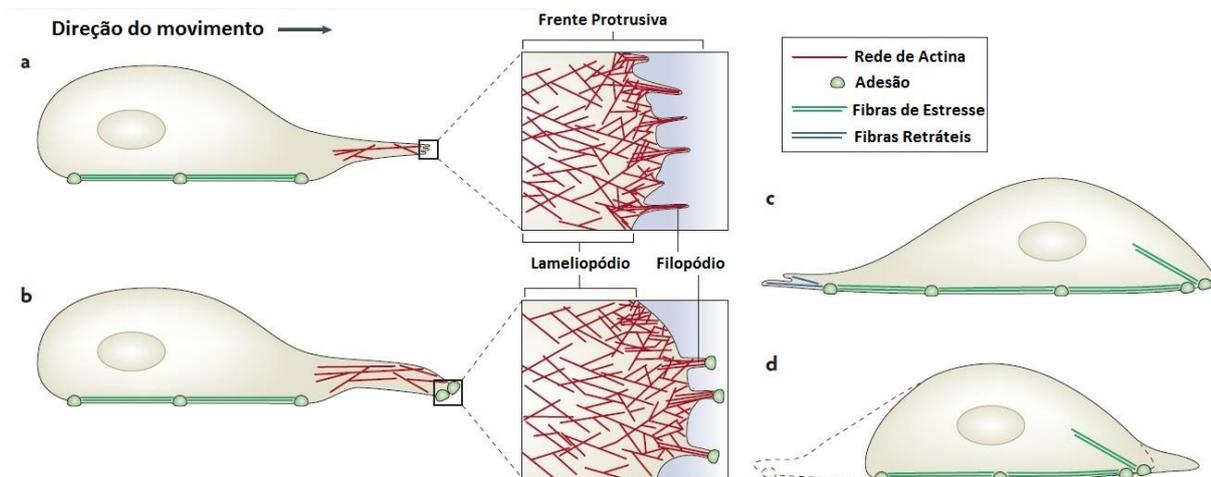


Figura 2.12 – Etapas do processo de rastejamento celular.

A figura ilustra as quatro etapas observadas durante o movimento tipo rastejamento. Primeiro há a formação protrusiva (a), em seguida, pontos de adesões focais se formam ancorando a célula ao substrato (b). As contrações geradas pelas fibras de estresse deslocam o corpo celular (c) e o rompimento das adesões mais antigas possibilitam a retração da parte traseira da célula (d) (adaptada da Ref. [34]).

Por final estes quatro passos se repetem de forma sincrônica e cíclica, caracterizando um rastejamento (Figura 2.12). Podemos observar este tipo de movimento não apenas em diferentes tipos de células individualmente, mas também coletivamente, como supercélulas.

Em casos mais específicos, como o do queratócito de peixe, ou quando submetidas a substratos com diferentes características biomecânicas e bioquímicas de fibrosidade, porosidade, estas etapas podem deixar de ser tão bem definidas e ainda pode haver a necessidade de atividades proteolíticas pela ação de proteínas proteolíticas como as MMPs.

Em resumo, temos indícios experimentais suficientes para afirmar que todos os modos de mobilidade celular, sem estímulos mecânicos externos e sem a perda da coerência em seu citoplasma [74], utilizam diferentes combinações entre os mecanismos de protrusão, ancoragem, proteólise e geração de tensões internas.

É importante destacar a componente estocástica presente nas migrações celulares. A polarização da célula é gerada internamente, com a polarização das proteínas que são responsáveis pela formação dinâmica da rede de actina localizando-se no front de migração, enquanto que fibras de estresse e microtúbulos formam-se na parte posterior, podendo dar lugar a caudas compridas. No entanto, essa polarização pode ocorrer em diferentes direções, formando grandes ondulações da membrana na parte frontal, como pode ser observada no fibroblasto ilustrado na Figura 2.10.

Tudo isso evidencia que o movimento celular é uma composição de processos em múltiplas escalas, tanto espaciais quanto temporais, que envolvem interações físico-químicas entre proteínas, interações mecânicas entre filamentos e geração de tensões sobre ancoragens, resultando em diferentes padrões de movimentos das células, tanto individualmente quanto coletivamente, e em diferentes estruturas topológicas, extremamente importantes para a formação, funcionalidade e para a manutenção de organismos multicelulares.

2.4 Experimentos de Migração e Invasão Celular

Existem muitas maneiras de estudar migração celular experimentalmente, mas alguns modelos se destacam na literatura sobre o assunto. Para organizar esta informação, Kramer e colaboradores [75] publicaram uma revisão sobre os modelos e ensaios em migração

e invasão celular, separados em três tipos de experimentos: ensaios de migração, ensaios de migração em capilar e ensaios de invasão.

No geral, os ensaios se avaliam a variação na área ocupada pela célula a partir do monitoramento de imagens sequenciais obtidas por microscopia ótica, e são basicamente cinco ensaios diferentes: *Free Cell Migration*, *Wound Healing*, *Cell Exclusion Zone Assay*, *Micro-Carrier Bead Assay*, *Fence Assay*, *Spheroid Migration Assay* [75].

Ainda, existem ensaios que avaliam a distância de migração das células (*Single Cell Motility Assays*), que também podem ser monitorados via microscópio, ou ensaios que contam o número de células que migraram por uma membrana (*Transwell Migration Assay*) ou através de uma ponte (*Capillary Chamber Migration Assay*), estimuladas pela presença de uma condição preferencial (como um quimioatratador ou um meio mais nutritivo).

Em relação aos ensaios de invasão, alguns avaliam a área degradada pela proteólise da ECM à qual as células foram condicionadas, como o *Platypus Invasion Assay*, o *Gelatin Degradation Assay* e o *Spheroid Invasion Assay*, via imagens de microscopia. E o *Transwell Invasion Assay*, praticamente igual ao *Transwell Migration Assay*, mas com uma camada de ECM sobre a membrana pela qual as células passam, para selecionar células com atividade proteolítica, e o *Spheroid/Monodispersed Cell Invasion Assay*, no qual as células em uma suspensão são condicionadas a invadirem pequenas esferas de células de outro tipo.

Por final, ensaios de *3D Cell Tracking* e de *Vertical Gel Invasion Assay*, o primeiro sendo facilmente avaliado por microscopia e o segundo por contagem de células marcadas com fluorescência.

Todos os métodos precisam ser adaptados para certas condições de acordo com o experimento, como por exemplo, tamanho dos poros das membranas, tipo de meio envolvido, tipo celular, e tempo de análise. Sendo assim, alguns ensaios podem se demonstrar inviáveis pela demanda de tempo, alto custo, ou por haver a necessidade de um alto conhecimento técnico na área.

Pela complexidade dos processos envolvidos, são fundamentais abordagens experimentais capazes de acompanhar células individualmente e coletivamente, além de simulações computacionais que possam proporcionar um ambiente controlado para a análise de parâmetros.

3 Modelos Matemáticos para Migração Celular

(Nota: Parte deste capítulo é uma adaptação do texto publicado no artigo Thomas *et al.* [1], do qual sou coautor)

Sabemos que o processo de migração celular que acontece quando depositamos uma célula sobre uma superfície aderente e plana apresenta mecanismos e padrões que estão presentes tanto em processos biológicos saudáveis quanto em patológicos [6, 7, 8, 9]. Como descrito na seção anterior os experimentos que vamos analisar são ensaios de célula individuais livres (*Free Migration for Single Cell Assays*).

As experiências geralmente captam o movimento celular a partir de séries temporais de imagens (filmes) de células em migração. Para cada uma das imagens obtidas é necessário determinar a posição das células e isto é feito, ou a partir do centro geométrico da sua área total visível no microscópio, ou pelo centro geométrico do seu núcleo. A partir destes dados de posições é possível determinar o deslocamento que a célula realizou no intervalo de tempo entre duas imagens consecutivas.

Ao juntar a sequência de posições destas células estarão determinadas as suas trajetórias, a partir das suas posições iniciais. Geralmente estes movimentos são resumidos por suas curvas de deslocamento quadrado médio (que chamamos de *MSD*) e função de auto-correlação de velocidade (*VACF*, do inglês *Velocity AutoCorrelation Function*).

Estudar o movimento de células utilizando técnicas de mecânica estatística fora do equilíbrio é uma abordagem necessária para compreender os mecanismos envolvidos neste processo complexo. Estudar o movimento das células é um modelo de Matéria Ativa, pois as células têm a habilidade de se mover ativamente transformando energia do seu microambiente em energia cinética usando mecanismos internos de propulsão [76].

Canonicamente, migração celular é modelada como um processo de Langevin, como um caminhante aleatório com dois regimes: um *balístico* para pequenos intervalos de tempo e um *difusivo* para intervalos de tempo maiores. Isso significa que, para estudar a migração celular, a curva do *MSD*(Δt) versus Δt deve apresentar duas inclinações quando plotado em escala logarítmica, com uma transição entre elas em um intervalo chamado de tempo de

persistência. E no contexto de migração celular, esta curva é conhecida como a Equação de Fürth [3, 4].

3.1 O Modelo de Langevin

O comportamento padrão de partículas em movimento Browniano [77] é determinado por uma sequência de muitas colisões estocásticas recebidas pelas moléculas que compõem o meio. Neste caso, não há uma transferência ativa de energia do meio para a partícula. As flutuações de energia são dissipadas garantindo um equilíbrio energético entre a partícula e o meio, que pode ser compreendido pelo teorema flutuação-dissipação.

Podemos descrever o movimento Browniano utilizando dinâmica Newtoniana incluindo fricção de Stokes com coeficiente γ , em um potencial dependente do espaço $U(\vec{r})$ e forças estocásticas $\mathcal{F}(t)$ [78] pela equação de Langevin

$$\frac{d\vec{r}}{dt} = \vec{v}; \quad m \frac{d\vec{v}}{dt} = -\gamma\vec{v} - \Delta U(\vec{r}) + \mathcal{F}(t) \quad (3.1)$$

com $\Delta U(\vec{r}) = 0$, originalmente na publicação de Langevin [78]. Assumindo correlações temporárias das forças estocásticas $\mathcal{F}(t)$, independência entre a posição $\vec{r}(t)$ e a velocidade $\vec{v}(t)$ da partícula, e utilizando o teorema da equipartição de Boltzmann $\langle v^2 \rangle = 3k_B T/m$, onde k_B é a constante de Boltzmann.

Ornstein e Uhlenbeck [79] consideraram que as forças estocásticas $\mathcal{F}(t)$ devem ser distribuídas de forma gaussiana com componentes independentes e com dependência temporal na forma de funções δ :

$$\begin{aligned} \langle \mathcal{F}(t) \rangle &= 0; & \langle \mathcal{F}_i(t) \mathcal{F}_j(t') \rangle &= 2D_p \delta_{i,j} \delta(t - t'); \\ \langle v_i(t) \mathcal{F}_j(t) \rangle &= 0; & i, j &= x, y, z \end{aligned} \quad (3.2)$$

as componentes $\mathcal{F}_i(t)$ se referem ao ruído branco gaussiano com intensidade D_p . Obtemos o processo estacionário de Wiener integrando sobre todos os intervalos de tempo dt . Estas forças levam a um incremento no momentum da partícula em dt com distribuição gaussiana,

$$dW_{dt,i} = \int_t^{t+dt} ds \mathcal{F}_i(s), \quad i = x, y, z \quad (3.3)$$

a média é zero, e o segundo momento cresce linearmente em dt com inclinação $2D_p$. Os incrementos para tempos diferentes são independentes [80, 81].

As considerações feitas por Langevin nos dizem que, em equilíbrio térmico, a perda de energia por fricção é compensada pelo ganho médio de energia resultante das forças estocásticas que atuam sobre a partícula. Neste caso, o teorema flutuação-dissipação implica na relação $D_p = k_B T \gamma$, onde T é a temperatura absoluta. Sendo assim, podemos reescrever a equação de Langevin para a velocidade, explicitando o termo estocástico das forças como $\mathcal{F}(t) = \sqrt{2D_p} \xi(t) = \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t)$

$$\frac{d\vec{r}}{dt} = \vec{v}; \quad \frac{d\vec{v}}{dt} = -\frac{\gamma}{m} \vec{v} - \frac{\Delta U(\vec{r})}{m} + \sqrt{\frac{2k_B T \gamma}{m^2}} \xi(t) \quad , \quad (3.4)$$

onde o termo estocástico obedece

$$\langle \xi(t) \rangle = 0; \quad \langle \xi_i(t) \xi_j(t') \rangle = \delta(t - t'); \quad \langle v_i(t) \xi_j(t) \rangle = 0; \quad i, j = x, y, z \quad (3.5)$$

Ao integrarmos a equação (3.4) com $\Delta U(\vec{r}) = 0$, obtemos $\langle \Delta \vec{r}^2(\Delta t) \rangle$, que utilizamos para comparar com as medidas definidas na equação (1.1), quando realizamos as médias sobre as trajetórias que já entraram no estado estacionário, com $\Delta \vec{r} = \vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)$. Analiticamente o deslocamento quadrático médio fica:

$$\langle \Delta \vec{r}^2(\Delta t) \rangle = 2d \frac{k_B T}{\gamma} \left[\Delta t - \frac{m}{\gamma} \left(1 - e^{-\frac{\gamma}{m} \Delta t} \right) \right], \quad (3.6)$$

onde d é a dimensão do sistema. É importante destacar que nesta expressão identificamos dois regimes de difusividade quando comparamos com a escala de tempo do sistema, que chamamos de tempo de persistência $P = m/\gamma$. Quando $\Delta t \ll P$, o deslocamento quadrático médio apresenta um crescimento balístico ($\langle \Delta \vec{r}^2(\Delta t) \rangle \sim \Delta t^2$) como,

$$\langle \Delta \vec{r}^2(\Delta t) \rangle = d \frac{k_B T}{\gamma P} \Delta t^2, \quad (3.7)$$

e quando $\Delta t \gg P$, temos um crescimento linear, o mesmo observado para difusão de uma partícula em movimento Browniano:

$$\langle \Delta \vec{r}^2(\Delta t) \rangle = 2d D_{eff} \Delta t, \quad (3.8)$$

sendo que o coeficiente de difusão obedece a relação de Einstein-Sutherland, $D_{eff} = k_B T / \gamma$ [82, 83].

Para fins de simplificar a comparação com os dados experimentais e de simulações de mobilidade celular que apresentaremos a seguir, vamos considerar algumas modificações na notação da equação (3.6). Vamos nos restringir a movimentos em duas dimensões ($d = 2$),

usaremos a constante de difusão apenas como $D = D_{eff}$ e trocaremos $\langle \Delta \vec{r}^2(\Delta t) \rangle$ por $MSD(\Delta t)$ para fins de simplificar a notação. Nesta forma esta equação é conhecida como a equação de Fürth, e é largamente utilizada para descrever o MSD do movimento de células [3, 4]:

$$MSD(\Delta t) = 4D \left(\Delta t - P \left(1 - e^{-\Delta t/P} \right) \right) \quad (3.9)$$

onde Δt é o tempo decorrido entre duas medidas da posição da célula $\vec{r}(t)$ e $\vec{r}(t + \Delta t)$, o deslocamento é definido por $\Delta \vec{r} = \vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)$, e $\langle \cdot \rangle$ representa a média tomada para diferentes trajetórias já em estado estacionário e sobre diferentes rodadas de experimentos equivalentes.

O tempo de persistência, P , define a escala de tempo da transição entre o regime de movimento balístico (quando $\Delta t \ll P$) e o regime de movimento difusivo e coeficiente de difusão D (quando $\Delta t \gg P$). É importante notar que, para $\Delta t \rightarrow 0$, o deslocamento quadrático médio é $\langle |\Delta \vec{r}|^2 \rangle \sim 4D\Delta t^2/P$, e a velocidade \vec{v} é definida a partir de $\langle |\vec{v}|^2 \rangle = 4D/P$.

Para sermos ainda mais específicos, podemos determinar o expoente de difusão (α , tal que $\langle |\Delta \vec{r}|^2 \rangle \sim \Delta t^\alpha$) para observar a transição entre os regimes balístico ($\alpha = 2$) e difusivo ($\alpha = 1$), que se expressa pela inclinação da curva $\log MSD(\Delta t)$ versus $\log \Delta t$ como segue:

$$\alpha(\Delta t) = \frac{d(\log MSD)}{d(\log \Delta t)} = \frac{\Delta t}{MSD} \frac{dMSD}{d\Delta t} = \frac{\Delta t \left(1 - e^{-\Delta t/P} \right)}{\Delta t - P \left(1 - e^{-\Delta t/P} \right)}, \quad (3.10)$$

onde podemos verificar que $\alpha \rightarrow 2$ quando $\Delta t \ll P$ e $\alpha \rightarrow 1$ quando $\Delta t \gg P$ com uma transição suave entre os regimes.

Além disso, podemos calcular a $VACF$ para um processo estacionário conforme definimos na equação (1.2), como metade da segunda derivada da equação (3.9) [1]:

$$VACF(\Delta t) = \frac{1}{2} \frac{d^2}{d(\Delta t)^2} \langle |\Delta \vec{r}|^2 \rangle = \frac{2D}{P} e^{-\Delta t/P}. \quad (3.11)$$

No entanto, a literatura experimental relata desvios significativos do comportamento de Fürth em curtos intervalos de tempo [10, 84, 85, 86, 87, 88]. Alguns autores atribuem esses desvios a um decaimento exponencial de duas constantes para a $VACF$, por exemplo, $VACF = \phi_1 e^{-\Delta t/P_1} + \phi_2 e^{-\Delta t/P_2}$ no artigo do Selmeczi *et al.* [10], ou a erros de localização nas posições estimadas das células, como em Dieterich *et al.* [84] e em Wu *et al.* [87].

3.2 O que os Experimentos Mostram

A fim de verificar se esta previsão matemática realmente descreve os dados experimentais, analisamos doze experimentos de migração celular de cinco laboratórios diferentes e que estão disponíveis na literatura (Takagi et al. [11], Dieterich et al. [84], Potdar et al. [85], Wu et al. [87, 88] e Metzner *et al.* [89]), e os dados mostram desvios significativos na curva do MSD sempre para intervalos de tempo pequenos e estes desvios dependem muito do tipo de célula e do experimento realizado.

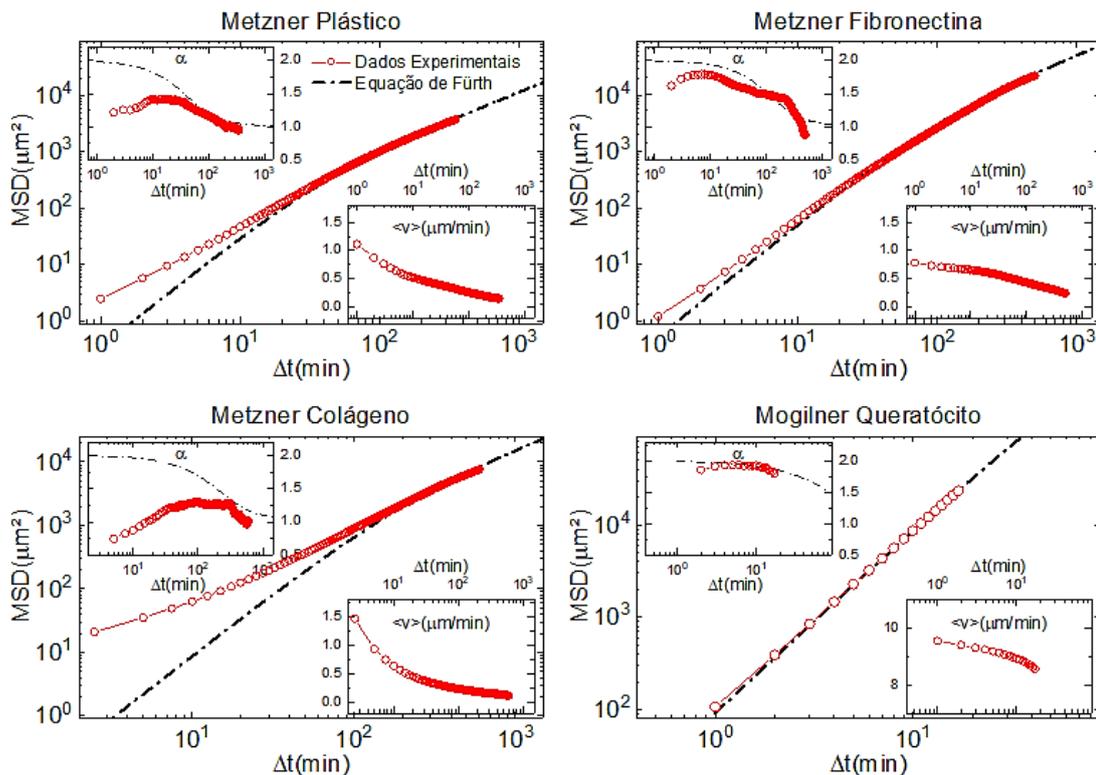


Figura 3.1 – A equação de Furch não descreve os dados experimentais como esperado. As figuras mostram as curvas MSD versus Δt comparando os dados experimentais (bolinhas vermelhas) com a previsão teórica da equação de Furch (tracejado preto) evidenciando desvios significativos para valores pequenos de Δt . Os insets superiores mostram a comparação entre os expoentes de difusão α da equação de Furch e os obtidos dos dados experimentais, e os insets inferiores mostram como a velocidade média $\langle v \rangle$ depende do Δt escolhido. Os experimentos publicados por Metzner *et al.* [89] mostram células migrando em três substratos diferentes, enquanto que o experimento publicado por Mogilner *et al.* [32] mostra a migração do queratócito.

Na Figura 3.1 estão plotadas as curvas de $MSD(\Delta t)$ calculadas utilizando a equação (1.1) para os dados experimentais obtidos de três experimentos publicados por Metzner *et al.* [89] para células migrando em três substratos diferentes e um experimento publicado por Mogilner *et al.* [32] para migração de queratócitos (conforme descrito na tabela 3.1). Para cada uma das curvas MSD procuramos valores de D e P que promovessem os melhores

ajustes da equação (3.9) aos dados experimentais e, mesmo assim, observamos desvios significativos entre teoria e experimentos para valores pequenos de Δt , sugerindo algum efeito não considerado na descrição teórica.

Os gráficos *insets* superiores da Figura 3.1 mostram os expoentes de difusão α experimentais (bolinhas em vermelho) e o ajuste para o previsto na equação (3.10) para os parâmetros do melhor ajuste dos dados à equação de Fürth (tracejado preto). É possível observar como a teoria prevê que, para intervalos de tempo pequenos, o movimento das células deveria ser balístico ($\alpha = 2$) com uma transição para o movimento difusivo ($\alpha = 1$) conforme aumentamos os intervalos de tempo. Entretanto, os dados experimentais evidenciam o desvio, exceto para o queratócito, que é uma célula essencialmente migratória com um movimento altamente persistente.

Também na Figura 3.1, temos os gráficos *insets* inferiores nos quais podemos ver que a velocidade média das células, em cada um dos experimentos, varia significativamente de acordo com o intervalo de tempo Δt utilizado para o cálculo da velocidade e não são convergentes para $\Delta t \rightarrow 0$. Isto significa que comparar a velocidade média das células não é uma boa medida de mobilidade celular pois não estabelece um parâmetro adequado para comparação entre experimentos, uma vez que depende do intervalo de tempo que as medidas são tomadas, por isso é necessário analisar toda a curva $MSD(\Delta t)$.

A partir destes dados experimentais, juntamente com outros disponíveis na literatura e que discutiremos com mais detalhes nas próximas seções, nos deparamos com os seguintes problemas:

- Os dados experimentais mostram um comportamento quase-difusivo, também, para intervalos de tempo muito pequenos;
- As evidências mostram que este comportamento difusivo não pode ser consequência de erros na captação das imagens, como sugerido por alguns autores, pois é sistematicamente acentuado para células em substratos mais adesivos ou fenotipicamente menos migratórias, como vamos mostrar no que segue;
- Quando existe este regime de flutuações para pequenos intervalos de tempo a velocidade instantânea não é uma grandeza bem definida, e a função de autocorrelação da velocidade apresenta um comportamento diferente do esperado pelo processo de Langevin para este regime;

É possível perceber que o desvio do comportamento esperado pela equação de Fürth depende do tipo de célula e das configurações experimentais e afeta diretamente as estimativas de velocidade instantânea realizados por diferentes ensaios ou diferentes laboratórios. Isso significa que a comparação direta entre as velocidades médias não pode ser utilizada para determinar se um conjunto de células é mais migratória que outro.

3.3 Proposta para uma Modificação na Equação de Fürth

Para descrever melhor os comportamentos observados nos experimentos e incluir o regime difusivo que a migração celular apresenta quando calculamos o MSD para pequenos intervalos de tempo, vamos propor uma modificação na equação de Fürth (3.9). Esta modificação pretende

1. propor unidades naturais (redimensionadas) de deslocamento e tempo para descrever a migração celular;
2. usar as unidades naturais para colapsar as curvas do MSD em uma única família de curvas a menos de um único parâmetro, permitindo assim que o MSD , a velocidade média e as funções de auto-correlação de velocidade sejam comparáveis quando obtidas em experimentos diferentes;
3. analisar a divergência na curva das velocidades médias quando o intervalo de tempo tende a zero, verificando a hipótese de comportamento difusivo para pequenas escalas de tempo em comparação com a hipótese de erro de medição;
4. determinar um intervalo de tempo ótimo, para demonstrar os efeitos da polarização interna da célula na direção do seu movimento e da persistência na velocidade.

Sugerimos a inclusão de um parâmetro S modificando a equação de Fürth (eq. (3.9)) promovendo um ajuste empírico ao comportamento que observamos nas curvas MSD obtidas dos experimentos, como segue:

$$MSD(\Delta t) = \langle |\Delta \vec{r}|^2 \rangle = 4D \left(\frac{\Delta t}{1-S} - P \left(1 - e^{-\Delta t/P} \right) \right), \quad (3.12)$$

onde o parâmetro S é adimensional, e $0 \leq S < 1$. Quando $S = 0$ reobtemos a equação de Fürth. Além disso, S pode ser interpretado como a fração do tempo de persistência P na qual

o comportamento da curva MSD permanece difusivo nos intervalos de tempo pequenos para então mudar para o regime balístico previsto pela equação original.

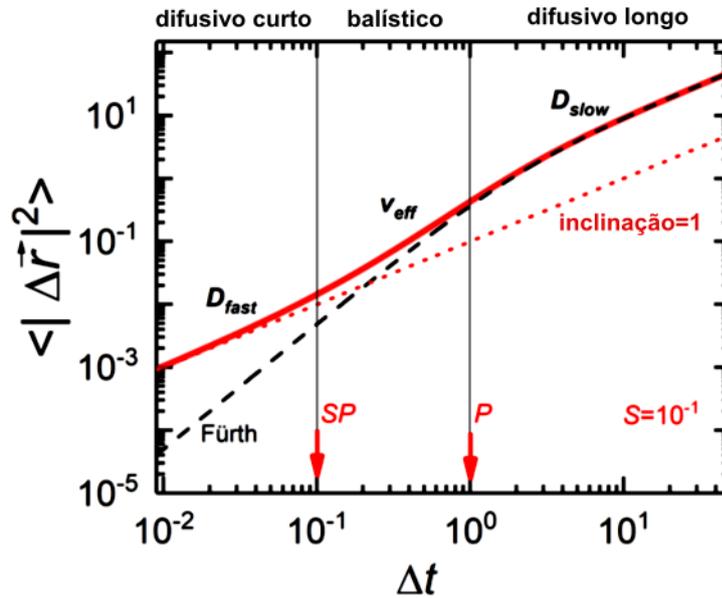


Figura 3.2 – Efeito da modificação na equação original de Fürth.

O gráfico mostra a equação de Fürth modificada para $S = 0,1$ com os três regimes: difusivo rápido, tipo balístico e difusivo lento. Para fins didáticos, plotamos a curva usando $P = 1$, assim é possível identificar as mudanças de regime que ocorrem em $\Delta t = SP$ e $\Delta t = P$. Cada regime é caracterizado por uma constante, respectivamente, D_{fast} , v_{eff} , e D_{slow} . O intervalo de tempo para cada regime é indicado pelas setas vermelhas (adaptado de Thomas *et al.* [1]).

Na Figura 3.2 vemos que as curva de MSD descritas pela equação (3.12), apresentam três regimes e, em cada um deles identificamos alguns parâmetros importantes [1]:

- (1) para intervalos de tempo pequenos ($\Delta t < SP$), a curva apresenta um regime difusivo com uma constante de difusão efetiva, definida por $D_{fast} \equiv \left(\frac{4DS}{1-S}\right)$;
- (2) para intervalos de tempo intermediários ($SP < \Delta t < P$), a curva tem um regime balístico, e podemos definir uma velocidade balística efetiva, como $v_{eff} \equiv \frac{1}{1-S} \sqrt{\frac{D}{P}}$, e;
- (3) para intervalos de tempo grandes ($\Delta t > P$), temos o segundo regime difusivo, e a constante de difusão efetiva $D_{slow} \equiv \left(\frac{4D}{1-S}\right)$.

Podemos identificar que $S = \frac{D_{fast}}{D_{slow}}$, e interpretamos este parâmetro como um excesso de difusão. Ou seja, se D_{fast} for zero, D_{slow} fica igual a constante de difusão D e a equação (3.12) retorna à equação original de Fürth, eq. (3.9). Em outras palavras, S define a duração do regime difusivo inicial.

Quando analisamos a velocidade média obtida pela equação de Fürth modificada, vemos que $\frac{\langle |\Delta \vec{r}| \rangle}{\Delta t}$ diverge à medida que Δt chega a zero com inclinação $-0,5$, $\langle v \rangle \sim \Delta t^{-0,5}$. Podemos verificar esta relação tomando a equação (3.12) no limite de intervalos de tempo pequenos ($\Delta t < SP$), quando obtemos $\langle |\Delta \vec{r}|^2 \rangle = 4D \frac{S}{1-S} \Delta t$ (ou $\langle |\Delta \vec{r}|^2 \rangle = D_{fast} \Delta t$). E este resultado é importante porque demonstra que a velocidade instantânea não pode considerada uma boa medida para medir mobilidade celular, uma vez que depende do intervalo de tempo que as medidas experimentais são tomadas. Este é exatamente o comportamento observado na Figura 3.1.

A escala da equação de Fürth modificada fica evidente quando reescrevemos a equação (3.12) dividindo os dois lados por $4DP/(1-S)$, como podemos ver:

$$\frac{\langle |\Delta \vec{r}|^2 \rangle}{\left(\frac{4DP}{1-S}\right)} = \frac{\Delta t}{P} - (1-S)(1 - e^{-\Delta t/P}), \quad (3.13)$$

esta equação sugere que $\sqrt{4DP/(1-S)}$ é a escala natural de comprimento para quantificar o movimento e P é a escala natural de tempo. Assim, podemos reescrever a equação em termos de unidades naturais adimensionais definindo $\tau \equiv t/P$ e $\vec{\rho} \equiv \vec{r}/\sqrt{4DP/(1-S)}$, isto é, o tempo em termos da escala de tempo de persistência P e comprimento em termos da escala de comprimento de persistência $\sqrt{4DP/(1-S)}$:

$$\langle |\Delta \vec{\rho}|^2 \rangle = \Delta \tau - (1-S)(1 - e^{-\Delta \tau}). \quad (3.14)$$

O redimensionamento que transforma a equação (3.12) na equação (3.14) não afeta o parâmetro S porque este já é adimensional por definição. Desta maneira, ficamos com uma família de curvas determinadas por S , com $0 \leq S < 1$. Lembrando que é o valor de S que determina os intervalos de tempo nos quais os três regimes se aplicam e os coeficientes de velocidade e difusão nos regimes apropriados.

A Figura 3.3 mostra o efeito do parâmetro S na forma da curva descrita pela equação (3.14) quando plotado em escala logarítmica. Especificamente nesta figura as retas com pontilhados azul, vermelho e verde indicam regime difusivo, enquanto que o pontilhado preto indica um comportamento balístico.

Quando $S = 0$ temos a equação original de Fürth (tracejado preto), com $S = 1$ o movimento das células é difusivo para qualquer intervalo de tempo Δt utilizado para o cálculo

do MSD (linha azul), o que impede a determinação de um tempo de persistência P e de uma velocidade instantânea. A figura também apresenta as curvas verde ($S = 10^{-2}$) e vermelho ($S = 10^{-1}$) que mostram os 3 regimes. Dentro desta família de curvas conseguimos ajustar todos os dados experimentais que encontramos na literatura.

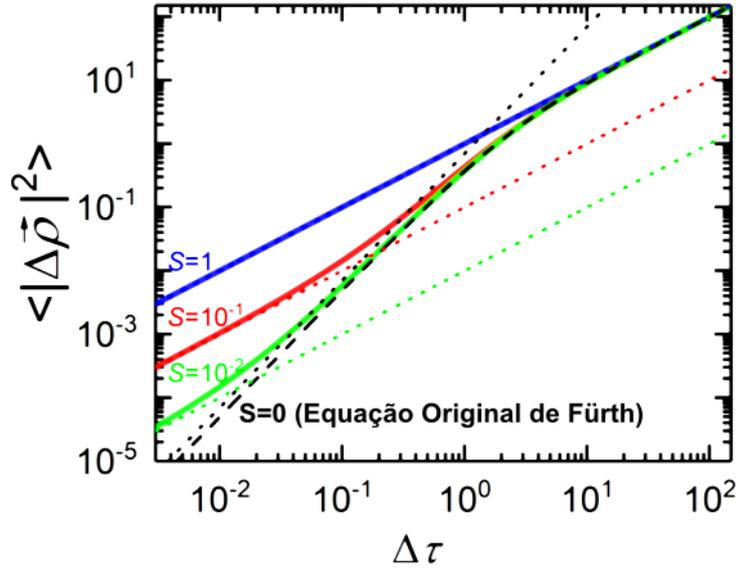


Figura 3.3 – Família de curvas da equação de F urth modificada obtidas pelo parâmetro S . O gráfico mostra o efeito do parâmetro S ($0 \leq S < 1$) na forma da curva de difusão. Observamos o comportamento difusivo para intervalos de tempo pequenos e comportamentos balísticos e difusivos para intervalos de tempo mais longos. $\Delta \vec{\rho}$ e $\Delta \tau$ são, respectivamente, deslocamento e tempo, ambos redimensionados pela escala de tempo de persistência P e escala de comprimento de persistência $\sqrt{4DP/(1-S)}$. S   o único parâmetro do modelo e define o escala de tempo da transi o do movimento difusivo de curto prazo para o movimento balístico. Note que $\Delta \tau = 1$ corresponde ao $\Delta t = P$ (adaptado de Thomas *et al.* [1])

Lembrando que neste tipo de gráfico, a inclina o da curva indica o regime de mobilidade, pois está relacionada ao expoente de difusão α , onde $MSD \sim \Delta t^\alpha$. Podemos obter este expoente de difusão para a equa o de F urth modificada da mesma forma que fizemos para a equa o sem a modifica o mostrada na equa o (3.10) como segue:

$$\alpha(\Delta t) = \frac{\Delta t \left(1 - (1-S)e^{-\Delta t/P}\right)}{\Delta t - P(1-S) \left(1 - e^{-\Delta t/P}\right)}, \quad (3.15)$$

onde este novo α apresenta o regime difusivo pois $\alpha \rightarrow 1$ quando $\Delta t \ll SP$, além disso, $1 < \alpha \leq 2$ quando $SP < \Delta t < P$ e $\alpha \rightarrow 1$ novamente quando $\Delta t \gg P$ com transi es suaves entre os regimes. No entanto, se $S = 0$ esta equa o retorna   equa o (3.10) original e, caso $S \rightarrow 1$ o expoente $\alpha \rightarrow 1$ independentemente de Δt . E reescrevendo em fun o das variáveis adimensionais, temos

$$\alpha(\Delta\tau) = \frac{\Delta\tau(1 - (1 - S)e^{-\Delta\tau})}{\Delta\tau - (1 - S)(1 - e^{-\Delta\tau})}. \quad (3.16)$$

Além disso, podemos verificar que a $VACF$ obtida como metade da segunda derivada da MSD para a equação de Fürth modificada não se altera e não depende do parâmetro S , dada pela equação (3.11).

3.4 Protocolo para Ajuste dos Dados de Migração Celular

Usando a equação (3.12) e a sua segunda derivada em relação a Δt , podemos determinar D , P e S a partir de dados de trajetórias experimentais ou simuladas, como segue (traduzido de Thomas et al. [1]):

- Calcule o MSD em função do intervalo de tempo a partir das séries de posições da célula obtidas no experimento seguindo a equação (1.1);
- Calcular a segunda derivada numérica da curva MSD experimental;
- Ajuste os resultados da etapa (b) à curva da $VACF$ da equação (3.11) para determinar os parâmetros D e P ;
- Com os valores para D e P , ajuste a equação de Fürth modificada dada pela eq. (3.12) para obter o parâmetro S .
- Com os valores de D , P e S , podemos calcular o comprimento natural $\sqrt{\frac{4DP}{1-S}}$ e o tempo natural P para ajustar a equação normalizada (3.14).

Aplicamos na prática este protocolo para experimentos de 5 laboratórios diferentes, quatro destes resultados estão resumidos nos gráficos da Figura 3.4. Estes gráficos mostram como o procedimento promove ótimos ajustes aos desvios que os dados experimentais apresentam em relação ao previsto para equação de Fürth sem a modificação (tracejado preto). Note que os gráficos principais estão todos na mesma escala e as curvas ajustadas diferem, apenas, pelo parâmetro S (ver Tabela 3.1). Finalmente vemos que os gráficos *insets* apresentam as curvas MSD nas unidades de laboratório, e que estas curvas diferem bastante em escala.

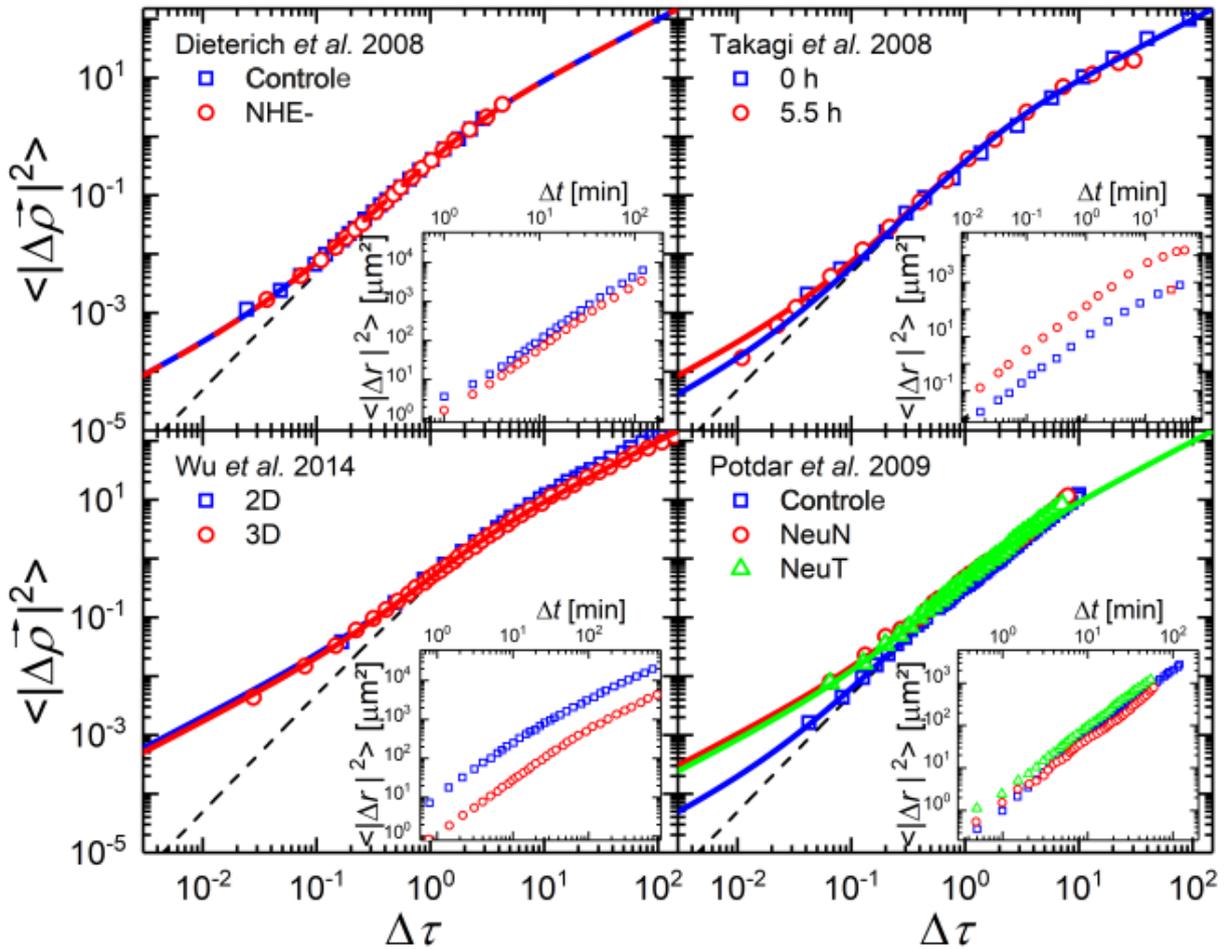


Figura 3.4 – Curvas MSD para diferentes células, tratamentos e laboratórios.

Conforme indicado, a figura apresenta curvas para diversas condições de migração celular, todas ajustadas usando o procedimento indicado no texto e rescalados para unidades adimensionais, com as curvas MSD nas unidades reais dos experimentos nos insets. Consulte a Tabela 3.1 para mais detalhes. (adaptado de Thomas et al. [1]).

Encontramos o melhor ajuste entre o MSD experimental e a equação de Fürth modificada quando usamos os dados dos experimentos de Takagi *et al.* [11]. Neste experimento, o intervalo de tempo entre as imagens é 1 s e a duração do experimento é 2400 s. Este alcance de escalas de tempo teve dados suficientes para todos os três regimes temporais e o menor valor de S é na ordem de 0,01. Baseados nestes dados concluímos que uma série de dados experimentais que seja realmente informativa deve tomar imagens com intervalos entre as imagens $\leq 0,01P$ e o tempo total de observação deve ser $\geq 50P$, para explorar todos os três regimes e permitir uma quantificação precisa dos três parâmetros D , P e S da equação de Fürth modificada.

Os parâmetros D , P e S ajustados para cada um destes experimentos e as descrições dos procedimentos experimentais estão resumidos na Tabela 3.1:

Tabela 3.1 - Informações detalhadas dos experimentos (adaptado de Thomas et al. [1])

Referência	Descrição	Raio da Célula	Experimento	D ($\mu\text{m}^2/\text{min}$)	P (min)	S
Potdar <i>et al.</i> , 2009 [85]	Linha celular MCF-10A que expressa diferentes versões do receptor de tirosina promigratório Her2 / neu; Culturas 2D em substrato plástico. Intervalo de tempo entre as fotos: 0,5 min; tamanhos da amostra: células neuN-187, células neuT-169.	5-10 μm	Controle	4,63	11,92	0,015
			neu-N	2,00	7,50	0,100
			neu-T	4,37	7,69	0,080
Metzner <i>et al.</i> , 2015 [89]	Linha celular MDA-MB-231; Culturas 2D em substratos plásticos e revestidos com fibronectina e rede de colágeno 3D. Intervalo de tempo entre as fotos: 1 min; tamanhos das amostras: plástico - 177 células, fibronectina - 69 células, colágeno - 65 células.	5-10 μm	Plástico	2,15	13,41	0,206
			Fibronectina	6,69	19,41	0,020
			Colágeno	1,7	79,11	0,298
Dieterich <i>et al.</i> , 2008 [84]	Linha celular MDCK-F; tipo selvagem e deficiente em NHE (relevante para a migração celular); Culturas 2D em substrato plástico. Intervalo de tempo entre as fotos: 1 min; tamanhos da amostra: 13 células de cada tipo.	5-10 μm	Controle	8,43	27,60	0,028
			NHE- (deficiente)	18,27	41,72	0,028
Takagi <i>et al.</i> , 2008 [11]	Dictyostelium discoideum, preparado no estado vegetativo. Dados adquiridos 0 h e 5,5 h após o preparo, na fase de desenvolvimento. Intervalo de tempo entre as fotos: 1 min; tamanhos da amostra: 20 células em cada estado.	3-5 μm	Vegetativas (0 h)	4,78	0,41	0,028
			Famintas (5,5 h)	123,42	1,51	0,013
Wu <i>et al.</i> , 2014 [87]	Células WT fibrosarcoma HT1080, em uma placa plana revestida de colágeno (2D) e células incorporadas em uma matriz de colágeno (3D). Intervalo de tempo entre as fotos: 2 min; tamanhos de amostra: 64 células (2D), 69 células (3D).	5-10 μm	2D	4,95	1,62	0,200
			3D	0,80	9,81	0,169

Para analisar as medidas de velocidade das células, embora a velocidade instantânea não seja bem definida, podemos utilizar uma aproximação da velocidade secante para um intervalo de tempo finito, δ , como

$$\vec{u}(\tau, \delta) = \frac{\vec{\rho}(\tau + \delta) - \vec{\rho}(\tau)}{\delta}. \quad (3.17)$$

Na Figura 3.5 estão as curvas de MSD e da velocidade média $\langle |\vec{u}(\tau, \delta)| \rangle$ em unidades adimensionais. Vemos que a velocidade média diverge para intervalos de tempo pequenos, para o experimento em colágeno que tem um S maior (= 0,298) a divergência fica mais evidente (em verde). Como as curvas foram plotadas na mesma escala de $\Delta\tau$, podemos facilmente observar que o regime difusivo dado pela inclinação da curva MSD para intervalos de tempo pequenos coincide com a divergência na velocidade.

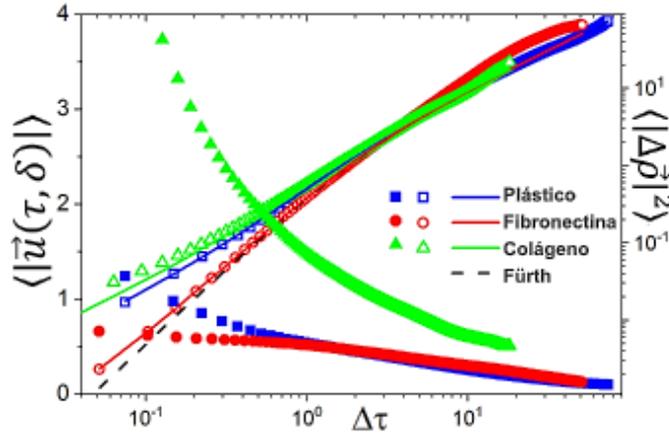


Figura 3.5 – MSD e velocidade média para experimentos de Metzner *et al.* [89]. O gráfico apresenta a velocidade média em função de δ , juntamente com as curvas MSD redimensionadas para três experimentos diferentes. Em tracejado preto temos a equação de Fürth ($S = 0$), as linhas contínuas são os ajustes realizados utilizando o procedimento descrito no texto. (adaptado de Thomas *et al.* [1])

A partir desta definição vamos analisar a função autocorrelação de velocidade (*VACF*), porém evitamos o uso da velocidade instantânea, então redefinimos a função autocorrelação da velocidade por $\psi_\delta(\Delta\tau)$ definida como:

$$\begin{aligned} \psi_\delta(\Delta\tau) &\equiv \langle \vec{u}(\tau, \delta) \cdot \vec{u}(\tau + \Delta\tau, \delta) \rangle_{T/P - \Delta\tau} \\ &= \left\langle \frac{1}{T/P - \Delta\tau} \int_0^{T/P - \Delta\tau} d\tau \vec{u}(\tau + \Delta\tau, \delta) \cdot \vec{u}(\tau, \delta) \right\rangle \end{aligned} \quad (3.18)$$

ψ_δ detecta correlações triviais quando $\delta < \Delta\tau$, pois os intervalos usados para calcular $\vec{u}(\tau, \delta)$ e $\vec{u}(\tau + \Delta\tau, \delta)$ se sobrepõem.

Na Figura 3.6 temos os gráficos de $\psi_\delta(\Delta\tau)$ para os 3 conjuntos de dados de Metzner. As equações de Fürth originais e modificadas têm segundas derivadas idênticas e preveem o mesmo *VACF* (linhas sólidas azuis).

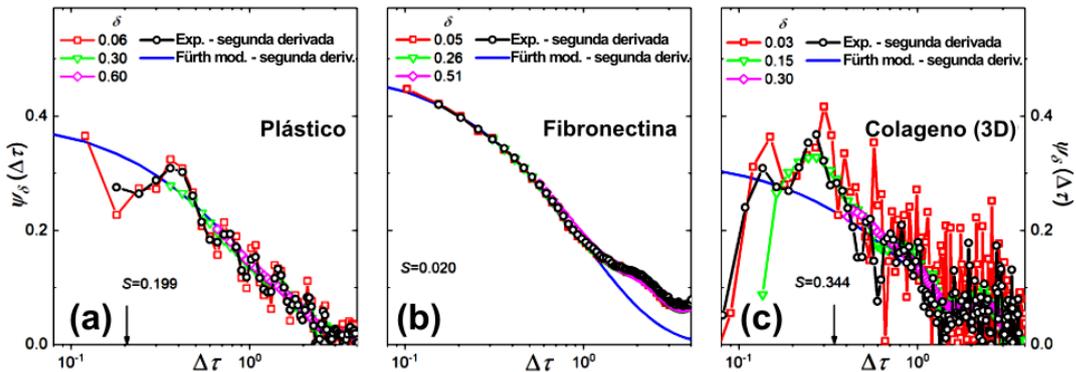


Figura 3.6 – Efeitos do intervalo de tempo nas medidas de autocorrelação de velocidade. As figuras (a), (b) e (c) mostram $\psi_\delta(\Delta\tau)$ calculados utilizando diferentes valores de δ para três experimentos, Metzner *et al.* [89]. (adaptado de Thomas *et al.* [1])

A Figura 3.6 mostra os valores de $\psi_\delta(\Delta\tau)$ calculados diretamente das trajetórias para diferentes valores de δ , e os compara a segundas derivadas da equação de Fürth apresentada na eq. (3.11) e a segunda derivada numérica a partir dos dados experimentais do *MSD*. Todos $\psi_\delta(\Delta\tau)$ concordam com os três conjuntos experimentais de $\Delta\tau > S$, indicando um processo estacionário. Para $\delta < \Delta\tau < S$, $\psi_\delta(\Delta\tau)$ e a segunda derivada do *MSD* experimental diminuem, indicando uma perda de autocorrelação da velocidade média, típico de comportamento difusivo.

A segunda derivada analítica da equação (3.9) (mostrada na eq. (3.11)) não se ajusta aos dados experimentais para pequenos intervalos de tempo. Juntos, os comportamentos de $\langle |\vec{u}(\tau, \delta)| \rangle$ e $\psi_\delta(\Delta\tau)$ fornecem fortes evidências de que a migração celular em pequenos intervalos de tempo difere do comportamento de Fürth. O comportamento de $\langle |\vec{u}(\tau, \delta)| \rangle$ suporta fortemente que a migração celular é difusiva para pequenas escalas de tempo, e justifica a proposta de modificação empírica como fizemos na equação (3.12).

A Figura 3.7 mostra algumas trajetórias experimentais de células em três configurações experimentais publicadas por Metzner *et al.* [89]. No primeiro experimento apresentado as células foram depositadas para migrar livremente sobre um substrato plástico bidimensional. É possível observar nas trajetórias que o comportamento das células é compatível com um movimento difusivo para escalas de tempo pequenas. No segundo experimento as células foram depositadas sobre um substrato plano recoberto por fibronectina. Neste caso, os intervalos entre as imagens são da ordem da escala de tempo *SP* obtido para este experimento, conseqüentemente a maioria das trajetórias não apresenta o comportamento difusivo esperado para intervalos de tempo pequenos. No último experimento as células foram depositadas em um substrato tridimensional de colágeno e a figura mostra a projeção bidimensional da trajetória no plano *xy*, também mostrando o comportamento difusivo para pequenos intervalos de tempo.

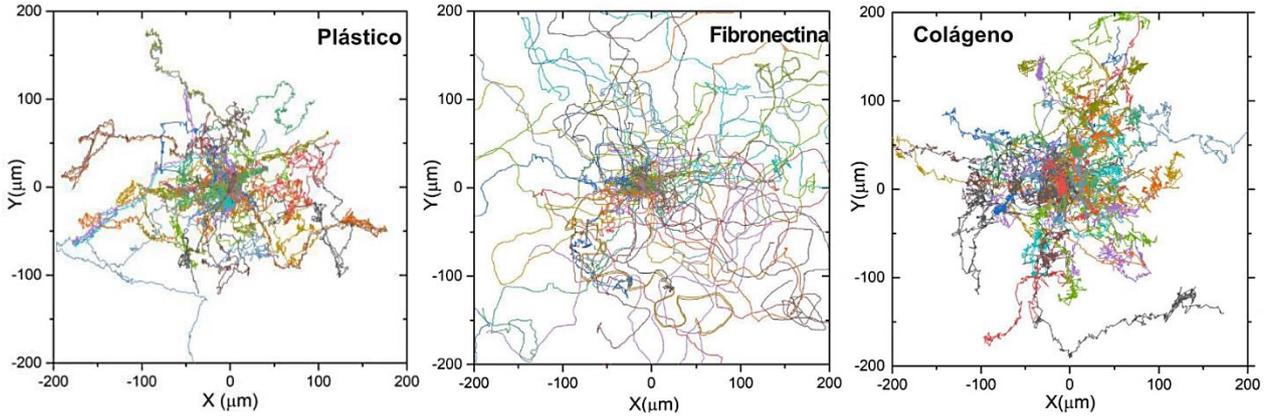


Figura 3.7 – Trajetórias dos experimentos de migração celular em diferentes substratos. As trajetórias da figura (a) são de células migrando sobre substrato plástico. Em (b) temos as trajetórias das células rastejando sobre substrato recoberto por fibronectina. Por último, em (c) temos as projeções 2D das trajetórias experimentais 3D para células migrando em colágeno. Os experimentos foram realizados por Metzner *et al.* [89] conforme descrito na tabela 3.1 (adaptado de Thomas et al. [1])

3.5 Por que a Hipótese de Erro de Localização não Funciona?

Como alguns autores sugerem, os desvios observados que este desvio é uma consequência do erro na determinação da localização da célula inerente ao procedimento experimental. Nesse caso, a curva MSD sugerida seria dada por:

$$MSD = 4D \left(\Delta t - P(1 - e^{-\Delta t/P}) \right) + 2\sigma^2 \quad (3.19)$$

onde o termo adicional $2\sigma^2$ é uma constante resultante do erro de localização que depende da precisão do equipamento. Como o deslocamento é estimado a partir de duas medições de posição, independentemente do intervalo de tempo entre estas medições, o erro deveria ser o mesmo.

Quando analisamos a velocidade média, notamos que ambos os mecanismos de correção para a equação de Fürth preveem que a velocidade média diverge. No entanto, a correção com erro de localização prediz que a velocidade média diverge como Δt^{-1} , enquanto o comportamento difusivo rápido (proposto pelo termo adicional que chamamos de equação de Fürth modificada, eq. (3.12)) implica que a velocidade média diverge como $\Delta t^{-0,5}$.

Realizamos este cálculo para os dados experimentais de Metzner *et al.* [89] e, como podemos verificar na Figura 3.8, para o experimento de célula em colágeno ($S = 0,339$), a inclinação chega à $-0,5$, ao contrário do que esperaríamos para um erro na tomada dos dados que deveria ser $-1,0$.

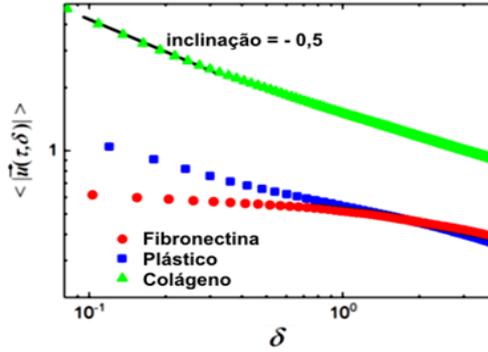


Figura 3.8 – Efeitos do intervalo de tempo nas medidas de velocidade.

A figura apresenta a aproximação secante para velocidade renormalizada $\langle |\vec{u}(\tau, \delta) | \rangle$, em função do intervalo de tempo δ para três experimentos de Metzner *et al.* [89]. Notamos que a inclinação para a célula com valor de S maior chega a -0.5 , ao contrário do que esperaríamos para um erro na tomada dos dados que deveria ser -1.0 . (adaptado de Thomas et al. [1]).

O comportamento esperado pela equação de Fürth, que apresenta um regime de movimento balístico para intervalos de tempos pequenos, seria que esta média permanecesse constante quando $\delta \rightarrow 0$. Além de analisar a velocidade, utilizamos o mesmo procedimento de ajuste descrito na seção 3.4 (acima) para ajustar as curvas MSD usando as duas equações (3.12) e (3.19) para verificar se a hipótese do erro de localização descreve os dados. Primeiro determinamos os valores de D e P a partir da segunda derivada numérica dos dados do MSD , e em seguida ajustamos os dois mecanismos hipotéticos para os desvios da equação de Fürth.

Já vimos nas Figura 3.4 e Figura 3.5 os resultados para a hipótese de difusão rápida pelo ajuste da eq. (3.12). Agora vamos testar a hipótese da equação (3.19) utilizando os resultados do experimento Controle de Dieterich *et al.* [84] (conforme Tabela 3.1). Para fazer esta verificação vamos fazer vários ajustes da equação (3.19), mas queremos verificar o efeito dos dados dos menores intervalos de tempo Δt , ou seja, vamos ignorar sistematicamente os menores intervalos de tempo e refazer os ajustes da equação.

Esperamos que os termos de correção hipotéticos ($2\sigma^2$ ou $2D\frac{S}{1-S}$) não devem depender do menor intervalo de tempo tomado para realizar o ajuste. Mas, como podemos verificar na Figura 3.9 a estimativa para $2\sigma^2$ aumenta linearmente com o menor intervalo de tempo tomado, mostrando que a correção constante não se ajusta adequadamente os dados.

Por outro lado, vemos na Figura 3.10 vemos que o parâmetro S proposto na eq. (3.12) é quase insensível ao menor intervalo de tempo, desde que o intervalo seja curto o suficiente para cair no regime difusivo rápido (para pequenos intervalos de tempo). Portanto, a nossa análise apoia a hipótese de difusão rápida e rejeita a hipótese de erro de localização.

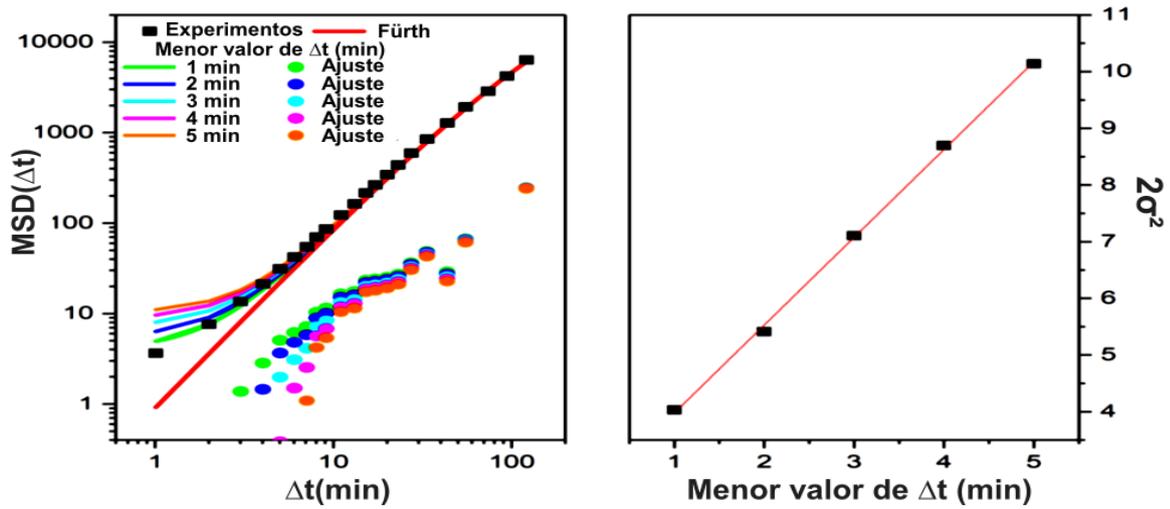


Figura 3.9 – Efeitos do intervalo de tempo assumindo erro de localização.

A figura mostra o procedimento de ajuste da curva MSD para o experimento Controle de Dieterich *et al.* [84], assumindo a hipótese de erro de localização. No painel esquerdo temos as curvas MSD . Obtivemos D e P a partir de um ajuste da sua segunda derivada. Em seguida, repetimos os ajustes excluindo os Δt de 1 a 5 minutos, sucessivamente, e obtivemos as linhas sólidas em cores diferentes. Calculamos a diferença entre os dados experimentais e as curvas de ajuste (pontos coloridos) para obter o termo adicional que, neste caso aumentam com Δt . No painel direito verificamos que os valores obtidos para a correção como um erro de localização $2\sigma^2$ dependem do menor Δt . Esta variação nos valores rejeita a hipótese. (adaptado de Thomas et al. [1]).

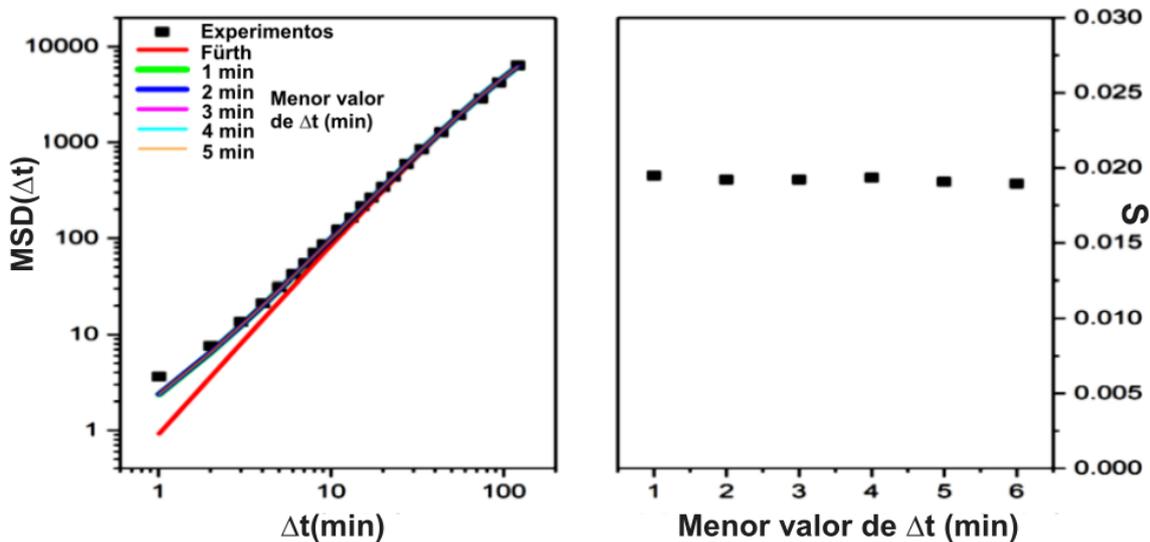


Figura 3.10 – Efeitos do intervalo de tempo assumindo correção difusiva rápida.

Procedimento de ajuste para dados o experimento de Controle de Dieterich *et al.* [84], assumindo correção de difusão rápida. No painel esquerdo temos as curvas MSD . Obtivemos D e P a partir de um ajuste da sua segunda derivada. Em seguida, repetimos os ajustes excluindo os Δt de 1 a 5 minutos, sucessivamente, e obtivemos as linhas sólidas em cores diferentes. Calculamos a diferença entre os dados experimentais e as curvas de ajuste (linhas coloridos) para obter o termo adicional que, neste caso, se sobrepõem. Painel direito vemos que os valores obtidos para o parâmetro S conforme variamos o menor valor de Δt , permanecem constantes, o que é consistente com a hipótese de difusão rápida. (adaptado de Thomas et al. [1]).

3.6 Discussões sobre a Equação de Fürth Modificada

Os experimentos de migração celular tipicamente rastreiam as posições dos centros de massas das células individualmente para obter a curva do *MSD* em relação ao intervalo de tempo Δt . No entanto, para comparar os resultados de diferentes experimentos é necessário reescalar o tempo e as distâncias. A modificação que propomos na equação de Fürth (eq. (3.12)) nos fornece valores adequados para reescalar tempo e distância para unidades adimensionais. Ao contrário da equação de Fürth original, a modificação possibilita descrever o regime difusivo observado para os dados experimentais quando analisamos intervalos de tempo pequenos.

Muitos autores atribuem este desvio dos dados experimentais da previsão fornecida pela equação de Fürth para pequenos intervalos de tempo a erros de medição, ou simplesmente descartam estes dados. Porém este regime difusivo para pequenos intervalos de tempo nos fornece informações sobre os mecanismos subcelulares que geram a mobilidade celular e determinam o tempo necessário para que o lamelipódio se forme, se dissipe ou se reorganize para desestabilizar a polarização celular responsável pela migração persistente que resulta no regime balístico, e que ainda pode ser fundamental para explicar mecanismos de migração para tipos de células específicos.

Definimos um protocolo que possibilita o ajuste dos dados obtidos por experimentos de migração e concluímos que, para que uma série de dados seja realmente informativa, as imagens com as posições das células devem ser tomadas em intervalos $\leq 0.01P$ e o tempo total de observação deve ser $\geq 50P$, para explorar todos os três regimes e permitir uma quantificação precisa dos três parâmetros D , P e S da equação de Fürth modificada.

Além disso, durante o regime difusivo para curtos intervalo de tempo, a velocidade instantânea não é adequadamente definida e medidas de velocidade e da autocorrelação da velocidade requerem a definição de uma velocidade média (definição pela secante). Neste caso os resultados podem depender do intervalo de tempo δ utilizado para calcular esta velocidade média.

Os resultados apresentados aqui também fornecem a possibilidade de responder um paradoxo de longa dada em migração celular: embora a polarização celular pareça determinar a direção da migração celular, demonstrar uma correlação entre a velocidade celular e a

polarização celular tem sido difícil. Agora sabemos que, para que essa análise funcione, a direção do movimento celular e a velocidade média devem ser medidas ao longo de intervalos de tempo $S < \Delta\tau < 1$, ou seja, no regime intermediário quase-balístico.

Finalmente, apontamos que as trajetórias obedecem a equação modificada de Fürth e isso indica que este comportamento emerge de equações dinâmicas análogas ao problema de Langevin. Esta possibilidade inspirou uma investigação específica sobre a natureza deste comportamento, e já tem resultados que estão sendo preparados para publicação por Rita M.C. de Almeida, Guilherme S. Y. Giardini, Mendeli Vainstein, James A. Glazier e Gilberto L. Thomas com o título *Exact solution for the Anisotropic Ornstein-Uhlenbeck Process* [90].

4 Modelos para Simulações de Migração Celular

Desenvolver modelos que simulem comportamentos observados em processos de mobilidade celular tem por objetivo melhorar a compreensão sobre a natureza dos mecanismos envolvidos, suas consequências, fundamentos e como podemos abordar casos clínicos como, por exemplo, células cancerosas invasivas.

4.1 Modelos para Simulação de Mobilidade Celular

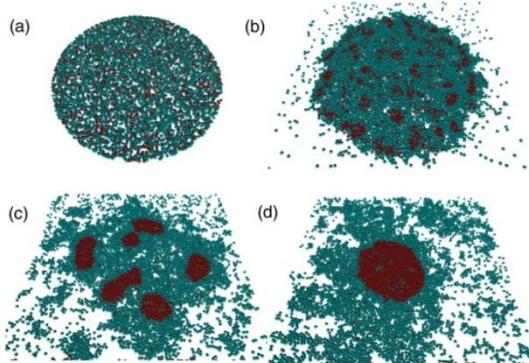
Nesta seção tentarei apresentar um panorama geral de modelos de estudo destes sistemas. Iniciando por modelos computacionais que consideram mobilidade coletiva, como *BOIDS*, *Surface Evolver*, *Potts Celular (Cellular Potts Model – CPM)* e *Potts Sub-Celular*, seus fundamentos, suas vantagens e desvantagens e como podemos e pretendemos utilizar estes modelos neste trabalho de doutorado.

4.1.1 Modelo de Animóides

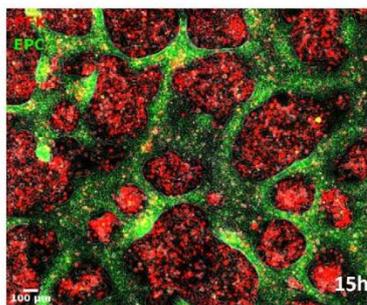
O modelo de Boids, ou é um modelo de animóides desenvolvido por Reynolds [91] em 1987 para descrever os comportamentos coletivos observados em movimento de bando de pássaros, cardumes ou, até mesmo, de multidões nas ruas. Um estudo sistemático do espaço de parâmetros de um modelo de Boids bidimensional foi apresentado por Vicsek *et al.* [92]. O modelo considera um sistema de N partículas e determina que a posição \vec{r}_i da i -ésima partícula ($i = 1, \dots, N$) deve variar de acordo com sua interação com os indivíduos ao seu redor, matematicamente dado por:

$$\vec{r}_i(t + 1) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i \Delta t, \quad (4.1)$$

onde o vetor velocidade \vec{v}_i tem módulo constante e sua direção depende de uma média sobre as direções dos vizinhos e um termo de ruído. Simulações utilizando este modelo apresentam surgimento espontâneo de movimentos coordenados [92] e reproduz fenômenos de segregação celular quando se implementa a condição de velocidades diferenciadas entre os tipos de indivíduos [93, 94], como observado experimentalmente [95].



Simulações de BOIDS



Fluorescência em Co-Culturas Celulares

Figura 4.1 – Segregação celular testada pela hipótese de velocidades diferenciadas. Na esquerda, dois tipos de células em segregação espontânea utilizando modelo de BOIDS (adaptada da Ref. [94]); na direita, imagem de fluorescência mostrando segregação entre dois tipos de células: em vermelho, PFK (cultura primária de queratócito de peixe), e em verde, EPC (linhagem de queratócito de peixe) (adaptada da Ref. [95]). Em ambas, simulações e experimentos, células mais velozes são envolvidas pelas menos velozes, como um efeito de blindagem.

Apesar de reproduzir muito bem padrões de comportamento observados em movimentos coletivos bidimensionais, este modelo ignora efeitos individuais e intracelulares, o que é desfavorável para estudos de mobilidade de uma única célula.

4.1.2 Surface Evolver

Outro modelo possível para simulações de movimento de células é o modelo de evolução de superfícies, implementado em um ambiente computacional chamado de *Surface Evolver* [96]. O modelo prossegue a partir de uma condição inicial de superfície com uma dinâmica de minimização de energia usando elementos finitos [97]. O modelo possibilita a inclusão de termos de energia que descrevem tensão superficial, gravidade, curvatura média quadrática, etc. [97], e recentemente apresentou ótimos resultados em simulações de dinâmica de ruptura e coalescência em espumas [98].

O *Surface Evolver* tem por principal vantagem a alta resolução no trato de efeitos locais de superfície e, por apresentar excelentes resultados em simulações de dinâmica de sistemas compartimentados, como as espumas [98], demonstra ter grande potencial em ser utilizado para reproduzir comportamentos da membrana celular que resultam no deslocamento da célula.

Por outro lado, este modelo acarreta alto custo computacional, dificultando a possibilidade de simulações de comportamentos coletivos. Além disso, o *Surface Evolver* ignora os efeitos internos locais como de alterações no citoesqueleto celular.

4.1.3 Modelo Celular de Potts e Modelo GGH

François Graner e James Glazier [99, 100] em 1992 adaptaram o modelo de Potts [101, 102] para simular fenômenos de segregação celular utilizando a hipótese de adesão diferenciada e adicionando efeito de conservação de volume, caracterizando o que hoje conhecemos por modelo Celular de Potts (CPM, do inglês *Cellular Potts Model*). Alguns anos depois, em 1997, Hogeweg e colaboradores [103, 104] incluíram efeitos de interação entre as células e a concentração de químicos, e conservação de área superficial, dando abertura para novas adaptações ao modelo que passou a ser chamado de modelo GGH (*Glazier-Graner-Hogeweg*).

Atualmente é muito utilizado em estudos de células e tecidos em diferentes morfologias e formações topológicas. Valendo também citar o artigo publicado por Mombach e colaboradores [105], que em 1993 utilizou o modelo CPM para incluir efeitos de crescimento celular e mitose, sempre que a razão $(\text{área})/(\text{perímetro})$ alcançava um valor crítico, reproduzindo, com isto, resultados coerentes com experimentos e modelos teóricos, dependentes da temperatura utilizada na simulação.

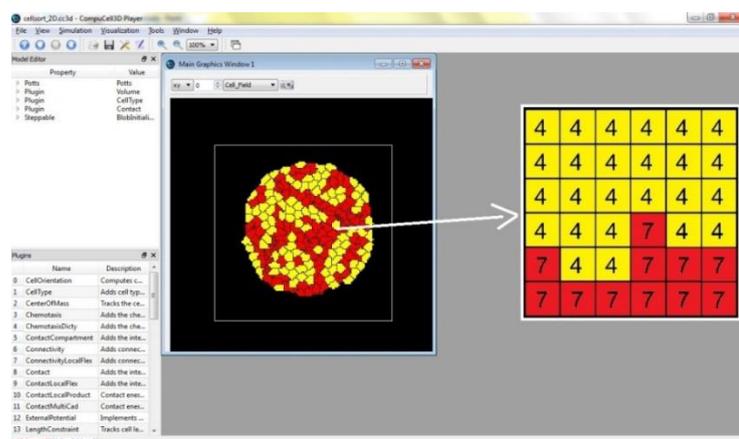


Figura 4.2 – Programa CompuCell3D® em uma simulação com dois tipos de células. Em destaque, o detalhe da rede quadrada com a interface pixelizada entre duas células (no caso, a célula de número 4 de tipo *amarela* e a célula 7 de tipo *vermelha*).

Modelos do tipo CPM podem ser usados para simulações de sistemas biológicos ou não biológicos, como por exemplo, espumas. Um trabalho que realizamos utilizando este

modelo aplicado a dinâmica de espumas molhadas foi publicado na revista *Physical Review Letters*, como o título: *Growth Laws and Self-Similar Growth Regimes of Coarsening Two-Dimensional Foams: Transition from Dry to Wet Limits* [106]. Além deste, também recomendamos a leitura do trabalho publicado sobre o crescimento de espumas molhadas em 3D [107] e sobre o crescimento de grãos em cristais, ou bolhas em espumas secas [108], ambos publicados por de Thomas *et al.*, como exemplos de aplicação de modelos tipo CPM.

O desenvolvimento do software livre *CompuCell3D*[®] [106] como um facilitador na execução de simulações utilizando este modelo [107], apresenta-se como uma robusta ferramenta para estudos de biologia de sistemas, por já acoplar a rede de células e promover uma boa visualização gráfica da simulação e análises estatísticas durante a execução do programa (Figura 4.2).

Como está ilustrado na Figura 4.2, vemos que este modelo supõe uma rede, na qual cada sítio recebe um rótulo s , e um conjunto conexo de sítios de mesmo valor são tratados como uma célula ou um compartimento de uma célula. O número de sítios com o mesmo rótulo define o volume da célula, o que nos permite definir um volume alvo e determinar qual o tamanho da célula que queremos simular. A interação entre as células, ou entre a célula e o ambiente pode ser ajustado pelas energias de interfaces. Além disso é possível definir a interação entre a célula e campos químicos cujas concentrações são definidas por equações de difusão. De acordo com os conjuntos de parâmetros escolhido, podemos simular diferentes comportamentos de células ou de tecidos.

A dinâmica da simulação segue um processo de minimização de energia com base no método de Monte Carlo [111]. O programa propõe trocas locais de spins na rede utilizando a probabilidade de Boltzmann [se $\Delta E < 0$, aceita a troca; caso contrário, $\Delta E \geq 0$, aceita com probabilidade $\exp(-\Delta E/T)$, onde T funciona como uma temperatura representando flutuações de energia, e a energia E do sistema carrega termos de energia de interface, conservação de volume e superfícies, afinidade química, entre outros, e pode ser escrita como

$$\begin{aligned}
 E = & \sum_s \sum_{\langle s \rangle_n} J(\tau, \tau') [1 - \delta_{s,s'}] + \sum_s \lambda_{surf}(S) [a(S) - a_t(S)]^2 \\
 & + \sum_s \lambda_{vol}(S) [V(S) - V_t(S)]^2 + \sum_s \lambda_{chem}(S) C(\vec{r}) + \dots,
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

onde, a soma do primeiro termo é feito sobre todos os sítios s da rede (que pode ser quadrada, hexagonal ou cúbica) e sobre todos seus n -ésimos primeiros vizinhos $\langle s \rangle_n$; $J(\tau, \tau')$ representa as energias de interface entre células e que depende dos tipos τ das células S e S' , às quais pertencem, respectivamente, os sítios s e $\langle s \rangle_n$, da soma; nos próximos termos, as somas são feitas sobre todas as células S , e os λ 's são os multiplicadores de Lagrange que mantêm o volume $V(S)$ e a área superficial $a(S)$ em torno de seus respectivos valores alvos, $V_t(S)$ e $a_t(S)$; também é possível quantificar a afinidade com agentes bioquímicos que possam estar presentes com a concentração $C(\vec{r})$, na posição \vec{r} do sítio s , esta afinidade pode ser atrativa (se $\lambda_{chem}(S) < 0$) ou repulsiva (se $\lambda_{chem}(S) > 0$).

A partir deste modelo e utilizando CompuCell3D®, Alexandre J. Kabla [112], desenvolveu simulações bidimensionais de movimentos coletivos em tecidos aplicando a hipótese de velocidades diferenciadas. Suas simulações mostraram que é possível reproduzir muitos comportamentos coletivos comumente observados *in vitro* e *in vivo*, como segregação de tecidos, influência de células líderes no movimento do grupo e como pode ser necessária a emergência de movimentos coordenados para promover invasão de tecidos cancerosos em sistemas onde uma única célula é mecanicamente incapaz de invadir. Porém, a complexidade do sistema ainda requer um modelo para simulações do sistema real tridimensional, como iremos propor a seguir.

E, para movimento individual, Marée e colaboradores [113] acoplaram simulações de CPM com efeitos de polarização de proteínas intracelulares específicas, envolvidas com alterações no citoesqueleto e conseqüente propulsão ao movimento da célula (as Rho GTPases), a partir da resolução de equações diferenciais acopladas para as devidas rotas de sinalização. Os resultados mostraram como variações na forma da célula altera as zonas de atividade de Cdc42 e a resposta do lameliopódio a partir de estímulos múltiplos, complexos ou por alterações rápidas nestes estímulos. Também mostraram como alterações na forma da célula alteram as distribuições das concentrações das Rho GTPases através do citoplasma. O ponto negativo deste modelo é o alto custo computacional mesmo para simulações bidimensionais, o que impõe sérias dificuldades para implementação em um sistema tridimensional real ou para simulações de migração coletiva.

4.1.4 Modelo GGH Sub-Celular

Uma variação do CPM é o modelo de Potts Sub-Celular (sCPM) ou, com a possibilidade de inclusão e interação com potenciais químicos ou físicos, pode ser chamado de modelo GGH Sub-Celular (sCGGH)¹. Este modelo consiste em subdividir ou, efetivamente, *pixelizar* as células para representar a dinâmica de proteínas e de organelas intracelulares envolvidas nos processos de interesse a serem simulados. A inclusão de campos de potencial químicos ou físicos pode ser útil na representação de distribuições moleculares intra e extracelulares. Com esta pixelização, o conceito de tipo celular, passa a ser interno à célula, e as energias de contato passam a ser distinguidas entre *internas* e *externas*.

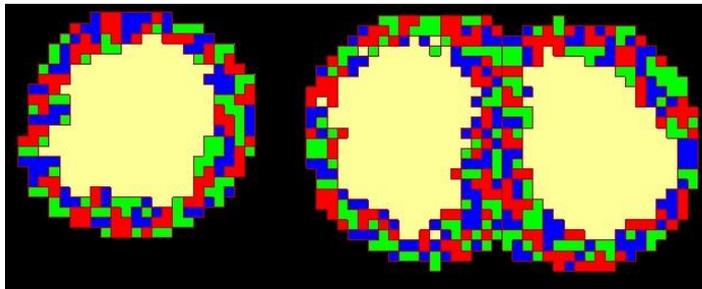


Figura 4.3 – Imagem de uma simulação de CompuCell3D® com células pixelizadas. Utilizar a técnica de células pixelizadas possibilita compartimentalizar a célula e reproduzir comportamentos de polarização que serão muito úteis nas simulações de migração celular.

Isto possibilita simular polarização intracelular, bem como eventos locais dentro das células, tanto na escala de célula individualmente ou em coletivo. Esta possibilidade é fundamental para reproduzir efeitos de interação entre células e entre célula e substrato, pois, como já foi discutido no Capítulo 2 sobre A Biomecânica do Movimento Celular, pode-se distinguir entre diferentes regimes, tanto individuais quanto coletivos.

4.2 Construindo um Modelo de Migração Celular em Ambiente CC3D

(Nota: Parte deste texto foi adaptado do artigo publicado por Fortuna et al. [2])

Construímos simulações de células individuais migrando sobre uma superfície plana e homogênea, não consideramos a modelagem de superfícies heterogêneas, a influência de campos químicos e a migração através da matriz extracelular 3D. Ao estabelecer este modelo de simulação desejamos que sirva de base para estes, e outros estudos, em trabalhos futuros.

¹ Idealizada por Júlio Belmonte, ex-aluno de mestrado do Laboratório de Estruturas Celulares do Instituto de Física da UFRGS.

As aplicações na engenharia de tecidos e órgãos impõem restrições adicionais aos modelos de migração de células. Estes modelos devem descrever, além da migração, a dinâmica das formas e das interações entre as células, e as propriedades estruturais que se adaptam ao contexto da migração coletiva em ambientes 3D estruturados. É importante que cada célula tenha a geometria tridimensional apropriada, um núcleo rígido, a capacidade de formar lamelipódio e respostas apropriadas a estímulos externos.

Também é importante que o modelo empregue acoplamento intracelular entre inibição global e excitação local para regular a protrusão da membrana e possibilitar quebra espontânea da simetria do lamelipódio e, conseqüentemente, gerar a polarização celular necessária para iniciar a migração e promover persistência no movimento. Esta é uma condição necessária para que um sistema apresente quebra espontânea de simetria, conforme demonstrado por Turing [114].

O modelo que construímos foi baseado nestes critérios e, como veremos, a célula simulada reproduz os estágios do rastreamento que a célula executa durante a migração: protrusão, contração e retração traseira. Embora o modelo apresente acoplamento entre a protrusão frontal e a retração traseira - uma vez que são experimentalmente necessários para produzir rastreamento celular - nosso objetivo não é representar os processos internos de microescala da célula em detalhes, mas replicar a cinética e a resposta a estímulos externos de células reais em escalas de tempo curtas e longas.

Para analisar os resultados das simulações, utilizamos as ferramentas matemáticas que construímos no capítulo anterior para analisar os resultados das simulações. Primeiramente, traçamos as trajetórias e calculamos as curvas do deslocamento quadrático médio (*MSD*), então comparamos com a equação de Fürth modificada (eq. (3.12)). Observamos que os dados obtidos apresentam os três regimes previstos com bastante precisão [1]. Também analisamos os dados de *VACF* que mostram que as células simuladas apresentam alteração espontânea na direção do movimento, produzindo a caminhada aleatória persistente que observamos nos dados experimentais [1].

Como já sabemos, os regimes são caracterizados por três parâmetros bem definidos (a constante de difusão *D*, a escala de tempo de persistência *P* e o coeficiente adimensional *S*). Após o redimensionamento em termos de comprimento e tempo das unidades naturais

$\tau \equiv t / P$ e $\vec{\rho} \equiv \vec{r} / \sqrt{2DP / (1 - S)}$, veremos que as curvas de MSD das simulações colapsam em uma família de curvas de um único parâmetro S , exatamente como observamos nos experimentos [1]. Lembrando da definição de uma constante de difusão *rápida* efetiva $D_{fast} \equiv \left(\frac{2DS}{1-S}\right)$, para tempos curtos $\Delta t < SP$, e de uma constante de difusão *lenta* efetiva, que chamamos $D_{slow} \equiv \left(\frac{2D}{1-S}\right)$, para $\Delta t > P$, conforme ilustrado na Figura 3.2.

Como no movimento Browniano clássico, o movimento difusivo de curta escala de tempo da célula significa que a velocidade instantânea da célula está mal definida [1], necessitando de uma escolha cuidadosa de intervalos de tempo ao estimar a velocidade da célula no experimento e simulação. A Figura 4.4 resume esquematicamente como a equação de Fürth modificada permite a quantificação do regime para intervalos de tempo pequenos, além dos regimes de tempos médio e longo, aos quais a equação clássica de Fürth trata.

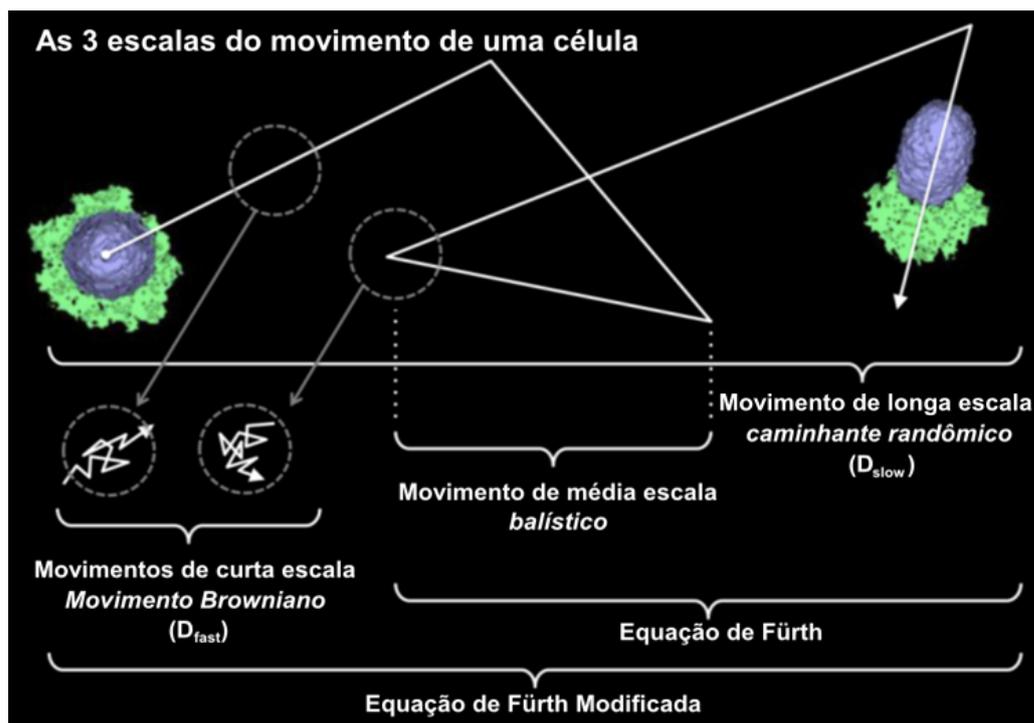


Figura 4.4 – Esquema dos três regimes temporais do deslocamento celular.

As equações de Fürth clássicas e modificadas geram os mesmos comportamentos quando tomamos intervalos de tempo médios e longos. No entanto, apenas a equação de Fürth modificada descreve o comportamento difusivo observado para intervalos de tempos pequenos, que é consequência do processo de organização e reorganização da rede de actina no lamelipódio da célula. Construímos um modelo 3D para o rastreamento de células, que gera espontaneamente todos os três regimes temporais da equação (3.12). (Adaptado de Fortuna et al. [2])

A seguir discutimos o comportamento das células biológicas que nosso modelo reproduz e as métricas apropriadas para avaliar o este modelo. Em seguida, descrevemos a implementação deste modelo conceitual para simulações em ambiente CompuCell3D. Finalmente, discutiremos os resultados e os limites de validade destas simulações.

4.2.1 Modelo Conceitual

Iniciamos representando uma célula como um objeto 3D com 3 compartimentos internos distintos: núcleo, citoplasma e lamelipódio (usaremos a fonte do Lucida Console para distinguir objetos de simulação de objetos biológicos, por exemplo, célula versus célula). A célula existe em um ambiente externo composto por um plano de substrato 2D, no qual a célula rasteja e se move, e em um espaço vazio, o meio que circunda a célula. O compartimento lamelipódio gera um campo de F-actina que promove a expansão do lamelipódio na interface lamelipódio-meio, criando um *loop de feedback* local, resultando em movimento protrusivo da célula.

As restrições de tamanho, juntamente com as restrições de energia interfacial em todos os compartimentos da célula garantem o movimento global de toda a célula na direção da expansão do lamelipódio. As mesmas restrições no compartimento lamelipódio também atuam como um mecanismo inibidor de longo alcance, restringindo a extensão do lamelipódio da célula.

4.2.2 Modelo Computacional

Nossas simulações da migração celular empregam o modelo CP/GGH [115, 116, 117], implementado no ambiente CompuCell3D (CC3D) [118]. O modelo divide o espaço em uma rede cúbica, e a cada sítio da rede $\vec{r} = (x, y, z)$ será atribuído um rótulo por um número inteiro σ . Definimos uma célula σ como o conjunto de sítios de rede que compartilham o mesmo rótulo σ . Outro rótulo, C , identifica os compartimentos internos da célula: núcleo ($C = 1$), citoplasma ($C = 2$) ou lamelipódio ($C = 3$). Quando definimos compartimentos celulares temos a possibilidade de definir diferentes propriedades biomecânicas para estas sub-regiões da célula [119, 120, 121]. Também definimos substrato e meio com rótulos σ adicionais, no entanto, o substrato tem a característica de ser fixo ao longo da simulação e o meio não tem restrições de tamanho nem subcompartimentos.

Atribuimos ao sistema uma energia efetiva que descreve todos os mecanismos biológicos que desejamos incluir em nosso modelo, e que vão reproduzir os comportamentos migratórios das células:

$$E = E_{interface} + E_{volume\ alvo} + E_{F-actin} \quad , \quad (4.3)$$

onde $E_{interface}$ é o termo típico do modelo de Potts que quantifica a energia interfacial da célula e que reproduz a interação mecânica entre a célula e o ambiente ou entre os compartimentos intracelulares:

$$E_{interface} = \sum_{\vec{r}} \sum_{\vec{v}(\vec{r})} J(\sigma(\vec{r}), C(\vec{r}); \sigma(\vec{v}), C(\vec{v})) \quad , \quad (4.4)$$

onde $J(\sigma(\vec{r}), C(\vec{r}); \sigma(\vec{v}), C(\vec{v}))$ é a energia interfacial por superfície do local da rede entre os locais vizinhos da rede nos locais em \vec{r} e \vec{v} , cujos rótulos são $\sigma(\vec{r}), C(\vec{r})$ e $\sigma(\vec{v}), C(\vec{v})$. A soma acima de $\vec{v}(\vec{r})$ é somada até o 4º vizinho em torno de \vec{r} (32 vizinhos) para reduzir a anisotropia da rede [122]. Para locais de rede vizinhos que pertencem à mesma célula e compartimento ($\sigma(\vec{r}) = \sigma(\vec{v})$ e $C(\vec{r}) = C(\vec{v})$), $J = 0$. Em todos os outros casos, definimos $J(\sigma(\vec{r}), C(\vec{r}); \sigma(\vec{v}), C(\vec{v}))$ como ferromagnéticos (ou seja, as energias interfaciais são positivas). A escolha correta das hierarquias de energia garante que o citoplasma sempre envolva o núcleo e o lamelipódio permaneça ligado ao citoplasma, substrato e meio (veja a Figura 4.4).

O segundo termo no lado direito da equação (4.3) restringe o volume de cada compartimento celular a um valor próximo do seu volume de referência:

$$E_{volume\ alvo} = \sum_{C=1}^3 \lambda_C (V_C - V_C^{alvo})^2 \quad , \quad (4.5)$$

onde V_C é o volume atual do C – ésimo compartimento de células, V_C^{alvo} é o volume alvo do compartimento e λ_C é a compressibilidade inversa do compartimento.

O último termo na equação (4.3), estende a energia efetiva usual de CP/GGH para descrever as forças protrusivas que a polimerização da F-actina exerce na borda anterior da célula. Primeiro, definimos um campo de actina associado ao compartimento lamelipódio da célula que obedece à equação simplificada de reação-difusão:

$$\frac{\partial F(\vec{r}, t)}{\partial t} = D_F \nabla^2 F(\vec{r}, t) + k_{fonte} \delta(C(x, y, 1) - 3) - k_{decai} F(\vec{r}, t) , \quad (4.6)$$

em que k_{fonte} representa a taxa de nucleação e polimerização das fibras de F-actina, que ocorrem apenas em sítios de rede pertencentes ao compartimento **Lamelipódio** e que tocam o **substrato**; D_F é uma constante de difusão efetiva para a **actina** no interior da **célula** (não modelamos o transporte ativo da F-actina); e o parâmetro k_{decai} representa a taxa de despolimerização das fibras de F-actina dentro da **célula**. Poderíamos ter modelado a equação do campo de actina de várias maneiras, desde que a concentração do campo de F-actina se mantenha razoavelmente constante dentro do **Lamelipódio** e quase zero fora.

Em seguida, usamos esse campo de F-actina para aplicar uma força ao longo da **borda meio-Lamelipódio**, favorecendo que os sítios do **meio** que estejam próximas ao **Lamelipódio** se transformem em **Lamelipódio**, simulando um efeito de flutuação de membrana que gera uma extensão direcional no corpo da **célula**. Fazemos isso usando a seguinte correção na variação da energia efetiva:

$$\Delta E_{F-actin} = \lambda_{F-actin} [F(\vec{v}) - F(\vec{r})] \delta(C(\vec{r}) - 3) \delta(\sigma(\vec{v}) - meio) , \quad (4.7)$$

onde os deltas de Kronecker δ confinam a força a agir apenas nos sítios de **borda** entre o compartimento **Lamelipódio** de uma **célula** e o **meio** circundante.

Equação (4.7) aplica o equivalente a uma força à membrana na direção da tentativa de cópia, com a magnitude $-\Delta E_{F-actin}/(\text{distância da cópia})$, onde a distância da cópia representa a distância entre os sítios da rede de origem e da cópia. $F(\vec{r})$ é um campo que representa a concentração de F-actina e $\lambda_{F-actin}$ representa a força por área por unidade de F-actina. $\Delta E_{F-actin}$ aumenta a probabilidade de que um sítio de rede no **Lamelipódio** da **célula** substitua um sítio do **meio** vizinho. A equação (4.7) não tenta fornecer uma descrição mecanicista detalhada da dinâmica da rede de F-actina e geração de força, mas com a assistência da equação (4.6), modela heurísticamente a força que a rede de actina exerce na frente da célula durante a protrusão.

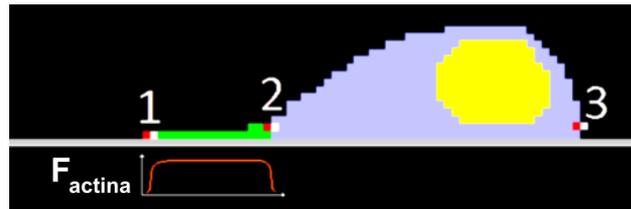


Figura 4.5 – Esquema ilustrando o rastreamento de uma célula simulada.

Na figura, no ponto 1) o campo de actina nos sítios de rede ocupados por lamelipódio, representado em verde, favorece os sítios de rede do lamelipódio sobrescrevendo os pixels do meio, aumentando o volume do compartimento lamelipódico e estendendo o compartimento para a esquerda. Em seguida, no ponto 2) A restrição de volume no compartimento lamelipódico favorece que pixels do citoplasma sobrescrevam os pixels do lamelipódio, diminuindo o volume do compartimento lamelipódico e aumentando o volume do compartimento do citoplasma. Finalmente, a restrição de volume no compartimento do citoplasma favorece que os pixels do meio sobrescrevam pixels do compartimento citoplasma, conforme destacado em 3). Juntas, essas três etapas criam um eixo de polarização que causa uma migração da célula na direção do compartimento lamelipódico (para a esquerda na figura). (Adaptado de Fortuna et al. [2])

O termo $\Delta E_{F-actin}$ acoplado à restrição de volume na equação (4.5) e energia interfacial na equação (4.4) também aumenta a taxa na qual os sítios de rede do citoplasma sobrescrevem os locais da rede do lamelipódio e os pixels do meio sobrescrevem os pixels do citoplasma na parte traseira da célula, criando um eixo de polarização que direciona a migração celular na direção do compartimento lamelipódico, como ilustrado na Figura 4.5. Consequentemente, os mecanismos do modelo também incluem um acoplamento entre a protrusão frontal da célula e a contração traseira.

4.2.3 Dinâmica de Monte Carlo para Simulações de Migração Celular

A evolução no modelo CP/GGH é simulada a partir de um processo de Monte Carlo: primeiro calculamos a energia efetiva da configuração atual da rede da célula, obtemos $E_{inicial}$ e, em seguida, selecionamos aleatoriamente um par de sítios da rede adjacentes. Propomos copiar os rótulos σ e C do primeiro sobre o segundo sítio da rede e calculamos a energia efetiva da configuração final, após a troca proposta, e obtemos E_{final} . A diferença entre as energias efetivas final e inicial $\Delta E \equiv E_{final} - E_{inicial}$ representa a **variação de energia**.

A dinâmica segue da seguinte forma:

- Se $\Delta E \leq 0$ (ou seja, se a troca proposta representar uma diminuição desta energia associada à rede) aceitamos a cópia;

- Se $\Delta E > 0$ (ou seja, se a troca promover um aumento na energia da rede), ainda assim definimos uma probabilidade $\exp\left(-\frac{\Delta E}{T_B}\right)$ de aceitar a troca, onde T_B é uma amplitude de flutuação do tipo Boltzmann (este termo está associado à amplitude do termo de ruído nas equações de Langevin e Fürth).

Nesta dinâmica, a configuração pode mudar apenas se os sítios vizinhos selecionados tiverem rótulos diferentes σ e/ou C . O tempo de simulação é contado a partir da unidade de tempo natural da simulação, o Monte Carlo Step (MCS) e consiste em $N = L_x * L_y * L_z$ escolhas e tentativas de cópia, onde L_x, L_y, L_z são as dimensões x, y e z da rede, em unidades de (sítios da rede)^{1/3}. Basicamente 1 MCS o número de tentativas equivalente ao número de sítios na rede da simulação.

4.2.4 Construindo o Ambiente Virtual para Simulações de Células Rastejando

Para simular o rastejamento de uma célula, nossas simulações usam uma rede 3D com condições de contorno periódicas, de tamanho (L_x, L_y, L_z) , definidas em unidades do raio da célula ($R_{célula}$), com $L_z = 2.1R_{célula}$ e $L_x = L_y \in [8R_{célula}, 14R_{célula}]$.

Inicialmente, a célula é composta por dois compartimentos, citoplasma e núcleo, sem lamelipódio. Um lamelipódio acabará se formando devido ao contato da célula com o substrato: após cada passo de Monte Carlo, cada pixel do citoplasma que toca o substrato tem uma probabilidade de se transformar em lamelipódio proporcional a $\left(1 - \frac{V_3}{V_3^{alvo}}\right)$. Este termo é importante apenas se o volume V_3 do lamelipódio for muito diferente do seu valor alvo V_3^{alvo} , ou seja, nos primeiros tempos de uma simulação, quando o lamelipódio estiver sendo criado. Para detalhes completos sobre a simulação CompuCell3D e as condições iniciais, consulte o Anexo 1 aonde descrevemos o passo a passo para a implementação e dos códigos de uma simulação.

Os volumes alvo, juntamente com a compressibilidade inversa de cada compartimento, permitem que a célula se mova, preservando os volumes relativos de cada compartimento dentro de uma pequena variação de menos de 1% de seus valores alvo [9].

Escolhemos as energias interfaciais entre os compartimentos celulares para garantir que os locais da rede que compõem uma célula ocupem uma região conectada da rede. O compartimento do núcleo possui alta energia interfacial, tanto com o meio quanto com o substrato, garantindo que ele permaneça cercado pelo citoplasma. O lamelipódio se liga mais fortemente ao substrato do que o citoplasma se liga ao substrato, para replicar a observação experimental de que a borda anterior de uma célula que migra em um substrato adere mais fortemente ao substrato do que a borda posterior adere ao substrato [123, 124]. A tabela A1, no Anexo 1, mostra os valores dos parâmetros de simulação de referência, que são fixos nas presentes simulações.

Para um dado raio de célula $R_{célula}$, definimos o volume alvo da célula como $V_{célula}^{alvo} = \left(\frac{4\pi}{3}\right) R_{célula}^3$. As frações volumétricas dos compartimentos do núcleo e lamelipódio são $\phi_n = \frac{V_1^{alvo}}{V_{célula}}$ e $\phi_l = \frac{V_3^{alvo}}{V_{célula}}$. Nossas simulações exploraram os intervalos de parâmetros: $0,05 \leq \phi_l \leq 0,3$, $0 \leq \lambda_{F-actin} \leq 250$ e $10(\text{sítios da rede})^{1/3} \leq R_{célula} \leq 20(\text{sítios da rede})^{1/3}$.

A Figura 4.6 mostra o comportamento típico de migração de células para um conjunto típico de parâmetros. Uma célula suspensa no meio é simétrica, carece de um lamelipódio e não migra (A, A', A''). Quando o citoplasma celular (cinza) toca o substrato, forma-se um lamelipódio (verde) aproximadamente simétrico e se espalha sobre o substrato, formando um halo circular em torno do citoplasma (B, B', B''). Instabilidade no feedback entre a equação da reação-difusão da F-actina, equação (4.6) e protrusão da membrana devido à equação (4.7) faz com que o lamelipódio perca espontaneamente sua simetria circular e várias protrusões incipientes competem para arrastar o centro de massa da célula (C, C', C'') no plano xy .

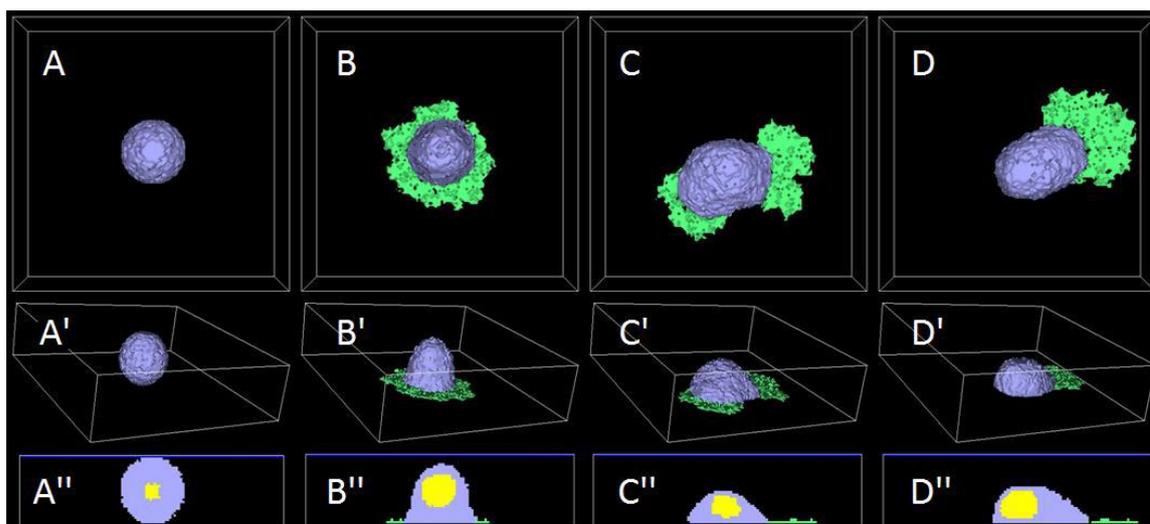


Figura 4.6 – Início da simulação de uma célula simulada em ambiente CC3D.

A célula, inicialmente não polar e suspensa que entra em contato com um substrato e desenvolve polarização na direção do movimento com o citoplasma em violeta, lameliopódio em verde e núcleo em amarelo. A: Célula inicial não móvel e simétrica sem lameliopódio; B: Célula não móvel com lameliopódio simétrico; C: a competição entre os lados leva à quebra de simetria; D: A seleção de um lado dominante leva a um movimento persistente na direção que aponta do núcleo para o centro de massa do lameliopódio. A célula alterna intermitentemente entre os estados C e D, mudando de direção a cada ciclo. Pontos de vista: A, B, C, D: vista superior; A', B', C', D': visão 3/4; A'', B'', C'', D'': seção transversal. (Adaptado de Fortuna et al. [2])

O feedback positivo entre o movimento celular e a dinâmica da F-actina reforça a assimetria, selecionando uma protrusão principal, e a célula desenvolve uma morfologia clássica de migração (D, D', D''). De tempos em tempos, o lameliopódio pode se dividir, retornando à morfologia das protrusões incipientes concorrentes vistas em (C, C', C''); quando uma seção do lameliopódio vence, a célula começa a se mover em uma nova direção.

Como em experimentos, o lameliopódio (verde) é muito mais fino que o resto da célula. Seções sagitais (A'', B'', C'', D'') mostram o núcleo celular (amarelo) incorporado no citoplasma.

4.3 Resultados das Simulações de Migração Celular

A Figura 4.7 mostra o deslocamento total da célula de sua posição inicial após 10^5 MCS em função de $\lambda_{F-actina}$ para 4 valores de ϕ_l e 3 valores de $R_{célula}$. A dependência de $\lambda_{F-actina}$ é sempre qualitativamente a mesma: para pequenos $\lambda_{F-actina}$, o deslocamento total da célula pode ser menor que o diâmetro da célula ($2R_{célula}$); portanto, o movimento

do centro de massa da célula permanece no regime difusivo de intervalos de tempo pequenos e o gráfico de log-log do MSD mostra uma linha reta com a inclinação 1. Classificamos as células com esses comportamentos como não-móveis.

Para pequena fração volumétrica de lamelipódio ϕ_l , o lamelipódio nunca atinge uma configuração simétrica pois não tem volume suficiente para contornar a célula, favorecendo a mobilidade celular. No entanto, para ϕ_l pequeno mas com $\lambda_{F-actina}$ grande, o lamelipódio pode se desprender do resto da célula e a migração acaba.

Para uma fração maior do volume lamelipódio ϕ_l , a migração requer que $\lambda_{F-actina}$ seja maior que um valor mínimo. Para $\lambda_{F-actina}$ fixo, aumentar ϕ_l diminui o tempo de persistência do movimento celular, de modo que as trajetórias são mais tortuosas.

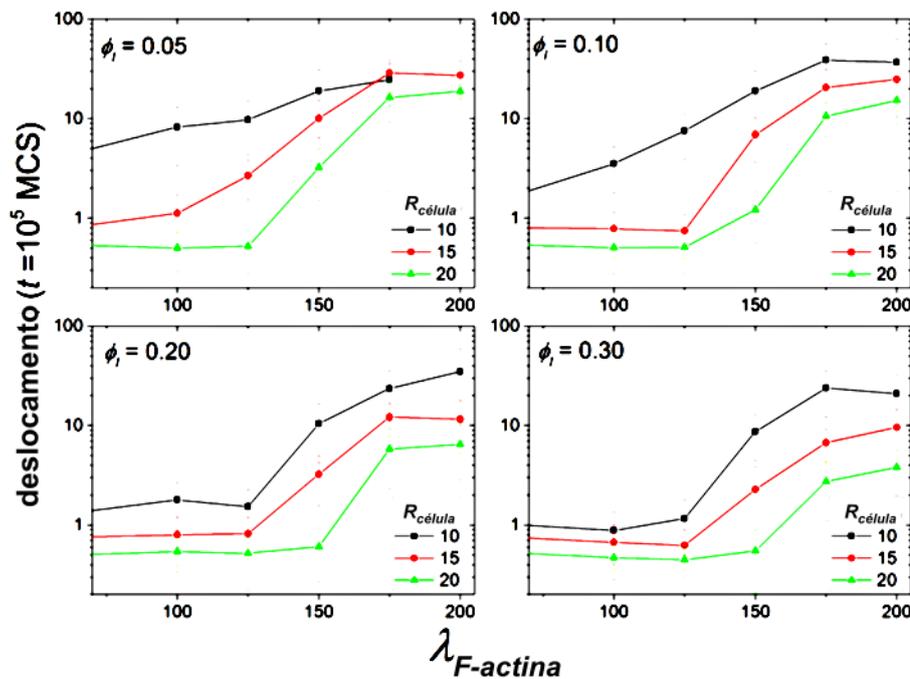


Figura 4.7 – Gráficos de deslocamento médio para diferentes parâmetros de simulações. Deslocamentos médios medidos após 10^5 MCS em unidades de $R_{célula}$. Para valores pequenos de $\lambda_{F-actina}$ a célula mal se move. Os símbolos e barras mostram médias e erros padrão para 5 réplicas por conjunto de parâmetros. (Adaptado de Fortuna et al. [2])

A Figura 4.8 mostra configurações de amostra e conjuntos de 10 trajetórias cada uma para células com $R_{célula} = 15(\text{sítios da rede})^{1/3}$, para uma faixa de valores de $\lambda_{F-actina}$ (a força que cada unidade de lamelipódio gera) e ϕ_l (a fração do volume lamelipódio). A cor de fundo é ciano para células não móveis, cinza para células em migração e vermelho claro para simulações em que o compartimento lamelipódio da célula se

desprende do compartimento do citoplasma. Os parâmetros determinam o tempo de persistência do movimento celular.

Para cada par de parâmetros, o *MSD* das células se ajusta à equação de Fürth modificada, equação (3.12), com um conjunto único de *S*, *P* e *D*. As figuras de apoio A1 e A2 no Anexo 1 mostram resultados equivalentes para $R_{célula} = 10$ e 20 (sítios da rede)^{1/3}.

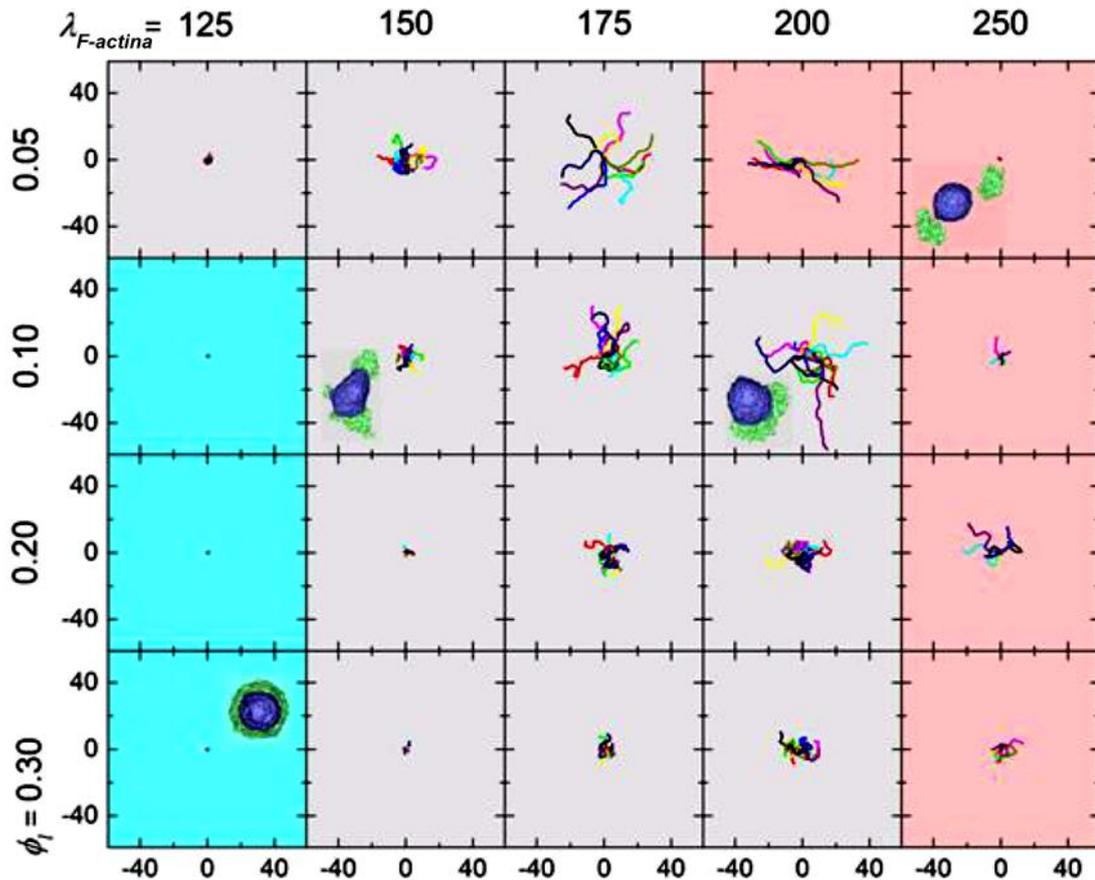


Figura 4.8 – Trajetórias obtidas por simulações para diferentes valores de ϕ_l e $\lambda_{F-actina}$. Trajetórias e morfologias de algumas células selecionadas. Cada painel mostra 10 trajetórias de células para 10^5 MCS de simulação, com $R_{célula} = 15$ (sítios da rede)^{1/3}. Os eixos mostram as posições *x* e *y* medidas em relação ao centro da rede celular em unidades de $R_{célula}$. A cor de fundo indica confinamento (ciano), migração persistente (cinza) e descolamento do lamelipódio (vermelho claro). Maiores $\lambda_{F-actina}$ e menores ϕ_l aumentam a motilidade celular. Quando $\lambda_{F-actina}$ é muito pequeno, o lamelipódio permanece simétrico e a célula não migra, enquanto que para ϕ_l muito pequeno, o lamelipódio não é suficiente para conduzir a migração celular (não mostrado). (adaptado de Fortuna et al. [2])

A Figura 4.9 mostra *MSD* redimensionado em relação a diferentes intervalos de tempo (a escala obtida ajustando-se para *D* e *P* e *S* na equação (3.12)) para uma variedade de regimes de parâmetros (tabela A2 do Anexo 2) mostrando que todas as trajetórias colapsam em uma família de curvas caracterizada por um único parâmetro *S*.

Os *MSDs* obtidos pelas simulações concordam com a equação de Fürth modificada e, portanto, com os dados experimentais [1]. As inserções apresentam as curvas *MSD* em unidades naturais, como definidas na equação (3.9). As figuras A3 e A4 no Anexo 2, mostram resultados equivalentes para $R_{célula} = 10$ e 20 (*sítios da rede*)^{1/3}.

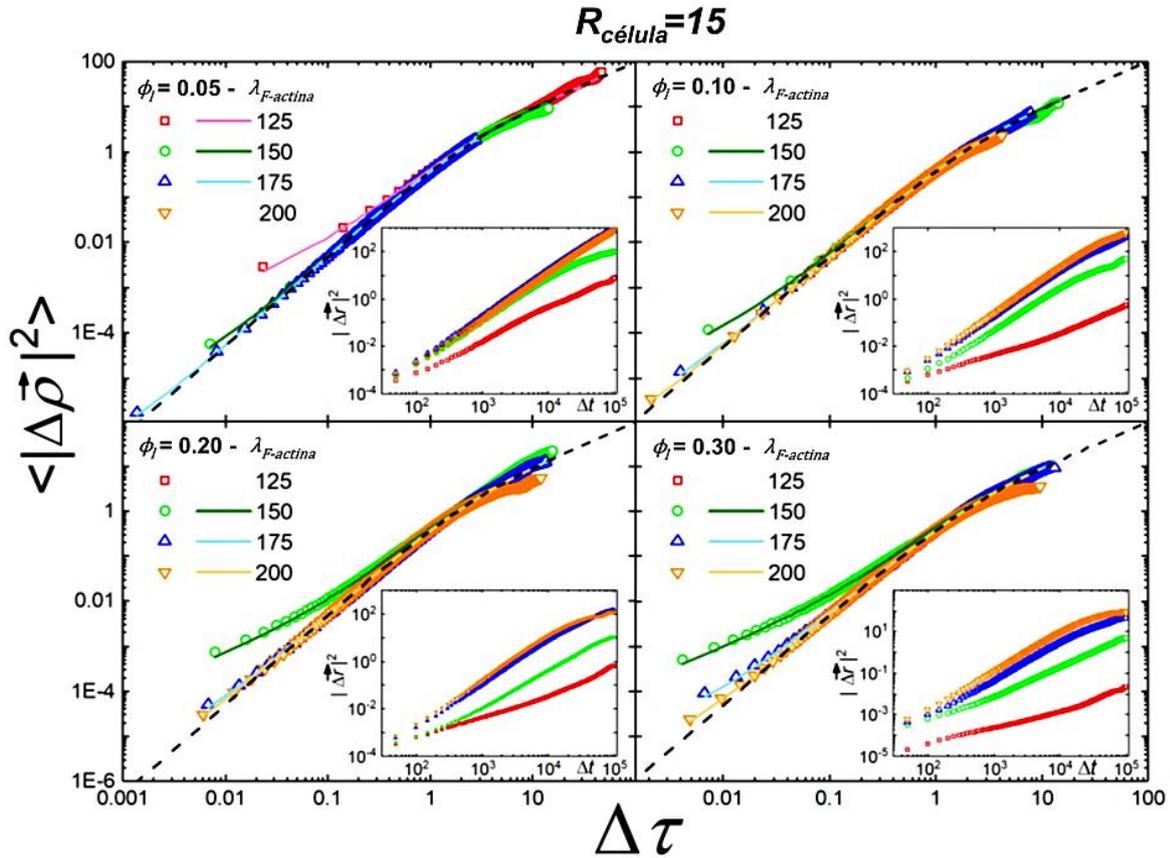


Figura 4.9 – *MSD* ($\langle |\Delta \vec{\rho}|^2 \rangle$) obtido pelas simulações para diferentes valores de ϕ_l e $\lambda_{F-actina}$. Gráficos em uma escala log-log, redimensionada, com média de 5 execuções. As inserções apresentam os mesmos dados com o comprimento indicado em múltiplos de raio de célula e MCS. Observe que todas as curvas de simulação redimensionadas colapsam na mesma família de curvas de um parâmetro dado por S , como publicamos em Thomas et al. [1]. (Adaptado de Fortuna et al. [2])

Diferentes processos biomecânicos podem produzir curvas *MSD* idênticas [84, 10]. A comparação entre as autocorrelações temporais da velocidade pode, em princípio, resolver algumas dessas redundâncias. A função auto-correlação de velocidade (*VACF*) é definida pela equação (1.2). Lembrando que, para uma caminhada aleatória persistente clássica no estado estacionário, *VACF* é uma medida útil que pode ser obtida tomando a segunda derivada da curva *MSD*.

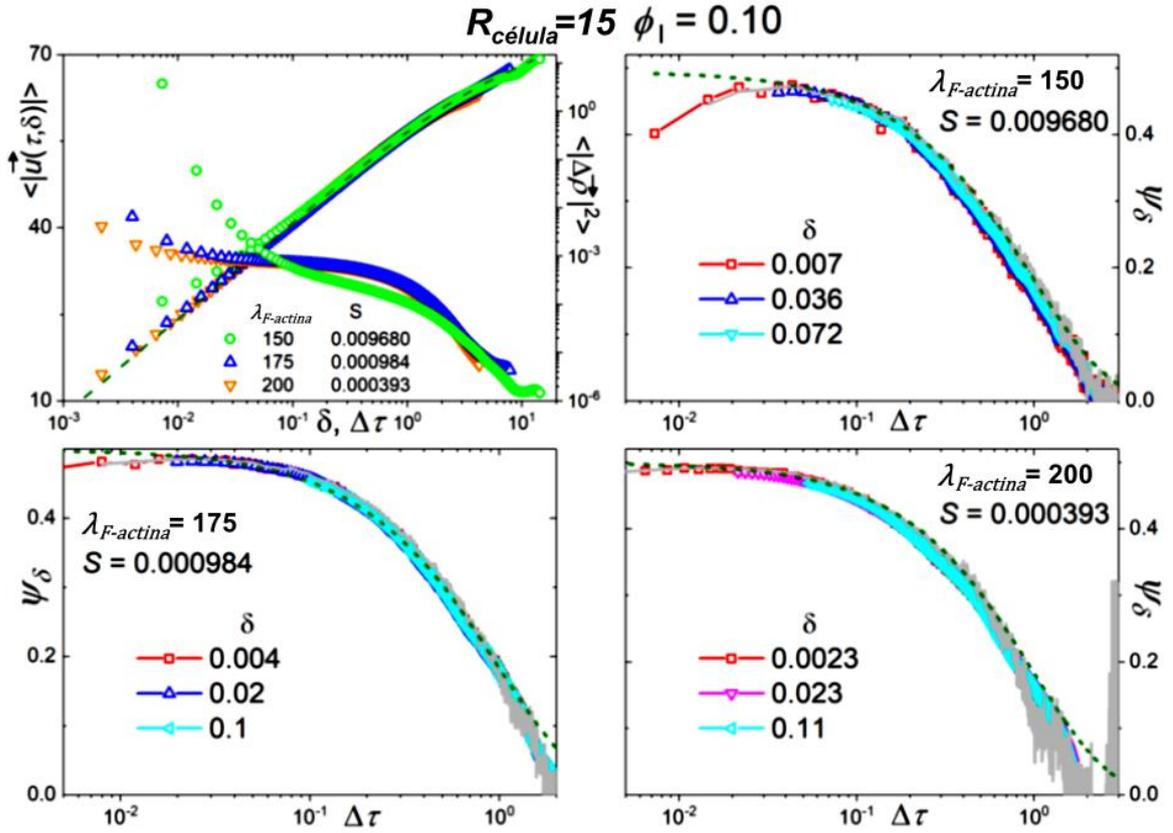


Figura 4.10 – Velocidade média $\langle |\vec{u}(\tau, \delta) | \rangle$ e da autocorrelação $\psi_\delta(\Delta\tau)$ nas simulações. O painel mostra os gráficos para as simulações com $R_{célula} = 15$ (sítios da rede)^{1/3}, $\lambda_{F-actina} = 150, 175$ e 200 e $\phi_l = 0,10$. No painel superior esquerdo temos uma composição com a velocidade média $\langle |\vec{u}(\tau, \delta) | \rangle$ em função de δ , juntamente com curvas MSD (em função de $\Delta\tau$) para três valores diferentes de $\lambda_{F-actina}$. Nos outros painéis temos as médias de $\psi_\delta(\Delta\tau)$, em função de $\Delta\tau$ para diferentes valores de δ , para os mesmos dados. Em todos os painéis, a linha tracejada de oliva corresponde ao modelo original da Fürth. (Adaptado de Fortuna *et al.* [2])

No entanto, quando o movimento em intervalos de tempo pequenos é difusivo, a velocidade instantânea não está bem definida [1], e devemos usar uma velocidade média calculada pela aproximação secante, como $\vec{u}(\tau, \delta) = \frac{\vec{p}(\tau+\delta) - \vec{p}(\tau)}{\delta}$ em unidades naturais. E, a partir de $\vec{u}(\tau, \delta)$, podemos definir uma função de auto-correlação da velocidade média $\psi_\delta(\Delta\tau)$, conforme apresentamos na equação (3.18). A função ψ_δ detecta correlações artificiais quando $\delta \geq \Delta\tau$ pois, nesse caso, os intervalos usados para calcular $\vec{u}(\tau, \delta)$ e $\vec{u}(\tau + \Delta\tau, \delta)$ se sobrepõem.

A Figura 4.10, no painel superior esquerdo, apresenta a média do módulo das velocidades $\langle |\vec{u}(\tau, \delta) | \rangle$, calculada levando-se em conta todos os pontos de trajetória e para diferentes execuções, para simulações com $R_{célula} = 15$ (sítios da rede)^{1/3}, $\phi_l = 0,10$ e $\lambda_{F-actina} = 150, 175$ e 200 em função de δ : $\langle |\vec{u}(\tau, \delta) | \rangle$ não converge para um valor finito

como $\delta \rightarrow 0$, devido ao comportamento difusivo das células em pequenos intervalos de tempo. Traçamos os MSDs correspondentes juntos para enfatizar a existência dos três regimes cinéticos. Os outros três painéis apresentam $\psi_\delta(\Delta\tau)$ versus $\Delta\tau$ para diferentes valores de δ correspondentes às simulações com $R_{célula} = 15(\text{sítios da rede})^{1/3}$ e $\phi_l = 0,10$ e $\lambda_{F-actina}$ conforme indicado. Mostramos dados apenas para $\delta < \Delta\tau$.

A equação de Fürth modificada, ajustada para esses dados de simulação, resulta nos valores de S conforme indicado nos painéis da figura. Para $\Delta\tau > S$, todas as curvas redimensionadas são idênticas. Para $\Delta\tau < S$, a segunda derivada da equação de Fürth modificada não descreve a diminuição observada em $\psi_\delta(\Delta\tau)$. Isso ocorre devido à precisão finita na estimativa da velocidade média das células: para δ pequeno, o deslocamento não correlacionado na direção perpendicular de polarização domina, em comparação com o deslocamento correlacionado paralelo à polarização. Discutiremos mais sobre o conceito de polarização no que segue.

Ao calcular $\psi_\delta(\Delta\tau)$ para δ pequena e precisão finita, a contribuição da componente de correlação da dinâmica de Langevin é eventualmente perdida, resultando que $\psi_\delta(\Delta\tau)$ diminui à medida que $\Delta\tau$ diminui (desde que seja maior que δ). Assim, para $\delta < \Delta\tau < S$, a segunda derivada da equação original de Fürth mede a auto-correlação entre os componentes da velocidade na direção do deslocamento persistente, enquanto o $\psi_\delta(\Delta\tau)$ obtido numericamente mede os componentes de correlação de um movimento Browniano, e que vai para zero quando $\Delta\tau \rightarrow 0$. Anteriormente vimos que trajetórias celulares experimentais mostram comportamentos idênticos.

4.3.1 Movimento Paralelo e Perpendicular ao Eixo de Polarização

Durante o processo de rastejamento o citoesqueleto de actina apresenta uma polarização direcional, sempre empurrando a membrana celular forçando-a de dentro pra fora e fazendo o lamelipódio se estender, o que gera polarização *back-to-front* o que faz com que a célula se avance com o núcleo na parte posterior. Apesar deste fenótipo típico do movimento, as forças geradas pela polimerização da F-actina dentro do lamelipódio continuam sendo consequência de processos estocásticos.

Sabendo disso, entendemos que o movimento da célula está totalmente sujeito às flutuações estocásticas em consequência da polimerização da F-actina nas laterais da célula, quando analisamos intervalos de tempo muito pequenos. Como um efeito Browniano que atua no eixo perpendicular ao eixo principal do movimento, que pode ser analisado como um processo de Wiener, no qual a velocidade instantânea diverge. Enquanto isso, no eixo principal da polarização da célula, o movimento segue uma dinâmica de Langevin e a velocidade instantânea é bem definida.

Em outras palavras, para um dado intervalo de tempo infinitesimal dt , durante o qual o eixo de polarização permanece constante, o deslocamento da célula pode ser escrito como $d\vec{r} = d\vec{r}_{\parallel} + d\vec{r}_{\perp}$, onde $d\vec{r}_{\parallel}$ e $d\vec{r}_{\perp}$ são os deslocamentos paralelos e ortogonais à direção da polarização, respectivamente. O deslocamento durante um intervalo de tempo finito é a soma de uma sucessão destes deslocamentos infinitesimais, e que são ajustados conforme a direção da polarização muda.

A média ao longo do tempo e as diferentes realizações desse processo resultam em um deslocamento do quadrado médio dado por:

$$\langle |\Delta\vec{r}|^2 \rangle = \langle \left| \int d\vec{r}_{\parallel} \right|^2 \rangle + \langle \left| \int d\vec{r}_{\perp} \right|^2 \rangle + 2 \langle \left| \int d\vec{r}_{\parallel} \right| \cdot \left| \int d\vec{r}_{\perp} \right| \rangle. \quad (4.8)$$

onde o primeiro termo no lado direito fornece a equação original de Fürth, pois nessa direção a célula segue um processo de Langevin. Por outro lado, na direção perpendicular ao eixo de polarização, o processo de Wiener gera o segundo termo no lado direito da equação (4.8), que é proporcional a Δt e o terceiro termo desaparece, conforme é demonstrado no artigo que está sendo produzido por Rita M. C. de Almeida, Guilherme S. Y. Giardini, Mendeli Vainstein, James A. Glazier e Gilberto L. Thomas com o título *Exact solution for the Anisotropic Ornstein-Uhlenbeck Process* [90].

4.4 Discussões sobre os Resultados das Simulações

A validação de qualquer resultado de simulação uma comparação entre os dados da simulação e os dados experimentais. Em experimentos de migração celular, rastrear as posições do centro de massa ou do centro geométrico das células individuais e traçar o deslocamento ao quadrado médio versus o intervalo de tempo é uma medida padrão.

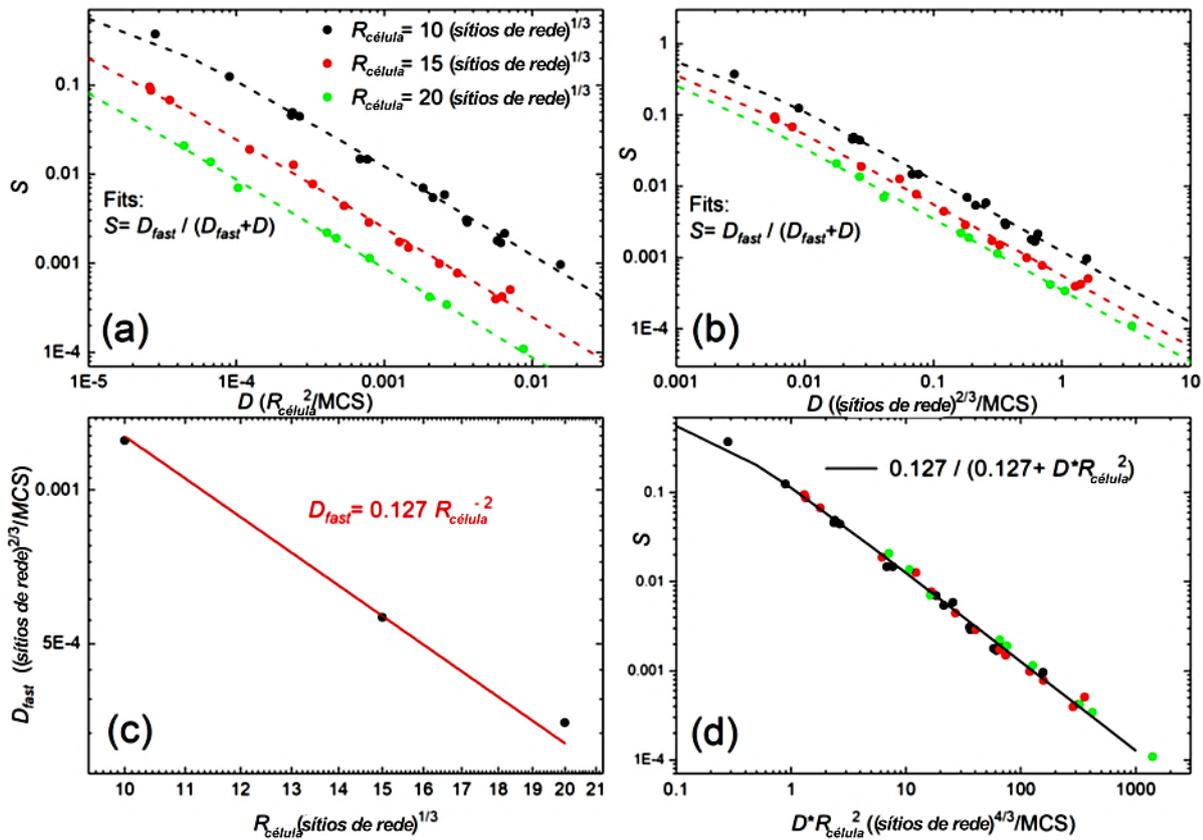


Figura 4.11 – Correlação entre S e D obtidos para simulações com diferentes parâmetros. O colapso dos dados em uma única curva sugere que o regime difusivo rápido decorre das flutuações da membrana. No gráfico (a) notamos o efeito do tamanho da célula simulada em valores de $R_{célula}$, mas que pode ser ajustado com grande concordância, conforme sugerido pelo gráfico (d). (adaptado de Fortuna *et al.* [2])

A equação clássica de Fürth permite esta comparação direta entre experimentos e simulações, mas exclui o movimento difusivo para intervalos de tempos muito pequenos, pois ficam fora do alcance geralmente observado nos experimentos. No entanto, o movimento difusivo de intervalos de tempos pequenos pode surgir dos mecanismos biomecânicos fundamentais que geram o movimento celular e afetam o tempo que um lamelipódio leva para formar, dissipar ou reorganizar. De fato, a Figura 4.11 apoia fortemente essa hipótese: plotamos S versus D na Figura 4.11a, onde medimos D em unidades de $R_{célula}^2/MCS$, conforme os dados listados na tabela A2 do Anexo 2.

O fato de os dados se ajustarem tão bem em uma única curva significa que D_{fast} é constante para um determinado valor de $R_{célula}$. Ajustamos os pontos com a função $S = \frac{D_{fast}}{D_{fast}+D}$, usando o valor médio de D_{fast} para simulações com o mesmo $R_{célula}$. A Figura 4.11b mostra S versus D , mas para D dado em unidades de $\frac{(sítios\ da\ rede)^{2/3}}{MCS}$. A Figura 4.11c, em

seguida, plota os valores da média D_{fast} em unidades de $\frac{(\text{sítios da rede})^{2/3}}{MCS}$ e mostra que $D_{fast}(R_{célula}) \sim R_{célula}^{-2}$. Usando essa relação para redimensionar o eixo das abscissas na Figura 4.11d, observamos que os dados são recolhidos na mesma curva para todos os valores de $R_{célula}$.

As Figura 4.11 mostram que o termo adicional na curva MSD devido à difusão em intervalos de tempo curto depende linearmente do número de sítios na superfície da célula o que sugere que este é um termo estocástico devido a flutuações da superfície celular. Experimentos também mostram uma correlação entre S e D [1], embora mais fraca. Todas as simulações usaram o mesmo valor de T_B , o parâmetro de simulação que controla as flutuações no modelo CP/GGH. Não esperaríamos que células reais de diferentes tipos tivessem a mesma amplitude de flutuação da membrana, o que poderia explicar esta divergência.

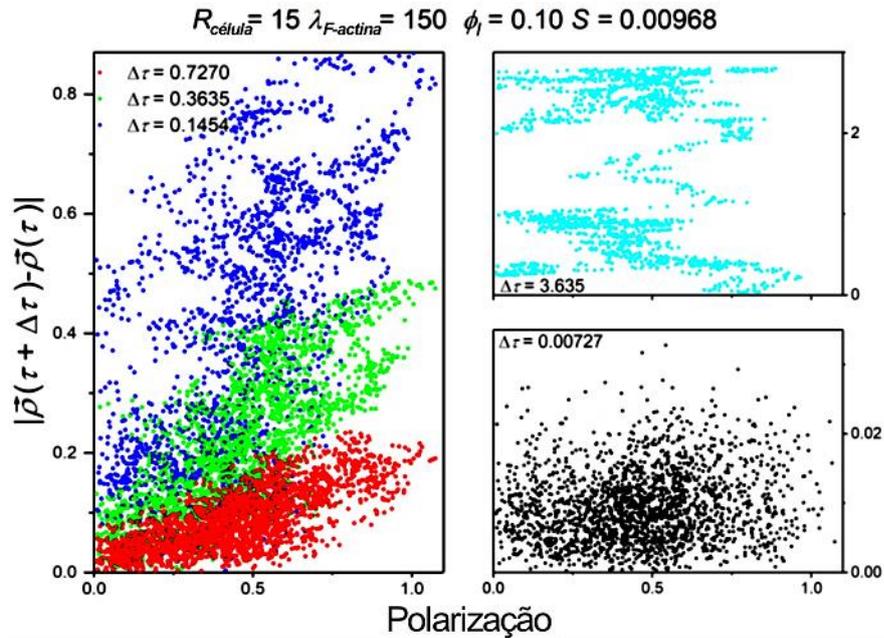


Figura 4.12 – Deslocamento da célula como uma função da Polarização celular. Deslocamento calculado em unidades de raio celular para $\Delta\tau < S$ (pontos pretos, painel inferior direito), $S < \Delta\tau < 1$ (pontos azuis, verdes e vermelhos, painel esquerdo) e $\Delta\tau > 1$ (pontos cianos, superior painel direito) como uma função da polarização celular para uma simulação executada com $R_{célula} = 15$, $\phi_l = 0,10$ e $\lambda_{F-actina} = 175$. (adaptado de Fortuna *et al.* [2])

A Figura 4.12 mostra os módulos de deslocamento $|\rho(\tau + \Delta\tau) - \rho(\tau)|$ para τ diferente para uma corrida de simulação, calculada usando diferentes valores de $\Delta\tau$, em função da polarização celular, aqui definida como a distância entre o lamelipódio e os centros de massa do núcleo, medidos no início do intervalo de tempo. Para $\Delta\tau < S$, no regime difusivo

de curto, deslocamento e polarização não são correlacionados (pontos pretos na Figura 4.12 painel inferior direito). Para $S < \Delta\tau < 1$, no regime balístico, o deslocamento e a polarização se correlacionam (Figura 4.12, painel esquerdo). Para $\Delta\tau > 1$, o regime difuso longo, esperamos que a direção da polarização da célula mude ao longo dos intervalos de $\Delta\tau$, reduzindo a correlação na velocidade (média).

Em resumo, nossa simulação de rastejamento de células apresentam polarização espontânea, migração persistente e perda intermitente e reorganização do lamelipódio celular, típicas de células que rastejam *in vitro* em um substrato plano e homogêneo.

Os resultados concordam com os *MSDs* produzidos pela equação de Fürth modificada (equação (3.12)) e, conseqüentemente, com quaisquer medições experimentais da mobilidade para uma grande variedade de tipos de células que se ajustam à esta equação.

A equação de Fürth modificada adiciona uma correção difusiva para intervalos de tempo pequenos à equação de Fürth original. Já mostramos que os dados experimentais concordam com essa correção e que não resultam de erros na medição da posição [1], como sugerido algumas vezes na literatura [13, 14]. No entanto, testamos nossas simulações para erros de localização como uma explicação alternativa para difusão em pequenos intervalos de tempo, mas descartamos essa possibilidade: erros de localização produziriam desvios em pouco tempo *MSD* várias ordens de magnitude menores [2].

Os tempos de execução para as simulações são aproximadamente proporcionais ao número de locais da rede de simulação $N = L_x * L_y * L_z$, que é, por construção, proporcional a $R_{célula}^3$ e aproximadamente independente de $\lambda_{F-actina}$ e ϕ_l . A figura A5 de suporte mostra os tempos de execução para simulações com $\lambda_{F-actina} = 150$ e $\phi_l = 0,05$ e $0,10$ executadas em uma CPU Intel i7-3770K. Para uma célula com $R_{célula} = 15(\text{sítios da rede})^{1/3}$, uma simulação típica de migração de duração 10^5 MCS leva, aproximadamente, 200 minutos. Ou seja, as simulações são rápidas o suficiente para serem usadas em simulações de órgãos e tecidos com grande número de células.

5 Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho apresentamos uma abordagem teórica e computacional sobre o processo de migração celular. Identificamos uma deficiência importante na teoria canônica que não descrevia o movimento aleatório que as células realizam para intervalos de tempo pequenos e propusemos uma modificação empírica para o modelo que se ajusta muito bem aos dados experimentais e de simulações.

A modificação proposta para a equação de Fürth mostra que o regime difusivo para tempos curtos é uma característica importante e relevante do comportamento das células. A equação modificada apresenta três regimes distintos: difusivo curto, quase-balístico e difusivo longo; esta equação pode ser renormalizadas em termos de parâmetros adimensionais. A existência do regime difusivo curto mostra que a velocidade média das células diverge quando o intervalo de tempo tende a zero, e que medir a velocidade das células não é uma medida adequada para ser utilizada em comparação entre diferentes experimentos.

Foi apresentado um protocolo para o ajuste das curvas de *MSD* obtidas experimentalmente, ou de simulações, a equação modificada de Fürth, e posterior renormalização para a forma adimensional da equação, o que possibilita a comparação entre os resultados de diferentes experimentos ou simulações apenas por um parâmetro adimensional S .

As simulações realizadas a partir do modelo computacional em ambiente virtual CompuCell3D, diferente de outros modelos na literatura, é tridimensional e simula o comportamento de uma célula composta pelas organelas intracelulares que estão envolvidas na biomecânica do movimento celular. O processo de quebra de simetria que permite que a célula comece a migrar de forma persistente, acontece espontaneamente, de forma muito similar ao observado no sistema real. As simulações apresentaram baixo custo computacional, e já estão sendo adaptadas para simulações de movimento coletivo de células.

Apresentamos todas as etapas necessárias para a implementação de simulações de mobilidade celular em ambiente CompuCell3D, o que possibilita que qualquer pessoa interessada implemente sua própria simulação de mobilidade celular.

A existência do regime difusivo curto fornece informações quantitativas sobre os mecanismos subcelulares que desestabilizam a polarização celular responsável pelo regime balístico e, portanto, podem ser críticos para explicar o mecanismo de migração celular em um experimento específico. A Figura 5.1 ilustra os centros de massas dos compartimentos em uma vista de cima e em um corte transversal, para duas situações: A) célula sem polarização, as projeções dos centros de massas se sobrepõem; e, B) célula polarizada durante a migração, com uma nítida separação entre as projeções dos centros de massas.

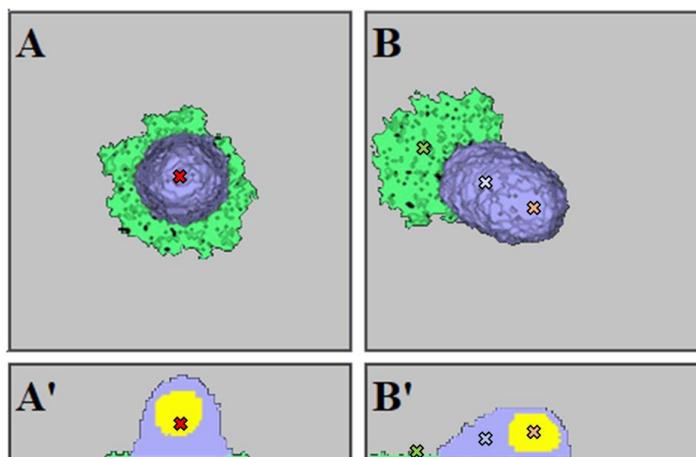


Figura 5.1 – Posições dos centros de massas de célula não-polarizadas e polarizadas.

As imagens foram obtidas por células simuladas em CompuCell3D. As figuras A e A' representam uma célula cuja simetria espacial não foi quebrada e a projeção das posições dos centros de massas sobre o plano do substrato são praticamente as mesmas para núcleo, citoplasma e lameliopódio. B e B' representam uma célula com a simetria espacial quebrada. As cruces localizam o centro de massa do núcleo, citoplasma e lameliopódio e vemos como as projeções não coincidem e que o núcleo fica na parte posterior, uma vez que a migração acontece a partir do lameliopódio puxando a célula. (adaptado de Thomas *et al.* [125])

5.1 Perspectivas

Os resultados das simulações indicam a existência de uma correlação entre a polarização da célula e o seu deslocamento futuro. Sabemos que a polarização desempenha um papel fundamental na migração celular, tanto no que diz respeito ao movimento de uma célula sobre um substrato plano, quanto às células que se movem coletivamente em um tecido. De fato, a polarização é importante em todo modelo de matéria ativa [126, 76], pois a atividade das partículas necessariamente quebra a simetria espacial. Embora existam muitas definições diferentes de polarização, como a relativa ao eixo basal-apical nos tecidos epiteliais, neste trabalho nos concentramos na polarização celular relacionada à *back-to-front* associada à migração de células eucariontes.

A polarização durante a migração celular é uma consequência da organização biológica dentro da célula e, portanto, pode ser tomada como uma possível indicação sobre o movimento celular. De fato, Maiuri *et al.* mostraram que existe um acoplamento universal entre velocidade e polarização (vamos chamar *UCSP*, do inglês *Universal Coupling between Speed and Polarization* [127]), de modo que polarização e velocidade estão correlacionadas. O conceito de *UCSP* baseia-se no fato de que a velocidade e a persistência das células dependem da estabilidade e da rotatividade contínua dos filamentos de actina no lamelipódio [128, 129]. Nesse caso, deve haver uma relação entre a polarização celular e as medidas cinéticas, como curvas *MSD* ou funções de autocorrelação de velocidade (*VACF*).

Para verificar o comportamento das medidas de polarização devemos comparar com as medidas de velocidade, porém, como já demonstramos, a medida de velocidade depende do intervalo de tempo. Assim, precisamos estimar a correlação entre esses vetores polarização e o deslocamento celular para diferentes intervalos de tempo. No entanto, para intervalos de tempo muito pequenos (menores que *SP*), os deslocamentos são dominados por flutuações aleatórias na direção perpendicular a polarização da célula [1, 2, 90] e para intervalos de tempo muito grandes, maiores que o tempo de persistência *P*, o deslocamento também pode se descorrelacionar com a polarização celular.

Isso significa que, para avaliar o desempenho da polarização celular como preditores de deslocamento celular, devemos primeiro escolher um intervalo de tempo adequado. Definiremos como $\Delta\tau_{\text{ótimo}}$ o intervalo de tempo ótimo para obter o deslocamento celular que tenha a maior correlação com a polarização celular. Podemos fazer uma estimativa teórica de $\Delta\tau_{\text{ótimo}}^{\text{teórico}}$ analisando qual é o $\Delta\tau$ no qual a temos a maior inclinação na curva log-log $\langle |\Delta\vec{\rho}|^2 \rangle$ versus $\Delta\tau$. Ou seja, a partir da equação (3.16) para o expoente de difusão α , vamos encontramos o valor máximo $\alpha_{\text{ótimo}}$ que indica a situação na qual o movimento está mais próximo do balístico, quando a definição de velocidade é mais coerente. Nossa hipótese é de que o deslocamento e a polarização das células apresentam uma correlação máxima para este intervalo de tempo nesse intervalo de tempo $\Delta\tau_{\text{ótimo}}$ que corresponde ao máximo valor de α , quando o regime de mobilidade está mais próximo de ser balístico.

6 Referências Bibliográficas

- [1] G. L. Thomas, I. Fortuna, G. C. Perrone, J. A. Glazier, J. M. Belmonte e R. M. C. de Almeida, “Parameterizing cell movement when the instantaneous cell migration velocity is ill-defined,” *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 550, p. 124493, 2020.
- [2] I. Fortuna, G. Perrone, E. Susin, M. Krug, J. Belmonte, G. Thomas, J. A. Glazier e R. M. C. e de Almeida, “CompuCell3D simulations reproduce mesenchymal cell migration on flat substrates,” *Biophysical Journal*, vol. 118, pp. 2801-2815, 2020.
- [3] R. Fürth, “Die Brownsche Bewegung bei Berücksichtigung einer Persistenz der Bewegungsrichtung. Mit Anwendungen auf die Bewegung lebender Infusorien,” *Zeitschrift für Physik*, vol. 2, pp. 244-256, 1920.
- [4] L. S. Ornstein, *P K Akad Wet-Amsterd*, pp. 96-108, 1919.
- [5] V. Ruprecht, S. Wieser, A. Callan-Jones, M. Smutny, H. Morita, K. Sako, V. Barone, M. Ritsch-Marte, M. Sixt, R. Voituriez e C. Heisenberg, “Cortical Contractility Triggers a Stochastic Switch to Fast Amoeboid Cell Motility,” *Cell*, vol. 160, pp. 673-685, 2015.
- [6] C. Weijer, “J Cell Sci. 2009: p. 3215-3223,” *J Cell Sci*, pp. 3215-3223, 2009.
- [7] P. Martin, *Science*, pp. 75-81, 1997.
- [8] W. Muller, *Trends Immun.*, pp. 326-333, 2003.
- [9] J. Staruss, T. Bley, L. Sogaard-Andersen e A. Deutsch, *J Stat Phys*, pp. 269-286, 2007.
- [10] D. Selmecki, S. Mosler, P. H. Hagedorn, N. B. Larsen e H. Flyvbjerg, *Biophys J.*, pp. 912-931, 2005.
- [11] H. Takagi, M. J. Sato, T. Yanagida e M. Ueda, *PLoS One*, p. e2648, 2008.
- [12] L. Li, S. F. Norrelykke e E. C. Cox, *PLoS One*, vol. 3, p. e2093, 2008.
- [13] L. Li, E. C. Cox e H. Flyvbjerg, *Phys Biol*, 2011.
- [14] J. N. Pedersen, L. Li, C. Gradinaru, R. H. Austin, E. C. Cox e H. Flyvbjerg, *Phys Rev E*, vol. 94, p. 062401, 2016.
- [15] V. Mironov, V. Kasyanov e R. R. Markwald, “Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, pp. 667-673, 2011.
- [16] C. J. Weijer, “Collective cell migration in development,” *Journal of Cell Science*, vol. 122, pp. 3215-3223, 2009.
- [17] P. Martin, “Wound Healing - Aiming for Perfect Skin Regeneration,” *Science*, vol. 276, pp. 75-81, 1997.

- [18] E. R. e. al., “Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing,” *Molecular Systems Biology*, vol. 14, p. e814, 2018.
- [19] W. A. Muller, “Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response,” *TRENDS in Immunology*, vol. 24, pp. 326-333, 2003.
- [20] T. B. L. S.-A. A. D. J. Staruss, “A New Mechanism for Collective Migration in *Myxococcus xanthus*,” *Journal of Statistical Physics*, vol. 128, pp. 269-286, 2007.
- [21] D. Lauffenburger e A. Horwitz, “Cell migration: a physically integrated molecular process,” *Cell*, vol. 84, p. 359–369., 1996.
- [22] A. Ridley, M. Schwartz, K. Burridge, R. Firtel, M. Ginsberg, G. Borisy, J. Parsons e A. Horwitz, “Cell migration: integrating signals from front to back,” *Science*, vol. 302, p. 1704–1709, 2003.
- [23] V. Sanz-Moreno e C. Marshall, “The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration,” *Curr. Opin. Cell Biol*, vol. 22, p. 690–696, 2010.
- [24] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts e P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 5^a ed., New York: Garland science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008.
- [25] D. Hanahan and R. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, pp. 646-674, 2011.
- [26] P. Friedl, J. Locker, E. Sahai e J. Segall, “Classifying collective cancer cell invasion,” *Nat. Cell. Biol.*, vol. 14, pp. 777-783, 2012.
- [27] F. Huber, J. Schnauß, S. Rönicke, P. Rauch, K. Müller, C. Fütterer e J. Käs, “Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue,” *Adv. Phys.*, vol. 62, pp. 1-112, 2013.
- [28] B. Ladoux e A. Nicolas, “Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues,” *Rep. Prog. Phys.*, vol. 75, pp. 116601 (1-25), 2012.
- [29] K. Vikstrom, S. Lim, R. Goldman e G. Borisy, “Steady state dynamics of intermediate filament networks , (1992), pp.,” *J. Cell Biol.*, vol. 118, p. 121–129, 1992.
- [30] R. Zackroff e R. Goldman, “InVitro assembly of intermediate filaments from baby hamster-kidney (BHK-21) cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 76, p. 6226–6230, 1979.
- [31] T. Pollard e C. Beltzner, “Structure and function of the Arp2/3 complex,” *Cur. Opin. Struc. Biol.*, vol. 20, pp. 768-774, 2002.
- [32] A. Mogilner e K. Keren, “The shape of motile cells,” *Current Biology*, vol. 19, pp. R762-R771, 2009.
- [33] J. Parsons, A. Horwitz e M. Schwartz, “Cell Adhesion: Integrating Cytoskeletal Dynamics and Cellular Tension,” *Nature Review Molecular Cell Biology*, vol. 11, pp. 633-643, 2010.
- [34] P. Mattila e P. Lappalainen, “Filopodia: molecular architecture and cellular functions,” *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, vol. 9, p. 446–454, 2008.

- [35] R. Hynes, "Cell adhesion: old and new questions," *Tren. Bio. Sci.*, vol. 9, pp. M33-37, 1999.
- [36] S. Mitra, D. Hanson e D. Schlaepfer, "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility," *Nat. Rev. Mol. Cel. Biol.*, vol. 6, pp. 56-68, 2005.
- [37] A. Yap, W. Briehner e B. Gumbiner, "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 13, pp. 119-146, 1997.
- [38] F. Walsh e P. Doherty, "Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 13, pp. 425-426, 1997.
- [39] L. Lasky, "Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response," *Anny. Rev. Biochem.*, vol. 64, pp. 113-139, 1995.
- [40] G. Kansas, "Selectins and their ligands: current concepts and controversies," *Blood*, vol. 88, pp. 3259-3287, 1996.
- [41] R. Hynes, "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion," *Cell*, vol. 69, pp. 11-25, 1992.
- [42] M. Hemler, "Integrins," em *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion protetins*, Oxford University Press, 1999.
- [43] S. Johansson, "Fibronectin-integrin interactions," *Front. BioSci.*, vol. 2, pp. 126-146, 1997.
- [44] S. Kim e J. Turnbull, "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor," *Jour. Endoc.*, vol. 209, pp. 139-151, 2011.
- [45] R. Hynes, "The extracellular matrix: not just pretty fibrils," *Science*, vol. 326, pp. 1216-1219, 2009.
- [46] P. Madaule e R. Axel, "A novel ras-related gene family," *Cell*, vol. 41, pp. 31-40, 1985.
- [47] X. Bustelo, V. Sauzeau e I. Berenjeno, "GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo," *BioEssays*, vol. 29, pp. 356-370, 2007.
- [48] A. Boureux, E. Vignal, S. Faure e P. Fort, "Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, pp. 203-216, 2007.
- [49] D. Spiering e L. Hodgson, "Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility," *Cell. Adh. Migr.*, vol. 5, p. 170-180, 2011.
- [50] S. Li, J. Guan e C. S., "Biochemistry and biomechanics of cell motility," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 7, p. 105-150, 2005.
- [51] R. Petrie, N. Gavara, R. Chadwick e K. Yamada, "Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration," *Jour. Cell Biol.*, vol. 197, pp. 439-455, 2012.
- [52] M. Bergert, S. Chandradoss, R. Desai e E. Palucha, "Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration," *PNAS*, vol. 109, p. 14434-14439, 2012.

- [53] E. Cox, S. Sastry e A. Huttenlocher, “Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, p. 265–277, 2001.
- [54] P. Friedl, “Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 16, p. 14–23, 2004.
- [55] P. Friedl e S. Alexander, “Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity,” *Cell*, vol. 147, pp. 992-1009, 2011.
- [56] P. Friedl e K. Wolf, “Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model,” *J. Cell Biol.*, vol. 188, p. 11–19, 2010.
- [57] P. Friedl, S. Borgmann e E. and Bröcker, “Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 70, p. 491–509, 2001.
- [58] T. Lämmermann e M. Sixt, “Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 21, p. 636–644, 2009.
- [59] A. Lorentzen, J. Bamber, A. Sadok, I. Elson-Schwab e C. Marshall, “An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells,” *J. Cell Sci.*, vol. 124, p. 1256–1267, 2011.
- [60] E. Paluch, C. Sykes, J. Prost e M. Bornens, “Dynamic modes of the cortical actomyosin gel during cell locomotion and division,” *Trends Cell Biol.*, vol. 16, p. 5–10, 2006.
- [61] R. Poincloux, O. Collin, F. Lizárraga, M. Romao, M. Debray, M. Piel e P. Chavrier, “Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 108, p. 1943–1948, 2011.
- [62] K. Wolf, R. Müller, S. Borgmann, E. Bröcker e P. Friedl, “Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other protease,” *Blood*, vol. 102, p. 3262–3269, 2003.
- [63] C. Madsen e E. Sahai, “Cancer dissemination—lessons from leukocytes,” *Dev. Cell*, vol. 19, p. 13–26, 2012.
- [64] F. Heinemann, H. Doschke e M. Radmacher, “Keratocyte Lamellipodial Protrusion Is Characterized by a Concave Force-Velocity Relation,” *BioPhys. Jour.*, vol. 100, pp. 1420-1142, 2011.
- [65] K. Wolf, Y. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M. Stack e P. Friedl, “Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, p. 893–904, 2007.
- [66] P. Friedl e K. Wolf, “Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, p. 129–135, 2009.
- [67] T. Brabletz, A. Jung, S. Reu, M. Porzner, F. Hlubek, L. Kunz-Schughart, R. Knuechel e T. Kirchner, “Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor

- progression driven by the tumor environment.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 98, p. 10356–10361, 2001.
- [68] V. Sanz-Moreno, G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai e C. Marshall, "Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement," *Cell*, vol. 135, p. 510–523, 2008.
- [69] J. Lee, S. Debhar, R. Kalluri and E. Thompson, "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease," *J. Cell Biol.*, vol. 172, p. 973, 2006.
- [70] A. Page-McCaw, A. Ewald and Z. Werb, "Matrix Metalloproteinases and the Regulation of Tissue Remodelling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, p. 221, 2007.
- [71] M. Sheetz, D. Felsenfeld, C. Galbraith e D. Choquet, "Cell migration as a five-step cycle," *Biochem. Soc. Symp.*, vol. 65, p. 233–243, 1999.
- [72] A. Estecha, L. Sánchez-Martín, A. Puig-Kröger, R. Bartolomé, J. Teixidó, R. Samaniego e P. Sánchez-Mateos, "Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion," *J. Cell Sci.*, vol. 122, p. 3492–3501, 2009.
- [73] P. Friedl, K. Maaser, C. Klein, B. Niggemann, G. Krohne e K. Zänker, "Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44," *Cancer Res.*, vol. 57, p. 2061–2070, 1997.
- [74] Y. Cai, O. Rossier, N. Gauthier, N. Biais, M. Fardin, X. Zhang, L. Miller, B. Ladoux, V. Cornish e M. Sheetz, "Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility," *Jour. Cell Sci.*, vol. 123, pp. 413-423, 2009.
- [75] N. Kramer, A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschläger e H. Dolznig, "In vitro cell migration and invasion assays," *Mut. Research*, vol. 752, pp. 10-24, 2013.
- [76] P. Romanczuk, M. Bär, W. Ebeling, B. Lindner e L. Schimansky-Geier, "Active Brownian Particles," *The European Physical Journal Special Topics*, vol. 202, pp. 1-162, 2012.
- [77] R. Brown, "A brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies," *Philosophical Magazine Series 2*, vol. 4, n° 21, pp. 161-173, 1828.
- [78] P. Langevin, "The theory of brownian movement," *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences*, vol. 146, pp. 530-533, 1908.
- [79] G. E. Uhlenbeck e L. S. Ornstein, "On the theory of the brownian motion," *Physical Review*, vol. 36, n° 5, p. 823, 1930.
- [80] C. W. Gardiner, *Handbook of Stochastic Methods for Physics, Chemistry and the Natural Sciences.*, 2 ed., vol. volume 13 of Springer Series in Synergetics, Berlin Heidelberg New York: Springer, 1985.

- [81] H. Risken, *The Fokker-Planck equation: Methods of solution and applications*, Springer Verlag, 1996.
- [82] W. Sutherland, “A dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin,” *Philosophical Magazine Series 6*, vol. 9, n° 54, pp. 781-785, 1905.
- [83] A. Einstein, “The motion of elements suspended in static liquids as claimed in the molecular kinetic theory of heat,” *Annalen der Physik*, vol. 17, n° 8, pp. 549-560, 1905.
- [84] P. Dieterich, R. Klages, R. Preuss e A. P. Schwab, *Natl Acad Sci USA*, pp. 459-463, 2008.
- [85] A. A. Potdar, J. Lu, J. Jeon, A. M. Weaver e P. T. Cummings, *Ann Biomed Eng.*, pp. 230-245, 2009.
- [86] J. S. Gruver, A. A. Potdar, J. Jeon, J. Sai, B. Anderson, D. Webb e e. al., *Biophys J*, pp. 367-376, 2010.
- [87] P. H. Wu, A. Giri, S. X. Sun e D. P. Wirtz, *Natl Acad Sci USA*, p. 3949–3954, 2014.
- [88] P. H. Wu, A. Giri e D. Wirtz, *Nat Protoc*, pp. 517-521, 2015.
- [89] C. Metzner, C. Mark, J. Steinwachs, L. Lautscham, F. Stadler e B. Fabry, *Nat Commun*, p. 6:7516, 2015.
- [90] R. M. C. de Almeida, G. S. Giardini, M. Vainstein, J. A. Glazier e G. L. Thomas, “Exact solution for an anisotropic ornstein-uhlenbeck process,” 2020.
- [91] C. Reynolds, “Flocks, herds and schools: A distributed behavioral model,” *Computer Graphics*, vol. 21, pp. 25-34, 1987.
- [92] T. Vicsek, A. Czirók, E. Ben-Jacob, I. Cohen e O. Shochet, “Novel type of phase transition in a system of self-driven particles,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 75, pp. 1226-1229, 1995.
- [93] J. Belmonte, G. Thomas, L. Brunnet, R. de Almeida e H. Chate, “Self-propelled particle model for cell-sorting phenomena,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, p. 248702, 2008.
- [94] C. Beatrici e L. Brunnet, “Cell sorting based on motility differences,” *Phys. Rev. E*, vol. 84, p. 031927, 2011.
- [95] E. Méhes, E. Mones, V. Németh e T. Vicsek, “Collective motion of cells mediates segregation and pattern formation in co-cultures,” *PLoS ONE*, vol. 7, p. e31711, 2012.
- [96] K. Brakke, “Evolver,” Mathematics Department, Susquehanna University., [Online]. Available: <http://www.susqu.edu/brakke/evolver/evolver.html>. [Acesso em 26 Junho 2013].
- [97] B. Kenneth, “The surface evolver,” *Exp. Math.*, vol. 1, pp. 141-165, 1992.
- [98] R. Saye e J. Sethian, “Multiscale modeling of membrane rearrangement, drainage, and rupture in evolving foams,” *Science*, vol. 10, pp. 720-724, 2013.

- [99] J. Glazier e F. Graner, "Simulations of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells," *Phy. Rev. E*, vol. 47, pp. 2128-2154, 1993.
- [100] F. Graner and J. Glazier, "Simulation of biological cell sorting using a 2-dimensional extended Potts-model," *Phy. Rev. Lett.*, vol. 69, pp. 2013-2016, September 1992.
- [101] R. Potts, "Some generalized order-disorder transformations," *Math. Proceed.*, vol. 48, pp. 106-109, 1952.
- [102] F. (. Wu, "The Potts model," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 54, p. 235-268, 1982.
- [103] F. Maree and P. Hogeweg, "How amoeboids self-organize into a fruiting body: multicellular coordination in *cictyostelium discoideum*," *Proc. Nat. Ac. Sc. USA*, vol. 98, pp. 3879-3883, 2001.
- [104] N. Savill and P. Hogeweg, "Modelling morphogenesis: from single cells to crawling slugs," *Jour. Th. Bio.*, vol. 184, pp. 229-235, 1997.
- [105] J. Mombach, R. de Almeida e J. Iglesias, "Mitosis and growth in biological tissues," *Phys. Rev. E*, vol. 48, pp. 598-602, 1993.
- [106] I. Fortuna, G. L. Thomas, R. M. C. de Almeida e F. Graner, "Growth Laws and Self-Similar Growth Regimes of Coarsening Two-Dimensional Foams: Transition from Dry to Wet Limits," *Physical Review Letters*, vol. 108, p. 248301, 14 Junho 2012.
- [107] G. L. Thomas, J. M. Belmonte, F. Graner, J. A. Glazier e R. M. C. de Almeida, "3D simulations of wet foam coarsening evidence a self similar growth regime," *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 473, pp. 109-114, 20 Maio 2015.
- [108] G. L. Thomas, R. M. C. de Almeida e F. Graner, "Coarsening of three-dimensional grains in crystals, or bubbles in dry foams, tends towards a universal, statistically scale-invariant regime," *Physics Review E*, vol. 74, p. 021407, Agosto 2006.
- [109] Glazier, J.A., "CompuCell3D - CC3D," Indiana University and Biocomplexity Institute, [Online]. Available: <http://www.compuCell3d.org/>. [Accessed 24 Junho 2013].
- [110] J. Izaguirre, R. Chaturvedi, C. Huang, T. Cickovski, J. Coffland, G. Thomas, G. Forgacs, M. Alber, G. Hentschel, S. Newman e J. Glazier, "COMPUCELL, a multi-model framework for simulation of morphogenesis," *BioInformatics*, vol. 20, p. 1129-1137, 2004.
- [111] N. Metropolis and S. Ulam, "The Monte Carlo Method," *Jour Amer Statis Assoc*, vol. 44, pp. 335-341, 1949.
- [112] A. Kabla, "Collective cell migration: leadership, invasion and segregation," *J. R. Soc. Interf.*, vol. 9, p. 3268-3278, 2012.
- [113] A. Marée, V. Grieneisen e L. Edelstein-Keshet, "How cells integrate complex stimuli: the effect of feedback from phosphoinositides and cell shape on cell polarization and motility," *PLoS Comp. Biol.*, vol. 8, p. e1002402, 2012.
- [114] A. M. Turing, "The Chemical Basis of Morphogenesis," *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, vol. 237, pp. 37-72, 1952.

- [115] P. Hogeweg, "Computing and organism: on the interface between informatic and dynamic proceses," *Biosystems*, vol. 64, pp. 97-109, 2002.
- [116] F. Graner e J. A. Glazier, *Physical Review Letters*, vol. 69, pp. 2013-2016, 1992.
- [117] J. A. Glazier e F. Graner, *Physical Review E*, vol. 47, pp. 2128-2154, 1993.
- [118] M. Swat e e. al., "Multi-Scale Modeling of Tissues Using CompuCell3D," *Methods in Cell Biology*, vol. 110, pp. 325-366, 2012.
- [119] M. Scianna, L. Munaron e L. Preziosi, "A multiscale hybrid approach for vasculogenesis and related potential blocking therapies," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 106, pp. 450-462, 2011.
- [120] A. S. Dias, I. d. Almeida, J. M. Belmonte, J. A. Glazier e C. D. Stern, "Somites Without a Clock," *SCIENCE*, vol. 343, pp. 791-794, 2014., " *Science*, vol. 343, pp. 791-794, 2014.
- [121] J. M. Belmonte e e. al., "Virtual-tissue computer simulations define the roles of cell adhesion and proliferation in the onset of Kidney cystic disease," *Molecular biology of the cell*, pp. E16-01-0059, 2016.
- [122] E. A. Holm, J. A. Glazier, D. J. Srolovitz e G. S. Grest, "Effects of lattice anisotropy and temperature on domain growth in the two-dimensional Potts model," *Physical Review A*, vol. 43, pp. 2662-2668, 1991.
- [123] E. L. Barnhart, G. M. Allen, F. Jülicher e J. A. Theriot, "Bipedal Locomotion in Crawling Cells," *Biophysical Journal*, vol. 98, pp. 933-942, 2010.
- [124] J. Lee e K. Jacobson, "The composition and dynamics of cell-substratum adhesion in locomoting fish keratocytes," *Journal of cell science*, vol. 110, pp. 2833-2844, 1997.
- [125] G. L. Thomas, I. Fortuna, G. C. Perrone, F. Graner e R. M. C. de Almeida, "Do Cell Velocity and Shape Polarizations Coincide?," *Não Publicado*.
- [126] B. ten Hagen, S. van Teeffelen e H. Lowen, "Brownian motion of a self-propelled particle," *Journal of Physics Condensed Matter*, vol. 23, n° 19, p. 194119, 2011.
- [127] P. Maiuri e e. al., "Actin Flows Mediate a Universal Coupling between Cell Speed and Cell Persistence," *Cell*, vol. 161, pp. 374-386, 2015.
- [128] R. H. Insall e L. M. Machesky, "Actin Dynamics at the Leading Edge: From Simple Machinery to Complex Networks," *Developmental Cell*, vol. 17, pp. 310-322, 2009.
- [129] A. J. Ridley, "Life at the Leading Edge," *Cell*, vol. 145, pp. 1012-1022, 2011.
- [130] A. C. Callan-Jones e R. Voituriez, "Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 39, pp. 12-17, 2016.
- [131] G. G. Gundersen e H. J. Worman, "Nuclear Positioning," *Cell*, vol. 152, pp. 1376-1389, 2013.

ANEXO 1

PROJETO COMPUCELL3D PARA REPLICAR OS RESULTADOS APRESENTADOS

(traduzido do artigo Fortuna *et al.* [2])

Discussão geral dos arquivos e seus conteúdos para executar o projeto de simulação

A capacidade de replicar os resultados da simulação é um objetivo central de melhores práticas no que se refere o desenvolvimento de modelos numéricos. O CompuCell3D permite simulação e execução de modelos compactos, tornando prática a publicação de modelos replicáveis. Este suplemento contém o código e as instruções para replicação de todas as simulações apresentadas neste documento. Observe que as simulações são estocásticas, de modo que os resultados de instâncias individuais de simulações serão diferentes. No entanto, conjuntos de simulações para os mesmos conjuntos de parâmetros devem reproduzir os resultados, que apresentamos neste artigo.

O CompuCell3D (**CC3D**) é uma estrutura de modelagem de código aberto, executada na maioria dos sistemas operacionais PC, Mac e Linux. Downloads e instruções de instalação estão disponíveis em <http://www.compuCell3d.org/>. Este site fornece instaladores de um botão para a maioria das configurações de PC e Mac. Ele também fornece código fonte e binários para alguns tipos de Linux. O site também arquiva executáveis mais antigos do CC3D para permitir o controle de alterações no comportamento do programa durante a revisão. As simulações publicadas foram executadas no CC3D versão 3.5.1, mas executam e reproduzem os resultados originais no CompuCell3D versão 3.7.9.

Os executáveis do CC3D consistem em duas interfaces gráficas de usuário (**GUIs**), Twedit ++ (um editor de simulação que permite aos usuários modificar especificações de simulação) e Player (que executa especificações de simulação e exibe e armazena os resultados da simulação). Uma especificação de simulação CompuCell3D consiste em um grupo hierárquico de arquivos e pastas. A maioria das especificações de simulação combina scripts escritos em Python e vários XMLs. Especificamente, uma simulação do CC3D **<project>** contém pelo menos quatro arquivos: um **gerente de projeto XML**, chamado **<project>.cc3d**, um **arquivo de controle Python**, chamado **<project>.py**, um **arquivo escalonável** do Python,

chamado `<project_steppables>.py`, e um **arquivo de verificação de parâmetro XML**, chamado `ParameterScanSpecs.xml`. O CompuCell3D armazena o arquivo do gerente de projeto em uma pasta que geralmente compartilha o nome do projeto `<project>` e os outros três arquivos em uma subpasta chamada Simulação (`<project>/Simulation`). Se você é novo nas simulações de CC3D, assista à apresentação:

http://compuCell3d.org/BinDoc/cc3d_binaries/Presentations/Introduction_To_CompuCell/Co53_mpuCell_intro_2014_Hamner.pdf.

Para executar uma simulação, inicie o Twedit ++, selecione *Open CC3D Project* no menu suspenso *CC3D Project* e abra o arquivo do gerente de projeto (neste caso, *CellMig3D*). Execute a simulação selecionando o arquivo *CellMig3D.cc3d* na sub-janela esquerda e clicando com o botão direito do mouse e selecionando *Open in Player*. Como alternativa, inicie o Player, selecione *Open Simulation* no menu suspenso *File* e selecione o arquivo *CellMig3D.cc3d*. Em ambos os casos, a simulação deve agora ser executada. Você pode usar a opção *Tile* do menu suspenso do *Windows* para ajustar o layout da tela para melhorar sua visualização da simulação em execução.

A seguir, descrevemos brevemente cada um dos quatro arquivos:

O arquivo `<project>.cc3d` informa ao CC3D quais arquivos o Player deve executar e onde encontrar os parâmetros para as simulações. Nosso projeto é chamado *CellMig3D*, portanto, o nome do gerente de projeto é **CellMig3D.cc3d**. `CellMig3D.cc3d` contém as linhas

```
<Simulation version="3.5.1">
  <PythonScript Type="PythonScript">Simulation/CellMig3D.py</PythonScript>
  <Resource Type="Python">Simulation/CellMig3D_Steppables.py</Resource>
  <ParameterScan Type="ParameterScan">Simulation/ParameterScanSpecs.xml</ParameterScan>
</Simulation>
```

O arquivo de controle Python `<project>.py` especifica os componentes da simulação e as definições do ambiente: tamanhos e tipos de células, tamanho da treliça, energias de interação, frequências de cálculo, duração da simulação, campos químicos, etc. Ele também chama as sub-rotinas de cálculo (**CC3D plugins**): posição do centro de massa, rastreador de vizinhos, etc. No nosso projeto, o nome do arquivo de controle é **CellMig3D.py**.

O arquivo steppable, **CellMig3D_Steppables.py**, especifica qualquer componente temporalmente dinâmico da estrutura e dos parâmetros da simulação, executa a análise da simulação e exibe e armazena dados, em intervalos especificados pelo arquivo de controle.

Nosso projeto possui dois arquivos de saída: um contém informações sobre os deslocamentos do centro de massa dos compartimentos celulares e o outro contém informações sobre quebra de simetria celular. A simulação atualiza esses arquivos de saída na frequência definida no arquivo de controle. A simulação armazena os arquivos de saída em uma subpasta da pasta *<project>*.

Finalmente, o arquivo XML **ParameterScanSpecs.xml** contém a lista dos parâmetros que varreremos na simulação, com seus intervalos (valores) de variação. Todos os valores que usamos neste trabalho estão listados nele. Obviamente, as simulações podem ser agrupadas em conjuntos de parâmetros. O arquivo fornecido no material suplementar gera 10 réplicas para cada conjunto de parâmetros, onde os conjuntos de parâmetros têm três raios celulares possíveis, quatro valores de *phiF* e sete valores de *lambCHEM*. Portanto, a execução do arquivo executa um conjunto de simulações que consiste em um total de $10 \times 3 \times 4 \times 7 = 830$ simulações individuais. Este arquivo gera todas as simulações individuais usadas no artigo:

```
<ParameterScan version="3.7.0">
  <OutputDirectory>CellMig3D_ParameterScan</OutputDirectory>
  <ParameterList Resource="Simulation/CellMig3D.py">
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="RANDOM_SEED" Type="PYTHON_GLOBAL"
      ValueType="int">
      <Values>68721, 198463, 206497, 211561, 217236, 240803, 353789, 380866, 404317,
      410770</Values>
    </Parameter>
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="deltaT" Type="PYTHON_GLOBAL" ValueType="int">
      <Values>50</Values>
    </Parameter>
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="cellRad" Type="PYTHON_GLOBAL"
      ValueType="float">
      <Values>10., 15., 20.</Values>
    </Parameter>
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="phiF" Type="PYTHON_GLOBAL" ValueType="float">
      <Values>0.05, 0.1, 0.2, 0.3</Values>
    </Parameter>
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="lambCHEM" Type="PYTHON_GLOBAL"
      ValueType="float">
      <Values>-75., -100., -125., -150., -175., -200., -250</Values>
    </Parameter>
  </ParameterList>
</ParameterScan>
```

Os valores na lista para o parâmetro RANDOM_SEED definem o número de réplicas para cada conjunto de parâmetros (*deltaT*, *cellRad*, *phiF*, *lambCHEM*). Sempre que uma réplica de simulação é iniciada, a variável CurrentIteration para cada parâmetro é incrementada em 1. Por exemplo, a

réplica executada com $RANDOM_SEED = 198463$, $deltaT = 50$, $cellRad = 15,0$, $phiF = 0.1$ e $lambCHEM = -100.0$, será réplica número 161 (o contador de réplicas começa em "0"). Esses valores também serão usados para montar os nomes de arquivos de saída associados. Identificando $cellRad$ como "R", $phiF$ como "pF", $lambCHEM$ como "lC" e $deltaT$ como "dT", os nomes de arquivos de amostra são:

- *161_R15.0_pF0.1_lC-175.0_dT50_Displacement.dat*: Este arquivo contém 13 colunas: tempo (mcs), as coordenadas do centro de massa dos três compartimentos C, F e N da célula e as coordenadas do centro de massa de toda a célula.
- *161_R15.0_pF0.1_lC-175.0_dT50_SBAAn.dat*: Este arquivo contém 8 colunas: tempo (mcs), a distância entre o centro de massa do compartimento F e o centro de massa dos compartimentos C e N combinados, a coordenada z do compartimento N, a área do limite entre os compartimentos C e F, o volume do compartimento C, o volume do compartimento F, o volume do compartimento N e o volume de toda a célula. Todos os comprimentos e áreas estão em unidades de espaçamento da rede com a potência apropriada.

As simulações do CC3D possuem uma unidade de tempo natural de um Monte Carlo Step (**mcs**). Os cálculos para o deslocamento médio quadrático redimensionam os tempos de experimento e simulação pelos tempos de persistência medidos. A proporção desses dois tempos de persistência converte mcs em unidades de tempo experimentais.

Para gerar simulações diferentes usando o arquivo **ParameterScanSpecs.xml**, você deve alterar os números entre os pares de tags apropriados do formato `<Values>... </Values>`. Por exemplo, para executar 5 réplicas de uma simulação com $deltaT = 50$, $cellRad = 20.0$, $phiF = 0.2$ e $lambCHEM = -150.0$, o arquivo **ParameterScanSpecs.xml** modificado lê:

```
<ParameterScan version="3.7.0">
  <OutputDirectory>CellMig3D_ParameterScan</OutputDirectory>
  <ParameterList Resource="Simulation/CellMig3D.py">
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="RANDOM_SEED" Type="PYTHON_GLOBAL"
      ValueType="int">
      <Values>68721, 198463, 206497, 211561, 217236</Values>
    </Parameter>
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="deltaT" Type="PYTHON_GLOBAL" ValueType="int">
      <Values>50</Values>
    </Parameter>
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="cellRad" Type="PYTHON_GLOBAL"
      ValueType="float">
      <Values>20.</Values>
    </Parameter>
    <Parameter CurrentIteration="0" Name="phiF" Type="PYTHON_GLOBAL" ValueType="float">
      <Values> 0.2 </Values>
```

```

</Parameter>
<Parameter CurrentIteration="0" Name="lambCHEM"
Type="PYTHON_GLOBAL"ValueType="float">
  <Values>-150. </Values>
</Parameter>
</ParameterList>
</ParameterScan>

```

em que **negrito** indica linhas alteradas a partir da versão do **ParameterScanSpecs.xml** fornecida.

Como modificar e executar a simulação do projeto usando o CC3D

Primeiro, baixe o instalador ou pacote binário apropriado do CC3D em <http://compucell3d.org/> e instale-o. Em computadores Windows, recomendamos a instalação no diretório "Desktop" em vez do diretório "Programs" para evitar conflitos de permissão. Faça o download do arquivo de projeto compactado e descompacte-o em uma pasta no seu espaço de trabalho.

Inicie o editor / criador do projeto CC3D, **Twedit++**, usando o método apropriado ao seu sistema operacional. Clique no *CC3d Project* e, em seguida, no *Open CC3D Project*. Vá para a pasta em que você descompactou os arquivos do projeto e abra o arquivo .cc3d. Este projeto selecionado agora será exibido no painel de estrutura à esquerda do **Twedit++**, que exibe a hierarquia de arquivos dos projetos abertos. Clicar no projeto exibirá os arquivos componentes do projeto e abrirá os dois arquivos Python descritos na seção anterior, como guias no painel de edição direito do **Twedit++**.

Se você deseja executar a simulação para um conjunto específico de parâmetros, clique em *ParameterScan* no painel de estrutura de projeto mais à esquerda do Twedit++ para abrir o arquivo **ParameterScanSpecs.xml** para edição. **ParameterScanSpecs.xml** especifica todos os parâmetros de simulação controlados externamente. Faça as alterações desejadas no número de réplicas, opções de "*deltaT*" ou outros parâmetros varridos. **CellMig3D_Steppables.py** especifica todos os outros parâmetros de simulação, conforme fornecido na tabela A2. Esses parâmetros são deixados iguais em cada réplica de simulação. Você pode alterar qualquer um desses valores clicando em *CellMig3D_Steppables* no painel de estrutura de projeto mais à esquerda do Twedit++ para abrir o arquivo **CellMig3D_Steppables.py** para edição.

Salve todos os arquivos usando o botão *Save All* ou o item *Save CC3D Project As* do menu suspenso *CC3D Project* e clique com o botão direito do mouse no nome do projeto no painel de estrutura de projeto mais à esquerda do Twedit ++. Clique em *Open in Player*. O CC3D player abrirá e iniciará a série de simulações especificadas em **ParameterScanSpecs.xml**.

Configuração inicial da simulação

Nossas simulações usam uma treliça 3D com condições de contorno periódicas, de tamanho (L_x, L_y, L_z) , definidas em unidades do raio da célula, $R_{célula}$. Inicialmente, o número de sítios lamelipódio é zero e a célula é esférica. A célula se espalha em contato com o substrato e o lamelipódio se forma e se espalha rapidamente devido ao termo de energia efetiva do volume-alvo. O volume alvo do lamelipódio é proporcional a $R_{célula}^3$ e ϕ_l . Consequentemente, as dimensões horizontais da estrutura celular devem aumentar com $R_{célula}$ e ϕ_l . As seguintes dimensões de estrutura celular foram suficientes para impedir que a célula se espalhe por toda a dimensão da rede, formando única de estrutura celular e gerando problemas devido às condições de contorno periódicas:

$$L_x = L_y = \begin{cases} 8 R_{célula}, & R_{célula} < 20 \text{ (sítios da rede)}^{1/3} \text{ ou } \phi_l < 0.20 \\ 10 R_{célula}, & 20 \text{ (sítios da rede)}^{1/3} \leq R_{célula} < 30 \text{ (sítios da rede)}^{1/3} \text{ e } \phi_l \geq 0.20 \\ 12 R_{célula}, & 30 \text{ (sítios da rede)}^{1/3} \leq R_{célula} < 40 \text{ (sítios da rede)}^{1/3} \text{ e } \phi_l \geq 0.20 \\ 14 R_{célula}, & 40 \text{ (sítios da rede)}^{1/3} \leq R_{célula} \text{ e } \phi_l \geq 0.20 \end{cases} \quad (A1)$$

Dentro da rede, os locais da rede com coordenadas em $(x, y, z = 0)$ são congelados e configurados para uma célula generalizada do tipo substrato. Todos os outros sítios que não estão no compartimento celular são configurados para uma célula generalizada do tipo médio. Inicialmente, a célula é uma esfera centrada nas coordenadas $(\frac{L_x}{2}, \frac{L_y}{2}, \frac{L_z}{2})$ que consiste em dois compartimentos concêntricos, uma esfera central, do núcleo do tipo celular e uma concha esférica circundante, do citoplasma do tipo celular. Quando locais de rede do citoplasma do tipo entram em contato com os sítios de rede do substrato do tipo celular generalizado, eles criam sítios de rede do tipo celular lamelipódio, como ilustrado no texto principal.

Valores para parâmetros fixos nas simulações

Tabela A1 – Parâmetros de referência para a simulação. (adaptado de Fortuna *et al.* [2])

Valores de Parâmetro de Referência									
	ϕ_n	D_F	λ_c	λ_l	λ_n	k_{decai}	k_{fonte}	T_B	
	0.15	0.0001	10	10	10	0.9	0.9	100	
$J_{meio-substrato}$	$J_{meio-cito}$	$J_{meio-lamelio}$	$J_{meio-nucleo}$	$J_{substrato-cito}$	$J_{substrato-lamelio}$	$J_{substrato-nucleo}$	$J_{cito-lamelio}$	$J_{cito-nucleo}$	$J_{lamelio-nucleo}$
20	20	40/3	100	20	20/3	100	20	20	40

ANEXO 2

SIMULAÇÕES PARA DIFERENTES TAMANHOS DE CÉLULAS

(Traduzido do artigo Fortuna *et al.* [2])

Trajatórias para $R_{célula} = 10$

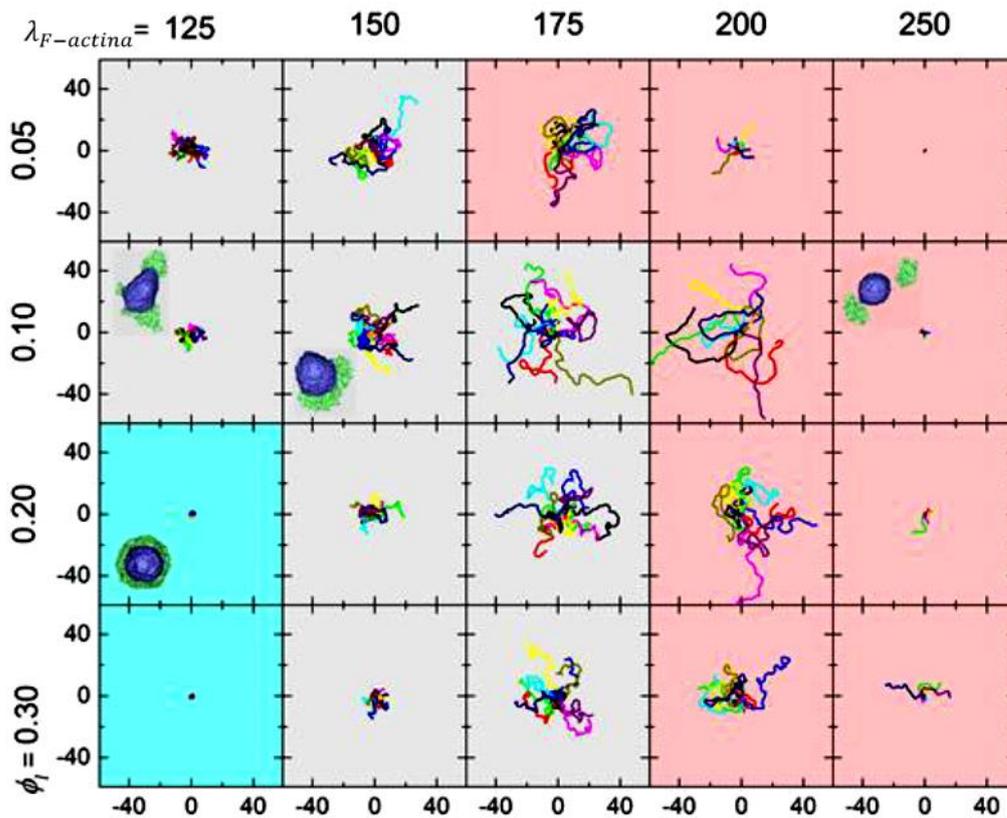


Figura A1 - Trajetórias típicas e morfologias (selecionadas) de algumas células para diferentes valores de ϕ_l e $\lambda_{F-actina}$. Cada painel mostra 10 trajetórias de células de comprimento 10^5 MCS, com $R_{célula} = 10$ (sítios da rede)^{1/3}. Os eixos mostram as posições x e y medidas em relação ao centro da rede em unidades de $R_{célula}$. A cor de fundo indica confinamento (ciano), migração persistente (cinza) e descolamento do lameliopódio (vermelho claro). Maiores e menores aumentam a motilidade celular. Quando $\lambda_{F-actina}$ é muito pequeno, o lameliopódio permanece simétrico e a célula não migra, enquanto que para valores muito pequenos de ϕ_l , o lameliopódio não é forte o suficiente para causar migração celular (não mostrado). (Adaptado de Fortuna *et al.* [2])

Trajétórias para $R_{célula} = 20$

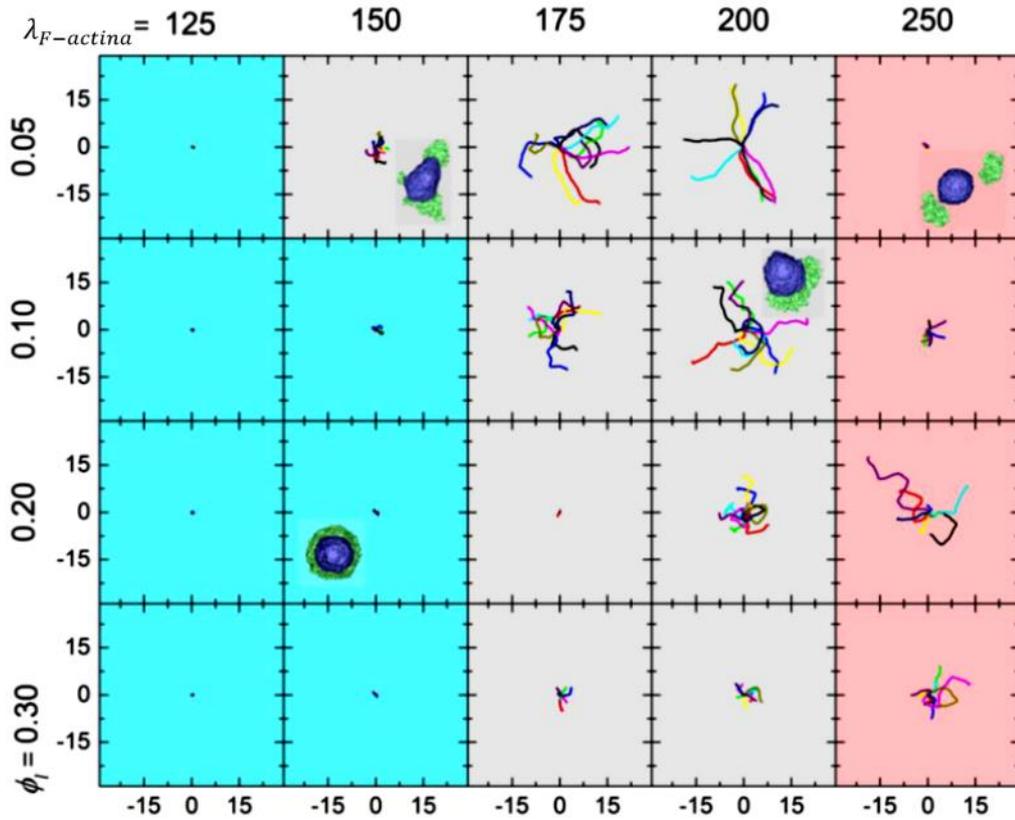


Figura A2 - Trajetórias típicas e morfologias (selecionadas) de algumas células para diferentes valores de ϕ_l e $\lambda_{F-actin}$. Cada painel mostra 10 trajetórias de células de comprimento 10^5 MCS, com $R_{célula} = 20$ (*sítios da rede*)^{1/3}. Os eixos mostram as posições x e y medidas em relação ao centro da rede em unidades de $R_{célula}$. A cor de fundo indica confinamento (ciano), migração persistente (cinza) e descolamento do lameliopódio (vermelho claro). Maiores e menores aumentam a motilidade celular. Quando $\lambda_{F-actina}$ é muito pequeno, o lameliopódio permanece simétrico e a célula não migra, enquanto que para valores muito pequenos de ϕ_l , o lameliopódio não é forte o suficiente para causar migração celular (não mostrado). (Adaptado de Fortuna *et al.* [2])

MSDs para $R_{célula} = 10$

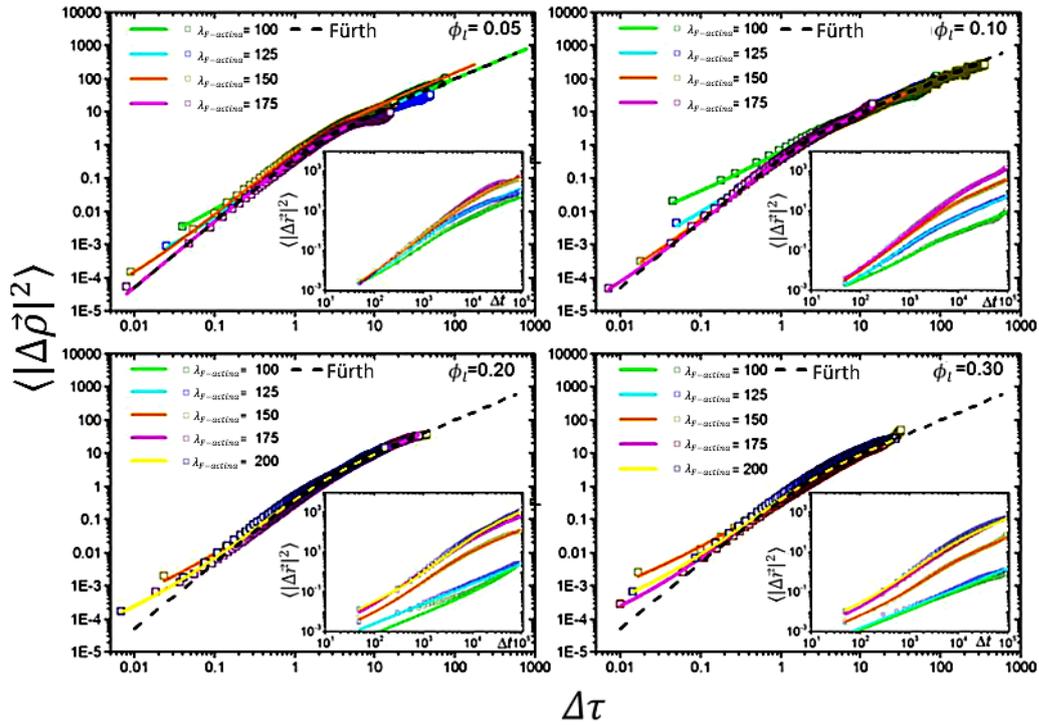


Figura A3 – $\langle |\Delta \vec{\rho}|^2 \rangle$ versus $\Delta \tau$ em um gráfico log-log, ambas as quantidades redimensionadas, para células com $R_{célula} = 10$ (*sítios de rede*)^{1/3}, com média sobre 5 réplicas. As inserções apresentam os dados não dimensionados em unidades de MCS e raio celular. (adaptado de Fortuna *et al.* [2])

MSDs para $R_{célula} = 20$

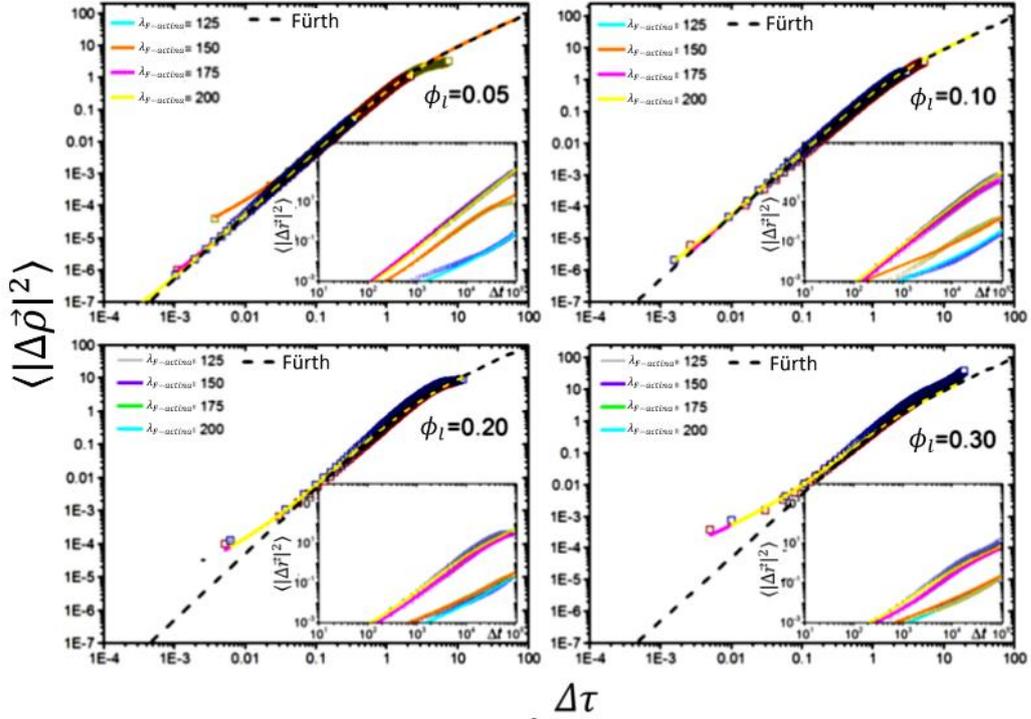


Figura A4 – $\langle |\Delta \vec{\rho}|^2 \rangle$ versus $\Delta \tau$ em um gráfico log-log, ambas as quantidades redimensionadas, para células com $R_{célula} = 20$ (sítios de rede) $^{1/3}$, com média sobre 5 réplicas. As inserções apresentam os dados não dimensionados em unidades de MCS e raio celular. (adaptado de Fortuna *et al.* [2])

Tabela Auxiliar: Parâmetros de ajuste da simulação.

Tabela A2 - Valores ajustados de S , P e D (3.12)) para simulações de células rastejando sobre substrato plano. Obs.: $2DP/(1 - S)$ na última coluna é o quadrado da escala natural de comprimento ($\sqrt{2DP/(1 - S)}$) medidos em unidades de $R_{célula}^2$. (adaptado de Fortuna *et al.* [2])

Parâmetros de Ajustes de Dados das Simulações						
$R_{célula}$ (sítios da rede) ^{1/3}	ϕ_l	$\lambda_{F-actina}$	P (MCS)	D ($R_{célula}^2/MCS$)	S	$2DP/(1 - S)$ ($R_{célula}^2$)
10	0.05	75	841	8.99E-5	1.24E-1	0.17
		100	1205	2.68E-4	4.43E-2	0.68
		125	1801	7.70E-4	1.46E-2	2.81
		150	4150	2.56E-3	5.84E-3	21.37
		175	9616	6.15E-3	1.68E-3	118.49
	0.10	100	624	2.83E-5	3.71E-1	0.06
		125	1065	2.40E-4	4.88E-2	0.54
		150	2576	1.83E-3	6.95E-3	9.50
		175	6396	6.52E-3	2.15E-3	83.58
		200	16840	1.56E-2	9.58E-4	525.60
	0.20	150	2279	6.85E-4	1.47E-1	3.17
		175	3878	3.60E-4	3.06E-3	28.01
		200	4637	5.82E-3	1.78E-3	54.08
	0.30	150	2272	2.36E-4	4.55E-2	1.12
		175	3648	2.14E-3	5.41E-3	15.70
200		3714	3.65E-3	2.87E-3	27.20	
15	0.05	125	2117	2.65E-5	8.64E-2	0.12
		150	6958	7.77E-4	3.13E-3	10.85
		175	35781	6.25E-3	4.20E-4	447.45
	0.10	150	6878	2.83E-4	9.68E-3	1.98
		175	12546	2.37E-3	9.84E-4	59.53
		200	23265	5.66E-3	3.93E-04	263.47
	0.20	150	6333	3.56E-5	6.73E-02	0.69
		175	7361	7.92E-4	2.87E-03	11.70
		200	8213	1.46E-3	1.49E-03	24.02
	0.30	150	11987	2.59E-5	9.46E-02	0.69
		160	11025	1.23E-4	1.87E-02	2.76
		165	11507	2.43E-4	1.26E-02	5.66
170		15079	5.36E-4	4.41E-03	16.23	
175		7491	3.29E-4	7.67E-03	4.96	
200		10124	1.27E-3	1.72E-03	25.76	
20	0.05	150	10018	1.028E-4	7.00E-3	2.07
		175	44862	2.64E-3	3.41E-4	236.95
		200	194567	8.74E-3	1.09E-4	3401.40
	0.10	175	21630	7.93E-4	1.14E-3	34.34
		200	30424	2.03E-3	4.19E-4	123.57
	0.20	175	26853	4.10E-4	2.20E-3	22.07
		200	12613	4.74E-4	1.90E-3	11.98
	0.30	175	14932	4.44E-5	2.07E-2	1.35
		200	7775	6.71E-5	1.36E-2	1.06

Estimativa de Erro de Localização para as Simulações

As simulações foram realizadas em um espaço discreto, em rede cúbica, resultando em um efeito diferente na função de autocorrelação de velocidade e MSD . Obtivemos curvas MSD medindo a posição do centro de massa do núcleo no plano xy da célula, calculada usando as coordenadas x e y de todos os sítios do núcleo. Todos os sítios que estão na superfície do núcleo contribuem com um erro de segmentação para nossa estimativa da posição do centro de massa do núcleo. Como esse erro na determinação das posições não é correlacionado ao longo do tempo em que a célula se move significativamente, o erro é diluído pela média dos intervalos de tempo $\frac{T-\Delta t}{\Delta t}$ presentes em uma trajetória. Assim, o erro estimado é:

$$\varepsilon \sim \frac{0.53}{\sqrt{\frac{T-\Delta t}{\Delta t}} R_{célula}^3} \text{ pixel}, \quad (A2)$$

onde tomamos o volume do núcleo em 0,15 do volume da célula e, portanto, o raio do núcleo em $0,15^{1/3} R_{célula}$. Para $R_{célula} = 15$ (sítios de rede) $^{1/3}$ e tendo $\frac{T-\Delta t}{\Delta t} = 1999$ em nossas simulações, encontramos $\varepsilon \sim 3,5 \times 10^{-6}$ (sítios de rede) $^{1/3}$. A tabela A3 apresenta os desvios do comportamento de Fürth nos curtos intervalos de tempo das curvas MSD para uma simulação de $R_{célula} = 15$ (sítios de rede) $^{1/3}$.

A comparação entre a estimativa de erro na equação (3.19) com os valores na última coluna da tabela A3 mostra que os desvios observados de MSD em relação ao comportamento de Fürth nas simulações não se devem a erros de localização. Juntamente com os resultados do procedimento de ajuste, esses resultados indicam que um termo difusivo é a principal correção da equação de Fürth em escalas de tempo curtas.

Tabela A3 - Desvios de MSD do comportamento de Fürth no regime de curto prazo para

$R_{célula} = 15$ e $\phi_l = 0.05$. (adaptado de Fortuna *et al.* [2])

$\lambda_{F-actina}$	MSD desvio ($R_{célula}^2$)	MSD desvio (sítios da rede) $^{2/3}$	\sqrt{MSD} desvio (sítios da rede) $^{1/3}$
150	3.26E-04	7.33E-02	0.27
175	3.29E-04	7.40E-2	0.27
200	3.11E-04	7.00E-02	0.26

Tempos de Simulações

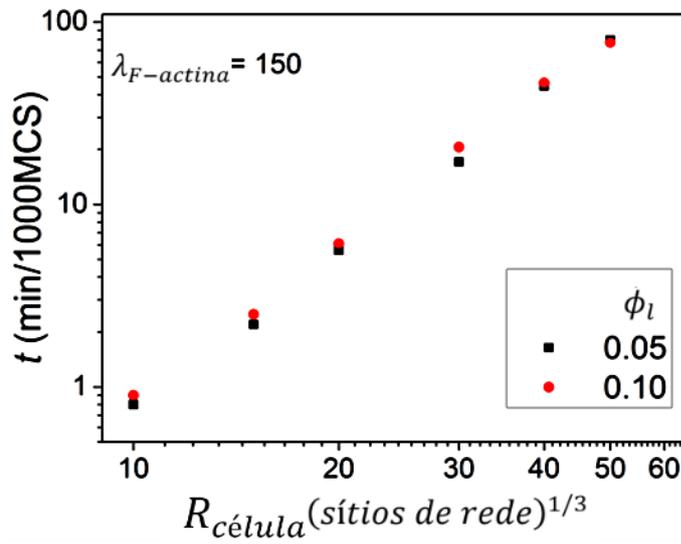


Figura A5 - Tempos de execução da simulação (em $\text{min}/1000\text{MCS}$) em função do raio da célula $R_{\text{célula}}$. Os tempos de execução são aproximadamente independentes de $\lambda_{F-actina}$ (não mostrado) e ϕ_l . (adaptado de Fortuna *et al.* [2])