

Scuola di Scienze
Dipartimento di Fisica e Astronomia
Corso di Laurea in Fisica

**ANALISI DELLA MIGRAZIONE CELLULARE
IN VITRO IN PRESENZA E IN ASSENZA DI
UN CAMPO ELETTRICO**

Relatore:
Prof. Gastone Castellani

Presentata da:
Giacomo Giuliani

Correlatore:
Dott. Alessandro Fuschi

Correlatore:
Dott. Isabella Zironi

Abstract

La galvanotassi, la migrazione cellulare stimolata dalla presenza di un campo elettrico esogeno o endogeno, è stata oggetto di studi sin dalla fine del diciannovesimo secolo. Nonostante la molteplicità di lavori a riguardo, non c'è uniformità nelle tecniche sperimentali, se non per il fatto che il campo elettrico viene generato tramite una configurazione a cella elettrolitica, detta anche a generazione interna di campo elettrico. Scopo di questa tesi è analizzare e caratterizzare la migrazione di cellule isolate *in vitro* in presenza e in assenza di un campo elettrostatico esterno, rendendola originale rispetto a studi precedenti. La differenza nella configurazione sperimentale è fondamentale per spiegare le caratteristiche dei moti osservati. Per la procedura sperimentale sono state usate come campione cellule di linea di origine tumorale denominate T98G adese a una piastra in polistirene posta, non a contatto, tra due piastre in rame cariche. Sono state acquisite micrografie in contrasto di fase a intervalli regolari inizialmente in una fase di controllo, quindi applicando un campo elettrostatico, così da poter analizzare il moto cellulare nelle diverse condizioni. In particolare, l'analisi del tracking di singole cellule selezionate sulla base di criteri stabiliti a priori ha permesso di evidenziare un moto isotropo, indipendentemente dalla presenza del campo elettrostatico. Invece, mostrando che i dati sperimentali delle distanze e delle velocità seguono distribuzioni Gamma, si osserva che dipende dalla presenza del campo elettrostatico la maggiore probabilità che una cellula si sposti più della media. Infine, è stato possibile determinare che l'influenza del campo elettrostatico sul moto delle cellule non dipende dalla posizione di queste rispetto alle piastre. Il lavoro svolto in questa tesi sarà parte dei risultati inseriti in una pubblicazione su rivista internazionale.

Indice

Abstract	iii
Elenco delle figure	vi
Elenco delle tabelle	vii
1 Introduzione	1
1.1 Motilità e Migrazione cellulare	1
1.1.1 Migrazione della singola cellula	2
1.1.1.1 Chemiotassi	2
1.1.1.2 Durotassi	2
1.1.1.3 Galvanotassi	3
1.1.1.4 Un modello di migrazione: il moto ameboidale	3
1.1.2 Migrazione cellulare collettiva	5
1.2 Distribuzione Gamma	6
1.2.1 Applicazioni della Distribuzione Gamma	9
1.3 Il moto browniano e tipi di moto diffusivo	10
2 Materiali e Metodi	14
2.1 La coltura cellulare	14
2.1.1 Linee cellulari	16
2.1.1.1 Linea cellulare T98G	16
2.2 Apparato sperimentale	16
2.3 Procedura sperimentale	18
2.3.1 Preparazione del Campione	18
2.3.2 Esperimento	19
3 Analisi delle immagini	21
Cernita delle immagini	21
Ripartizione delle cellule per zona	21
3.1 Selezione delle cellule	22

3.2	Tracking delle Cellule	23
3.2.1	Errore associato ai dati ottenuti tramite tracking	25
3.3	Stima del numero di cellule	26
3.4	Comparazione e Selezione del Best Fit	28
3.4.1	Fit delle Distribuzioni	28
3.5	Calcolo del MSD	29
3.5.1	Fit	29
4	Risultati	30
4.1	Distribuzioni sperimentali	30
4.1.1	Best Fit: La Distribuzione Gamma	30
4.1.2	Distanza	32
4.1.3	Velocità Media	34
4.2	MSD	35
4.3	Dipendenza del moto dalla posizione della cellula sulla superficie della Petri	36
4.4	Considerazioni sul Moto	39
5	Conclusioni	41
	Appendice	43
	Risultati suddivisi per densità	43
	Bibliografia	44
	Ringraziamenti	48

Elenco delle figure

1.1	Meccanismo di azione della galvanotassi mediato dalla concentrazione di ioni Ca^{2+}	3
1.2	Fasi del crawling di una cellula	4
1.3	Distribuzione Gamma per differenti valori di k e di θ	6
1.4	Differenti distribuzioni Gamma con lo stesso valor medio	8
1.5	Traiettorie MSD per processi diffusivi non normali	12
2.1	Postazione sperimentale per la preparazione e conservazione dei campioni biologici	15
2.2	Piastra Petri contenente la coltura cellulare	17
2.3	Set-Up sperimentale per il tracciamento delle cellule	17
2.4	Circuito realizzato	19
3.1	Esempio di Frame acquisito	22
3.2	Centro della cellula	24
4.1	Fit possibili - Distribuzione delle distanze	30
4.2	Fit possibili - Distribuzione delle velocità	31
4.3	Fit - Distribuzione delle distanze	32
4.4	Fit - Distribuzione delle velocità	34
4.5	Fit MSD	35
4.6	Distribuzione delle distanze - Polo Negativo	37
4.7	Distribuzione delle distanze - Centro	37
4.8	Distribuzione delle distanze - Polo Positivo	38
4.9	Variazione del MSD all'interno della Petri	38
4.10	Grafici Polari - Tracking delle Cellule	39
4.11	Grafici Polari - Vettori Spostamento	39
A.1	Dipendenza della distanza percorsa dalla densità del campione	43

Elenco delle tabelle

2.1	Valori tipici dei parametri ambientali all'interno di una coltura cellulare.	14
3.1	Numero totale di cellule stimato	27
4.1	Analisi del Negative Log-Likelihood	31
4.2	Parametri fit distribuzione distanze	33
4.3	Parametri Fit Distribuzione delle Velocità	34
4.4	Parametri MSD da fit	35
4.5	Parametri Fit Distribuzioni Distanze suddivise rispetto alla posizione delle cellule .	36
4.6	Mediana Heading	40

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Motilità e Migrazione cellulare

La prima osservazione delle cellule risale al 1665, al microscopio c'era Robert Hooke, scienziato inglese passato alla storia anche per la legge sulla forza elastica, che porta il suo nome in suo onore. Fu proprio lui a denominare quelle microscopiche unità elementari di sughero cellule, in analogia con il termine *cellulae* usato per le celle del monastero [1]. In effetti, la cellula è l'unità fondamentale comune a tutti gli organismi viventi. Di più, tutte le cellule, sia procarioti sia eucarioti, sono accomunate dalla possibilità di compiere movimenti auto-generati, convertendo energia chimica in energia meccanica. Questi si realizzano principalmente tramite particolari proteine di membrana altamente specializzate dette proteine motrici. L'insieme di queste proteine costituisce i motori molecolari, come l'actina e la miosina, la cui efficienza è molto elevata. Il movimento può avvenire a contatto con superfici solide o attraverso una soluzione acquosa. Nel primo caso, il movimento può essere dipendente da strutture protrusive, quali flagelli o ciglia, detto moto ameboidale, oppure indipendente, detto *gliding motility*. Invece, per nuotare all'interno di un liquido, le cellule utilizzano ciglia e flagelli per compiere un movimento detto *helical swimming* [2].

Bisogna fare un'ulteriore distinzione. Parliamo infatti di *motilità* se il movimento è spontaneo e non direzionato, e di *migrazione* se il movimento è una risposta organizzata e direzionale a uno stimolo cellulare, attrattivo o repulsivo [3]. In altri termini, la motilità è una condizione necessaria perché una cellula possa migrare. Difetti di motilità cellulare costituiscono una grave minaccia per l'esistenza di un organismo, dal momento che molti processi biologici, dall'angiogenesi al *wound healing*, si basano sulla migrazione cellulare. Per l'uomo, le conseguenze di tali difetti spaziano dall'infertilità a malformazioni neonatali. Un esempio sono le LAD, *Leucocyte Adhesion Deficiency*, rare malattie a trasmissione autosomica recessiva per cui i globuli bianchi sono carenti di integrine, proteine responsabili della diapedesi leucocitaria, ossia della migrazione attraverso i vasi sanguigni per raggiungere il sito dell'infezione [4].

1.1.1 Migrazione della singola cellula

La migrazione cellulare, innanzitutto, è una forma di *cell signaling*: una cellula inizia a migrare in risposta a uno stimolo o segnalazione proveniente dall'ambiente circostante [5]. La segnalazione può essere endocrina, paracrina o autocrina a seconda della molecola-segnale e del modo in cui il segnale è prodotto: ad esempio le cellule cancerogene sopravvivono e proliferano tramite segnalazione autocrina, ossia producendo loro stesse la segnalazione a cui rispondono [4]. La cellula che risponde al segnale è detta target e tramite trasduzione del segnale organizza una risposta che, nel caso della migrazione, avviene a livello del citoscheletro. Gli stimoli possono provenire da molteplici fonti. Nei prossimi paragrafi ne si discuteranno i principali.

1.1.1.1 Chemiotassi

Si definisce chemiotassi il movimento guidato di una cellula in risposta a uno stimolo chimico [6]. Questo stimolo può essere attrattivo, trasmesso da una sostanza chemioattrattante, oppure repulsivo, trasmesso da una molecola-segnale chemiorepellente. Si parla di aptotassi quando la migrazione è guidata da gradienti di chemioattrattanti. All'interno del corpo umano sono presenti alcune sostanze, come i disaccaridi glicosaminoglicani, specializzate nel legare i chemioattrattanti alla superficie lungo la quale le cellule target devono migrare [6]. Sia la chemiotassi sia l'aptotassi favoriscono una migrazione cellulare. Quando a uno stimolo chimico la cellula risponde con un movimento randomico si parla di chemiocinesi. Anche in questo caso il tipo di movimento dipende dai chemioattrattanti agenti. In particolare, si distinguono l'ortocinesi, quando la risposta consiste in una variazione della velocità o frequenza del movimento cellulare, e la clinocinesi, se la risposta consiste in un movimento rotatorio [7]. In entrambi i casi l'intensità della risposta dipende dalla magnitudine dello stimolo.

1.1.1.2 Durotassi

Si definisce durotassi il movimento guidato di una cellula in risposta a un gradiente di durezza presente sulla superficie a cui aderisce [8]. La maggior parte delle migrazioni avviene per durotassi positiva, per cui la cellula si muove da una superficie meno dura a una più dura, mentre sono stati osservati più raramente le migrazioni per durotassi negativa, quindi contro gradiente di durezza. La problematicità nello studio di questo fenomeno, oltre al fatto che sia stato osservato per la prima volta alla fine del secolo scorso, risiede nella difficoltà nel misurare e monitorare nel tempo i gradienti di durezza *in vivo* [9]. Tuttavia, grazie agli studi *in vitro*, è stato possibile formulare il modello a *molecular clutch*, in analogia al comportamento della frizione di un'automobile. Secondo questo modello, infatti, la cellula, esercitando una forza sulla superficie a cui aderisce, ne valuta la durezza in base alla risposta elastica esercitata. La frizione molecolare è la struttura che collega il citoscheletro e il substrato e che, a seconda del risultato del test di durezza, influenza il movimento della cellula.

1.1.1.3 Galvanotassi

Si definisce galvanotassi il movimento guidato di una cellula in risposta a un campo elettrico endogeno o esogeno [10]. Come per la chemiotassi, la galvanotassi gioca un ruolo chiave in alcuni processi biologici, come la riparazione tissutale, l'embriogenesi e il wound healing [11]. Contrariamente a quanto si possa pensare, nel corpo umano si trovano molte sorgenti di differenze di potenziale: la configurazione più comune si ha nel contatto tra un organo e lo strato di cellule epiteliali più vicino, per cui si produce una differenza di potenziale nell'ordine dei millivolt [10]. Lo studio del fenomeno *in vitro* è fortemente influenzato dal set-up sperimentale: infatti, considerando una piastra sulla quale è presente una popolazione cellulare, la configurazione con piastre esterne alla piastra (configurazione spiegata nel dettaglio nella Sez.2.2) dà luogo a un condensatore al cui interno vi è un dielettrico, ben approssimato dal terreno di coltura presente. Nella maggior parte degli studi, a partire dallo studio del 1891 in cui lo scienziato belga Dineur conìò il termine "galvanotassi" [12], si ha una configurazione a cella elettrolitica, inserendo anodo e catodo direttamente a contatto con il terreno di coltura.

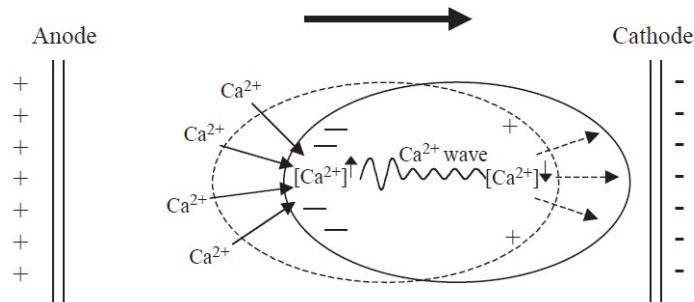


Figura 1.1: Meccanismo di azione della galvanotassi mediato dalla $[Ca^{2+}]_i$. Crediti: [10]

Si pensa che il fattore principale che legghi lo stimolo elettrico e la risposta citoscheletrica della cellula target sia la concentrazione di ioni Calcio $[Ca^{2+}]_i$ [10]. $[Ca^{2+}]_i$, infatti, regola i meccanismi di contrazione del citoscheletro e, in particolare, la miosina II, motore molecolare coinvolto nel movimento e nella crescita dell'adesione focale. Di conseguenza, il movimento di risposta è una migrazione per contrazione lungo la direzione parallela alle linee di campo dall'anodo al catodo. Secondo alcuni studi, questa migrazione sarebbe accompagnata dalla modifica della forma della cellula rispetto alle linee di campo [13]. Inoltre, è possibile che la variazione di concentrazione degli ioni Ca^{2+} modifichi l'adesione della cellula, in maniera che la cellula sia guidata anche dalla superficie a cui aderisce.

1.1.1.4 Un modello di migrazione: il moto ameboidale

All'interno del corpo umano il moto cellulare più comune è quello ameboidale, dato che sia la gliding motility sia il nuoto sono forme di movimento tipiche di batteri e parassiti [2]. Quindi, per modellare il movimento, consideriamo il caso semplice di moto ameboidale in due dimensioni su una superficie piana.

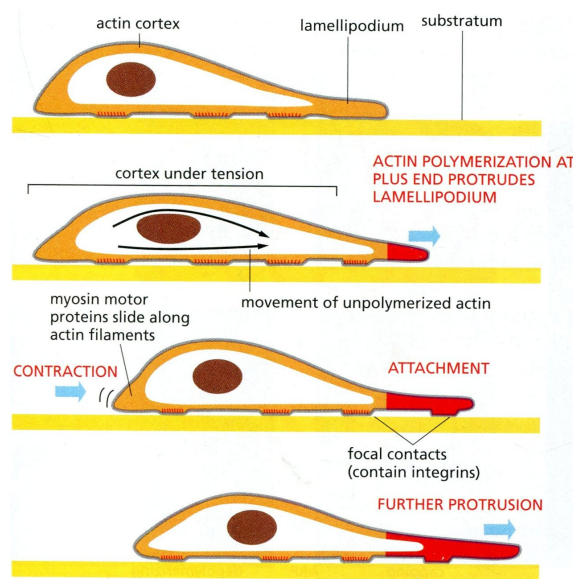


Figura 1.2: Fasi del crawling di una cellula. Partendo dall'alto: (A) configurazione della cellula inizialmente ferma, (B) estensione della protrusione guidata dalla polimerizzazione dell'actina, (C) adesione al substrato tramite adesione focale e traslocazione della cellula per contrazione, (D) deadesione nella parte opposta alla direzione del moto e creazione di una nuova protrusione a livello del leading edge. Crediti: [4]

Come si osserva nella Fig.1.2, il movimento si divide in quattro fasi. Inizialmente la cellula forma a livello del margine anteriore, detto *leading margin*, una protrusione, un lamellipodio se è larga, piatta e sottile, mentre si parla filopodio se si estende stretta in lunghezza. Questo meccanismo è principalmente guidato dalla polimerizzazione dei filamenti di actina, filamenti proteici nel citoscheletro, la quale è in grado di generare una forza sufficiente per spingere il leading margin della cellula e formare una protrusione. Inoltre, è particolarmente efficiente: infatti, essendo la formazione e la retrazione dell'estensione temporanea abbastanza veloci (questo piccolo ciclo ha una durata $\sim 1 \frac{\mu m}{s}$) [4], è possibile un'esplorazione funzionale al movimento. Una volta formatasi la protrusione, al di sotto di questa si sviluppa una struttura proteica per aderire al substrato, detta adesione focale (FA). La FA è una struttura dinamica della dimensione di $\sim 1 \mu m$ con cui la cellula stessa interagisce con la matrice extracellulare (ECM). Una FA è formata da numerose proteine, si stima 160 [14], di differenti classi e funzioni. Particolarmente importante per la realizzazione della migrazione è l'eventuale maturazione della FA. Infatti, nella fase prettamente esplorativa della protrusione, si forma sotto al lamellipodio un complesso proteico acerbo, detto complesso focale [15]. Questi complessi focali sono transitori e di durata molto breve, per cui o si evolvono rapidamente in FA, accrescendosi in dimensione incorporando nuove proteine, oppure vengono smantellati in un processo detto *turnover*. La FA, una volta matura, continua a crescere, e di questo sono responsabili le miosine, in particolare miosina IIA, un tipo di motore proteico che governa i movimenti contrattili. Come terzo step, la cellula effettua un movimento di traslocazione nella direzione del leading margin tramite una forza di contrazione. Infine, per completare il

movimento, si ha la de-adesione delle "vecchie" FA al margine posteriore della cellula, che semplicemente vengono lasciate sul substrato. Si intuisce che un movimento sarà tanto più veloce quanto più breve è la durata della presenza della FA. Questo meccanismo poi viene ripetuto per tutti gli altri passi compiuti dalla cellula. Si ottiene un cambio di direzione per movimenti casuali della membrana cellulare i quali permettono la creazione di lamellipodi lungo una direzione diversa rispetto a quella precedente.

Per quanto riguarda i meccanismi fisici coinvolti, si possono trascurare effetti Joule, dato che la dissipazione del calore è immediata per tali scale, inerzia e gravità, trascurabili per masse tanto piccole. Bisogna considerare invece la viscosità dell'acqua che rappresenta un ostacolo difficilmente superabile per le cellule e i moti browniani di agitazione termica.

Nel modello trattato è stata analizzata per semplicità la migrazione in due dimensioni. In tre dimensioni, le cellule si muovono su una matrice tridimensionale, una sorta di ragnatela che agisce come supporto, spesso ricreata *in vitro* con il collagene. Questo modifica anche la morfogenesi delle cellule durante la migrazione: rispetto a una migrazione bidimensionale si riducono le dimensioni e il numero di protrusioni [14].

1.1.2 Migrazione cellulare collettiva

La migrazione cellulare collettiva è un meccanismo di movimento cellulare che prevede lo spostamento di cluster di cellule [14]. Essa costituisce il modo principale di migrazione nella genesi e riparazione tissutale e, in generale, nello sviluppo dell'organismo umano. Il funzionamento del movimento ricalca quello della migrazione di una singola cellula descritto nella sezione precedente, per cui vi è una linea di cellule al leading margin del cluster che guida il movimento, mentre le cellule poste a ridosso e posteriormente vengono trascinate passivamente [16]. A ciò si aggiungono alcuni aspetti dovuti all'interazione chemomeccanica tra le cellule che formano il collettivo. Infatti, questa configurazione permette di mantenere il tessuto coeso, ben regolato e multifunzionale, cioè è possibile svolgere funzioni diverse assegnandole a diverse cellule. Per lo sviluppo di un tumore, ad esempio, la collettività permette una migliore protezione contro eventuali attacchi da parte del sistema immunitario [14].

1.2 Distribuzione Gamma

La distribuzione Gamma è una famiglia di curve a due parametri, k, θ . La funzione Densità di Probabilità (*PDF*) è definita:

$$f(x) = \frac{\left(\frac{x}{\theta}\right)^{k-1} e^{-\frac{x}{\theta}}}{\theta \Gamma(k)} \quad (1.1)$$

dove $x, k, \theta > 0$ e $\Gamma(k)$ è la funzione Gamma di Eulero a variabile k ,

$$\Gamma(k) = \int_0^{\infty} t^{k-1} e^{-t} dt \quad (1.2)$$

$$\Gamma(k+1) = k! \quad \text{se } k \in \mathbb{N}$$

La funzione di ripartizione (*Cumulative Distribution Function, CDF*) è definita dalla seguente equazione:

$$F(X) = \frac{\gamma(k, \frac{x}{\theta})}{\Gamma(k)}$$

dove $\gamma(k, \frac{x}{\theta})$ è la funzione incompleta inferiore Gamma di Eulero:

$$\gamma(k, \frac{x}{\theta}) = \int_0^{\frac{x}{\theta}} t^{k-1} e^{-t} dt$$

La PDF, per definizione, gode delle seguenti proprietà:

- L'integrale sul dominio è normalizzato: $\int_0^{\infty} f(x) dx = 1$
- La funzione assume solo valori positivi: $f(x) \geq 0$

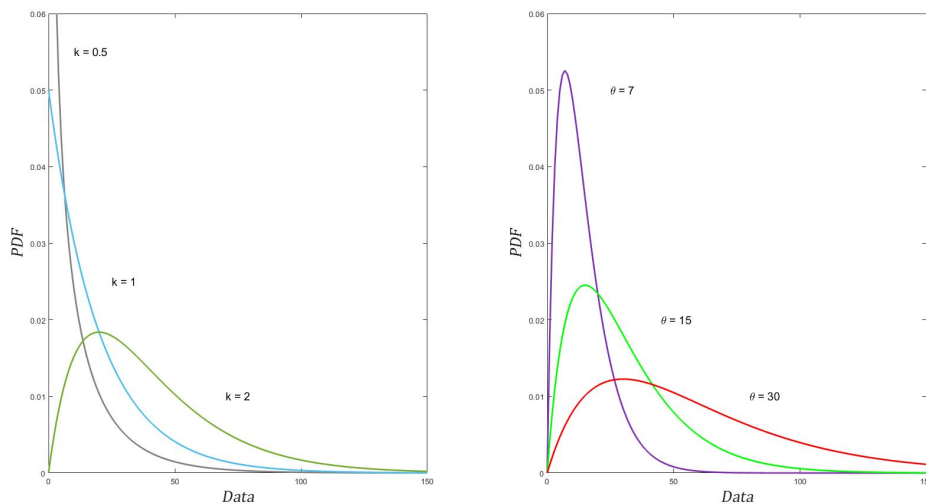


Figura 1.3: A Sinistra: differenti densità di probabilità Gamma per valori differenti di k con $\theta = 20$ costante. A Destra: differenti densità di probabilità Gamma per valori differenti di θ con $k = 2$ costante.

Il parametro k , detto parametro di *forma*, è un numero reale, positivo che definisce i profili possibili della distribuzione. Come si osserva dalla Fig.1.3, possiamo distinguere tre casi: per $k < 1$ la funzione diverge sull'origine ed è fortemente asimmetrica verso sinistra, per $k > 1$ la funzione converge sull'origine a 0 e tende lentamente, per valori crescenti di k , a una forma simmetrica (per $k > 100$, si può approssimare a una distribuzione normale); infine, per $k = 1$, dato che $\Gamma(1) = 1$, la distribuzione si riduce a una distribuzione esponenziale. Dall'Eq.1.1 k è sempre adimensionale.

Il parametro θ , detto parametro di *scala*, è un numero reale, positivo che deforma il grafico della distribuzione in relazione alla magnitudine dei dati. Tale deformazione deve rispettare la condizione di normalizzazione per cui, a un abbassamento del picco della distribuzione corrisponde un aumento della dispersione, e viceversa. Dall'Eq.1.1 si deduce che θ ha la stessa dimensione di x . Per $\theta = 2$, fissato $k = \frac{\nu}{2}$ in cui ν è il numero di gradi di libertà del sistema, la distribuzione si riconduce a una distribuzione Chi-Quadrato:

$$f(x) = \frac{\left(\frac{x}{2}\right)^{\frac{\nu}{2}-1} e^{-\frac{x}{2}}}{2 \Gamma\left(\frac{\nu}{2}\right)}, \quad x > 0$$

Un'altra parametrizzazione comunemente adottata è data dalla coppia di numeri positivi α, β , riconducibile alla prima parametrizzazione presentata tramite la relazione:

$$\alpha = k, \quad \beta = \frac{1}{\theta}$$

I momenti della distribuzione sono dati dall'espressione classica:

$$E[x^p] = \int_0^{\infty} x^p f(x) dx \quad (1.3)$$

Rispetto alla distribuzione normale e a quella esponenziale, i parametri della distribuzione gamma non corrispondono ai momenti della distribuzione. Questo si può vedere, infatti, calcolando dall'Eq.1.1 il momento primo della distribuzione:

$$\mu = \int_0^{\infty} x \frac{\left(\frac{x}{\theta}\right)^{k-1} e^{-\frac{x}{\theta}}}{\theta \Gamma(k)} dx = \int_0^{\infty} \frac{\left(\frac{x}{\theta}\right)^k e^{-\frac{x}{\theta}}}{\Gamma(k)}$$

Operando la sostituzione $\frac{x}{\theta} = z$ da cui $dx = \theta dz$, si ottiene:

$$= \frac{\theta}{\Gamma(k)} \int_0^{\infty} z^k e^{-z}$$

Dall'Eq.1.2 si riconosce immediatamente che l'integrale corrisponde a $\Gamma(k+1)$. Usando quindi la seguente proprietà della funzione Gamma di Eulero:

$$\frac{\Gamma(k+1)}{\Gamma(k)} = k$$

si ottiene infine che

$$\mu = k\theta \quad (1.4)$$

Tramite passaggi analoghi è possibile definire la varianza della distribuzione:

$$\sigma^2 = E[(x - E[x])^2] = k\theta^2 \quad (1.5)$$

Come sottolineato, i parametri della distribuzione devono essere combinati per definire i momenti della distribuzione. Si può trovare il momento t-esimo tramite la relazione:

$$\mu_t = \theta^t \prod_{n=1}^t (k + n - 1) \quad (1.6)$$

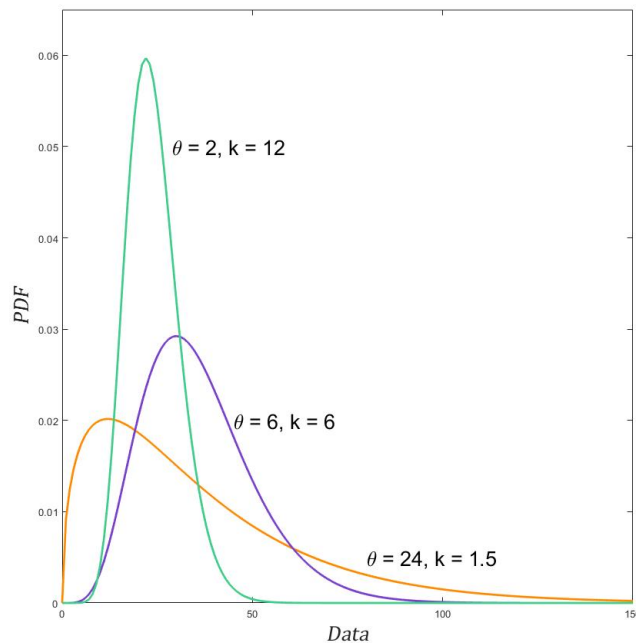


Figura 1.4: Differenti distribuzioni Gamma con lo stesso valor medio $\mu = 36$.

Bisogna dunque valutare entrambi i parametri per dare un'interpretazione al momento t-esimo. Consideriamo, a titolo di esempio, il caso in cui il momento primo della distribuzione sia $\mu = 36$, come nella Fig.1.4. Dall'Equazione 1.4 è immediato osservare come si possa ottenere lo stesso valore del valor medio per combinazioni differenti dei due parametri. In particolare, un primo caso (*curva turchese*) si ha quando $k \gg \theta$, per il quale osserviamo che i dati sono distribuiti in maniera quasi simmetrica e consistenti con il valore medio. Nel secondo caso (*curva viola*) si ha $k = \theta$ si ha una distribuzione asimmetrica, con una coda maggiore verso destra; infine, nel terzo

caso (*curva ocra*) si ha $k \ll \theta$ e osserviamo che la distribuzione è fortemente asimmetrica, per cui caratterizzata da una forte varianza - questa, infatti, ha una dipendenza quadratica dal parametro di scala.

Per quanto riguarda la miglior stima dei parametri della distribuzione, un importante studio [17] ha mostrato che tramite il criterio più semplice, il metodo dei momenti, si ottengono discreti risultati solo per valori di $k > 10$, ma pessimi per valori minori del parametro di forma. Per questo motivo, il metodo comunemente usato è il criterio della massima verosimiglianza (MLE, *Maximum Likelihood Estimation*), nonostante tale stima necessiti di essere calcolata con un computer.

1.2.1 Applicazioni della Distribuzione Gamma

Le caratteristiche sopra descritte della distribuzione Gamma la rendono una distribuzione estremamente versatile per fittare diversi campioni di dati. In ambito biologico, in ambito climatologico e in ambito medico si possono trovare infatti distribuzioni sperimentali asimmetriche e formate unicamente da dati non negativi. Come mostrato da un recente studio [18], la distribuzione Gamma è risultata essere la più frequente tra le distribuzioni non-normali per descrivere i dati raccolti in un campione di studi di scienze sociali e della salute.

In ambito climatologico, i dati relativi all'accumulo precipitativo sono una grandezza comunemente descritta tramite una distribuzione Gamma. Infatti, questa permette di rappresentare una variabile fisicamente sempre non negativa e che può avere valori estremamente elevati con probabilità non nulla.

In ambito biomedico, alcuni studi hanno evidenziato come la distribuzione Gamma sia il best fit per distribuzioni di grandezze che descrivono la durata di un meccanismo biologico. In particolare, un recente studio [19] ha mostrato che la distribuzione Gamma è il miglior match per le distribuzioni sperimentali dei *focal adhesion lifetimes* (*FALT*). Questo studio pone la base per l'interpretazione di alcuni risultati ottenuti nell'esperimento condotto, come poi verrà approfondito nel Capitolo 4.

1.3 Il moto browniano e tipi di moto diffusivo

Il moto browniano è il moto caratteristico di piccole particelle ($d \sim 1 \mu m$) sospese in un fluido. Fu osservato e studiato approfonditamente nel 1827 da Robert Brown, ma fu spiegato solamente nel 1905 da Albert Einstein [20]. Questo movimento emerge dai moti di agitazione termica che caratterizzano le molecole del fluido. Se consideriamo, per semplicità, una particella sospesa in un liquido che si può muovere lungo una sola direzione, il suo moto dipende unicamente dagli urti con le molecole del liquido. Dato che ogni urto è indipendente, ogni passo compiuto dalla particella è casuale. Il cammino descritto dalla particella è quindi detto Random Walk. Per quantificare la dispersione di tale particella sospesa nel fluido dopo un tempo t , possiamo definirne lo spostamento quadratico medio:

$$\langle x^2(t) \rangle = 2Dt \quad (1.7)$$

dove le parentesi angolari indicano una media sulla popolazione e D è il coefficiente di diffusione, caratteristico della particella a una data temperatura T :

$$D = k_B T \mu$$

dove k_B è la costante di Boltzmann e μ è la mobilità di una particella di raggio a sospesa in un fluido di viscosità η così definita:

$$\mu = \frac{1}{6\pi a \eta} \quad (1.8)$$

L'equazione 1.7 si può generalizzare per un moto n -dimensionale nella seguente relazione:

$$\langle r^2(t) \rangle = 2nDt \quad (1.9)$$

dove n indica la dimensione e $r^2(t) = \sum_{i=1}^n \sqrt{[x_i(t) - x_i(t_0)]^2}$.

Negli anni successivi, Langevin arrivò allo stesso risultato che applicò la seconda legge di Newton per la dinamica di una particella in un fluido. Partiamo per semplicità dal caso unidimensionale. Secondo l'equazione di Langevin, la dinamica di una particella che compie un moto browniano in una dimensione è determinata dalla somma di una forza d'attrito viscosa dovuta alla resistenza fluidodinamica e di una forza casuale dovuta ai moti di agitazione termica delle molecole del fluido:

$$m \frac{dv(t)}{dt} = -\gamma v(t) + \zeta(t) \quad (1.10)$$

dove $\gamma = 1/\mu$ è il coefficiente di drag e $\zeta(t)$ è la forza casuale, detto anche termine di rumore. Nel caso notevole in cui la forza casuale sia assente, l'equazione 1.10 si può risolvere per separazione delle variabili:

$$\frac{dv(t)}{v(t)} = -\frac{\gamma}{m} dt$$

Una volta integrato il primo membro tra $v(t)$ e $v(0)$ e il secondo tra t e $t_0 = 0$, si ottiene la

soluzione esponenziale:

$$v(t) = v(0)e^{-t/\tau_b} \quad (1.11)$$

dove $\tau_b = m/\gamma$ è un fattore di scala delle dimensioni di un tempo.

Questa è una classica soluzione di decadimento esponenziale, che prevede che la particella si fermi per $t \rightarrow \infty$ a causa della resistenza fluidodinamica. Tuttavia, questa soluzione non è verosimile, dal momento che all'equilibrio la particella è caratterizzata da una velocità quadratica media:

$$\langle v^2 \rangle = \frac{k_B T}{m}$$

data dal teorema di equipartizione dell'energia, in contraddizione con la soluzione ottenuta in precedenza (Equazione 1.11).

Per risolvere l'equazione di Langevin completa, occorre prima fare una considerazione sul termine di rumore, che deriva dall'interazione casuale della particella con le molecole del fluido. Questa forza, in quanto casuale, è assunta isotropa, per cui $\langle \zeta(t) \rangle = 0$. Inoltre, deve valere la non correlazione:

$$\langle \zeta(t_1)\zeta(t_2) \rangle = g\delta(t_1 - t_2)$$

perciò si assume che non ci sia correlazione tra due urti consecutivi. Infine, dato che questo rumore è l'effetto di un elevato numero di urti indipendenti, se questi eventi seguono la stessa distribuzione, il Teorema del Limite Centrale ci consente di assumere che la forza sia distribuita come una distribuzione normale [21].

Per comodità possiamo riscrivere l'equazione 1.10 in termini della posizione x e prendere i valori medi dei termini:

$$\langle m \frac{dx^2(t)}{dt^2} \rangle = \langle -\gamma \frac{dx(t)}{dt} \rangle \quad (1.12)$$

ottenendo così una forma semplificata grazie all'isotropia del termine di rumore. Moltiplicando entrambi i membri per $x(t)$, si ottiene:

$$m \langle \frac{d}{dt^2} \left(x(t) \frac{dx(t)}{dt} \right) \rangle - \left\langle \left(\frac{dx(t)}{dt} \right)^2 \right\rangle = -\gamma \left\langle \frac{dx(t)}{dt} \right\rangle \quad (1.13)$$

dove il primo termine è stato riscritto grazie alla relazione:

$$x \frac{dx^2(t)}{dt^2} = \frac{d}{dt^2} \left(x(t) \frac{dx(t)}{dt} \right) - \left(\frac{dx(t)}{dt} \right)^2$$

Possiamo usare il Teorema di Ripartizione dell'Energia, visto in precedenza, per riscrivere al primo membro:

$$m \left\langle \left(\frac{dx(t)}{dt} \right)^2 \right\rangle = -k_B t$$

per cui l'equazione 1.13 risulta:

$$m \left\langle \frac{d}{dt^2} \left(x(t) \frac{dx(t)}{dt} \right) \right\rangle - k_B t m = -\gamma \left\langle \frac{dx(t)}{dt} \right\rangle \quad (1.14)$$

Se integriamo l'equazione 1.14 applicando la sostituzione $y = \left\langle x(t) \frac{dx(t)}{dt} \right\rangle$ e usiamo la relazione:

$$\left\langle x(t) \frac{dx(t)}{dt} \right\rangle = \frac{1}{2} \frac{dx}{dt} \langle x^2 \rangle$$

otteniamo la seguente equazione differenziale:

$$\frac{dx}{dt} \langle x^2 \rangle = \frac{2k_B t}{\gamma} \left(1 - e^{-t/\tau_b} \right) \quad (1.15)$$

Per tempi lunghi ($t \ll \tau_B$) l'equazione si semplifica e si può risolvere tramite il metodo delle variabili separate, grazie al quale otteniamo, a meno di una costante,

$$\langle x^2 \rangle \simeq \frac{2k_B T t}{\gamma} = 2Dt \quad (1.16)$$

dove $\frac{k_B T}{\gamma}$ ha le dimensioni del coefficiente di diffusione; perciò il risultato di Langevin risulta equivalente alla relazione 1.7 trovata da Einstein.

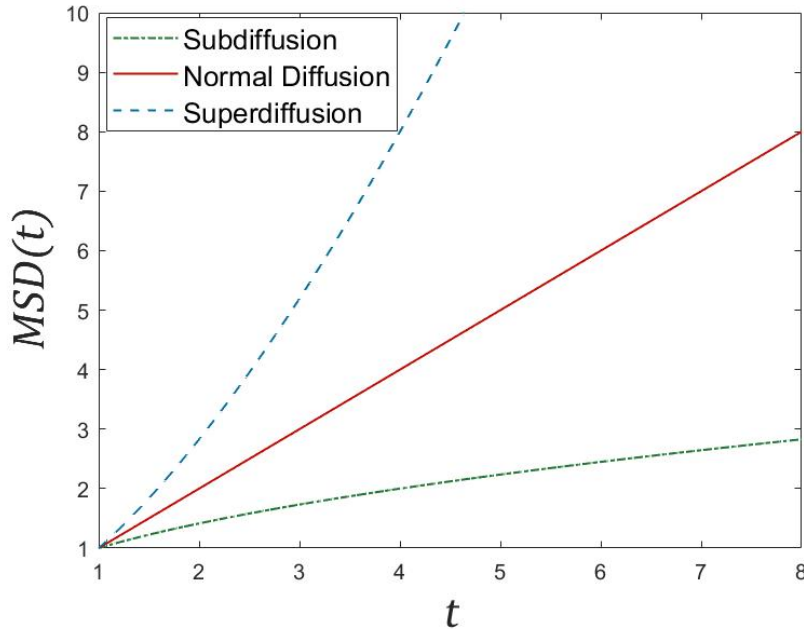


Figura 1.5: Traiettorie del Mean Squared Displacement nei casi di diffusione anomala

Il moto browniano rientra nella classe dei fenomeni a diffusione normale, ossia caratterizzati da un MSD, *Mean Squared Displacement*, in relazione lineare con il tempo: $\langle x^2 \rangle \propto t$. Tuttavia, sono stati osservati molti processi diffusivi per i quali sussiste una relazione non lineare tra il MSD e il tempo: in questo caso si parla di Diffusione Anomala. In un processo caratterizzato da diffusione anomala bisogna considerare modelli statistici non gaussiani, ad esempio la statistica di Levy. Infatti, in questi processi il cammino della particella in moto può prevedere che gli step siano di diversa lunghezza e che ci possa essere una pausa tra due step consecutivi. Questo comporta che lo spostamento quadratico medio non abbia più una dipendenza lineare dal tempo e segua quindi la seguente relazione:

$$\langle x^2 \rangle \sim Dt^\alpha \quad (1.17)$$

dove α è l'esponente che distingue i vari processi.

In particolare, come si può osservare nella Fig.1.5, per $\alpha > 1$ siamo nel caso di processi superdiffusivi, per $\alpha = 1$ siamo nel caso notevole di diffusione normale, infine per $\alpha < 1$ caratterizziamo la classe dei processi subdiffusivi. In altri termini, nel caso superdiffusivo la varianza cresce più velocemente del caso gaussiano, mentre in quello subdiffusivo la varianza cresce più lentamente.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 La coltura cellulare

Per coltura cellulare si intende l'insieme di metodi che permettono la crescita e la proliferazione artificiale di cellule procariote o eucariote in condizioni fisiologiche [22]. A differenza della coltura tissutale, comunemente trovata come *tissue culture*, prevede lo sviluppo unicamente di cellule isolate. Il protocollo prevede che le cellule siano poste in contenitori (fiasche o piastre) asettici in plastica o in vetro all'interno dei quali sono immerse in un appropriato mezzo di coltura, o terreno, e mantenute in incubatori, che permettono di controllare la temperatura, la concentrazione di CO_2 , che mantiene stabile il pH del mezzo ad un valore adeguato, e l'umidità dell'ambiente, i cui valori tipici sono riportati nella Tab.2.1 [23].

T (°C)	36.5 ± 1
CO_2	5%
pH	7.2-7.4
RH	85-95%

Tabella 2.1: Valori tipici dei parametri ambientali all'interno di una coltura cellulare. L'ambiente caratteristico di una coltura cellulare è neutro, molto umido, a temperatura corporea e con un'alta concentrazione di anidride carbonica.

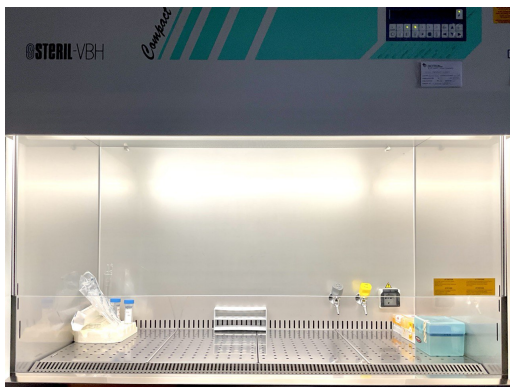
Il terreno di coltura è una miscela di nutrienti e fattori di crescita, a concentrazioni funzionali ai diversi tipi di cellula, permettendone la replicazione e la sopravvivenza [24].

L'Eagle's Minimum Essential Medium (*EMEM*) è un tipo di terreno di coltura sintetico brevettato da Harry Eagle nel 1959. La composizione del mezzo originale contiene 29 sostanze: 13 amminoacidi, 8 vitamine, 6 sali, glucosio e siero animale [25]. Questa miscela permette la

proliferazione di cellule sia in sospensione nel mezzo sia come monolayer, impedendo la formazione di strutture tridimensionali. Sono state sviluppate varianti della miscela originale, spesso tramite l'aggiunta di nutrienti e antibiotici, in particolari si cita la variante usata per coltivare il campione usato nell'esperimento, la *51200-MEM, no glutamine, no phenol red* [26], una variante dell'EMEM, ottenuto integrando quest'ultimo con siero bovino fetale al 10%, L-glutammina 1%, piruvato di sodio 10% e antibiotici (penicillina 1% e streptomina all'1%).

Il siero animale è uno dei componenti più importanti, comunemente usato a concentrazione del 5 – 20% [23]. Esso ha la funzione essenziale di sostituire elementi nutritivi, stromali e ormoni presenti *in vivo*, rendendo possibile, ad esempio, lo sviluppo delle strutture cellulari disposte all'ancoraggio della cellula sulla superficie interna del contenitore in cui cresce.

Il mantenimento di condizioni asettiche all'interno dell'ambiente di coltura è vitale per la sopravvivenza delle cellule animali, queste infatti sono estremamente sensibili a contaminazioni, sia di tipo batterico o fungino sia di tipo chimico, che possono portare a modifiche dei parametri ambientali fino alla morte della popolazione cellulare. Per garantire tali condizioni, è importante lavorare solo con strumenti e dispositivi di protezione personale opportunamente sterilizzati; inoltre, per la contaminazione con l'aria atmosferica, potenzialmente ricca di contaminanti, è necessario lavorare all'interno di una cappa a flusso laminare (Fig. 2.1), a vari livelli di protezione a seconda del tipo di oggetto biologico con cui si lavora.



(a) Cappa a flusso laminare STERIL-VBH 72 MP a livello di protezione 2. Al suo sono stati preparati i campioni cellulari per gli esperimenti.



(b) Incubatore Thermo Scientific™ Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ con capacità 184L. Al suo interno sono stati conservati i campioni biologici preparati per gli esperimenti.

Figura 2.1: Postazione sperimentale per la preparazione e conservazione dei campioni biologici

2.1.1 Linee cellulari

Si definisce linea cellulare una definita popolazione di cellule che può essere mantenuta in una cultura per un periodo di tempo prolungato, conservando le proprie funzioni e caratteristiche [27]. Una linea cellulare è continua, o immortale, se può essere potenzialmente sottoposta a un numero indefinito di divisioni, viceversa si dice finita (alcuni studi hanno stimato che il numero massimo di divisioni sia circa 50 [28]). Generalmente sono finite le linee cellulari provenienti direttamente da un essere vivente, mentre sono continue le linee provenienti da neoplasie o da popolazioni rese immortali quando vengono disattivati o modificati per via chimica o virale alcuni meccanismi cellulari responsabili, ad esempio, del ciclo cellulare o del tasso di divisione cellulare.

Una linea cellulare immortale possiede dunque il vantaggio di offrire una popolazione di cellule omogenee, indefinitamente riproducibili e che crescono in un ambiente controllato. Questo consente di effettuare varie procedure sperimentali partendo da un unico campione prelevato *in vivo* con la possibilità di riprodurre un processo biologico sia in una prospettiva di insieme sia scomponendolo nei "sottoprocessi" che lo costituiscono. Uno svantaggio presentato dalle linee, una volta sottoposte a numerosi passaggi, è la perdita delle caratteristiche di differenziazione da parte della popolazione, ovvero la popolazione perde quelle proprietà tipiche osservabili *in vivo*.

2.1.1.1 Linea cellulare T98G

La linea cellulare T98G è una variante poliploide della linea T98, costituita da cellule derivanti da un glioblastoma multiforma umano, un tumore maligno che si verifica nel cervello o nel midollo spinale. Questa linea è immortale ed è costituita da cellule che non necessitano dell'ancoraggio a una superficie per la proliferazione e che si fermano nella fase G1 del processo di divisione cellulare sotto condizioni di alta densità cellulare o bassa concentrazione di siero nel terreno di coltura [29]. Inoltre, questa linea cellulare ha un tasso di duplicazione della popolazione $PDT = 28 h$ [30]. Per quanto riguarda la migrazione cellulare, le T98G presentano le seguenti proprietà: *in vivo* possono invadere sia individualmente sia collettivamente il parenchima cerebrale; *in vitro* aderiscono facilmente su superfici rigide producendo la propria matrice extracellulare; presentano una migrazione mesencimale invece che ameboidale; sia *in vivo* sia *in vitro* sono sensibili alla presenza di un campo elettrostatico [31].

2.2 Apparato sperimentale

Per ogni procedura sono state usate cellule della linea T98G fornite da ATTC [30] che sono state poste su una piastra Petri in polistirene di $d_{piastra} = 35 mm$ (Falcon® TC-treated Easy-Grip Style - #353001, Becton Dickinson Labware, USA) sottoposta a trattamento al plasma per sterilizzarla e aumentarne l'adesività, e adatta per la microscopia ottica (Fig.2.2).



Figura 2.2: Piastra Petri in polistirene utilizzata negli esperimenti: (a sinistra il tappo, a destra la superficie interna che ospita la coltura cellulare). Durante gli esperimenti la piastra viene chiusa in modo tale da mantenere il campione isolato.

Le colture sono state mantenute nel mezzo 51200-MEM completo, i cui componenti sono specificati dettagliatamente nella Sez.2.1. Inoltre le cellule sono state conservate all'interno di un incubatore Thermo Scientific™ Forma™ Series II Water-Jacketed CO_2 con capacità 184 L [32], impostato a 37 °C al 5% di CO_2 (Fig.2.1b).

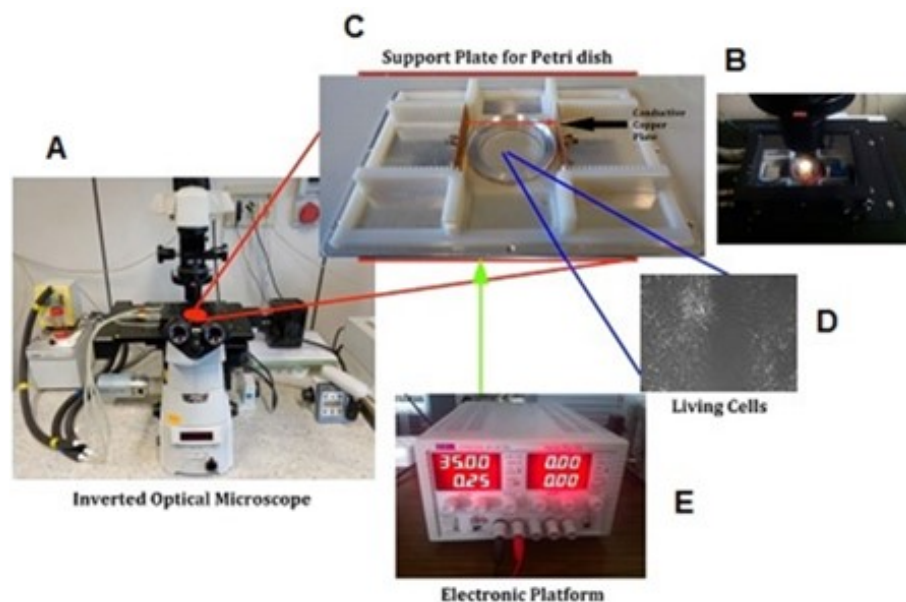


Figura 2.3: (A) Microscopio ottico; (B) Incubatore posto all'interno del microscopio che permette di termostatare le cellule per la durata dell'esperimento; (C) Supporto in plastica per la piastra Petri e per la coppia di pinze; (D) Immagine acquisita delle cellule all'interno della Petri; (E) alimentatore CPX200 (TTi)

Per il set-up sperimentale sono stati utilizzati: un microscopio ottico invertito Eclipse Ti (Nikon, Bologna, Italia) operante a illuminazione a contrasto di fase sul cui tavolino traslatore (la piattaforma nera visibile in Fig. 2.3.A e Fig.2.3.B) è stato posto un piccolo incubatore (Fig.2.3.B), per permettere di mantenere il campione a un'atmosfera umidificata a 37 °C al 5% di CO_2 durante l'esperimento. In particolare la temperatura è stata controllata tramite una termocoppia e

mantenuta costante tramite un termostato esterno al microscopio. Per il circuito, sono stati usati un alimentatore CPX200 (TTi) (Fig. 2.3.E) operante come generatore di tensione, delle piastre in rame poste su un supporto in plastica appositamente progettato, tra le quali è posta la Petri, formando pertanto un condensatore con dielettrico.

2.3 Procedura sperimentale

L'esperimento ha previsto una fase preliminare di coltura standard delle cellule e di preparazione del campione biologico e una fase operativa durante la quale sono stati realizzate le acquisizioni delle immagini.

2.3.1 Preparazione del Campione

Per la buona conservazione della coltura cellulare è stato necessario "passare" le cellule per assicurare che mantenessero una crescita esponenziale e disponessero di nutrienti indispensabili con continuità. Il passaggio delle cellule T98G è una procedura effettuata da un operatore munito di dispositivi di protezione personale sterili all'interno di una cappa a flusso laminare che segue il seguente protocollo:

- Il terreno di coltura viene trasferito dalla fiasca contenente la coltura cellulare in un becher vuoto, non necessariamente sterile dato che il terreno verrà smaltito, in maniera tale che all'interno della fiasca rimangano esclusivamente le cellule ancorate alla superficie interna. Per rimuovere i residui del terreno contenenti anche le cellule morte, si sciacqua la superficie della piastra con del PBS (Phosphate Buffered Saline), una soluzione salina che non danneggia la popolazione ancora in vita [33].
- Si inseriscono nella fiasca 500 μL di tripsina, un enzima che favorisce il distacco delle cellule dalla superficie interna e la dissociazione dei cluster formati. Quindi si ripone la fiasca nell'incubatore per ca. 1 *min* fino al compimento del processo.
- Dopo aver controllato al microscopio che le cellule siano in sospensione isolate, si aggiungono 1500 μL di terreno di coltura 51200-MEM, quindi si svuota la miscela in una provetta sterile.
- La fiasca utilizzata viene smaltita e si prepara una nuova coltura inserendo 5 *mL* di 51200-MEM all'interno di una nuova fiasca. In particolare il mezzo si distribuisce sulla superficie inferiore in maniera tale che la coltura si disponga come monolayer.
- Una volta preparata la nuova fiasca, si versano al suo interno 500 μL della soluzione contenuta nella provetta sterile e si pone la coltura ottenuta in incubatore
- Il procedimento è da ripetere ogni 2-3 giorni, periodo dopo il quale la popolazione ha effettuato un numero sufficiente di divisioni da diminuire il tasso di proliferazione come spiegato nel paragrafo sulla linea T98G.

Per realizzare un campione per l'esperimento, al termine dell'ultimo passaggio, vengono preparate una fiasca contenente $500 \mu L$ di coltura cellulare per la prosecuzione della popolazione, e una piastra, contenente circa $30 - 40 \mu L$ di coltura cellulare, come campione per la procedura sperimentale.

2.3.2 Esperimento

Una volta ottenute le condizioni ambientali necessarie, all'interno dell'incubatore è stata allocata una struttura in plastica appositamente progettata per consentire che il campo elettrostatico non sia generato all'interno della piastra. Infatti, all'interno del supporto (Fig. 2.3.C), le piastre in rame che costituiscono il condensatore sono fissate alle pareti isolanti del supporto, senza essere a contatto con la Petri, in posizione centrale ed equidistante dalle piastre. Il circuito si chiude

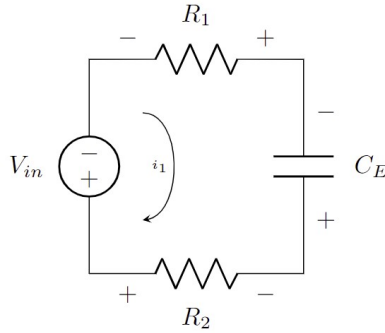


Figura 2.4: In una rappresentazione semplificata, il circuito è formato da un generatore di tensione V_{in} , da un condensatore con dielettrico C_E in serie con due resistenze R_1 e R_2 .

collegando le due piastre in rame all'alimentatore settato a $(35.24 \pm 0.28)V$. Il pulsante ON/OFF, sull'output dell'alimentatore, funge anche da interruttore per il circuito, consentendo di tenere la stessa postazione sperimentale per entrambi i regimi di acquisizione. Una volta acceso l'interruttore, si crea un campo elettrostatico all'interno del condensatore di un'intensità dipendente dalla permittività elettrica del campione.

Tramite le equazioni dell'elettromagnetismo per i dielettrici, se approssimiamo il dielettrico al solo mezzo di coltura con permittività elettrica $k \simeq 80 \epsilon_0$ [34], si verifica che un potenziale di $V \simeq 35 V$ può generare tra due piastre distanti $L = 42 mm$ un campo elettrostatico $E \approx 10 V/m$. Come mostrato dalla Fig.2.4 si realizza un circuito RC serie in cui il condensatore contiene un dielettrico tra le piastre e la resistenza è quella dei cavi che collegano condensatore e generatore di tensione, schematizzabili come due piccole resistenze in serie con il condensatore.

Una volta preparata la postazione, il protocollo sperimentale adottato è il seguente:

- Si impone un campionamento lungo l'asse della piastra parallelo alle linee di campo e lungo l'asse perpendicolare, ai quali mi riferirò rispettivamente come "asse orizzontale" e "asse verticale", in un intervallo $d_{camp} < d_{piastra}$ per entrambi gli assi. Il numero di posizioni in cui si effettua il campionamento è variabile dato che dipende dal numero e dalla densità

di cellule presenti all'interno dell'inquadratura in un intorno della posizione campionata. Si è deciso di campionare solo posizioni in cui fossero assenti cluster di cellule e presenti un numero sufficiente, stimabile in 10-15 unità, di cellule isolate.

- Per ogni posizione da campionare, viene acquisita una micrografia a contrasto di fase in configurazione time-lapse (1 *frame* / 5 *minuti*) a 20× di ingrandimento con autofocus attivo per 3 ore. Durante questo periodo il circuito è aperto e le cellule non sono sottoposte a campo elettrostatico e viene definito come Regime SHAM (termine inglese che indica un evento di controllo o placebo)
- terminate le 3 ore, viene acceso l'interruttore dell'alimentatore e viene resettata l'acquisizione. Infatti, viene chiuso il file contenente le immagini acquisite durante le prime tre ore e ne viene aperto un altro: di conseguenza, tutti i parametri delle cellule misurati dal computer sono resettati a 0. Inoltre se, a causa del proprio moto, le cellule sono ai margini del campo in cui vengono osservate, il campo viene spostato. Quest'operazione tuttavia non è importante ai fini della misura, perché lo spostamento modifica la posizione relativa della cellula rispetto al campo d'osservazione, ma non la posizione assoluta. Si effettua quindi il campionamento con la stessa procedura descritta al punto precedente. Dato che le cellule sono sottoposte a campo elettrostatico definiamo questo periodo Regime EF (*Electrostatic Field*)

Questo protocollo è stato prima collaudato in un test in cui sono state acquisite micrografie per 6 ore mentre l'alimentatore era impostato come sopra ma con il pulsante di output disattivato, per cui il sistema era in regime di controllo, quindi è stato utilizzato per sei procedure sperimentali uguali.

Capitolo 3

Analisi delle immagini

L'effetto del campo elettrostatico sulla motilità cellulare è stato studiato tramite l'analisi delle immagini ottenute negli esperimenti descritti nella Sez.2.3.2. In particolare per ogni cellula è stata confrontata la motilità in regime di controllo (*SHAM*) e in regime di campo elettrostatico *EF*, come già fatto in altri studi [35]. Il processo di analisi delle immagini si è quindi suddiviso in 2 fasi: la selezione delle cellule su cui eseguire il tracking e l'analisi dei dati forniti dal software di tracking.

Cernita delle immagini

Prima dell'inizio dell'analisi è stata effettuata una cernita delle immagini ottenute da analizzare. Infatti, dal momento che la velocità delle cellule ottenuta dall'esperimento in media risulta essere rispettivamente $\bar{v}_{sham} \approx 0.37 \mu m/min$ e $\bar{v}_{ef} \approx 0.46 \mu m/min$, in media la distanza percorsa da una cellula ogni 5 minuti $\bar{d}_{5,sham} \approx 1.8 \mu m \ll \bar{d}_{sham}$ e $\bar{d}_{5,sham} \approx 2.3 \mu m \ll \bar{d}_{ef}$ dove $\bar{d}_{sham} \approx 65 \mu m$ e $\bar{d}_{ef} \approx 82 \mu m$ sono le distanze medie coperte dalle cellule in 3 ore ottenute dall'analisi dati nei due regimi. Per questo motivo si è scelto di analizzare immagini acquisite ogni 15 minuti. In questo modo il numero di immagini da analizzare per ogni frame è stato ridotto da 37, numero di immagini per ogni frame ottenuto facendo l'acquisizione ogni 5 minuti, a 13.

Ripartizione delle cellule per zona

Come descritto nella Sez.2.3.2, il campionamento lungo l'asse orizzontale della piastra è stato effettuato in un intervallo $d_{camp} < d_{piastra}$, dal momento che sono state escluse dall'analisi le cellule che potessero interagire con i bordi della piastra e che la densità superficiale cellulare in tali zone risulta molto minore della densità media. Per questo motivo, l'intervallo reale nel quale è stato effettuato il campionamento è $d_{camp} = [-10.5; +10.5] mm$. In base alla coordinata x di ogni cellula campionata, questa è stata classificata come:

- Cellula al *Polo Negativo* se $-10.5 \text{ mm} < x < -3.5 \text{ mm}$
- Cellula al *Centro* se $-3.5 \text{ mm} < x < +3.5 \text{ mm}$
- Cellula al *Polo Positivo* se $+3.5 \text{ mm} < x < +10.5 \text{ mm}$

Questa classificazione risulta necessaria per valutare l'effetto del campo elettrostatico in funzione della distanza della cellula dalle piastre.

Nelle sezioni seguenti l'espressione *cellula al polo negativo/positivo/centro* farà riferimento a tale classificazione.

3.1 Selezione delle cellule

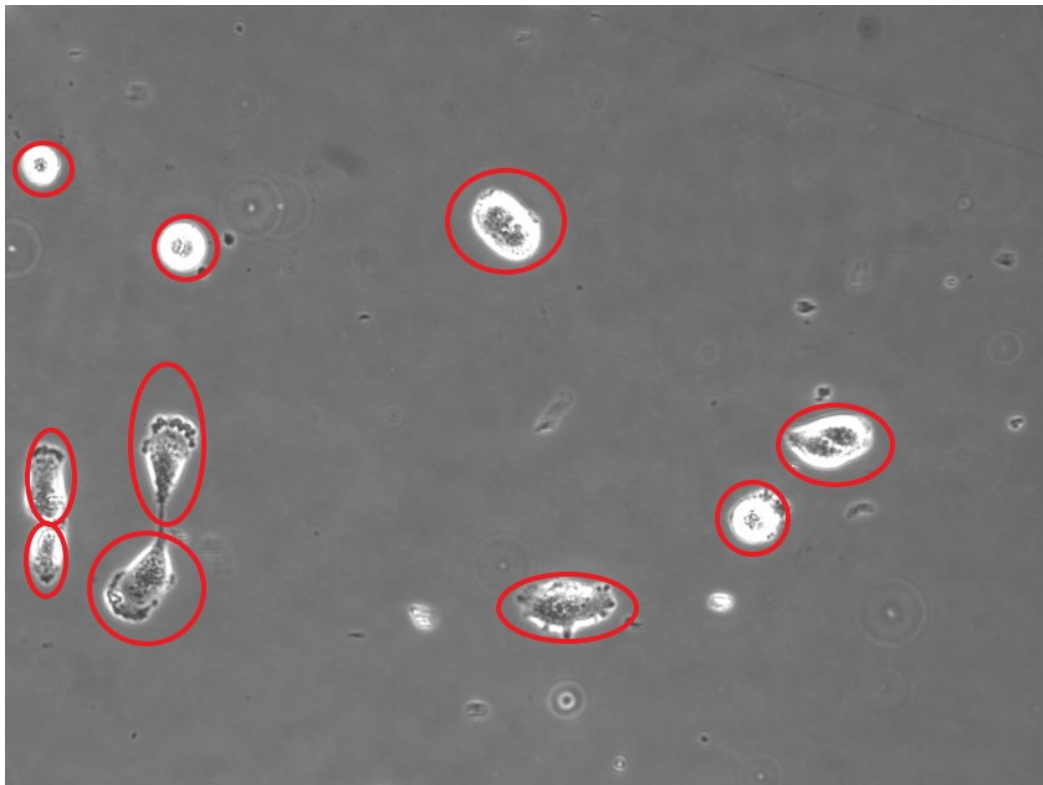


Figura 3.1: Esempio di frame acquisito. La micrografia è acquisita a contrasto di fase con ingrandimento $20\times$ all'inizio della fase SHAM. Sono cerchiare in rosso le cellule vive e potenzialmente tracciabili.

Come mostrato dalla Fig.3.1, in ogni frame è inquadrata una porzione della piastra in cui sono presenti 10-15 cellule. Questo numero è soggetto a variazioni. Infatti, a causa del loro movimento alcune cellule escono dall'inquadratura. Inoltre, nel corso dell'esperimento, alcune cellule sono soggette a duplicazione. In entrambi i casi il tracciamento di tali cellule non può essere eseguito.

Dal punto di vista sistematico, un possibile ostacolo al corretto tracciamento delle cellule risiede nella perdita della messa a fuoco sulle cellule una volta che queste si spostano. Infatti, utilizzando un ingrandimento $20\times$, la messa a fuoco è estremamente sensibile a vibrazioni esterne, per cui è normale che questa vada modificata nel corso dell'esperimento. Questo problema si può risolvere tramite la funzionalità *Autofocus* del software: utilizzando il metodo di autofocus "Steps in Range", ogni acquisizione sarà effettuata con una scelta automatica della migliore messa a fuoco. In particolare, a ogni acquisizione l'obiettivo si sposterà lungo l'asse z dalla posizione definita all'inizio della procedura o da quella salvata dalla precedente acquisizione lungo un determinato range e di un numero di step, i cui valori sono preimpostati dall'operatore. Per ogni step viene calcolato il contrasto e, una volta ripetuto il procedimento per ogni step, l'obiettivo si posiziona sullo step con contrasto migliore. Risulta quindi evidente che la funzione di autofocus sia particolarmente sensibile alla definizione di step [36]. Nel corso degli esperimenti è stata massimizzata l'efficienza dell'autofocus fissando il range a $R_{auto} = 450 \mu m$ e gli step a $s_{auto} = 10 \mu m$.

Escluse le cellule il cui tracciamento non fosse possibile, è stata fatta un'ulteriore valutazione su quelle rimanenti. Il campione finale è costituito solamente da cellule che presentano un movimento rilevante ai fini dell'esperimento. Lungo l'intera durata della procedura, ovvero sia nella fase *SHAM* sia nella fase *EF*, è stato infatti osservato che la maggior parte delle cellule presenti tende a stare ancorata alla superficie della piastra senza movimenti effettivi. Questo infatti può accadere se l'estensione dei lamellopodi e la forza di adesione totale non sono sufficienti a consentire il movimento [37]. Inoltre, per convenzione, un movimento ameboidale, come quello osservato, è definito da una velocità cellulare compresa nel range $1 \frac{\mu m}{h} \leq v_{cell} \leq 10^3 \frac{\mu m}{h}$ [2], per cui si intende *rilevante* il movimento di cellule la cui velocità rientri nell'intervallo sopra riportato. Infatti, nel campione ottenuto sperimentalmente, la velocità è definita nell'intervallo $3.2797 \frac{\mu m}{h} \leq v_{cell} \leq 97.3976 \frac{\mu m}{h}$. La conseguenza più importante di questo metodo è stata la disomogeneità del campione ottenuto nelle diverse zone della piastra per ogni esperimento. Anche il campione finale è risultato disomogeneo; a titolo di esempio, la differenza tra le cellule campionate al polo negativo ($N_{pn} = 107$) e il polo positivo ($N_{ps} = 79$) è di 29 unità.

3.2 Tracking delle Cellule

La fase principale di analisi delle immagini è consistita nel tracciamento, o *tracking*, secondo il nome della funzione del software, di ogni cellula nel moto.

Per prima cosa, la cellula selezionata deve essere definita tramite una *Region of Interest (ROI)*, una figura chiusa di forma ovoidale il cui bordo può essere disegnato liberamente dall'operatore dato che la cellula varia di dimensioni e forma nel movimento [38]. Al fine di eseguire un tracking corretto, l'unico vincolo sulla definizione della ROI è che il centro della ROI corrisponda a un punto ben definito sulla superficie cellulare. In particolare, tale punto, che chiamerò "centro della cellula" per semplicità, deve essere definito all'interno del nucleo cellulare, in maniera tale da non

considerare nel tracciamento le elongazioni dei lamellopodii. Infatti, come descritto nella Sez.3.1, all'elongazione di una protrusione non corrisponde sempre un effettivo movimento.

Nonostante sia possibile modificare il contrasto di fase tramite la *Look-Up Table (LUT)* [39], tuttavia, a causa degli aspetti già evidenziati nella Sez.3.1, non è sempre possibile trovare un punto sulla superficie che rimanga visibile e inalterato lungo la durata dell'esperimento: in questi casi è bene definire una ROI che tenda ad approssimare in maniera ottimale la superficie cellulare. Una volta definita la ROI, bisogna individuare nelle immagini acquisite a istanti successivi il centro

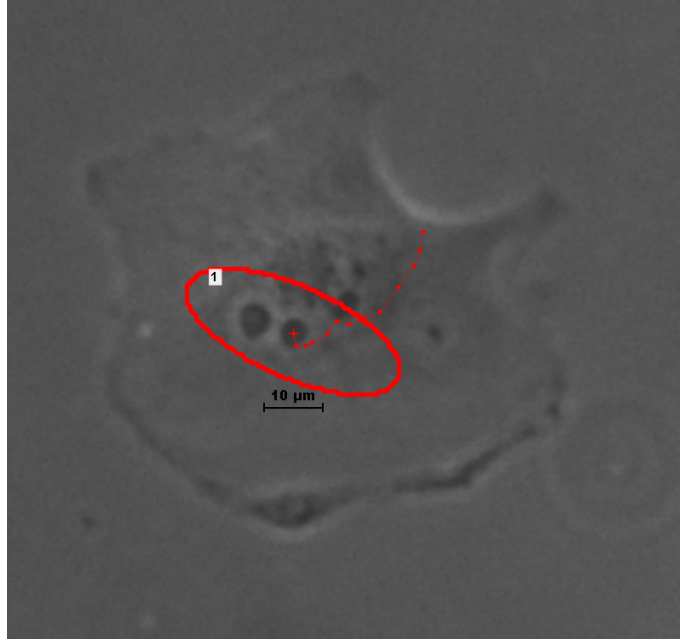


Figura 3.2: Micrografia acquisita a contrasto di fase con ingrandimento $20\times$ dopo 3 ore dall'inizio della fase SHAM. L'ellisse rossa definisce la ROI per il cui centro, visualizzabile come la croce rossa, sono calcolati i dati. Il centro della cellula è stato definito all'interno del nucleo cellulare. In questo caso il nucleo risulta ben visibile, perciò la ROI non è stata scelta in maniera da approssimare la forma della cellula. I punti del tracciato indicano le posizioni del centro in ciascuna delle 12 immagini precedenti.

della cellula: questo viene collegato alla posizione individuata nell'immagine precedente tramite un vettore spostamento. In questo modo, ripetuto il procedimento per l'intera sequenza di immagini, si ha il tracciamento di una cellula all'interno di un frame. Dato che alla fine dell'acquisizione in regime di controllo vi è una pausa $t_p = 5 \text{ min}$, come spiegato nella Sez.2.3.2, l'acquisizione in regime di campo elettrostatico è stata riavviata, per cui l'istante dell'acquisizione della prima immagine è stato definito come istante iniziale t_0 .

Tramite tale operazione si misurano alcune grandezze e proprietà della cellula al variare del tempo, i cui dati vengono salvati ed esportati su tabella Excel. Di seguito vengono riportate le definizioni, secondo manuale [39], delle grandezze misurate che sono state utilizzate per l'analisi dati:

- *Heading*: angolo tra la direzione del vettore velocità e l'asse x. Viene definito in senso antiorario.

- *PathLength*: distanza bidimensionale percorsa dal centro della cellula, definita come somma dei segmenti delle distanze dalla prima immagine all'immagine corrente k :

$$PathLength = \sum_{i=1}^k \sqrt{x(t_i)^2 + y(t_i)^2}$$

- *PathSpeed*: velocità media del centro della cellula, definita come

$$PathSpeed = \frac{PathLength}{\Delta t}$$

dove Δt è l'intervallo di tempo trascorso dall'acquisizione della prima immagine all'acquisizione dell'immagine corrente.

- *Speed*: velocità del centro della cellula, definita come

$$Speed = \frac{\sqrt{x(t+dt)^2 + y(t+dt)^2} - \sqrt{x(t)^2 + y(t)^2}}{dt}$$

dove dt è l'intervallo di tempo trascorso dall'acquisizione dell'immagine corrente a quello dell'immagine immediatamente precedente.

- *Time*: istante di tempo in cui viene acquisita l'immagine. Viene definita rispetto a un tempo iniziale t_0 che corrisponde all'istante di tempo in cui inizia l'acquisizione del primo frame.

Nell'analisi sono state valutate le seguenti distribuzioni sperimentali:

- Distribuzione delle distanze, in cui per distanza si intende lo spostamento, in valore assoluto, compiuto dalla cellula nelle tre ore di acquisizione:

$$d_i = PathLength(t = 3 h)_i$$

Sono state quindi ottenute due distribuzioni, una per il regime SHAM e una seconda per il regime EF.

- Distribuzione delle velocità medie, in cui il tempo considerato sono le tre ore di acquisizione:

$$v_i = PathSpeed(t = 3 h)_i$$

Come per la distribuzione delle distanze, sono state ottenute due distribuzioni per le due fasi di acquisizione.

3.2.1 Errore associato ai dati ottenuti tramite tracking

Dal momento che l'operazione di tracking è estremamente sensibile all'operatore, è evidente che alle misure ottenute deve essere associato un errore. Nonostante questo sia minimizzato

vincolando il tracking al centro della ROI definita, tuttavia un errore sulla misura persiste. Per calcolare tale errore, si è scelto di ripetere il tracking di una cellula 10 volte. In questo modo, sono stati calcolati i valori medi delle grandezze misurate e, inoltre, è stato possibile ottenere l'errore associato, definito come [40]:

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (3.1)$$

dove x è la grandezza misurata e $N = 10$ è il numero di operazioni di misura effettuate.

Dal momento che l'errore ottenuto dipende dal movimento della cellula scelta, si può definire il rapporto:

$$\delta_{\sigma_m} = \frac{\sigma_m}{x} \quad (3.2)$$

dove σ_{m_x} è l'incertezza associata alla misura di x . Dalla 3.1 e 3.2 si ottiene quindi l'errore statistico σ_s per la misura di una grandezza y di una cellula qualsiasi:

$$\sigma_s = \delta_{\sigma_m} \times y \quad (3.3)$$

Dato che l'operazione di misura viene ripetuta usando la stessa tecnica, stabilire in questo modo l'errore permette di calcolare direttamente l'incertezza associata ai valori ottenuti senza dover ripetere le misure stesse.

Inoltre è necessario definire un'incertezza legata alla sensibilità dello strumento di misura. Infatti, i dati ottenuti presentano i seguenti errori sistematici:

- $\sigma_{pl} = 10^{-6} \mu m$, errore associato a *PathLength*
- $\sigma_{ps} = 10^{-6} \frac{\mu m}{s}$, errore associato a *PathSpeed*
- $\sigma_h = 10^{-6}^\circ$, errore associato a *Heading*

L'errore totale σ da associare alla misura sarà dato dalla somma in quadratura [40] di σ_s e σ_t , dove σ_t è l'errore sistematico dato dallo strumento di misura:

$$\sigma = \sqrt{\sigma_t^2 + \sigma_s^2} \quad (3.4)$$

I contributi sono infatti indipendenti dato che l'operatore non ha alcuna influenza sulla sensibilità del software, preimpostata dal costruttore.

3.3 Stima del numero di cellule

Per ogni esperimento è stata calcolata a posteriori la densità superficiale di cellule sulla piastra, in maniera tale da poterne stimare il numero totale e verificare la compatibilità degli esperimenti stessi.

Innanzitutto, per ogni esperimento, è stato stimato il numero medio di cellule presente in ogni frame tramite l'applicazione *Cell Count Analysis* [39]. Questo strumento si basa sul metodo del *Bright Spot Detection*, ovvero vengono rilevati oggetti chiari su sfondo scuro; l'opzione *Different Sizes* permette di riconoscere cellule di forme e dimensioni diverse. La *Cell Count Analysis* è stata applicata ad ogni frame all'istante t_0 di inizio dell'acquisizione in modo che il conteggio non sia influenzato dalle possibili variazioni, descritte nella Sez.3.1. Come si può osservare in Fig. 3.1, a causa delle diverse dimensioni e forme delle cellule presenti sulla piastra, la radiazione incidente subisce un cambiamento di fase differente da cellula a cellula. L'immagine risultante presenta quindi cellule illuminate diversamente, cosa che non permette un'analisi ottimale da parte dell'applicazione. Per questo motivo, ogni immagine è stata ricontrollata manualmente, ottenendo così un risultato privo di errore. Il numero medio di cellule su un frame è stato quindi calcolato seguendo l'espressione della media aritmetica:

$$\bar{N}_{fr} = \frac{1}{F} \sum_{i=1}^F N_i \quad (3.5)$$

dove F è il numero totale di frame acquisiti nell'esperimento considerato - questo infatti è variato a seconda della procedura. Note le dimensioni di ogni immagine ($A_{im} = 8.5 \text{ mm} \times 6.3 \text{ mm}$), si ottiene la densità superficiale delle cellule sulla piastra:

$$\rho_c = \frac{\bar{N}_{fr}}{A_{im}} \quad (3.6)$$

Dal momento che sono note le dimensioni della piastra A_p , il numero di cellule totale stimato per ogni esperimento risulta essere: $N_{TOT} = \rho_c A_p$, i cui valori sono riportati nella tabella seguente:

Esperimenti						
	16/11	23/11	02/12	07/12	14/12	21/12
N_{TOT}	23,549	29,884	31,113	24,978	25,153	23,990

Tabella 3.1: Numero totale di cellule stimato per ogni esperimento

Come mostrato dalla Tab.1, ogni esperimento dispone di un campione di cellule variabile. Tuttavia, i dati ottenuti da ciascuno esperimento sono risultati coerenti, per cui si è concluso che una differenza di densità $\Delta\rho \approx 10^3 \frac{\text{cells}}{\text{mm}^2}$ non influisce sull'analisi fatta.

Per completezza, è stato realizzato ulteriore controllo confrontando i dati relativi alla distanza media relativa delle singole cellule nei regimi di SHAM ed EF, per la cui definizione si rimanda alla Sez.2.3.2, suddividendo il campione totale in base alla densità. Sono stati creati infatti due sotto-campioni: il primo, costituito dagli esemplari raccolti negli esperimenti caratterizzati da una densità $\rho_c \approx 25,000 \frac{\text{cells}}{\text{mm}^2}$; e il secondo formato da quelli ottenuti negli esperimenti caratterizzati

da $\rho_c \approx 30,000 \frac{\text{cells}}{\text{mm}^2}$. Come mostrato nelle Figg. A.1a - A.1b, i risultati ottenuti sono differenti. Una spiegazione di questa incongruenza potrebbe risiedere nel fatto che i campioni confrontati sono diversi: il primo, infatti, è formato da 191 cellule, mentre il secondo da 100 cellule, per cui è possibile che, aumentando il numero di esemplari del secondo campione, i risultati ottenuti per entrambi i campioni siano compatibili. Per questo motivo, non è stata condotta un'ulteriore analisi rispetto a tali sotto-campioni e i grafici sono stati riportati in Appendice.

3.4 Comparazione e Selezione del Best Fit

Dato che la funzione che possa fittare meglio i dati non è nota a priori, è bene fare alcune considerazioni. Entrambe le distribuzioni hanno dominio $0 < x < \infty$, e sono continue. Per questi motivi, sono state prese in considerazione la distribuzione esponenziale, la distribuzione gamma, la distribuzione semi-normale, la distribuzione di Rayleigh, la distribuzione di Rice e la distribuzione di Weibull.

3.4.1 Fit delle Distribuzioni

Il campione di dati è stato fittato con tutte le funzioni di prova usando il metodo della massima verosimiglianza per stimare i parametri di tali funzioni. Il metodo della massima verosimiglianza prevede infatti che la miglior stima dei parametri della funzione di fit sia quella che permette di ottenere dei parametri che massimizzano la probabilità di ottenere il campione di dati da cui si fa la stima [21]. Data una funzione densità di probabilità $f(x; \lambda_r)$ dipendente da r parametri λ_r e un campione formato da n osservazioni, si definisce la verosimiglianza la funzione prodotto delle singole PDF assumendo che ogni osservazione sia indipendente:

$$M = \prod_{i=1}^n f(x_i; \lambda_r)$$

dove x_i è l' i -esimo dato. Dato che è una produttoria, è comodo fare la somma dei logaritmi delle funzioni:

$$L = \sum_{i=1}^n \log[f(x_i; \lambda_r)]$$

Quindi, per ottenere la miglior stima dei parametri, bisogna massimizzare L rispetto ai parametri, ottenendo un set di equazioni differenziali:

$$\frac{\partial L}{\partial \lambda_1}, \dots, \frac{\partial L}{\partial \lambda_r}$$

Una volta risolte, si ottengono $\hat{\lambda}_1, \dots, \hat{\lambda}_r$, le miglior stime dei parametri della funzione $f(x)$. In realtà, per un discorso di ottimizzazione legato agli algoritmi usati per computare tali parametri, conviene minimizzare una funzione. Perciò, per ottenere una forma equivalente, si minimizza il

logaritmo negativo della funzione di verosimiglianza:

$$\operatorname{argmin} -\log[L(\lambda_r|x)]$$

Questo ci è utile per valutare quale sia la funzione più adatta a fittare il campione di dati. Infatti, avvalendoci della monotonia del logaritmo, il best fit sarà dato dalla funzione per il quale il valore del logaritmo negativo della verosimiglianza è minore.

3.5 Calcolo del MSD

Il *Mean Squared Displacement* (MSD) è una misura della dispersione di una particella nel tempo rispetto a un'origine fissa. Mediando sui quadrati degli spostamenti, otteniamo un valore sempre positivo che non si annulla mai, possibile se consideriamo il solo spostamento, dato che per un Random Walk la probabilità di un passo avanti è uguale a quella di un passo indietro. Tale grandezza è unicamente dipendente dal tempo, ed è definita come:

$$MSD(t) = \langle [d(t_0 + \Delta t) - d(t_0)]^2 \rangle \quad (3.7)$$

dove t_0 è l'istante di inizio acquisizione, d è la *PathLength*, come definita nella Sezione 3.2 e Δt è l'intervallo di tempo intercorso tra l'inizio dell'acquisizione e l'istante corrente. Nel nostro caso per ogni cellula abbiamo posto $d(t_0) = 0$ per comodità, dato che la posizione iniziale di ogni cellula è indipendente dalle altre nel caso di migrazione di una singola cellula. In questo modo, come si deduce dall'Eq.3.7, è stato solo necessario elevare al quadrato i dati delle *PathLength*. Inoltre, è stato possibile sovrapporre gli spostamenti delle cellule su grafici polari per confrontarli.

Dato che il valore del MSD per un moto bidimensionale è importante per lo studio della diffusività, ci avvaliamo della relazione trovata nel Capitolo 1 che diventa:

$$\langle [d(\Delta t)]^2 \rangle = 4Dt^\alpha \quad (3.8)$$

Determinando il valore di α sarà possibile caratterizzare il tipo di diffusione della popolazione cellulare.

3.5.1 Fit

Secondo quanto appena discusso, la funzione che si addice al fit è la seguente:

$$MSD(t) = At^B \quad (3.9)$$

dove $A = 4D$ e B è l'esponente che valuta il tipo di diffusione anomala. Il fit è stato eseguito tramite la funzione *FIT_MSD.m*, nella quale si utilizza il metodo dei minimi quadrati non lineare per computare i parametri A e B con le relative incertezze.

Capitolo 4

Risultati

4.1 Distribuzioni sperimentali

Analizziamo in primo luogo le distribuzioni sperimentali delle distanze e delle velocità medie delle cellule a un tempo $t = 3 h$, sia per l'acquisizione SHAM sia per quella EF.

4.1.1 Best Fit: La Distribuzione Gamma

Innanzitutto, calcolando il negative log-likelihood per le distribuzioni prese in considerazione per i dati ottenuti, possiamo valutare quale sia il best fit.

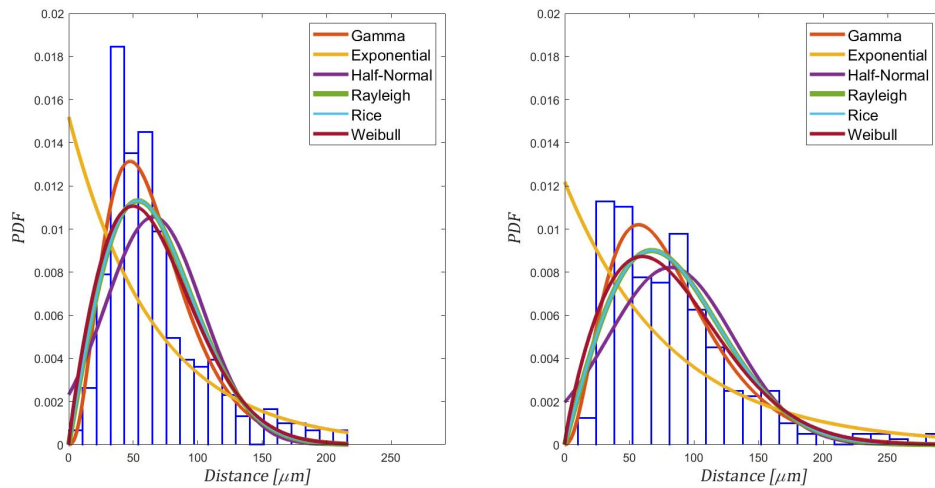


Figura 4.1: Fit possibili della distribuzione delle distanze. A sinistra è riportato il grafico nel caso SHAM, a destra caso EF.

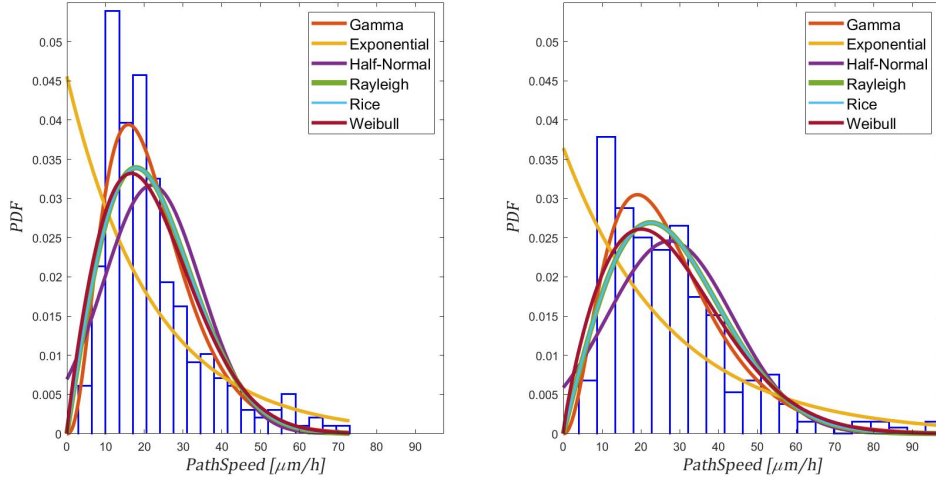


Figura 4.2: Fit possibili della distribuzione delle velocità. A sinistra è riportato il grafico nel caso SHAM, a destra caso EF.

Osservando le Figg.4.1 e 4.2 e i valori riportati nella Tab.4.1, la funzione che meglio modella le distribuzioni delle velocità e delle distanze è la PDF Gamma. Infatti, come si può osservare qualitativamente dai grafici, la distribuzione semi-normale prevede un picco spostato più a destra di quanto osservato dato che è simmetrica. La distribuzione esponenziale riesce a modellare solo la coda di destra, dato che per definizione la PDF non prevede un picco.

PDF	D_{SH}	D_{EF}	PS_{SH}	PS_{EF}
Gamma	1.3665017	1.4389066	1.2432101	1.1695903
Esponenziale	1.4573599	1.5194027	1.1521686	1.0893044
Normale	1.4187008	1.4890022	1.1911071	1.1196417
Rayleigh	1.3895726	1.4533976	-1.2267791	1.1551852
Rice	1.3829574	1.4533977	1.2267789	1.1551849
Weibull	1.3818958	1.4510417	1.2278063	1.1575516

Tabella 4.1: Parametro del negative loglikelihood per le probability density function prese in esame. Le distribuzioni sperimentali analizzate sono: la distanza delle cellule a $t = 3$ h in acquisizione SHAM (D_{SH}) e in quella EF (D_{EF}) e la velocità media delle cellule a $t = 3$ h in acquisizione SHAM (PS_{SH}) e in quella EF (PS_{EF}). Tutti i valori riportati vanno moltiplicati per un fattore 10^3 . In rosso vengono mostrati i valori che, per ciascuna distribuzione di dati, minimizzano il negative loglikelihood. Come si può evincere, i dati raccolti possono essere fittati tramite la distribuzione Gamma.

Per i dati a disposizione, ci troviamo nel caso in cui la distribuzione di Rice e di Rayleigh coincidono e, come la distribuzione di Weibull, risultano meno sensibili al picco delle distribuzioni rispetto alla distribuzione Gamma.

Il risultato ottenuto si può appoggiare a quanto osservato da un recente studio [19] secondo cui infatti la distribuzione Gamma è risultata il best fit delle distribuzioni sperimentali dei focal adhesion lifetimes (FALT) - misurati in condizione di controllo, ovvero la durata di particolari strutture proteiche responsabili della motilità cellulare, trattate nella Sez.1.1.1, per un ampio campione di cellule. Inoltre, lo stesso studio riporta una correlazione tra i FALT e le velocità delle cellule, ipotizzando quindi che si potessero predire le caratteristiche della velocità della popolazione nota la distribuzione dei FALT. Già altri studi avevano evidenziato che si potesse predire la velocità di una popolazione cellulare considerando, tuttavia, la dimensione delle FA delle cellule [41]. In questo caso, dal momento che il valor medio della velocità trovato analizzando i nostri dati è compatibile con i valori dello studio [19], possiamo effettivamente ipotizzare che la distribuzione delle velocità di una popolazione dipenda come sono distribuiti i FALT e che quindi le due grandezze siano dipendenti. In aggiunta, si osserva che il campo elettrostatico non modifica il tipo di distribuzione seguita dai dati. Tuttavia, dato che i parametri ottenuti nei fit variano tra la fase SHAM e la fase EF, come sarà discusso nelle sezioni successive, si può ipotizzare che le relazioni tra FALT e velocità in presenza e in assenza di campo elettrostatico siano lievemente diverse.

4.1.2 Distanza

Un primo confronto tra la migrazione delle cellule nella fase di controllo e nella fase in cui è acceso il campo elettrostatico può essere fatto valutando la distanza totale percorsa dalle cellule in un tempo standard di 3 ore per ogni fase.

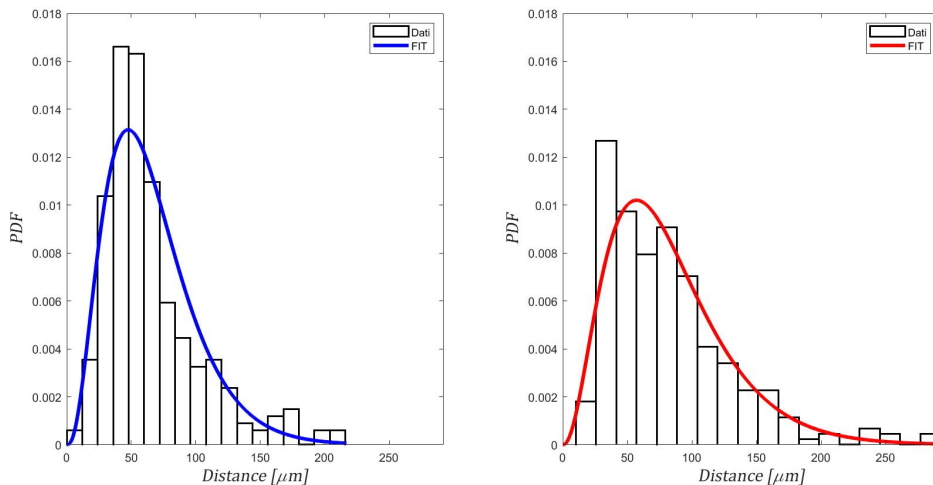


Figura 4.3: Fit delle distribuzioni delle distanze percorse dalle cellule in 3 ore. A sinistra è riportato il grafico nel caso SHAM, a destra caso EF.

Dai grafici si può osservare che le distribuzioni hanno una forma simile, come confermato dai valori assunti dal parametro k . Tuttavia, dal momento che $k_{EF} < k_{SHAM}$, possiamo affermare che la distribuzione delle distanze nel caso SHAM è meno asimmetrica di quella nel caso EF. Inoltre, il fatto che $\theta_{EF} > \theta_{SHAM}$ indica il maggiore stiramento della distribuzione verso destra a causa di un aumento della magnitudine dei dati all'estremo superiore. Questo si osserva anche nella Fig.4.3 confrontando le code delle distribuzioni: nel caso EF troviamo una coda più lunga e più popolata.

	k	σ_k	θ	σ_θ	$d (k \times \theta)$	$\sigma^2(k \times \theta^2)$
SHAM	3.62	0.29	18.15	1.57	65.78	1194.08
EF	3.30	0.27	24.89	2.16	82.03	2041.65

Tabella 4.2: Parametri ottenuti dal fit delle distribuzioni delle distanze. I valori di θ e d sono espressi in μm , i valori di σ^2 in μm^2 mentre k è adimensionale.

Tale conferma si ottiene dai parametri ricavati dal fit che, combinati, danno la media delle distanze percorse delle cellule: in presenza di campo elettrico acceso le cellule coprono mediamente una distanza maggiore del 24%. Inoltre, è evidente che il valor medio della distribuzione sia maggiormente influenzato dal parametro di scala. Ciò significa che la distribuzione è asimmetrica e indica, quindi, che è più probabile avere cellule che si muovano più della media piuttosto che cellule che si muovano meno della media.

Per i valori trovati in fase EF, dato che la relazione tra le variazioni relative tra i parametri $|\frac{K_{EF}-K_{SHAM}}{k_{EF}}| < |\frac{\theta_{EF}-\theta_{SHAM}}{\theta_{EF}}|$ indica che il parametro di scala aumenta di più di quello di forma, si può concludere che sia accentuato il fatto che sia più probabile trovare cellule che percorrono una distanza superiore alla media.

4.1.3 Velocità Media

Per come è definita la velocità media (Sez.3.2), ci aspettiamo che le distribuzioni e il parametro di forma ottenuto tramite fit ricalchino quelli appena visti per le distanze.

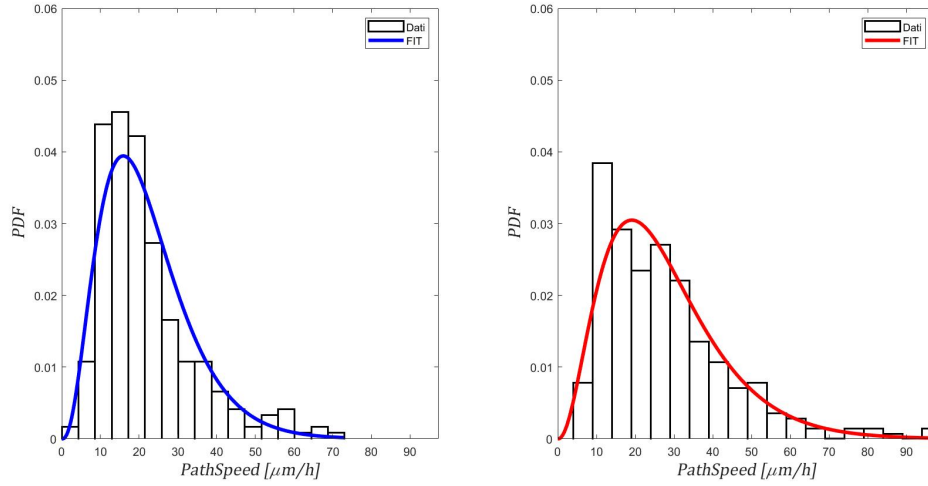


Figura 4.4: Fit delle distribuzioni delle velocità medie delle cellule per un tempo di 3 ore. A sinistra è riportato il grafico nel caso SHAM, a destra caso EF.

	k	σ_k	θ	σ_θ	$v(k \times \theta)$	$\sigma^2(k \times \theta^2)$
SHAM	3.63	0.29	6.04	0.52	21.94	132.64
EF	3.29	0.26	8.34	0.73	27.44	228.96

Tabella 4.3: Parametri ottenuti dal fit delle distribuzioni delle velocità. I valori di θ e v sono espressi in $\frac{\mu m}{h}$, i valori di σ^2 in $(\frac{\mu m}{h})^2$ mentre k è adimensionale.

Come atteso, i valori del parametro k per le distribuzioni delle velocità medie differiscono da quelli per le distribuzioni delle distanze nell'ordine di 2×10^{-3} . Analogamente a quanto osservato per le distribuzioni delle distanze, anche in questo caso si osserva una maggiore asimmetria nel caso EF, infatti $k_{EF} < k_{SHAM}$ e un aumento in media della velocità della popolazione quando il campo elettrico è acceso, dato che $v_{EF} > v_{SHAM}$. Rispetto alla distribuzione delle distanze, le distribuzioni delle velocità sono caratterizzate da valori dei parametri k e θ più vicini, osservando infatti una maggiore simmetria nella distribuzione dei dati.

4.2 MSD

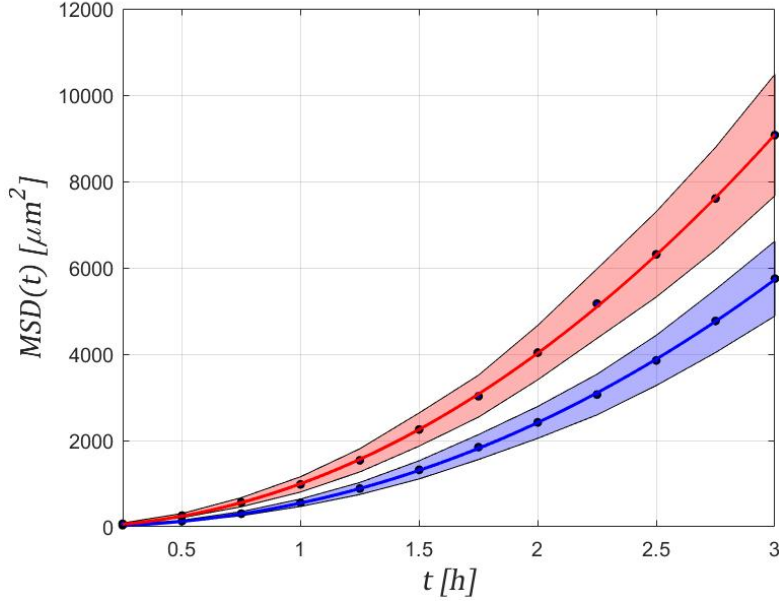


Figura 4.5: Fit del MSD in regime SHAM (curva blu) e in regime EF (curva rossa). Le aree sfumate rappresentano gli intervalli di confidenza al 95%

Da una prima analisi qualitativa, gli andamenti del MSD sono simili, con il valore del MSD che aumenta all'aumentare del tempo e in presenza di campo elettrico.

	A	$A(95\%)$	B	$B(95\%)$
SHAM	551.4	[538.0, 564.8]	2.131	[2.106, 2.156]
EF	999.1	[977.1, 1021.0]	2.010	[1.987, 2.033]

Tabella 4.4: Parametri per il MSD in SHAM e in EF riportati con gli intervalli al 95% di confidenza. I valori di A sono espressi in $\mu\text{m} \cdot \text{h}^B$, mentre B è adimensionale.

Andando a fare una valutazione quantitativa rispetto ai parametri ottenuti tramite fit, si osserva che $B > 1$ indipendentemente dalla presenza di un campo elettrostatico, per cui siamo in un caso di superdiffusività, come riportato in altri studi [42]. Come atteso, in seguito ai risultati mostrati nelle sezioni precedenti, il campo elettrostatico non va a modificare il tipo di diffusione della popolazione cellulare, ma aumenta la dispersione delle cellule. Questo è supportato anche dal fatto che la variazione relativa del parametro B sia $\sim 5\%$.

4.3 Dipendenza del moto dalla posizione della cellula sulla superficie della Petri

Una parte importante dello studio è stata rivolta alla dipendenza della migrazione di una cellula dalla sua posizione sulla superficie della Petri rispetto alle piastre. Come riportato nel Cap.3, prima dell'analisi, i dati di ogni cellula sono stati classificati in base alla posizione di questa sulla Petri. Dalla classificazione per ogni grandezza misurata sono state ottenute sei "subdistribuzioni", tre per ciascuna fase di acquisizione. In analogia con l'analisi fatta per il campione intero, in primo luogo è stato valutato quale sia il best fit delle distribuzioni delle distanze. Dalla valutazione del parametro del Negative Log-Likelihood, anche in questo caso la distribuzione che fitta in maniera migliore i dati è la distribuzione Gamma. Analizziamo ora i parametri ottenuti dai fit.

	POLE -			CENTRE			POLE +		
	k	θ	d	k	θ	d	k	θ	d
SHAM	3.26	18.65	60.92	4.36	15.87	69.22	3.58	19.05	68.21
EF	3.59	21.14	75.99	2.86	29.70	84.83	3.71	23.39	86.86

Tabella 4.5: Parametri ottenuti dal fit delle distribuzioni delle distanze rispettivamente per il polo negativo, centro e polo positivo. I valori di θ e d sono espressi in μm , i valori di σ^2 in μm^2 mentre k è adimensionale.

Come si osserva nella Tab.4.5, le sei distribuzioni sono dominate dal parametro di scala, dal momento che $\theta \gg k$. Ciò indica che la probabilità di trovare cellule che si spostano più della media è maggiore della probabilità di trovare cellule che si spostano meno della media. Questo fatto si accentua quando il campo elettrostatico è acceso, ricalcando quanto visto nel caso dell'analisi dell'intera popolazione. Osservando i valori dei singoli parametri, è interessante notare che per le cellule al centro questi variano in maniera inversamente proporzionale: $k_e/k_s \approx 0.66$, mentre $\theta_e/\theta_s \approx 1.87$. Il comportamento di questi parametri è peculiare per i seguenti motivi: innanzitutto, per nessun'altra distribuzione si registrano delle variazioni relative dei parametri di quest'ordine e, in secondo luogo, questo è l'unico caso in cui si osserva una diminuzione del valore di k con l'accensione del campo elettrostatico. Come si può notare nella Fig.4.7, la distribuzione delle distanze delle cellule presenta una lunga coda, risultando fortemente asimmetrica e stirata verso destra dalla presenza di dati dalla magnitudine elevata, cosa che potrebbe spiegare le variazioni dei parametri.

Per quanto riguarda il valor medio delle distribuzioni, si osserva che le cellule tendono a percorrere una distanza maggiore al centro e nella zona del polo positivo. Tuttavia si riscontra questa caratteristica del moto sia nella SHAM sia nella EF, per cui non si può concludere che l'azione del campo elettrostatico dipenda dalla posizione della cellula sulla piastra.

4.3. DIPENDENZA DEL MOTO DALLA POSIZIONE DELLA CELLULA SULLA SUPERFICIE DELLA PETRI37

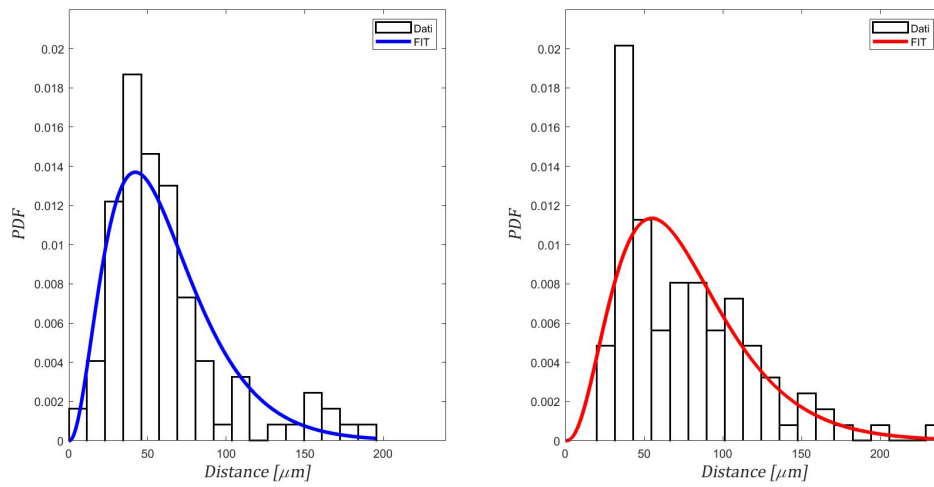


Figura 4.6: Fit della distribuzione delle distanze per le cellule al polo negativo. (A sinistra) distribuzione in regime di controllo - (A destra) distribuzione in regime di campo elettrico acceso.

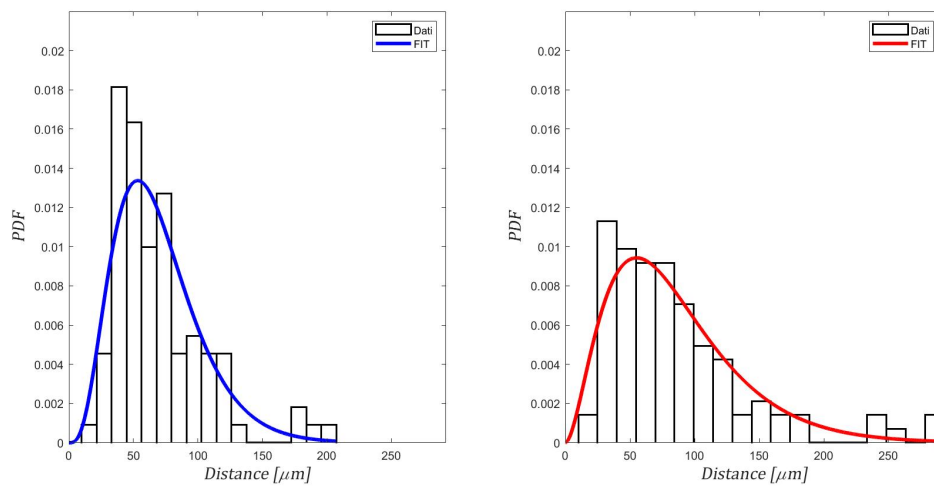


Figura 4.7: Fit della distribuzione delle distanze per le cellule al centro. (A sinistra) distribuzione in regime di controllo - (A destra) distribuzione in regime di campo elettrico acceso.

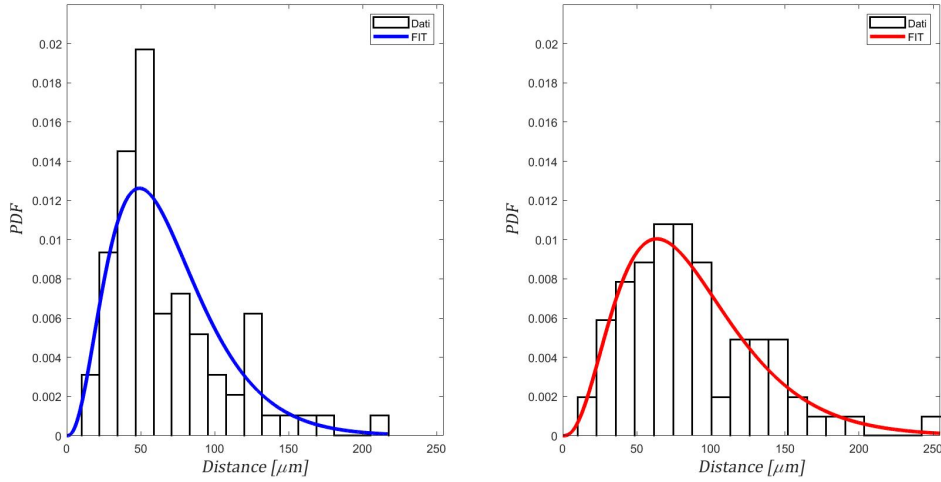


Figura 4.8: Fit della distribuzione delle distanze per le cellule al polo positivo. (A sinistra) distribuzione in regime di controllo - (A destra) distribuzione in regime di campo elettrico acceso.

Inoltre, sono stati confrontati i valori del MSD al variare del tempo per le popolazioni di cellule rispettivamente al polo negativo, centro e polo positivo. Si può osservare dalla Fig.4.9 che gli andamenti del MSD per le cellule nelle zone del polo positivo e del centro siano quasi sovrapposti, mentre sussiste una differenza con i valori del MSD della popolazione al polo negativo. Questo vale sia in regime di controllo sia in regime di campo elettrostatico acceso. Tuttavia, dato che gli intervalli di confidenza dei tre andamenti non sono separati, non è possibile considerare questo risultato significativo. Dagli andamenti qualitativi è possibile ipotizzare che per tempi molto lunghi si osservi una variazione della dispersione delle cellule in base alla loro posizione sulla piastra.

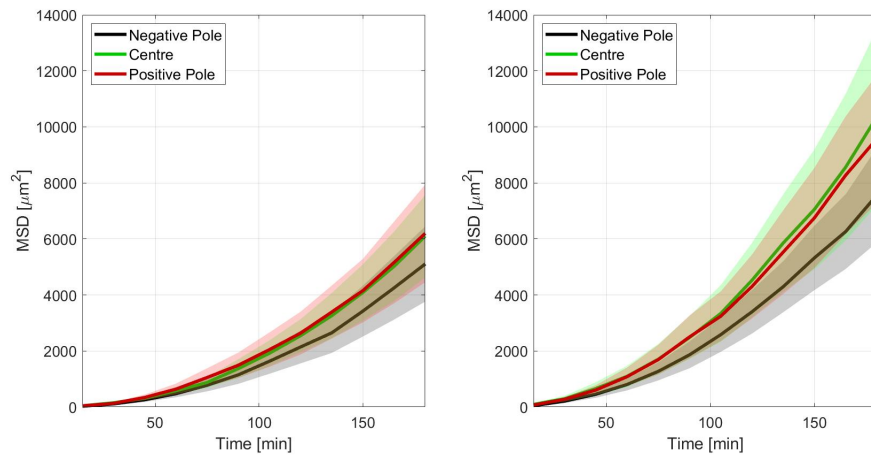


Figura 4.9: Dipendenza del MSD dalla posizione all'interno della Petri nel caso SHAM (a) e nel caso EF (b). Le aree ombreggiate raffigurano l'intervallo di confidenza al 95%.

4.4 Considerazioni sul Moto

Appurato che l'applicazione di un campo elettrostatico stimoli le cellule ad aumentare la propria velocità in media, cerchiamo di capire se questo influenzi anche la direzione del moto come osservato in altri studi [43] [44].

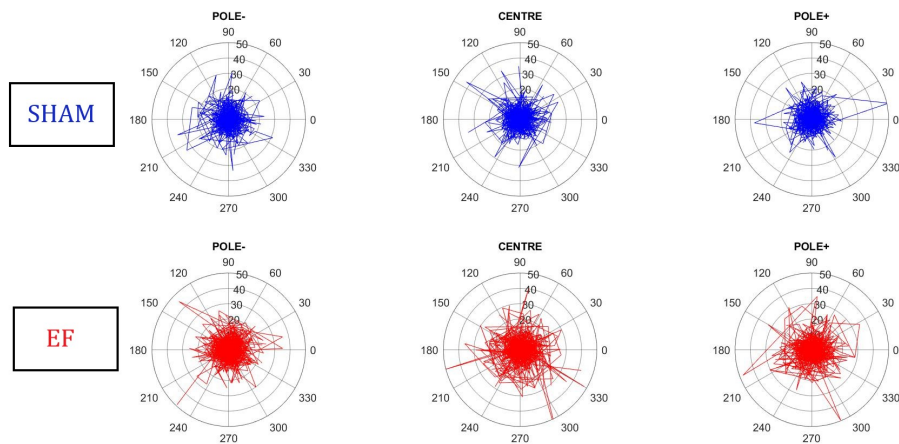


Figura 4.10: Grafici polari degli spostamenti percorsi dalle cellule.

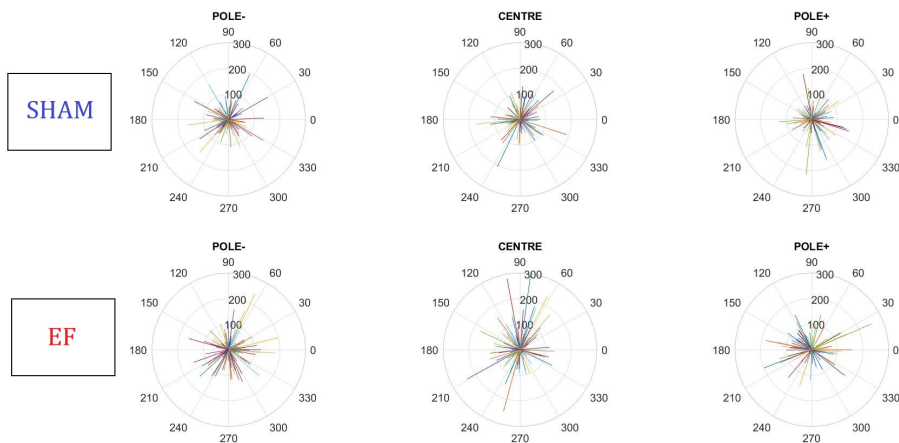


Figura 4.11: Grafici polari dei vettori spostamento delle cellule. Il modulo del vettore è definito dalla $PathLength$, l'angolo che definisce la direzione è stato calcolato come la mediana dell' $Heading$ di ogni cellula.

Come si può osservare dalle Fig.4.10 e 4.11, quando il campo elettrostatico è acceso non si osserva una direzione privilegiata di moto. Infatti, valutando la mediana dell' $Heading$ delle singole cellule si può osservare come queste seguano una distribuzione isotropa. Infatti, dato che

il valore della direzione di ogni spostamento può variare tra 0 °e 360 °, se fosse stata calcolata la media degli *heading*, questa sarebbe stata maggiormente influenzata da valori elevati portando a conclusioni fuorvianti.

	POLE -	CENTRE	POLE +
SHAM	187.4	184.1	185.0
EF	186.3	180.0	187.5

Tabella 4.6: Valori delle mediane delle distribuzioni *heading* per ciascuna posizione sulla piastra. I valori riportati sono espressi in gradi [°].

Per avere una valutazione quantitativa, sono stati calcolati i valori delle mediane per ciascuna distribuzione degli *heading* per ciascuna posizione sulla piastra. Come si evince dalla Tab.4.6, in qualsiasi regime considerato e per qualsiasi posizione sulla piastra la distribuzione risulta isotropa. Per questo si può affermare che l'accensione di un campo elettrostatico modifica unicamente la magnitudine della migrazione, ma non ne modifica la direzione. La differenza con i risultati degli studi sopra citati risiede nella diversa configurazione del dispositivo che produce il campo elettrico. Infatti, le piastre tra le quali si genera il campo elettrico formano un condensatore, in prima approssimazione, come spiegato nella Sez.2.3.1, invece della più utilizzata configurazione a cella elettrolitica. Dalla teoria dell'elettromagnetismo per un dielettrico è lecito aspettarsi una modifica delle proprietà del mezzo, ma non la formazione di una corrente. Utilizzando questa approssimazione si può quindi spiegare come mai non si osserva un movimento direzionato di cellule verso un polo.

Visti anche i risultati discussi nella sezione precedente, alle condizioni attuali, si può concludere che è corretto analizzare i dati in maniera unitaria senza alcuna distinzione rispetto alla posizione occupata dalla cellula durante l'esperimento.

Capitolo 5

Conclusioni

In questo lavoro è stato studiato l'effetto di un campo elettrostatico esogeno sulla migrazione di singole cellule analizzando i dati ottenuti da sei esperimenti indipendenti e condotti in maniera uguale, come descritto nel Capitolo 2.

In primo luogo, è stato trovato che i dati delle distanze e delle velocità possono essere modellati con una distribuzione Gamma. Infatti, tra le distribuzioni prese in esame, applicando il metodo della minimizzazione del Negative Log-Likelihood, il fit che descrive meglio le distribuzioni è dato dalla distribuzione Gamma. Il fatto che per entrambe le distribuzioni è stato stimato che il parametro di scala è sempre maggiore del parametro di forma ci dice che le distribuzioni sperimentali sono asimmetriche verso destra e che, data la grandezza maggiore di tale coda, risulta più probabile osservare cellule che si spostano più della media rispetto ad osservare cellule che si muovono più lentamente della media. Inoltre, il fatto che il best fit sia dato da una Gamma, ci assicura una probabilità non nulla per valori estremi molto lontani dal valor medio. Si osserva inoltre che il valor medio delle distribuzioni aumenta quando il campo elettrico è acceso, a causa dell'aumentare del parametro di scala, mentre non si ha un aumento sostanziale del parametro di forma. Ciò indica che, all'accensione del campo elettrico, l'unico effetto consiste nel fatto che le cellule tendono a coprire distanze maggiori e che sia più probabile trovare valori estremi di tale grandezza.

Dall'analisi del Mean Square Displacement si possono fare considerazioni analoghe. Tramite il fit, è stato possibile stimare il valore del parametro B : nel caso SHAM $B = 2.131$, mentre nel caso EF $B = 2.010$. Dato che B , parametro che definisce il tipo di diffusione anomala, assume sempre valori maggiori di 1, ciò indica che il moto è superdiffusivo, indipendentemente dalla presenza di un campo elettrostatico. Il campo elettrostatico ha quindi l'unico effetto di aumentare la dispersione.

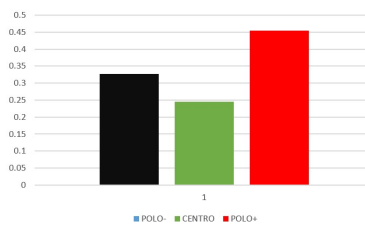
Dallo studio dei grafici polari degli spostamenti in funzione del tempo si osserva che la direzione del moto è casuale indipendentemente dalla presenza del campo elettrico. Questo si può spiegare con il tipo di configurazione per generare il campo elettrico, differente da quella a cella elettrolitica con la quale molti studi hanno osservato un movimento direzionale indotto dal campo elettrico. In questo caso, infatti, il campo elettrostatico è stato generato esternamente: il campio-

ne utilizzato, infatti, è stato posto in mezzo a un condensatore a piani paralleli in maniera tale da non essere a contatto con le piastre. Risulta doveroso fare una considerazione. In base alla definizione di galvanotassia, il moto, per cellule parallele alle linee di campo elettrico, deve essere direzionale, mentre noi abbiamo osservato un aumento della magnitudine del moto senza però che questo avvenga in una direzione privilegiata. Questo dimostra che anche un campo elettrostatico applicato secondo una configurazione il cui modello elettrico è quello di un condensatore e non di una cella elettrolitica può indurre una perturbazione, che in questo caso è l'aumento adirezionale del moto di cellule di glioblastoma. Ci si chiede dunque se, per i risultati appena ottenuti, in analogia alla definizione di chemiocinesi data nella Sez.1.1.1.1, sia più opportuno parlare di galvanocinesi.

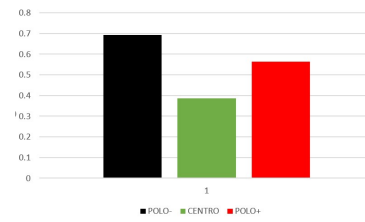
Appendice

Risultati suddivisi per densità

I grafici riportano la distanza media relativa per cellule appartenenti a pool di densità differenti. Come si può osservare, la differenza è marcata per le cellule situate al polo negativo e al centro. Tuttavia, come già riportato, i due campioni sono difficilmente confrontabili a causa della differenza di elementi contenuti in ciascuno.



(a) Campione di densità
 $\rho_c \approx 25,000 \text{ cells/mm}^2$



(b) Campione di densità
 $\rho_c \approx 30,000 \text{ cells/mm}^2$

Figura A.1: Distanza media relativa per campioni a differente densità

Bibliografia

- [1] Paolo Mazzarello. A unifying concept: the history of cell theory. *Nature cell biology*, 1(1):E13–E15, 1999.
- [2] Daniel A Fletcher and Julie A Theriot. An introduction to cell motility for the physical scientist. *Physical biology*, 1(1):T1, 2004.
- [3] Sangwoo Kwon, Woochul Yang, Donggerami Moon, and Kyung Sook Kim. Biomarkers to quantify cell migration characteristics. *Cancer cell international*, 20(1):1–13, 2020.
- [4] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander D Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Essential cell biology*, pages 533–536, 593–599, 697–700. Garland Science, 2015.
- [5] Revathi Ananthakrishnan and Allen Ehrlicher. The forces behind cell movement. *International journal of biological sciences*, 3(5):303, 2007.
- [6] Björn Petri and Maria-Jesús Sanz. Neutrophil chemotaxis. *Cell and tissue research*, 371(3):425–436, 2018.
- [7] Peter C. Wilkinson. Chemotaxis. In Peter J. Delves, editor, *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, pages 533–537. Elsevier, Oxford, second edition edition, 1998.
- [8] Brian J DuChez, Andrew D Doyle, Emiliós K Dimitriadis, and Kenneth M Yamada. Durotaxis by human cancer cells. *Biophysical journal*, 116(4):670–683, 2019.
- [9] Raimon Sunyer and Xavier Trepát. Durotaxis. *Current Biology*, 30(9):R383–R387, 2020.
- [10] Maria E Mycielska and Mustafa BA Djamgoz. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *Journal of cell science*, 117(9):1631–1639, 2004.
- [11] Richard Nuccitelli. Physiological electric fields can influence cell motility, growth, and polarity. In *Advances in Molecular and Cell Biology*, volume 2, pages 213–233. Elsevier, 1988.
- [12] E Dineur. Note sur la sensibilité des leucocytes à l’électricité. *Bull Seances Soc Belge Microsc*, 18:113–118, 1891.

- [13] MS Cooper and RE Keller. Perpendicular orientation and directional migration of amphibian neural crest cells in dc electrical fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(1):160–164, 1984.
- [14] Xavier Trepap, Zaozao Chen, and Ken Jacobson. Cell migration. *Comprehensive Physiology*, 2(4):2369, 2012.
- [15] Benjamin Geiger, Joachim P Spatz, and Alexander D Bershadsky. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1):21–33, 2009.
- [16] Fabien Binamé, Geraldine Pawlak, Pierre Roux, and Urszula Hibner. What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Molecular BioSystems*, 6(4):648–661, 2010.
- [17] Herbert CS Thom. A note on the gamma distribution. *Monthly weather review*, 86(4):117–122, 1958.
- [18] Roser Bono, María J Blanca, Jaume Arnau, and Juana Gómez-Benito. Non-normal distributions commonly used in health, education, and social sciences: A systematic review. *Frontiers in psychology*, 8:1602, 2017.
- [19] Mary Ellen Rosen and JC Dallan. A mathematical analysis of focal adhesion lifetimes and their effect on cell motility. *Biophysical Journal*, 121(6):1070–1080, 2022.
- [20] Howard Berg. *Random Walks in Biology*, chapter 1–2. Princeton University Press, Princeton, 2018.
- [21] Paolo Fornasini. *The uncertainty in physical measurements: an introduction to data analysis in the physics laboratory*, volume 995. Springer, 2008.
- [22] Charis-P. Segeritz and Ludovic Vallier. Chapter 9 - cell culture: Growing cells as model systems in vitro. In Morteza Jalali, Francesca Y.L. Saldanha, and Mehdi Jalali, editors, *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, pages 151–172. Academic Press, Boston, 2017.
- [23] Simon P Langdon. Part i - introduction to cancer cell culture. In *Cancer Cell Culture*, volume 5, pages 3–14. Springer, 2010.
- [24] John M Baust, Gertrude Case Buehring, Lia Campbell, Eugene Elmore, John W Harbell, Raymond W Nims, Paul Price, Yvonne A Reid, and Frank Simione. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 53(8):669–672, 2017.
- [25] Harry Eagle. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130(3373):432–437, 1959.
- [26] Thermo Fisher Scientific. 51200 - mem, no glutamine, no phenol red. <https://www.thermofisher.com/it/en/home/technical-resources/media-formulation.104.html>.

- [27] Z. Li. 5.43 - in vitro micro-tissue and -organ models for toxicity testing. In Murray Moo-Young, editor, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, pages 551–563. Academic Press, Burlington, second edition edition, 2011.
- [28] Leonard Hayflick and Paul S Moorhead. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25(3):585–621, 1961.
- [29] Gretchen H Stein. T98g: An anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase g1 arrest in vitro. *Journal of cellular physiology*, 99(1):43–54, 1979.
- [30] ATTC Company, may 2021. www.atcc.org.
- [31] Nelly Auersperg, Jie Pan, Bryon D Grove, Todd Peterson, Janet Fisher, Sarah Maines-Bandiera, Aruna Somasiri, and Calvin D Roskelley. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11):6249–6254, 1999.
- [32] ThermoFisher Scientific, 2022. www.thermofisher.com.
- [33] NC Martin, AA Pirie, LV Ford, CL Callaghan, K McTurk, David Lucy, and DG Scrimger. The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Science & justice: journal of the Forensic Science Society*, 46(3):179–184, 2006.
- [34] Tianyi Zhou, Yixuan Ming, Susan F Perry, and Svetlana Tatic-Lucic. Estimation of the physical properties of neurons and glial cells using dielectrophoresis crossover frequency. *Journal of biological physics*, 42(4):571–586, 2016.
- [35] Chun Yang, Lei Wang, Weiji Weng, Shen Wang, Yuxiao Ma, Qing Mao, Guoyi Gao, Rui Chen, and Junfeng Feng. Steered migration and changed morphology of human astrocytes by an applied electric field. *Experimental Cell Research*, 374(2):282–289, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.11.029>.
- [36] Nikon. Using autofocus in nis-elements, 2008. https://www.gvsu.edu/cms4/asset/8FCAC028-902A-3EFC-5137403A360C8843/autofocus_how_to.pdf.
- [37] Gaudenz Danuser, Jun Allard, and Alex Mogilner. Mathematical modeling of eukaryotic cell migration: insights beyond experiments. *Annual review of cell and developmental biology*, 29:501–528, 2013.
- [38] Brendan Flaherty, JP McGarry, and PE McHugh. Mathematical models of cell motility. *Cell biochemistry and biophysics*, 49(1):14–28, 2007.
- [39] Nikon. Nis-elements ar (advanced research) - user’s guide (ver. 4.50), 2015. https://www.gvsu.edu/cms4/asset/8FCAC028-902A-3EFC-5137403A360C8843/user_guide_nis-elements_ar.pdf.

- [40] John Robert Taylor. *Introduzione all'analisi degli errori: lo studio delle incertezze nelle misure fisiche*. Zanichelli, 1986.
- [41] Dong-Hwee Kim and Denis Wirtz. Predicting how cells spread and migrate: focal adhesion size does matter. *Cell adhesion & migration*, 7(3):293–296, 2013.
- [42] Peter Dieterich, Rainer Klages, Roland Preuss, and Albrecht Schwab. Anomalous dynamics of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2):459–463, 2008.
- [43] Qunfeng Yang, Nan Jiang, Hongwei Xu, Yajun Zhang, Chunyang Xiong, and Jianyong Huang. Integration of electrotaxis and durotaxis in cancer cells: Subtle nonlinear responses to electromechanical coupling cues. *Biosensors and Bioelectronics*, 186:113289, 2021.
- [44] Yaping Li, Tao Xu, Heng Zou, Xiaomei Chen, Dong Sun, and Mengsu Yang. Cell migration microfluidics for electrotaxis-based heterogeneity study of lung cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 89:837–845, 2017.

Ringraziamenti

Desidero sentitamente ringraziare il Professor Castellani, mio relatore, per l'opportunità di tesi, la Dottoressa Zironi per l'attività sperimentale e il Dottor Fuschi per il supporto nella parte di analisi.