

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Monique Siebra Krug

Análise da Difusão Celular em Linhagens com Potencial Metastático

Porto Alegre

2013

Monique Siebra Krug

Análise da Difusão Celular em Linhagens com Potencial Metastático

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Maria Cunha de Almeida

Porto Alegre

2013

Monique Siebra Krug

Análise da Dissociação Celular em Linhagens com Potencial Metastático

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Comissão Examinadora:

Dr. Rodrigo Juliani Siqueira Dalmolin
Departamento de Bioquímica – UFRGS

Prof. Dr. Diego Bonatto
Centro de Biotecnologia – UFRGS

Profa. Dra. Rita Maria Cunha de Almeida
Instituto de Física – UFRGS

Porto Alegre, 17 de Julho de 2013

Em especial, seis pessoas foram fundamentais para a conclusão dessa etapa tão importante da minha vida. Não necessariamente nessa ordem, meus sinceros agradecimentos à Professora Rita Maria Cunha de Almeida, que me ensinou coisas que vão além de uma vida acadêmica. À Professora Margareth Uarth Christoff, que sempre me ajudou nas minhas dificuldades – acadêmicas ou não. Às amigas Bruna Dalcin Baldasso e Rafaela Meissner Wetternick, pelo constante estímulo, pelas noites viradas fazendo trabalhos e pelas canecas de café com uma dose generosa de amizade. Por fim, aos meus pais, Sizéli e Sebastião, pelo apoio e por me proporcionar oportunidades que me trouxeram até aqui.

***“Aqueles que passam por nós, não vão sós,
não nos deixam sós. Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”***

– Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

Câncer é a segunda maior causa de morte atualmente, perdendo apenas para doenças cardiovasculares. A maior parte dos pacientes que vem a óbito decorrente de algum tipo de câncer apresentou metástase de um ou mais tumores primários. Dessa forma, estudar o processo que leva à metástase e que decorre dele é essencial para que se possa aumentar o índice de cura desses pacientes. Para que ocorra metástase, as células cancerosas devem passar pela Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*), a qual confere mobilidade às células, de modo que possam migrar para novos sítios, invadir outros tecidos e estabelecer focos de tumor secundários.

Para poder caracterizar a invasividade de linhagens celulares, vários estudos foram propostos, com o intuito de correlacionar a 'mesenquimalidade' (e consequente capacidade de entrar em metástase) dessas linhagens. O objetivo desse trabalho é propor uma caracterização de linhagens celulares a partir da difusividade, dimensão fractal e do processo de agregação apresentadas por culturas de células *in vitro*, para então correlacionar essas medidas com o perfil mesenquimal (previamente descrita na literatura) de cada linhagem.

A linhagem celular escolhida foi a MCF7 (câncer de mama de *Homo sapiens*), que tem capacidade de invasão moderada e crescimento normal. As células foram cultivadas em meio DMEM Low-Glucose, suplementadas com soro fetal bovino a 10% e antibiótico (Ampicilina e Streptomomicina) a 1% e foram mantidas em estufa a 37°C a 5% de CO₂. Para a aquisição de imagens, foi adicionado ao meio de cultura HEPES 20mM para que o meio se mantivesse tamponado. As imagens foram obtidas durante intervalos de tempo que variaram de 20 a 70 horas, com as objetivas de 10x e 20x. A aquisição de imagens foi feita por microscópio óptico invertido e pelo programa QCapture Pro. O processamento de imagens foi feito pelo programa ImageJ.

As células apresentaram-se não como um sistema difusivo, mas como um sistema onde as células apresentam um movimento direcionado, acelerado não uniformemente, dentro dos intervalos de tempo observados. Os agregados formados se fusionaram com o passar do tempo, com a tendência de formar agregados cada vez maiores e em menor número. Por fim, agregados de células com variação gradual de tamanho mostraram-se mais fractais que outros, sendo que imagens contendo agregados muito desiguais apresentaram dimensão fractal menor.

Analisando os resultados obtidos, a explicação é focada na complexidade das culturas, além da heterogeneidade entre as células. O ensaio provou ser válido para indicar o perfil mesenquimal de uma linhagem, entretanto mais experimentos em condições iguais, assim como em condições diferentes devam ser feitos para uma validação adequada.

Palavras-chave: câncer, EMT, mobilidade celular, cultura de células, microscopia

Abstract

Currently, cancer is the second major cause of death, second only to cardiovascular diseases. The majority of patients which die due to some kind of cancer presented metastasis of one or more primary tumours. Regarding this, understanding the leading process to metastasis is essential. For metastasis to occur, cancer cells must go through Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), which grants mobility to the cells, which renders possible migration, tissue invasion, and the eventual establishment of secondary tumor foci.

To characterize the invasiveness of cell lines, several methods have been proposed to correlate mesenchymal phenotype with metastasis. The present work proposes a characterization of cell lines based on the cell diffusivity, fractal dimension and clustering coefficient presented by *in vitro* cell culture, aiming at the correlation with the mesenchymal phenotype (previously described in literature) of each cell line.

The chosen cell line was MCF7 (breast cancer, *Homo sapiens*), which is moderately invasive and presents normal growth. The cells have been cultured in medium DMEM Low-Glucose, supplemented with 10 % Bovine Calf Serum and 1% antibiotics (Ampicillin and Streptomycin), and incubated at 37°C and 5% CO₂. For image acquisition purposes, it was added to the medium HEPES 20 mM. The images were obtained by inverse optical microscope with the objectives of 10x and 20x, at time intervals of one and three minutes, varying from 20 up to 70 hours. Image acquisition was performed with the software QCapture Pro. Image processing was performed using the software ImageJ.

The cells weren't presented as a diffusive system, but as a system, where the cells move with uniform acceleration, during the observed time intervals. The clusters have merged as time passes, tending to form larger clusters, in a smaller number. Concluding, systems with cellular clusters varying more in size have a smaller fractal dimension.

When analyzing the results, most of the explanation focus on complexity of the cultures, besides the heterogeneity among cells. The assay has proven to be valid to indicate the mesenchymal profile of a cell line, however more experiments in equal conditions as well as varying conditions as different substrates and cell lines must be performed.

Keywords: cancer, EMT, cell mobility, cell culture, microscopy

Lista de Equações, Figuras e Tabelas

Equação 1. Caracterização de um Sistema Difusivo.	14
Equação 2. Cálculo do $ \Delta x $	20
Figura 1. Superfície de Koch.	15
Figura 2. Exemplo de figura sobreposta para calcular a distância percorrida por uma célula. .	21
Figura 3. Figuras escolhidas para a medida da dimensão fractal.	22
Figura 4. Imagem da cultura de células MCF7 obtida com aumento de 10x.	23
Figura 5. Deslocamento das células em relação à posição inicial durante o experimento.	26
Figura 6. Deslocamento médio das células.	27
Figura 7. Logaritmo do deslocamento médio das células.	27
Figura 8. Imagem da cultura de células MCF7 obtida com aumento de 20x.	29
Figura 9. Distribuição do tamanho dos agregados.	30
Figura 10. Gráficos da Dimensão Fractal de cada figura.	31
Figura 11. Exemplo de trajetória difusiva.	33
Tabela 1. Número de células pertencentes a cada grupo. ..	23
Tabela 2. Tamanho do último lado anotado e valor do Coeficiente obtido.	32

Lista de Abreviações e Siglas

α – Expoente de t , da Equação 1

$|\Delta x|$ – Módulo do deslocamento de cada célula a partir do ponto inicial

ECM – Matriz Extracelular (do inglês *Extracellular matrix*)

EMT – Transição Epitelial-Mesenquimal (do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*)

MRU – Movimento Retilíneo Uniforme

MRUV – Movimento Retilíneo Uniformemente Variado

MRV – Movimento Retilíneo Variado

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Lista de Equações, Figuras e Tabelas	7
Lista de Abreviações e Siglas	8
1. Introdução	10
1.1. Câncer.....	10
1.2. Transição Epitelial-Mesenquimal	11
1.3. Mobilidade Celular	11
1.4. Dimensão Fractal.....	14
1.5. Medidas de Migração e Invasão Celular	15
2. Objetivos	18
2.1. Objetivos Gerais	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Escolha das Linhagens	19
3.2. Cultivo Celular	19
3.3. Aquisição de Imagens.....	19
3.4. Processamento de Imagens, Medidas de Difusividade, Tamanho dos Agregados e Dimensão Fractal	20
4. Resultados	23
4.1. Coeficientes de Difusividade α	23
4.2. Distribuição de Tamanhos de Agregados.....	29
4.3. Dimensão Fractal dos Agregados	30
5. Discussão	33
5.1. Potencial Metastático e Difusividade.....	33
5.2. Potencial Metastático e Tamanho dos Agregados.....	35
5.3. Potencial Metastático e Dimensão Fractal.....	36
6. Conclusões	38
6.1. Conclusão Geral.....	38
6.2. Conclusões Específicas	38
6.2.1. Condições de Experimento	38
6.2.2. Parâmetros Avaliados	39
7. Referências Bibliográficas	40

1. Introdução

1.1. Câncer

Câncer é uma doença multifatorial que consiste no crescimento descontrolado de tecidos e na falta de regulação deste pelas rotas bioquímicas responsáveis, o que faz com que as células acumulem cada vez mais mutações e diminuam o controle que o organismo tem sobre elas, possibilitando o desenvolvimento da doença.

James Ewing foi um dos primeiros autores a considerar câncer um conjunto de doenças complexas, de forma que uma única alternativa de tratamento para a doença era considerado inviável (EWING, 1935). Atualmente, é considerada um dos maiores e mais complexos problemas de saúde (SPANO *et al.*, 2012). Essa doença, por ser muito heterogênea, é altamente difícil de tratar ou erradicar, sendo que o índice de reincidência (mesmo que seja em outro órgão) é bastante alto. Além disso, aspectos sociais contribuem significativamente para o desenvolvimento de tumores específicos em faixas etárias, etnias e populações específicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (<http://www.who.int>), o número de pessoas desenvolvendo câncer vem aumentando consideravelmente, e as alternativas de tratamento não acompanham esse ritmo.

Para que uma doença seja considerada câncer, Hanahan *et al.* propuseram que seis requisitos devem ser atendidos: proliferação descontrolada e contínua, evasão de supressores de crescimento, ativação de invasão de outros tecidos e metástase, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e resistência à morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Como essa doença pode ocorrer em qualquer tecido e qualquer parte do corpo, os mecanismos que a envolvem não são totalmente claros, o que faz com que a abordagem envolvendo o câncer seja por áreas (por exemplo, abordagens bioquímicas, biofísicas, matemáticas, entre outras).

1.2. Transição Epitelial-Mesenquimal

De longe, a maior causa de morte por câncer é metástase. Uma das primeiras descrições para o processo de metástase é definido como “dependência da semente no solo”, exemplifica que a célula que adquiriu a capacidade de metástase deve ser compatível com o tecido em que irá parar para conseguir estabelecer focos de tumor secundários, que geralmente estão relacionados com os padrões circulatórios envolvendo o microambiente do tumor primário (SPANNO *et al.*, 2012).

Para que as células adquiram capacidade de metástase, primeiro elas devem passar pela Transição Epitelial-Mesenquimal, a qual confere características de células mesenquimais: uma maior capacidade de movimento e consequente invasão de tecidos (SPANNO *et al.*, 2012).

Nesse processo, há uma importante alteração em rotas de sinalização bioquímica, como apontado em uma revisão por Talbot *et al.* Segundo esses autores, algumas famílias gênicas estariam mais envolvidas em desencadear a transição Epitelial-Mesenquimal. As principais seriam as associadas às rotas de sinalização do *TGFβ*, do *Wnt*, do *Notch* e do *Hedgehog*, as quais, quando mal reguladas, podem desencadear o processo de EMT e formação de tumores (TALBOT; BHATTACHARYA; KUO, 2012).

Células que passaram pelo processo de EMT, têm maior facilidade para se desconectar do tecido em que se encontram e maior afinidade por componentes da Matriz Extracelular, utilizada como substrato para a locomoção e espalhamento do tumor.

1.3 Mobilidade Celular

Entre todos os tipos de células existentes, algumas desenvolveram a capacidade de se locomover no meio em que se encontram, seja esse uma superfície, um fluido ou mesmo um tecido. A mobilidade celular é um assunto amplamente pesquisado, tanto em pesquisa aplicada – como em doenças –, quanto em pesquisa básica – para ver como órgãos se desenvolvem, qual o padrão de movimento de células específicas. Como essa é uma área multidisciplinar, a abordagem de cada grupo para caracterizar a mobilidade celular é distinta: alguns grupos optam por uma caracterização bioquímica, para conhecer como e quais proteínas fazem parte do

processo (PARSONS; HORWITZ; SCHWARTZ, 2010; SCHMIDT; FRIEDL, 2010); outros optam por uma caracterização biofísica, para que a maneira e o padrão do movimento possam ser estudados (DOYLE *et al.*, 2009); outros optam por uma caracterização a partir de simulações computacionais, para depois correlacionar os dados obtidos com modelos teóricos (MÉHES *et al.*, 2012), com o intuito de que o comportamento de tipos celulares possa ser previsto.

Para que células possam se mover, há uma ampla variedade de maneiras pelas quais esse processo pode ocorrer. Algumas células possuem estruturas, como flagelos e cílios, algumas utilizam substâncias secretadas para deslizamento, algumas se movimentam a partir da reorganização do citoesqueleto (GINGER; PORTMAN; MCKEAN, 2008; PARTRIDGE; HARSHEY, 2013; TAYLOR *et al.*, [s.d.]; VINCENSINI; BLISNICK; BASTIN, 2011). Em microrganismos, os dois primeiros tipos de movimento são mais comuns, embora ainda existam microrganismos com o terceiro tipo de movimento (ANNESLEY; FISHER, 2009). Em vertebrados, a grande maioria das células se desloca por modificações no citoesqueleto direcionadas para o lado para o qual a célula irá se deslocar (HUBER *et al.*, 2013).

Neste trabalho, o foco principal será a mobilidade celular decorrente de modificações no citoesqueleto, as quais são dependentes da adesividade do substrato (SCHMIDT; FRIEDL, 2010; THÉRY *et al.*, 2006) Nesse processo, acontece a formação de estruturas específicas para cada tipo celular, em cada momento e em cada localização celular, o que é mediado pela concentração de proteínas específicas nos pontos alvo (laterais ou bases da célula), sendo que algumas dessas proteínas são as mesmas para os diferentes processos (HUBER *et al.*, 2013). O movimento mecânico da célula é decorrente da organização do citoesqueleto, que, por ser diferente em diferentes células, possibilita que apenas alguns tipos celulares se movimentem de maneiras pré-estabelecidas.

Na migração celular sobre substratos planos, envolvendo o citoesqueleto, há dois tipos de movimentos mais importantes que envolvem protrusões: o “*blebbing*” e o rastejamento (do inglês *crawling*) celular. *Blebbing* é um processo causado pela formação de protrusões chamadas *blebs*, que são causados pela pressão intracelular devida à desestruturação local e subsequente contração das redes de actina e miosina que forma o córtex celular. Já o rastejamento celular é um processo que ocorre no eixo anterior-posterior da célula, fazendo com que a parte frontal (o lado voltado à direção na qual a célula quer se locomover) da célula constantemente reorganize seu citoesqueleto para expandir as redes de actina e miosina, permitindo que se mova para frente uma curta distância a cada protrusão (SIXT; LA, 2009). A respeito de células cancerosas, sabe-se que a migração dessas é baseada em ambos os movimentos e esse

tipo de migração está correlacionado com o processo de metástase (FRIEDL; WOLF, 2003, 2009; WIRTZ; KONSTANTOPOULOS; SEARSON, 2011). Quando comparados esses dois tipos de movimento, o “*blebbing*” possibilita que as células se movam mais rapidamente e mais facilmente através de poros, redes de proteínas (como a ECM) e substratos em três dimensões (CHARRAS; PALUCH, 2008; FRIEDL; WOLF, 2003); o rastejamento é um processo mais controlado e mais complexo, mas é o processo que ocorre mais frequentemente em substratos em duas dimensões – o que acontece em quase todos os experimentos *in vitro*. Para que o rastejamento ocorra em três dimensões, normalmente há a degradação da ECM por proteínas proteolíticas (FRIEDL; WOLF, 2003; GEFEN, 2013).

Considerando que os experimentos deste trabalho serão feitos em duas dimensões, o tipo de movimento a ser avaliado será o rastejamento celular. Esse processo ocorre de uma maneira bastante mecânica, começando com a propulsão da parte frontal da célula, causada pela polimerização de redes de actina. Após, há a adesão da parte frontal ao substrato, seguida da contração da parte posterior da célula e, por fim, o deslocamento do centro de massa da célula para frente (HUBER *et al.*, 2013). Para efetuar esse deslocamento, a célula se utiliza da formação e degradação de lamelipódios e filopódios para se aderir ao substrato e se mover para frente. Essas estruturas são formadas pela constante organização, polimerização e despolimerização de actina – mediada por uma ampla gama de proteínas, entre as quais se destacam as Rho GTPases (PARSONS; HORWITZ; SCHWARTZ, 2010) –, formando fibras que pressionam a parte frontal da célula, obrigando-a a se lançar para a frente. Filopódios são prolongamentos menores, mas mais compactados, de redes de actina polimerizada que ficam perpendiculares às bordas da célula, com a função de explorar o meio em que a célula se encontra e com funções importantes na embriogênese e cicatrização. Lamelipódios são prolongamentos formados por redes de actina mais uniformes e menos concentradas, abrangendo áreas maiores quando comparadas aos filopódios. Esta estrutura parece ser responsável pela maior velocidade de movimento, visto que queratócitos de peixe – células que não possuem formação de filopódios – apresentam alta mobilidade celular (HUBER *et al.*, 2013).

Atualmente, foi mostrado que o movimento celular em uma dimensão é muito mais semelhante ao movimento celular em três dimensões (o equivalente *in vivo*) do que em duas dimensões (o equivalente *in vitro*), pois o movimento das células tende a ser para frente e não para os lados (DOYLE *et al.*, 2009), sendo guiados por fibras presentes na ECM.

Em um trabalho recente, Friedl *et al.* fizeram uma revisão voltada para o movimento celular coletivo. Nesse trabalho, é mostrado que há mais de uma maneira de as células se move-

rem coletivamente, as quais são muito dependentes da adesão entre proteínas específicas entre as células e entre as células e a ECM (FRIEDL *et al.*, 2012). Devido à importância que o movimento celular coletivo possui (natural ou patologicamente), alguns grupos simularam a segregação e o comportamento migratório desses sistemas (BEATRICI; BRUNET, 2011; KABLA, 2012).

Nesse trabalho, a análise quantitativa e qualitativa da mobilidade celular será feita por meio do cálculo da difusividade de algumas células. Um sistema difusivo pode ser caracterizado pela maneira como os deslocamentos $|\Delta x|$ dependem do tempo Δt , isto é

$$\lim_{t \rightarrow \infty} |\Delta x| = \frac{D}{2} \Delta t^\alpha, \quad (1)$$

em que D é o coeficiente de difusão e $\alpha = \frac{1}{2}$ caracteriza uma difusão normal, $\alpha > \frac{1}{2}$ um processo superdifusivo e $\alpha < \frac{1}{2}$, um processo subdifusivo. Um α maior do que um caracteriza um sistema difusivo. Aqui deslocamentos entende-se pela distância entre as posições do centro de massa da célula em um dado tempo e o tempo inicial. Desvios da difusão normal indicam a presença de outros fatores além de um movimento aleatório, ou seja, células que apresentem um padrão difusivo normal não tendem a ter fatores influenciando seu movimento, seja para algum lado ou com alguma velocidade. Para a caracterização do movimento celular como subdifusivo, normal ou superdifusivo, pode-se traçar em escala log-log o gráfico da média dos deslocamentos celulares versus os intervalos de tempo: o coeficiente angular da reta resultante é o expoente α da Equação 1. Uma vez determinado o expoente, pode-se traçar o gráfico, em escala linear, de $|\Delta x|$ versus Δt^α . Traçando um gráfico da distância até o ponto inicial versus o tempo em escala logarítmica, podemos determinar a o Coeficiente de Difusão, calculado como o coeficiente angular da reta.

1.4. Dimensão Fractal

Mandelbrot foi o primeiro matemático a usar a ideia de fractais como uma geometria aplicável a formas naturais (MANDELBROT, B.; 1983). Fractais são padrões que não se encaixam na descrição feita pela geometria clássica, visto que a medida adequada a formas fractais escala com expoentes fracionários da medida de comprimento.

Por exemplo, considere a superfície de Koch, construída como ilustrado na Figura 1: partindo de um segmento de reta de comprimento $\varepsilon = 1$, divide-se o segmento em três partes iguais e introduz-se na porção central dois segmentos de $1/3$ do segmento inicial, fazendo um ângulo de 60° com a horizontal. O comprimento total dos 4 segmentos fica, então, $\frac{4\varepsilon}{3}$. A seguir, repete-se o procedimento para cada um dos 4 segmentos, ficando então com 16 segmentos de $1/9$ de comprimento, isto é, o comprimento total fica $\frac{16\varepsilon}{9}$. Repetindo *ad infinitum*, dado que a cada passo o comprimento total aumenta, temos infinitos segmentos de reta cujo comprimento total vai a infinito. Neste caso, comprimento não é uma medida adequada para essa figura. Por outro lado, pode-se mostrar que área $a = \varepsilon^2$ de também não é adequada: a área da borda da figura de Koch vai a zero. Há, no entanto uma medida finita para o tamanho dessa figura.

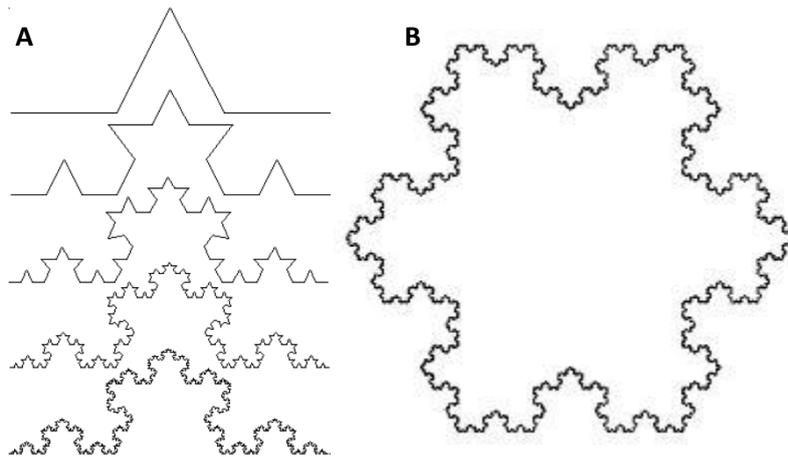


Figura 1. Superfície de Koch. **A.** Processo de construção da superfície de Koch. **B.** Figura após 5 passos de construção.

Computacionalmente essa medida pode ser realizada seguindo diferentes algoritmos. Focaremos no algoritmo conhecido como *box counting* (MANDELBROT, B.; 1983). Inicia-se com uma grade quadrada de lado ℓ sobre a figura. Conta-se o número de quadrados que contém alguma parte de imagem de interesse, deixando de lado aqueles quadrados vazios. Repete-se esse procedimento para redes com tamanho ε cada vez menor. Em um gráfico de escala logarítmica o comportamento do número de quadrados preenchidos versus o inverso do tamanho dos quadrados tende a uma reta. A inclinação da reta é a dimensão fractal da figura. (Ver materiais e métodos).

Padrões fractais já foram descritos diversas vezes na biologia, como por exemplo para correlacionar o padrão de crescimento de folhas com o tamanho de artrópodos encontrados

(MORSE, D. R.; LAWTON, J. H.; DODSON, M. M.; WILLIAMSON, 1985), na vascularização (ZAMIR, 2001), no padrão parenquimal mamográfico (CALDWELL et al., 1990) e na patologia (CROSS, 1997).

Figuras com dimensão fractal têm características geométricas não triviais. No caso de nosso trabalho, o traço interessante é a existência de lacunas de diferentes tamanhos, o que reflete a falta de regularidade dos agregados e/ou suas bordas. Assim, a aplicação do conceito de fractalidade ao estudo de linhagens tumorais pode trazer informações em relação ao comportamento segundo o qual essas linhagens tendem a crescer.

1.5. Medidas de Migração e Invasão Celular

Em um estudo recente, Kramer *et al.* fizeram uma revisão sobre os modelos e ensaios existentes para avaliar migração e invasão celular (KRAMER *et al.*, 2013). A revisão está separada em três tipos de experimentos: ensaios de migração, ensaios de migração em capilar e ensaios de invasão.

No geral, os ensaios possuem o mesmo princípio (por exemplo, medida da migração celular através da área ocupada pelas células ao decorrer do tempo), desenvolvido de formas diferentes.

Alguns dos ensaios de migração consistem em avaliar a área na qual as células migram (*Wound Healing, Cell Exclusion Zone Assay, Fence Assay, Micro-Carrier Bead Assay, Fence Assay, Spheroid Migration Assay*), ou seja, como as células migram em um determinado espaço de tempo, com monitoramento por meio de imagens obtidas por microscópio em intervalos de tempo determinados. Outros consistem em avaliar a distância de migração das células (*Single Cell Motility Assays*), que também podem ser monitorados via microscopia. Outros ainda consistem na contagem de células que migraram por uma membrana (*Transwell Migration Assay*) ou que migram através de uma ponte (*Capillary Chamber Migration Assay*), ambos os testes tendo como princípio as células migrando em direção a uma condição preferencial (um quimioatratador ou um meio mais nutritivo), e o resultado é obtido através da contagem de células. Entre os ensaios descritos, o *Wound Healing* é um dos mais usados, por ser um experimento bastante simples, de fácil análise e praticamente sem custos, mas que permite avaliar a

migração celular através da secção; não podendo, entretanto, ser submetido a um tempo mais longo de exposição, pois a multiplicação celular pode ser confundida com a migração.

Em relação aos ensaios, alguns deles também consistem em avaliar a área de alguma condição, seja a área de invasão ou a área de ECM degradada. Ensaios como o *Platypus Invasion Assay* e o *Spheroid Invasion Assay* podem ser avaliados pela área de invasão e facilmente monitorados através de imagens de microscopia, enquanto o *Gelatin Degradation Assay* mede a área de degradação de uma ECM fluorescente conforme a célula se move, podendo também ser monitorada por microscópio. Também há ensaios de invasão que utilizam a contagem do número de células como método de avaliação, como o *Transwell Invasion Assay* (praticamente igual ao *Transwell Migration Assay*, mas com uma camada de ECM sobre a membrana pela qual as células passam) e o *Spheroid/Monodispersed Cell Invasion Assay*, no qual as células presentes em uma suspensão invadem pequenas esferas de células de outro tipo, podendo o resultado ser medido em fluorescência e, a partir daí, contagem de células. Por fim, há os estudos de invasão baseados na distância percorrida (*3d Cell Tracking*) e na profundidade da invasão (*Vertical Gel Invasion Assay*), o primeiro sendo facilmente avaliado por microscopia e o segundo por contagem de células marcadas fluorescentemente.

Analisando, nenhum dos métodos descritos pelos autores é universal, isto é, eles precisam ser adaptados para certas condições dependendo de como o experimento é feito (e.g. tamanho dos poros das membranas, tipo de meio envolvido, tipo celular, tempo de análise) e alguns não podem tão facilmente ser desenvolvidos (e.g. a demanda de tempo é muito grande, possuem um alto custo, é necessário que se tenha um alto conhecimento técnico na área). Dessa forma, ensaios que possam caracterizar mobilidade celular fazem-se necessários, tanto na área de migração, quanto na área de invasão.

Além disso, os mecanismos de migração celular são bastante complexos, o que faz com que o processo esteja longe de ser completamente elucidado. Abordagens experimentais capazes de acompanhar células individualmente fazem-se necessárias, principalmente para o desenvolvimento de simulações mais coesas com a realidade. Alguns experimentos desse tipo já foram desenvolvidos, embora os parâmetros analisados sejam, quase que na totalidade dos experimentos, velocidade, distância percorrida e caminho.

Esse trabalho apresenta uma proposta desse tipo de experimento, sem que interferentes (por exemplo, marcadores) sejam utilizados.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Objetivos gerais desse trabalho consistem na proposta de uma nova medida *in vitro* para migração e invasão celular e correlação entre o potencial metastático de uma linhagem celular e suas características (dimensão fractal, difusividade e tamanho dos agregados formados), no intuito de desenvolver uma nova metodologia para a caracterização de linhagens e tipos celulares.

2.2. Objetivos Específicos

Entre os objetivos específicos, podemos citar

- A caracterização do processo difusivo, da dimensão fractal e dos tamanho dos agregados formados (clusters);
- a correlação entre essas características e o perfil de cada linhagem;
- o estabelecimento de um protocolo para efetuar as medidas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Escolha das Linhagens

Para esse trabalho, foi usada uma linhagem celular: a MCF7, proveniente de câncer de mama humano (*Homo sapiens*). Essa linhagem é de células com crescimento moderado e um perfil intermediário entre epitelial e mesenquimal, de forma que não são muito invasivas, mas mantêm a capacidade de invasão de tecidos, além de possuírem uma menor capacidade de migração (<http://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#357C3571006A4259B64650D34DF19048>). A linhagem foi gentilmente cedida pelo laboratório do Prof. Dr. Guido Lenz, pertencente ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2. Cultivo Celular

As células foram cultivadas em meio DMEM Low-Glucose (Invitrogen), suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de antibiótico (Ampicilina e Streptomicina), sendo mantidas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Para a manutenção das culturas, as células foram tripsinizadas com uma solução de tripsina (Sigma-Aldrich) e EDTA (ZHANG; LONG; DING, 2012) uma vez por semana, e uma quantidade de 1×10^6 células/mL foi depositada em cada garrafa após cada tripsinização.

3.3. Aquisição de Imagens

Para os experimentos, as células foram tripsinizadas em fase estacionária, com confluência de 90-95% da garrafa. As células foram contadas em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi medida com Azul de Trypan a 0,2%, e um número entre 5×10^4 e 1×10^5 células/mL foi colocado em placas de 24 poços. Durante a aquisição de imagens, HEPES (Invitrogen) a 20

mM foi adicionado ao meio de cultura utilizado, segundo protocolo do fabricante. A temperatura foi mantida durante todo o experimento. Durante as três primeiras horas, as células foram deixadas para sedimentar, sem que fotos fossem tiradas.

As imagens foram adquiridas por microscópio óptico invertido (Olympus, modelo IX70), com as objetivas de 10x e 20x. O programa utilizado para a obtenção de imagens foi o QCapture Pro (<http://www.qimaging.com/products/software/qcappro7.php>), o qual registrava as imagens em intervalos de um ou três minutos, durante períodos entre 20 e 72 horas.

3.4. Processamento de Imagens, Medidas de Difusividade, Tamanho dos Agregados e Dimensão Fractal

Para as análises, dois sets de imagens adquiridos em dois dias e duas condições experimentais diferentes (quantidade de células e aumento da objetiva) foram utilizados, de forma que são experimentos para fins distintos: o primeiro set (5×10^4 células/mL e objetiva de 10x) foi utilizado para a medida da difusividade e o segundo (1×10^5 células/mL e objetiva de 20x). Para o processamento, capturamos imagens com intervalo de 30 minutos cada, totalizando 1080 minutos.

As imagens foram processadas com software específico para processamento de imagens, ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>), o qual foi desenvolvido pelo NIH (*National Institute of Health*). As imagens adquiridas foram passadas para 8-bits e, em seguida, o plugin “enhance contrast” foi utilizado com a saturação de 0.9% e as opções “normalize” e “equalize histogram” marcadas.

Para as medidas de difusividade, as imagens obtidas a cada trinta minutos foram somadas, de forma que a posição das células escolhidas ficasse marcada na imagem composta pela sobreposição da anterior e da posterior, mostrando o local em que as células estavam nas duas imagens (Figura 2). Para verificar a distância da célula até sua posição inicial, anotamos a posição de cada célula na imagem inicial e em cada tempo posterior, de modo que cada célula possuirá uma posição $\vec{r}_0 = (i, j)$ na imagem inicial e uma posição $\vec{r}_t = (i', j')$ na de interesse. A distância foi calculada em pixels como

$$|\Delta x| = \sqrt{(i - i')^2 + (j - j')^2} \quad , \quad (2)$$

e, com os resultados obtidos, foi traçado um gráfico logarítmico da distância versus o tempo, e o expoente α da Equação 1 foi obtido medindo-se o coeficiente angular da reta neste gráfico.

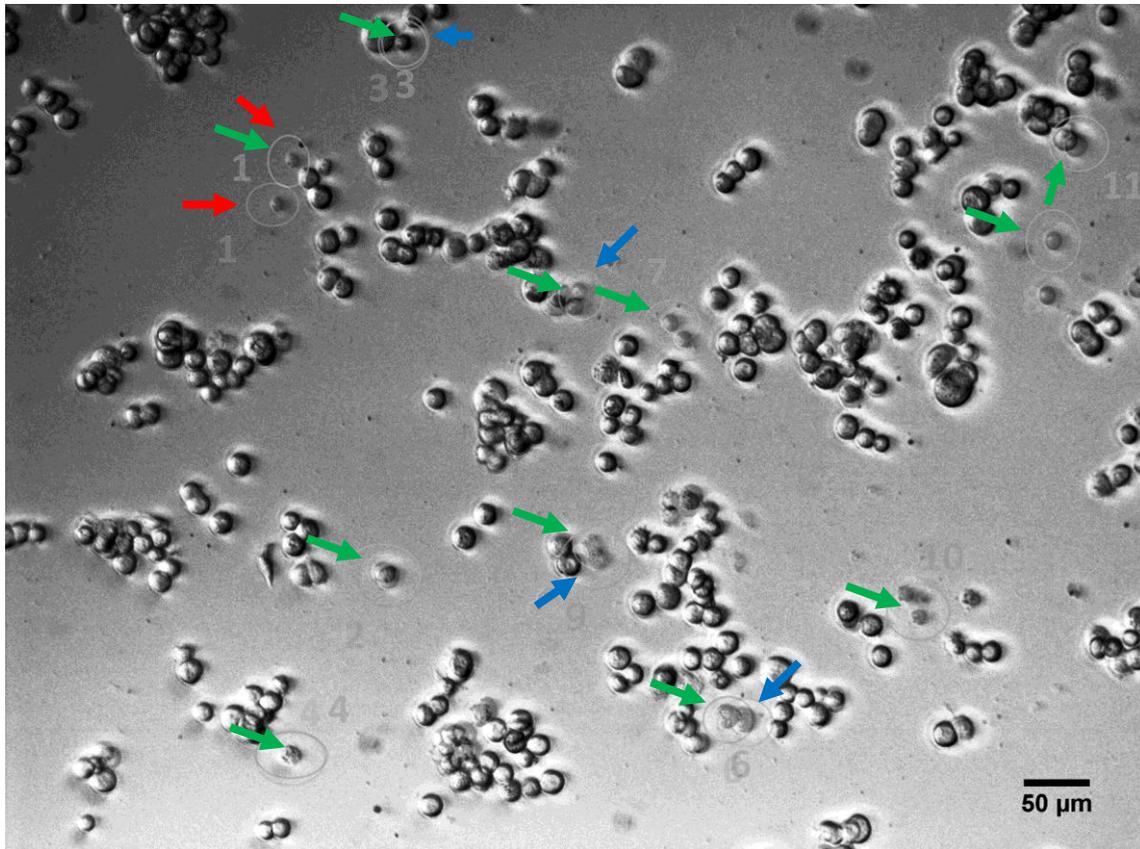


Figura 2. Exemplo de figura sobreposta para calcular a distância percorrida por uma célula. As setas vermelhas indicam a posição de uma célula em t_1 e t_2 , com intervalo entre eles de trinta minutos. As setas verdes indicam as células que em algum momento do intervalo 0-1080 minutos migraram de alguma forma, podendo ou não serem pertencentes a clusters (setas em azul). Os números indicam as células escolhidas para serem acompanhadas. Números repetidos são devido à sobreposição de imagens.

Para as medidas de tamanho dos agregados, foram escolhidas quatro imagens do aumento da objetiva de 20x. As imagens escolhidas tinham uma diferença de 330 minutos cada. Em cada imagem, os agregados de tamanhos 1, 2, 3-5, 6-10 e maiores que 10 células foram contados, e os resultados obtidos são mostrados em um gráfico.

Para a análise da dimensão fractal, as imagens utilizadas foram a da figura 6A (as das objetivas de 4x) do trabalho desenvolvido por Horiuchi *et al.* (HORIUCHI *et al.*, 2012). Nesse experimento, os autores cultivaram as células de quatro linhagens celulares diferentes em uma

matriz tridimensional, o que possibilita ver o comportamento do crescimento dos agregados celulares. As imagens escolhidas (Figura 3) foram seccionadas em quadrados de lado 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3 e 0,2 centímetros, formando redes quadradas com um determinado comprimento de lado. Apenas quadrados que contivessem uma célula ou ao menos uma parte de célula foram contados. Para o cálculo da dimensão fractal, foi traçado um gráfico logarítmico do número de quadrados contados versus o lado, e o coeficiente da dimensão fractal foi calculado como a inclinação da reta.

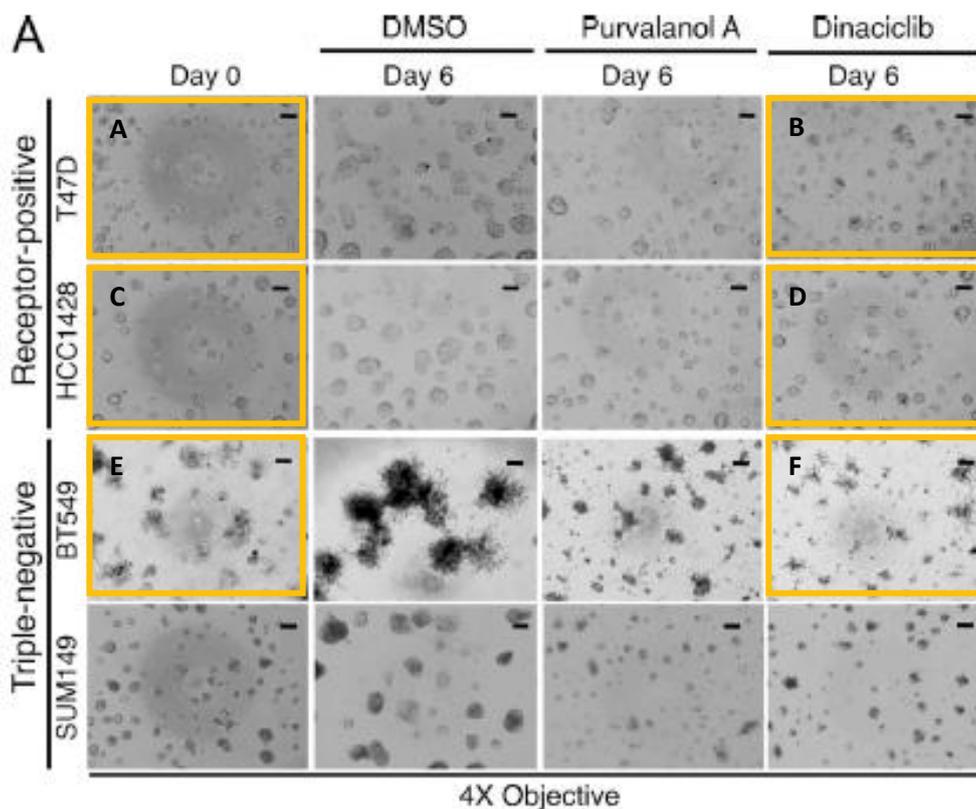


Figura 3. Figuras escolhidas para a medida da dimensão fractal. Em retângulos amarelos, as figuras escolhidas para o cálculo da dimensão fractal, retiradas do experimento de Matrigel 3D de Horiuchi *et al.*

4. Resultados

4.1. Coeficientes de Difusão e α

Imagens para o cálculo do α , obtidas utilizando-se as objetivas de 10x e 5×10^4 células/mL (Figura 4).

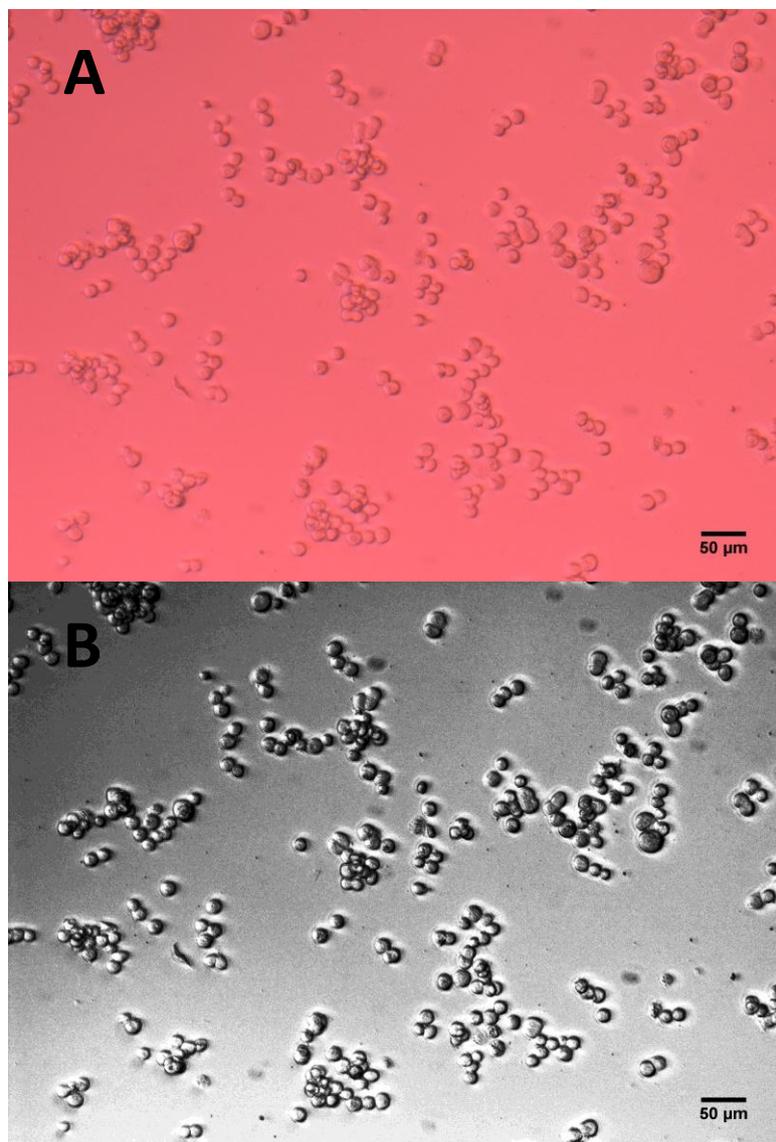


Figura 4. Imagem da cultura de células MCF7 obtida com aumento de 10x. **A.** Imagem obtida diretamente do software, sem processamento. **B.** Imagem obtida após processamento descrito no item 3.4.

Na análise da difusão, foram encontradas células que não se moveram em momento nenhum, células que estavam sozinhas e se moveram e células que se dissociaram do cluster em que estavam e se moveram. O número de células pertencentes a cada grupo pode ser visto abaixo (Tabela 1). Com o passar do tempo, mais células individuais foram observadas, o que pode ser explicado pelo aumento de células precipitadas ou a dissociação de células de seus clusters.

Tabela 1. Número de células pertencentes a cada grupo. **G1:** Total de células individuais; **G2:** Total de células individuais que movem-se ao menos uma vez durante o intervalo 0:1080 minutos; **G3:** Células inicialmente pertencentes a clusters que dissociaram-se e movem-se.

	Tempo				
	0	30	60	90	120
G1	16	17	19	21	20
G2	4	5	5	6	6
G3	3	3	4	5	4

Por não ter um movimento difusivo considerável, a célula 11 (mostrada na Figura 1) foi excluída do cálculo.

Pelo experimento, foi possível constatar que a porcentagem de células que migram após terem se dissociado de um cluster foi de 40%. Além disso, foi possível constatar que a porcentagem de células que se movimentam em relação ao número de células individuais foi de 50%. Entretanto, devido ao pequeno número de células, tais valores devem ainda ser validados por experimentos mais extensivos.

As dez células monitoradas durante o intervalo de tempo 0-1080 minutos apresentaram comportamentos migratórios bastante diferentes. Algumas células se moveram distâncias consideráveis, enquanto outras se moveram durante uma pequena distância e depois pararam de se mover. Em relação às células pertencentes a clusters, pode ser notado um esforço para que as células se dissociassem do cluster, permanecendo por um certo tempo próximas do mesmo local.

Na Figura 5, o valor de $|\Delta x|$ de cada célula em cada tempo foi plotado, possibilitando que a trajetória de cada célula durante o experimento pudesse ser monitorada. Se traçarmos um círculo onde a posição em um tempo t da célula está sobre a circunferência e a posição

inicial ($t=0$) é o centro, o raio do círculo indicará o $|\Delta x|$. Isso significa que inclinações positivas da linha que liga os pontos indica um maior afastamento em $|\Delta x|$ do centro, enquanto inclinações negativas indicam uma reaproximação do centro. Pode-se notar que algumas células oscilam entre uma certa região, ao passo que outras parecem ter uma direção mais específica, distanciando-se do ponto inicial, indicando a possibilidade de um movimento aleatório.

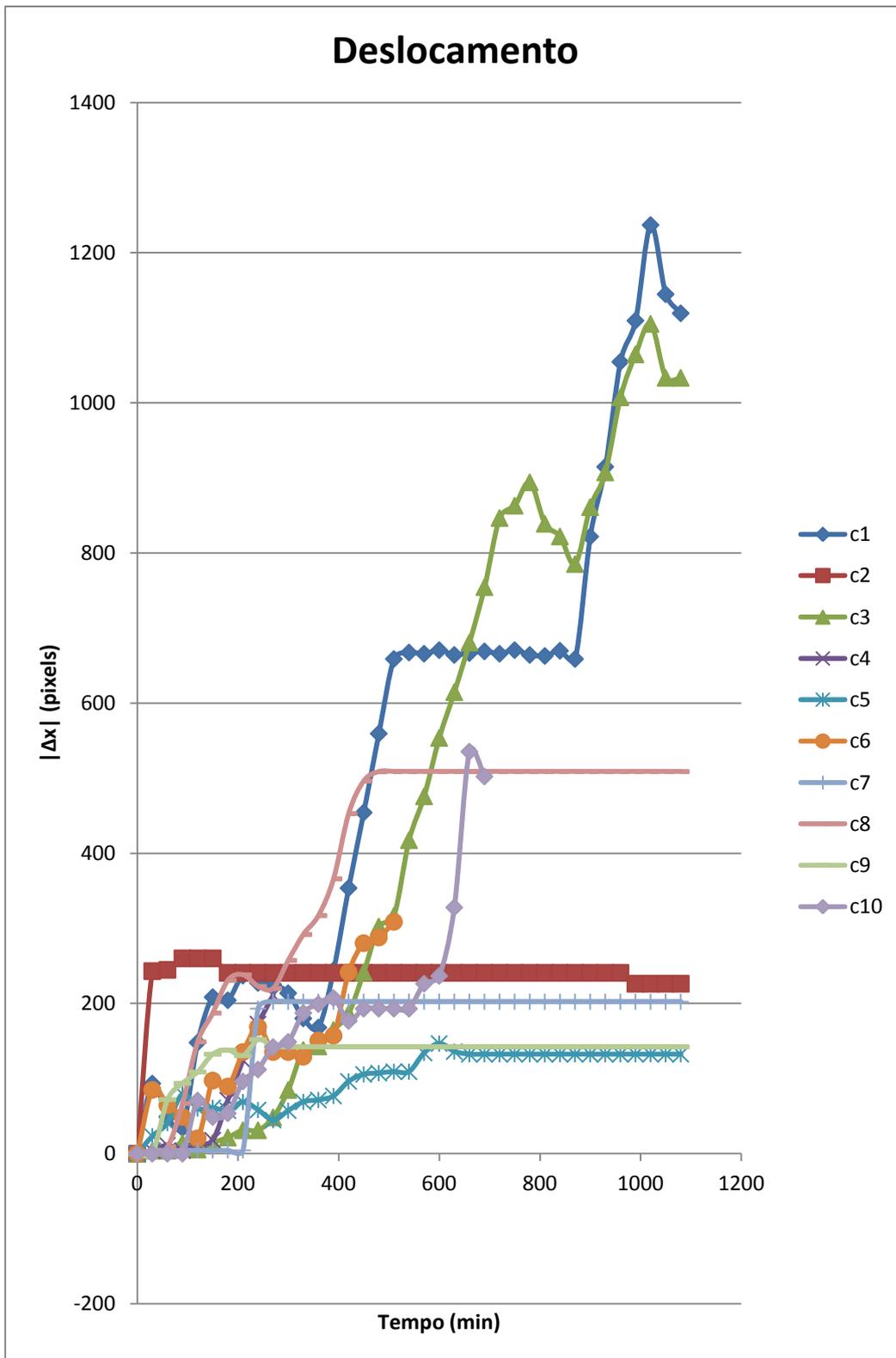


Figura 5. Deslocamento das células em relação à posição inicial durante o experimento. Nessa figura, é possível ver o monitoramento do deslocamento a partir do ponto inicial (em módulo) em pixels de dez células diferentes ao passar do tempo. Inclinações positivas indicam distanciamento do ponto inicial, enquanto inclinações negativas indicam aproximação.

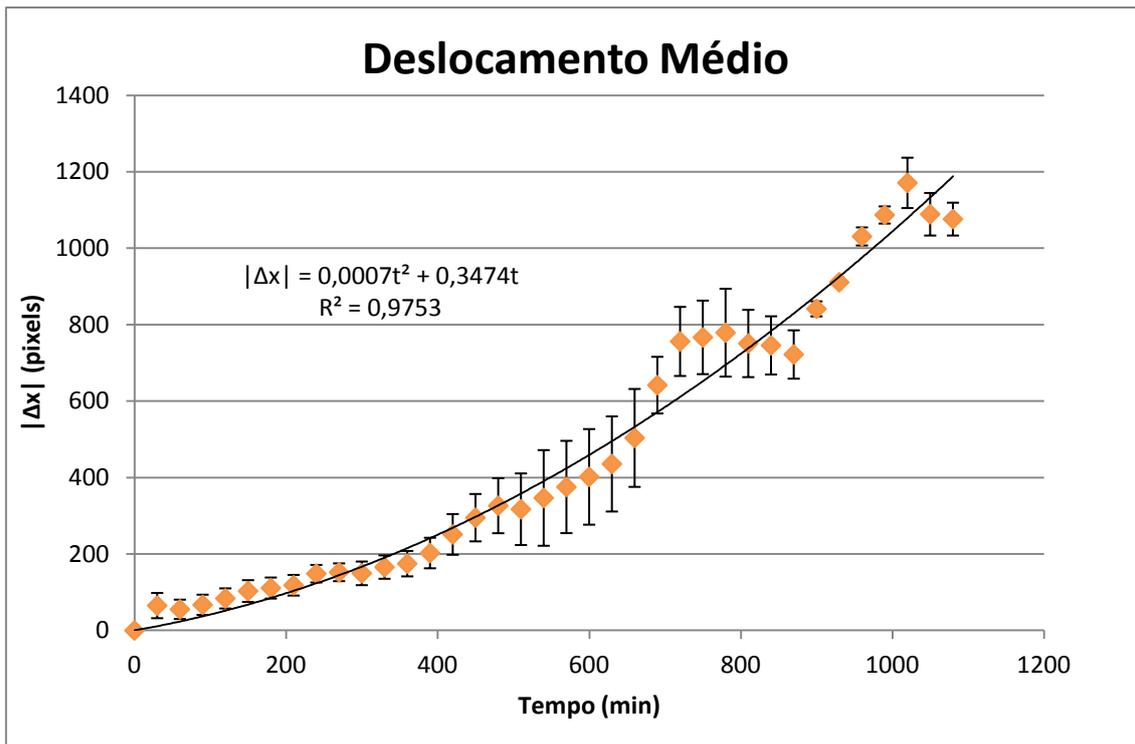


Figura 6. Deslocamento médio das células. As barras indicam o Erro Padrão da média de $|\Delta x|$. A linha preta indica a tendência da difusividade, com a equação mostrada. R^2 é o Coeficiente de Determinação.

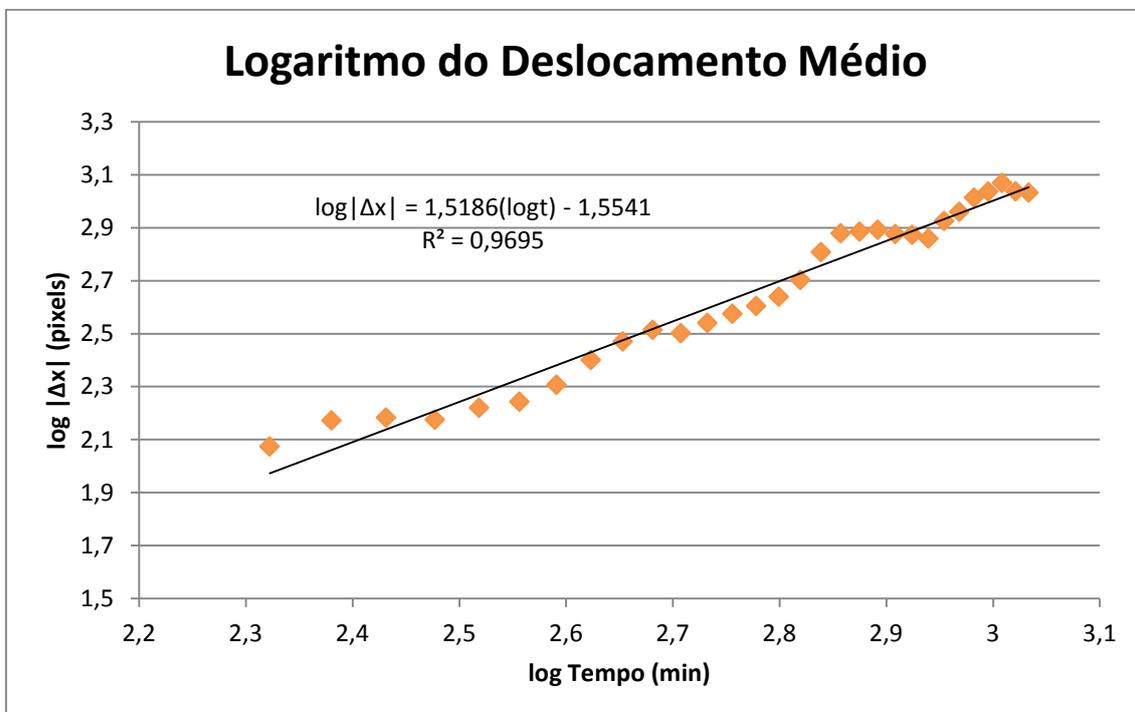


Figura 7. Logaritmo do deslocamento médio das células. A linha preta indica a tendência do logaritmo do deslocamento, com a equação mostrada. R^2 é o Coeficiente de Determinação.

A inclinação desta linha dá uma estimativa do coeficiente de difusão destas células neste experimento.

Pela Figura 7, pode-se notar que o deslocamento médio das células no gráfico log-log, embora apresentem flutuações, é bem descrito por uma reta, o que poderia indicar uma difusão normal.

No entanto, a inclinação da reta de tendência da Figura 6, obtém-se que o valor de $\alpha = 1,5186$. Como o t da Equação 1 está sendo elevado a um expoente maior do que $\frac{1}{2}$, o Coeficiente de Difusão não será calculado, pois esse sistema se apresentou como não difusivo, podendo ser considerado balístico. Este valor significa que os intervalos de tempos escolhidos para a monitoração dos deslocamentos é da ordem ou menor que os intervalos de tempo típicos em que a direção dos movimentos celulares perdem autocorrelação.

4.2. Distribuição de Tamanhos de Agregados

Imagens escolhidas para a distribuição de tamanho dos agregados, obtidas com a objetiva de 20x e 1×10^5 células/mL (Figura 8).

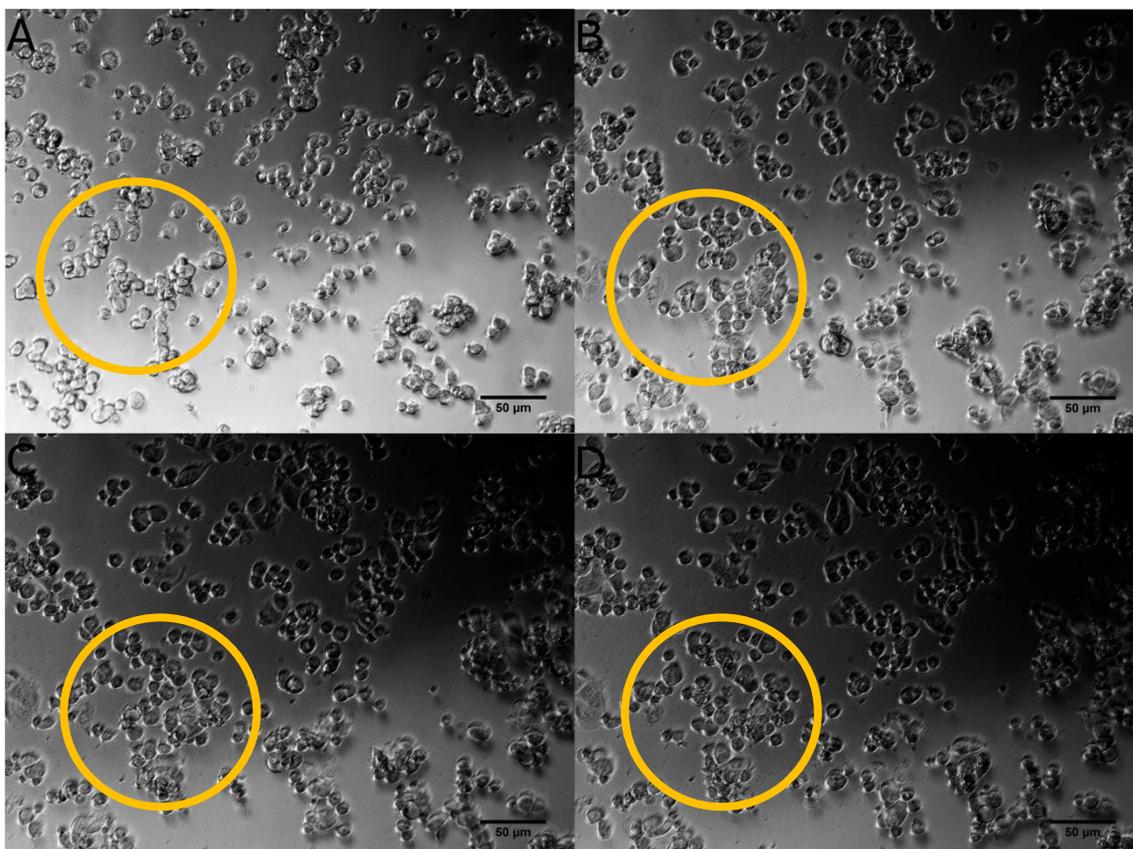


Figura 8. Imagem da cultura de células MCF7 obtida com aumento de 20x. **A.** Tempo de experimento igual a 0 minutos. **B.** Tempo de experimento igual a 330 minutos. **C.** Tempo de experimento igual a 660 minutos. **D.** Tempo de experimento igual a 990 minutos. Os círculos amarelos indicam exemplos de agregados que podem ser vistos fusionando-se com o passar do tempo.

Os resultados das contagens mostraram que o número inicial de agregados tende a diminuir conforme o tempo passa. Na Figura 9, podemos ver que os agregados de tamanho 1 são os que mais drasticamente diminuem de quantidade conforme o tempo passa.

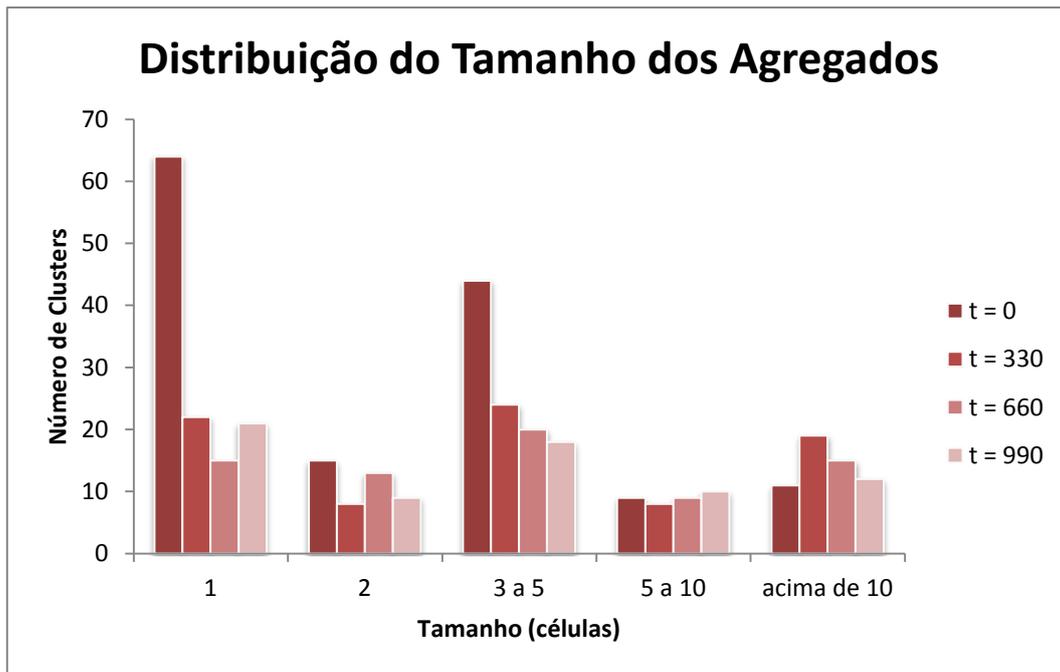


Figura 9. Distribuição do tamanho dos agregados.

Pode-se ver que os tamanhos mais comuns para os agregados são 1 (células separadas) e de 3 a 5 células. A distribuição de tamanho de agregado varia com o tempo, conservando o número de células (morte ou mitose não foram observadas em número significativo).

Como pode ser visto na Figura 8, os agregados tendem a se fundir, formando agregados de tamanho cada vez maiores, principalmente no aumento do número de células nos agregados de tamanho acima de 10, indicando que a tendência é de agregação celular.

4.3. Dimensão Fractal dos Agregados

As imagens retiradas de (HORIUCHI *et al.*, 2012) mostraram-se capazes de validar o teste da dimensão fractal.

Na Figura 10, pode-se ver os resultados obtidos para cada figura. Nos gráficos log-log estão plotados todos os pontos obtidos de acordo com a contagem e os pontos escolhidos para o ajuste da curva. Pode-se ver que os pontos finais (os que aparecem em azul) aparentemente trocam de inclinação, mostrando que, para essa escala, a dimensão fractal seria diferente da obtida. A figura que apresentou uma menor dimensão fractal foi a E, que é mais irregular nos quesitos tamanho e forma dos agregados.

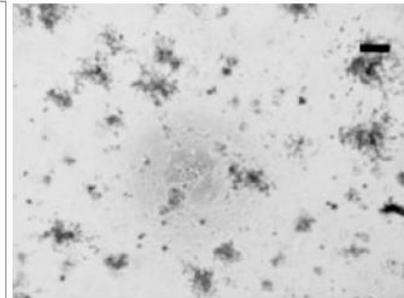
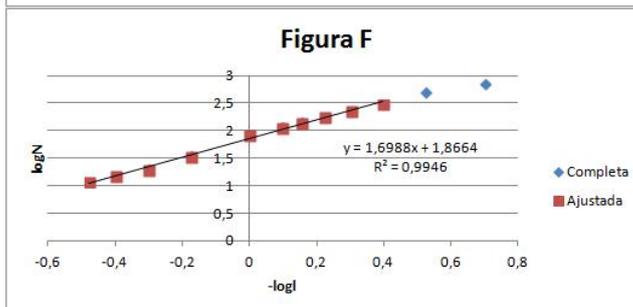
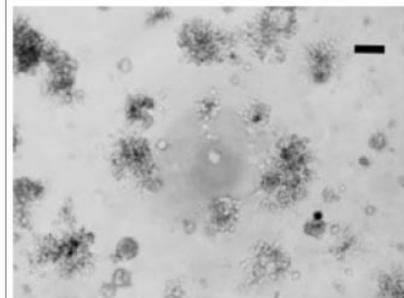
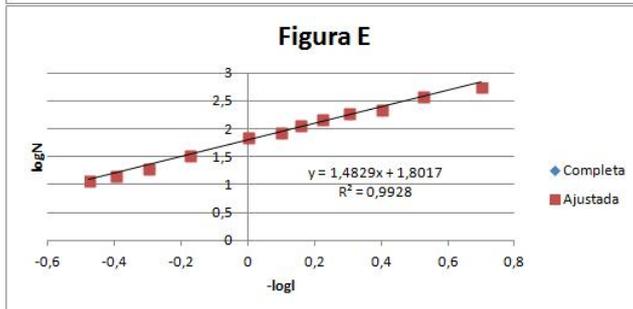
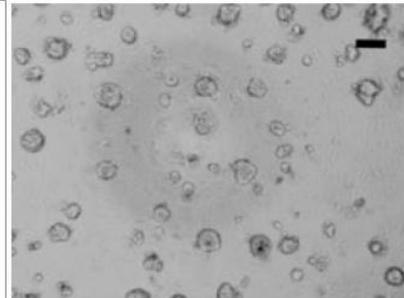
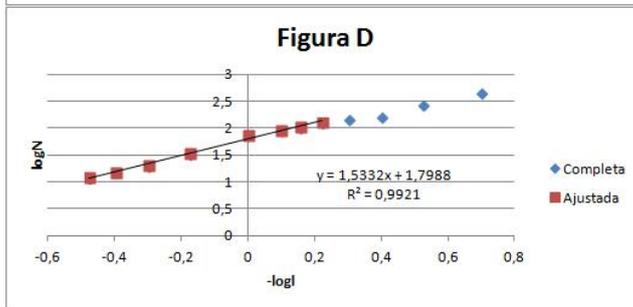
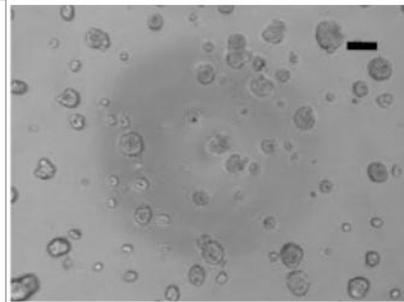
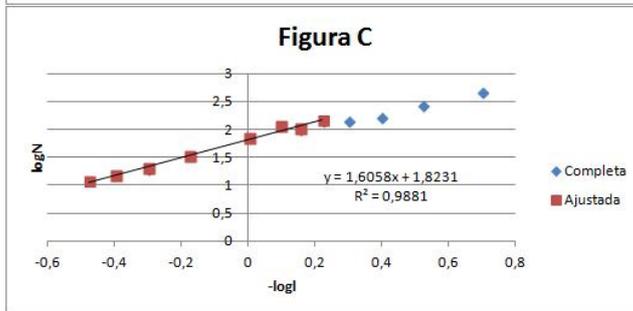
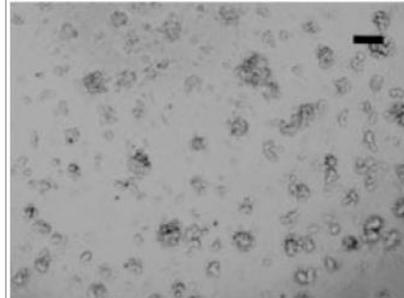
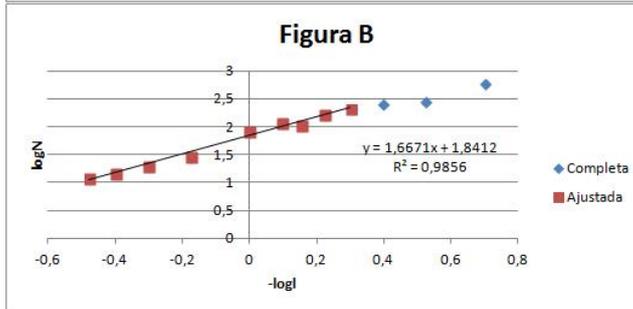
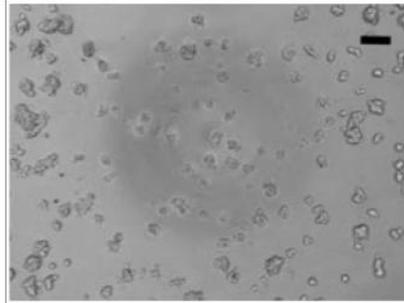
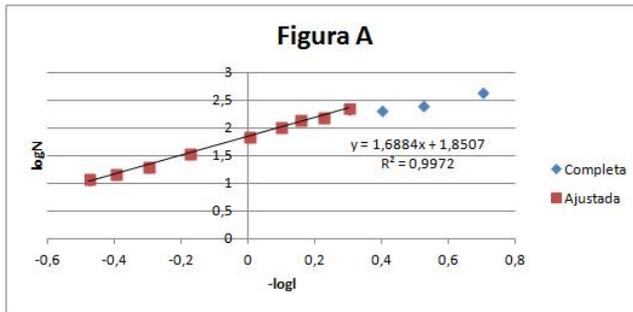


Figura 10. Gráficos da Dimensão Fractal de cada figura. Barra de escala = 10 μm . N: Número de quadrados contados. l: lado do quadrado em centímetros. Os pontos em azul correspondem a todos os pontos obtidos com a contagem, enquanto os vermelhos são os utilizados no ajuste da curva, escolhidos com o intuito de formar uma reta. O Coeficiente de Determinação indica que a curva ficou bem ajustada.

Tabela 2. Tamanho do último lado anotado e valor da Dimensão Fractal obtido.

Figura	Tamanho do Lado (Último)	Valor da Dimensão Fractal
A	0,5 cm	1,6884
B	0,5 cm	1,6671
C	0,6 cm	1,6058
D	0,6 cm	1,5332
E	0,2 cm	1,4829
F	0,4 cm	1,6988

Os valores de lado obtido foram para o último valor utilizado no ajuste da curva.

As figuras escolhidas para a obtenção da dimensão fractal apresentaram comportamentos bastante parecidos dentro de uma escala específica: para o aumento de 4x, pode-se dividir as figuras em quadrados de lado até 0,5 cm para se traçar um perfil fractal; para valores menores de lado, os quadrados já são da ordem do tamanho das menores células, isto é, atinge-se o cut-off inferior para o tamanho dos quadrados.

Duas das imagens mostraram um tamanho de lado do último ponto escolhido menor que 0,5 cm (Tabela 2). Todas as figuras apresentaram dimensões fractais ao redor de 1,6, com exceção da figura A, com Dimensão Fractal da ordem de 1,4. Por inspeção visual, pode-se notar que o tamanho das células variam mais, apresentando muitas células isoladas, enquanto que as outras figuras, apresentam cluster mais regulares e menos células isoladas. Essa é justamente o tipo de informação que a medida de dimensão fractal pode fornecer.

5. Discussão

5.1. Potencial Metastático e Difusividade

A capacidade de migração é um processo preliminar à capacidade de invasão de um tecido. Por isso, células com um alto grau de invasão tendem a ser bastante móveis.

Considerando que as células escolhidas para desempenhar os experimentos são células intermediárias entre perfis epitelial e mesenquimal, sendo mais para o epitelial, espera-se que elas não apresentem o perfil de movimento clássico de uma célula mesenquimal – migração alongada (FRIEDL; ZALLEN, 2010). O tipo de migração apresentado pelas células (movimento ameboide – células com corpo redondo ou elipsoide, formação principalmente de *blebs*, embora também haja formação de filipódios, e baixa adesão ao substrato) é um indicativo de que a EMT nessa linhagem celular não foi um processo tão drástico quanto o que acontece em linhagens mais invasivas (KRAMER *et al.*, 2013). É importante salientar que o substrato de adesão das células pode resultar em um processo migratório completamente diferente (THÉRY *et al.*, 2006).

Conforme está mostrado na Figura 4, as células possuem um comportamento de migração bastante heterogêneo, de modo que no mesmo tempo nem todas as células movem-se a mesma distância e para um lado preferencial para cada célula – até mesmo células que tiveram um raio de deslocamento maior apresentaram oscilações durante o trajeto. Esse tipo de comportamento é visto em sistemas difusivos em geral, no qual os elementos que difundem percorrem caminhos intermediários até chegarem ao ponto final, conforme Figura 11:

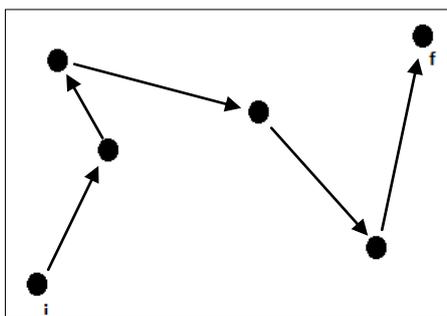


Figura 11. Exemplo de trajetória difusiva. Ponto inicial representado por i; o final, por f.

Para as células que mostraram preferência de movimento em relação a uma direção, pode ser que possuam uma maior polarização dos elementos responsáveis pelo deslocamento em um lado específico da célula, o que explicaria o deslocamento preferencial mesmo que não haja um quimioatratador específico no meio. Comportamentos difusivos são caracterizados pela perda de correlação da direção do movimento em intervalos de tempo característicos do sistema. A difusão atômica em um gás, por exemplo, é caracterizada pelo movimento retilíneo dos átomos entre colisões. Tais colisões têm o efeito que pode ser modelado pela mudança aleatória da direção do movimento dos átomos. O livre caminho médio é o tamanho típico entre colisões sucessivas e é percorrido durante intervalos de tempos também típicos para cada sistema. Caso a observação aconteça em intervalos de tempos menores que esse intervalo típico, não será observado o comportamento difusivo. Não podemos descartar que neste experimento o intervalo de tempo de 30 horas não seja ainda pequeno para que caracterização da difusão.

Por outro lado, o movimento dos átomos entre colisão é tipicamente uniforme, sem aceleração. Isto significa deslocamentos que aumentam com a primeira potência de t , isto é, $|\Delta x| \sim t$, enquanto que o comportamento difusivo $|\Delta x| \sim t^{1/2}$. Assim, à medida que o tempo de observação aumenta, observamos uma transição do expoente 1 para 1/2. O que observamos, no entanto, é que os expoentes são maiores que 1, indicando que o movimento em tempos pequenos parece ser acelerado.

Entretanto, ao efetuarmos os cálculos da média da difusividade média das células, o sistema mostrou-se não difusivo. Na Figura 6, fica evidente que nesse sistema, o tempo influencia com um expoente maior que 1, visto que a tendência não é linear, e menor que 2, o que indica que não é uma parábola: um indicativo de um sistema acelerado, mas talvez não uniformemente. Um α intermediário entre esses dois números mostra que a relação do sistema não é balística, ou seja, não pode ser descrito através de MRU, tampouco podendo ser descrito como MRUV, pois não apresenta uma aceleração constante. O sistema de migração estudado aparentemente é pode ser descrito como MRV, o que desqualifica ser um processo difusivo. Isso indica que as células tem um componente de aceleração no sistema que não é constante, de forma que a célula não mantenha a mesma velocidade nem a aceleração durante o seu percurso. Devido ao alto valor obtido para o Coeficiente de Determinação, pode-se considerar que o resultado é válido, mas experimentos mais extensivos devem ser realizados para validar este resultado.

Uma explicação possível para o fato é que células são sistemas mais complexos que os modelos clássicos de difusão estudados, considerando ainda que a heterogeneidade bioquímica de cada célula influencia fortemente na sua migração, adesão ao substrato e fixação em um local específico (podendo ser uma outra célula, um substrato proteico ou simplesmente uma superfície), portanto possuem um comportamento mais irregular em relação a modelos já descritos (SCHMIDT; FRIEDL, 2010).

Esse fato não invalida o estudo, mas mostra que condições diferentes – como substrato ou linhagem celular – podem (e provavelmente o fazem) mudar o comportamento migratório de um sistema e as equações que o descrevem. Segundo o experimento feito, células com um perfil mesenquimal não elevado não podem ser classificadas segundo um padrão difusivo quando avaliadas *in vitro*, embora isso possa não ser válido quando avaliado *in vivo*. Em relação a outras linhagens celulares mais ou menos mesenquimais, não se pode afirmar que esse comportamento se repetiria, necessitando que mais experimentos sob os mesmos moldes, mas variando condições diferentes (substrato, linhagem, presença de quimioatratador) para que se tire mais conclusões.

5.2. Potencial Metastático e Tamanho dos Agregados

Células em geral tendem a formar tecidos, mas nem sempre estes são de mesmo tamanho e mesma compactação. Enquanto células epiteliais tendem a formar lâminas bastante confluentes, fibroblastos, por outro lado, possuem um maior espalhamento, bem como uma maior quantidade de interstício entre eles.

Células que passaram pelo processo de EMT tendem a adquirir características mais mesenquimais, entre as quais está a preferência pela migração individual, embora casos em que células mais mesenquimais apresentem migração coletiva sejam observados. Seguindo essa lógica, as células possuem mais ou menos proteínas de adesão célula-célula, o que torna possível se desgrudar do cluster e migrar ou migrar juntamente com algumas células (FRIEDL *et al.*, 2012).

Ao mesmo tempo, o movimento coletivo de células pode ser utilizado para questões fisiológicas normais, como em processos de embriogênese e cicatrização, necessários para qualquer animal (KABLA, 2012). Em relação ao tamanho dos agregados formados, foi notada a

tendência de adquirir confluência por parte das células. Como pode ser visto na Figura 8, o número de células individuais cai consideravelmente conforme o tempo de experimento passa. Além disso, pode ser constatado que o tamanho dos clusters tende a aumentar, como é mostrado na Figura 7, formando cada vez menos agregados, porém, com um tamanho maior.

Como já foi discutido anteriormente, o perfil das células da linhagem MCF7 não é muito mesenquimal, o que é um indício de um alto número de moléculas de adesão célula-célula. Entretanto, fica claro que, com o passar do tempo, os clusters movem-se para fusionarem-se, em condições que já foram previamente descritas (FRIEDL *et al.*, 2012; KABLA, 2012) e que, de certa forma, podem ser vistos como o mesmo processo que acontece em um experimento de *Wound Healing* (KRAMER *et al.*, 2013).

Quando se fala em movimento coletivo, sabe-se que a densidade celular do sistema em questão interfere no comportamento das células (KABLA, 2012), portanto uma variação na quantidade de células envolvidas no experimento pode resultar em um resultado completamente diferente, mesmo que a mesma linhagem seja usada e as condições experimentais sejam mantidas.

5.3. Potencial Metastático e Dimensão Fractal

O crescimento de tumores é um processo complexo, pois nem sempre tumores crescem na mesma velocidade (considerando migração e divisão celular). Sabe-se que tumores mais ramificados costumam ser mais invasivos, tanto por causa da velocidade de espalhamento, quanto por causa da distância do centro. Simulações mostraram que tumores crescem com ramificações, fato que indica a malignidade de um tumor, bem como a morfologia e as irregularidades (BEARER *et al.*, 2009).

A caracterização de um tumor a partir da sua dimensão fractal é um bom indicativo de malignidade, visto que quanto mais irregular for um tumor, maior será sua fractalidade. A figura que apresentou o menor valor para a inclinação da reta foi a Figura E (da Figura 3), pois dentro de um mesmo tamanho de análise que as outras, é a que tem a maior variação no tamanho de cada agregado em crescimento, e é justamente a amostra menos simétrica (em forma e tamanho). Figuras como a 1, a 2 e a 6, que possuem uma mudança drástica no tamanho de cada agregado, não possuem uma dimensão fractal tão grande justamente por que o

tamanho de quadrado a ser analisado fica inadequado, ou para os agregados maiores, ou para ou menores.

Olhando a parte dos gráficos, pode se notar que quando o tamanho do quadrado escolhido é muito pequeno, o agregado tende a perder a sua característica fractal, pois muitas vezes o que está sendo considerado como irregularidade pertence à célula em si e não ao agregado. Isso pode ser confirmado pela mudança na inclinação da reta a partir dos pontos marcados em azul.

Considerando que o crescimento irregular de um tumor não possui mudanças drásticas de tamanho, tumores mais invasivos provavelmente teriam uma dimensão fractal menor que tumores com mudanças mais drásticas no tamanho de suas ramificações (BEARER *et al.*, 2009).

Para que seja possível avaliar a irregularidade da borda de um agregado, o tamanho do quadrado escolhido deve ser diminuído, além de adaptar o algoritmo para medidas de Dimensão Fractal de bordas.

Uma alternativa seria medir a borda de agregados com objetivas de maior aumento, tornando possível utilizar o mesmo tamanho de quadrado sem perder a qualidade da análise.

6. Conclusões

6.1. Conclusão Geral

No geral, os objetivos do trabalho foram concluídos, tornando esse um ensaio bastante simples sob o qual é possível avaliar a malignidade de uma linhagem celular. Pelo que pôde ser constatado, as condições e parâmetros analisados serviram para descrever uma linhagem, mas, como é um ensaio novo, este precisa ser validado em outras condições, como linhagens diferentes e substratos.

6.2. Conclusões Específicas

6.2.1. Condições de Experimento

No geral, as condições de experimento foram satisfatórias, pois os resultados foram obtidos sem que houvesse interferências (morte celular devido ao tamponamento ou à temperatura; células em condições inadequadas, como mitose). Para os testes de difusividade, o aumento de 10x se mostrou propício, pois permite que as células sejam monitoradas por uma longa distância e a quantidade de células utilizadas foi adequada para manter uma média, ao passo que as células tinham espaço para migrar. No entanto, falta ainda determinar quais intervalos de tempo seriam os mais adequados. Para os testes de tamanho dos agregados, o aumento utilizado possibilitou ver as fusões de clusters muito próximos, de forma que o tamanho do cluster possa ser controlado. O número de células utilizado conseguiu validar o experimento, porém um número menor de células deve ser testado para ver qual a melhor condição e aumentar a estatística, possibilitando uma melhor caracterização. Em relação aos experimentos de dimensão fractal, é necessário um tempo maior, para que o crescimento das culturas possa ser monitorado. Entretanto, pode ser constatado que, em imagens com aumento

de 4x, pode-se estabelecer um perfil de dimensão fractal para a cultura, embora talvez seja mais interessante fazê-lo em um aumento de 10x.

6.2.2. Parâmetros Avaliados

Em princípio, os parâmetros avaliados se apresentam como bons candidatos de indicadores do perfil mesenquimal de uma linhagem celular. De maneiras diferentes o perfil da linhagem pôde ser correlacionado, condizendo com os dados existentes na literatura. A abordagem por três lados diferentes (velocidade e tendência de crescimento, capacidade de migração e medida da irregularidade de agregados) dá uma visão geral em áreas distintas, mas que se correlacionam quando levada em conta a malignidade do tumor ou da linhagem

7. Referências Bibliográficas

- ANNESLEY, S. J.; FISHER, Æ. P. R. Dictyostelium discoideum — a model for many reasons. n. April, p. 73-91, 2009.
- BEARER, E. L. et al. Multiparameter computational modeling of tumor invasion. **Cancer research**, v. 69, n. 10, p. 4493-501, maio. 2009.
- BEATRICI, C. P.; BRUNET, L. G. Cell sorting based on motility differences. **Physical Review E**, v. 84, n. 3, p. 031927, set. 2011.
- CALDWELL, C. B. et al. Characterisation of mammographic parenchymal pattern by fractal dimension. **Physics in medicine and biology**, v. 35, n. 2, p. 235-47, fev. 1990.
- CHARRAS, G.; PALUCH, E. Blebs lead the way : how to migrate without lamellipodia. 2008.
- CROSS, S. S. Fractals in pathology. **Journal of Pathology**, v. 182, n. November 1996, p. 1-8, 1997.
- DOYLE, A. D. et al. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. **The Journal of cell biology**, v. 184, n. 4, p. 481-90, 23 fev. 2009.
- EWING, J. The General Pathological Conception of Cancer. **Canadian Medical Association journal**, v. 33, n. 2, p. 125-35, ago. 1935.
- FRIEDL, P. et al. Classifying collective cancer cell invasion. **Nature cell biology**, v. 14, n. 8, p. 777-83, ago. 2012.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. TUMOUR-CELL INVASION AND MIGRATION : DIVERSITY AND ESCAPE MECHANISMS. v. 3, n. May, p. 362-374, 2003.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration : a multiscale tuning model. v. 188, n. 1, p. 11-19, 2009.
- FRIEDL, P.; ZALLEN, J. A. Dynamics of cell-cell and cell-matrix interactions in morphogenesis, regeneration and cancer. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 5, p. 557-9, out. 2010.
- GEFEN, A. A new technique for studying directional cell migration in a hydrogel-based three-dimensional matrix for tissue engineering model systems. **Micron**, p. 4-7, 2013.
- GINGER, M. L.; PORTMAN, N.; MCKEAN, P. G. Swimming with protists : perception , motility and flagellum assembly. v. 6, n. NovEMBER, 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HORIUCHI, D. et al. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 4, p. 679-96, 9 abr. 2012.

- KABLA, A. J. Collective cell migration: leadership, invasion and segregation. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 9, n. 77, p. 3268-78, 7 dez. 2012.
- KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 1, p. 10-24, jan. 2013.
- MANDELBROT, B. B. The fractal geometry of nature. Macmillan. 1983.
- MORSE, D. R.; LAWTON, J. H.; DODSON, M. M.; WILLIAMSON, M. H. Fractal dimension of vegetation and the distribution of arthropod body lengths. **Nature**, v. 314, p. 731-733, 1985.
- MÉHES, E. et al. Collective motion of cells mediates segregation and pattern formation in co-cultures. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31711, jan. 2012.
- PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 633-43, set. 2010.
- PARTRIDGE, J. D.; HARSHEY, R. M. Swarming : Flexible Roaming Plans. v. 195, n. 5, p. 909-918, 2013.
- SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 83-92, jan. 2010.
- SIXT, M.; LA, T. Mechanical modes of “ amoeboid ” cell migration. p. 636-644, 2009.
- SPANO, D. et al. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in cancer biology**, v. 22, n. 3, p. 234-49, jun. 2012.
- TALBOT, L. J.; BHATTACHARYA, S. D.; KUO, P. C. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 3, n. 2, p. 117-36, jan. 2012.
- TAYLOR, P. et al. Advances in Physics Emergent complexity of the cytoskeleton : from single filaments to tissue. n. May 2013, p. 37-41, [s.d.].
- THÉRY, M. et al. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 52, p. 19771-6, 26 dez. 2006.
- VINCENSINI, L.; BLISNICK, T.; BASTIN, P. 1001 model organisms to study cilia and flagella. v. 103, p. 109-130, 2011.
- WIRTZ, D.; KONSTANTOPOULOS, K.; SEARSON, P. C. The physics of cancer : the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. 2011.
- ZAMIR, M. Fractal dimensions and multifractality in vascular branching. **Journal of theoretical biology**, v. 212, n. 2, p. 183-90, 21 set. 2001.

ZHANG, M. M.; LONG, Y.; DING, Z. Filming a live cell by scanning electrochemical microscopy : label-free imaging of the dynamic morphology in real time. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 20, 2012.