UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YURI BILK MATOS

DINÂMICA E DIFUSÃO DE PEQUENOS ORGANISMOS: MÉTODOS DE ANÁLISE BASEADOS EM FÍSICA ESTATÍSTICA

CURITIBA

2025

YURI BILK MATOS

DINÂMICA E DIFUSÃO DE PEQUENOS ORGANISMOS: MÉTODOS DE ANÁLISE BASEADOS EM FÍSICA ESTATÍSTICA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Física no Programa de Pós-Graduação em Física, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Marcos Gomes Eleutério da Luz.

CURITIBA 2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Matos, Yuri Bilk

Dinâmica e difusão de pequenos organismos: métodos de análise baseados em física estatística / Yuri Bilk Matos. – Curitiba, 2025. 1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física.

Orientador: Marcos Gomes Eleutério da Luz

1. Física estatística. 2. Drosophila melanogaster. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Luz, Marcos Gomes Eleutério da. IV. Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FÍSICA - 40001016020P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FÍSICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **YURI BILK MATOS**, intitulada: **"Dinâmica e Difusão de Pequenos Organismos: Métodos de Análise Baseados em Física Estatística"**, sob orientação do Prof. Dr. MARCOS GOMES ELEUTÉRIO DA LUZ, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica 06/03/2025 08:56:37.0 MARCOS GOMES ELEUTÉRIO DA LUZ Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 28/02/2025 19:23:13.0 SABRINA BORGES LINO ARAÚJO Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ) Assinatura Eletrônica 02/03/2025 08:28:46.0 ANTONIO CARLOS ROQUE DA SILVA FILHO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica 28/02/2025 17:07:14.0 CARLOS EDUARDO FIORE DOS SANTOS Avaliador Interno (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 424405 Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp

e insira o codigo 424405

AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas sem as quais este trabalho não poderia ter existido.

Devo agradecer primeiramente aos meus pais, Ilka e Marcio. O incansável suporte de vocês dois foi o que me permitiu estudar. E eu tenho certeza que minha jornada acadêmica tem tanto do seu esforço nela quanto do meu.

Agradeço aos meus amigos Conrado e Tarran pela ajuda com algumas das figuras, e agradeço à minha amiga Daiane pelos sensatos conselhos que tanto me ajudaram a chegar aqui.

Agradeço, especialmente, aos meus professores, amigos e orientadores, Emilson Viana (no mestrado) e Marcos Gomes (no doutorado). Se hoje sinto que me tornei exatamente o cientista que sempre quis ser, isso é unicamente graças às oportunidades que vocês me deram. O Emilson de voltar pra física depois de cursar engenharia na graduação, e o Marcos de trabalhar com física teórica mesmo tendo formação de cientista experimental. A confiança que vocês depositaram em mim mudou meu futuro pra melhor, e as orientações que os senhores me ofereceram fizeram de mim o cientista que sou.

Agradeço, também, à minha amiga e (não oficial) co-orientadora, professora Jimena Berni, por tão gentilmente ter-me recebido em seu laboratório de pesquisa durante o ano de 2023, onde executei os experimentos que resultaram nesta tese. Aprendi muito com você, tanto sobre moscas quanto sobre como ser um bom cientista.

Agradecemos ainda ao professor Dr. Rogério Amino e seu grupo de pesquisa no Institut Pasteur, pela ótima oportunidade de colaboração científica na análise de movimento do *Plasmodium berghei*.

RESUMO

Este trabalho investiga o movimento de larvas de Drosophila melanogaster a partir de uma perspectiva físico-matemática, enfatizando o uso de formalismos estatísticos (como caminhadas aleatórias) e métodos de análise de difusão para caracterizar sua dispersão e dinâmica comportamental. O estudo justifica-se pela relevância de compreender princípios fundamentais que regem a locomoção em sistemas vivos, tanto para questões de ecologia e fisiologia, quanto para estabelecer conexões com modelos de transporte de partículas. Embora a D. melanogaster seja frequentemente associada à pesquisa genética e de desenvolvimento, aqui ressaltamos sua utilidade na compreensão de processos de exploração espacial e interação com o ambiente. Inicialmente, demonstramos como os trajetos larvares podem ser representados por distribuições de tamanho de passo, ângulo de virada e duração, classificando múltiplos modos de locomoção (zigue-zague, espiral e errático). A análise do deslocamento quadrático médio (MSD) revelou regimes tanto superdifusivos quanto subdifusivos, evidenciando correlações temporais e violações das hipóteses do Teorema do Limite Central. Em seguida, investigamos a base fisiológica desses padrões por meio de imagem de cálcio do cordão nervoso ventral (VNC), aplicando teoria de grafos para mapear a propagação de sinais neurais pelos gânglios segmentares. As diferenças na intensidade, fase e sincronização lateral dos disparos neuronais mostraram forte correlação com as trajetórias observadas. Além disso, foram detectadas variações significativas entre estágios larvais (L1 a L3), sobretudo no que tange à robustez das ondas neurais e ao consequente padrão de dispersão. Tomados em conjunto, os resultados reforçam o valor de D. melanogaster como organismo modelo para estudos de locomoção animal, pois integram aspectos comportamentais, ecológicos e neurofisiológicos em um mesmo sistema experimental. A abordagem físico-matemática aplicada comprova-se eficaz em quantificar, prever e distinguir modos de deslocamento, elucidar sua base neuromotora e situar a análise de comportamento em um diálogo entre física, biologia e neurociência. Dessa forma, este trabalho demonstra como conceitos de difusão, correlações de longo alcance e ferramentas de análise de rede podem contribuir para compreender processos de locomoção em organismos vivos.

Palavras-chave: Drosophila melanogaster; locomoção; difusão; caminhada aleatória.

ABSTRACT

This work investigates the locomotion of *Drosophila melanogaster* larvae through a physicalmathematical lens, emphasizing the use of statistical formalisms (such as random walks) and diffusion analysis methods to characterize their dispersal and behavioral dynamics. The study is motivated by the importance of understanding fundamental principles that govern locomotion in living systems, whether for ecological and physiological questions or for connections with particle transport models. While D. melanogaster is often associated with genetic and developmental research, here we highlight its utility for exploring spatial exploration processes and interactions with the environment. Initially, we show how larval trajectories can be represented via distributions of step size, turning angle, and duration, classifying multiple locomotion modes (zigzag, spiral, and erratic). Analysis of the mean squared displacement (MSD) revealed both superdiffusive and subdiffusive regimes, underscoring temporal correlations and violations of the Central Limit Theorem assumptions. Next, we investigate the physiological basis of these patterns using calcium imaging of the ventral nerve cord (VNC), applying graph theory to map the propagation of neural signals across segmental ganglia. Differences in the intensity, phase, and lateral synchronization of neuronal firing strongly correlated with the observed trajectories. We also detected significant variations among larval stages (L1 to L3), particularly regarding the robustness of neural waves and the resulting dispersion patterns. Taken together, these findings reinforce the value of D. melanogaster as a model organism for studies of animal locomotion, integrating behavioral, ecological, and neurophysiological aspects into a single experimental system. The applied physical-mathematical approach effectively quantifies, predicts, and differentiates modes of displacement, illuminates their neuromotor underpinnings, and promotes a dialogue among physics, biology, and neuroscience. Thus, this work demonstrates how diffusion concepts, long-range correlations, and network analysis tools can contribute to understanding locomotion processes in living organisms.

Keywords: Drosophila melanogaster; locomotion; diffusion; random walks.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Ciclo de vida da Drosophila melanogaster, desenho cedido por Dr. Ayelén Valko	17
2.1	Exemplo de caminhada aleatória unidimensional. Caminhante inicia o trajeto na posição $x_0 = 0$, podendo deslocar-se com passos na direção positiva ou negativa $(+\Delta x \text{ ou } -\Delta x)$ (a); processos com diferentes probabilidades de direção (b), acompanhados por suas trajetórias simuladas em 1000 passos (c)	21
2.2	(a) Amostragem de posições em um trajeto de organismo; (b) construção de passos representando os deslocamentos do organismo através do trajeto; (c) modelo de caminhada aleatória especificado em termos dos passos de comprimento l_i e direções θ_i .	23
2.3	Exemplo de ensemble de passos construído a partir de múltiplas amostragens do mesmo trajeto de organismo.	24
2.4	Exemplo de ensemble de passos construído a partir de múltiplas amostragens do mesmo trajeto de organismo.	25
2.5	(a) Exemplo esquemático de trajeto sem persistência direcional. Note a distribuição uniforme de direção de passo; (b) exemplo esquemático de trajeto com persistência direcional. Note a distribuição de direção de passo concentrada em 0.	26
2.6	Trajetos de caminhada com persistência direcional frontal, simulados por 1000 passos, com tamanho de passo $\ell = 1$ constante e probabilidade de direção $\rho(\theta)$ dada por uma distribuição normal circular (eq. 2.5), centrada em $\langle \theta \rangle = 0$. Valores maiores de κ concentram θ com mais intensidade, o que traduz-se em trajetos com variações menos dramáticas de direção	27
2.7	Trajetos com θ uniformemente distribuído, e $p(\ell) \sim 1/\ell^{\mu}$. Perceba como a diminuição de μ indica uma dinâmica dominada por alguns poucos passos de	21
2.8	comprimento exorbitante	28
2.9	das larvas com o substrato durante o processo de alimentação e desenvolvimento. (a) Ilustração do funcionamento da lei de Snell; (b) esquema da arena de medições;	30
0 10	(c) reflexão interna da luz entre camadas da arena de medição e corpo de larva.	32
2.10	Exemplos de construção digital de trajetorias através do Filvitrack	33 34
2.11	(a) exemplo de processo de concatenação de deslocamentos em passos a partir de um parâmetro de limite de ruído ϵ ; (b) Exemplo de como um trajeto pode ser	51
0.12	aproximado por diferentes composições de passos.	35
2.13	Espaço de fases dos passos de caminhada medidos. O código de cores indica a densidade relativa de pontos no espaço de fase, sendo as áreas em roxo as menos	30
	densas em passos, e as áreas em amarelo as mais densas	37
2.15	(a) Histograma de tamanho de passo; (b) KDE do tamanho de passo	38
2.16 2.17	<i>Fit</i> de lei de potência para a distribuição de tamanho de passo, com $\mu = 4.1$ <i>Fit</i> lognormal para a distribuição de tamanho de passo	39 40

2.18	Distribuição lognormal para comprimento de passo, com média $\mu = 2.78$ e desvio padrão $\sigma = 0.592$	41
2 19	(a) Histograma de velocidade de passo: (b) KDE da velocidade de passo	41
2.20	Distribuição gaussiana composta para velocidade de passo	42
2.21	(a) Histograma da mudanca de direção de passo: (b) KDE da mudanca de direção de	12
2.21	passo.	42
2.22	(a) Exemplos de trajeto decomposto por estado, onde o estado mais provável de cada	
	passo foi estimado utilizando o algoritmo de Viterbi, com inset para a (b), que	
	ilustra o Ilustração do padrão de movimento apresentado por cada estado do HMM.	46
3.1	Distribuição demográfica de uma população de 100 caminhantes aleatórios. O	
	mapa de calor expressa a densidade populacional de cada região do espaço —	
	zonas verdes indicando regiões menos densamente povoadas, zonas vermelhas	
	indicando regiões mais densamente povoadas. Note que o acúmulo de passos	
	resulta em uma redistribuição de caminhantes pelo espaço, que tem como	
	consequência a variação do padrão de distribuição demográfica da população.	49
3.2	Propagação pelo espaço de uma população de 100 caminhantes aleatórios. Círculos	
	indicam a menor circunferência capaz de envolver 90% dos caminhantes. Perceba	
	que com o acumulo de passos, a difusão do grupo de caminhantes <i>espalha</i> a	
	população pelo espaço.	50
3.3	Formas de gráfico de $\langle x^2 \rangle$ versus tempo para processos difusivos, superdifusivos e	
	subdifusivos.	54
3.4	Exemplos de trajetos com diferentes padrões de difusividade. Expoentes de Hurst	
	(H) indicados para cada trajeto	55
3.5	Decomposição de trajeto de larva por estratégia de movimento	57
3.6	Exemplos da construção de ensemble de passos de um trajeto para resoluções	
	temporais de (a) $\Delta t = 1$, (b) $\Delta t = 2$ e (c) $\Delta t = 3$	58
3.7	(a) Deslocamento líquido médio, (b) MSD e (c) expoente de Hurst, em função da	
	janela temporal Δt	59
3.8	Ajuste estatístico para as distribuições de Lei de Potência e Lognormal dos modos	
•	de movimento 1 (a), 2 (b) e 3 (c)	64
3.9	Curva de autocorrelação de velocidade dos três modos de movimento das larvas de	
2 10		67
3.10	Ciclo de vida do <i>Plasmodium berghei</i> : (a) fase de esquizogonia;(b) fase de invasao	
	da corrente sanguinea;(c) fase de diferenciação sexual;(d) fase de infecção do	60
2 1 1	Eluvogramo ilustrando es stanos do precedimento experimental pero solate de dedes	09
5.11	de movimento do <i>P</i> herahei	70
3 1 2	Fêmea de A stenhensi após o processo de hematofagia em ratos contaminados.	70
5.12	brilho esverdeado indica a presenca de <i>P herahei</i> s da cena ANKA na grandula	
	saliyar (flecha branca) e trato digestivo (flecha vermelha) do animal	71
3.13	Foto demonstrando a concentração de pontos de invasão de vaso sanguíneo (BVI)	/ 1
0.10	em <i>hotspots</i> , constituídos por círculos de não mais que 25µm, que agrupam até 5	
	BVIs distintos.	73
3.14	Distribuição de tamanho de passo (a) st1 e (b) st2: distribuição de direção de passo	
	(c) st1 e (d) st2. \ldots	74
3.15	distribuição de tamanho de passo do modo St1 (a) e St2 (b), distribuição de direção	
	de passo do modo St1 (c) e St2 (d) \ldots	75

3.16	Exemplo de trajeto de um organismo (ou esporozoíto) exibindo dois estados de
	movimento: St (em vermelho) e St2 (em azul). As linhas pontilhadas em cinza
	representam o contorno aproximado do ambiente ou de uma estrutura relevante
	(por exemplo, um vaso sanguíneo), enquanto os quadros ampliados evidenciam
	trechos do trajeto em cada estado. Observa-se que o estado St1 tende a ser mais
	localizado, enquanto o estado St2 apresenta deslocamentos mais dispersivos.

3.17	Exponente de Hurst (H) calculado em função da janela temporal para dois estados	
	de movimento, St1 (vermelho) e St2 (azul). A linha pontilhada indica $H = 0.5$,	
	que separa regimes superdifusivos ($H > 0.5$) de regimes subdifusivos ($H < 0.5$).	
	Observa-se que St2 tende a manter-se acima de 0.5 na maior parte do intervalo,	
	sugerindo comportamento superdifusivo, enquanto St1 aproxima-se gradualmente	
	de 0.5 ou valores ligeiramente inferiores, indicando um regime difusivo normal	
	ou subdifusivo.	77

76

4.2 (a) Corpo da *Drosophila* com as estruturas morfológicas indicadas. (b) O VNC e as regiões de interesse (ROIs) correspondentes. (c) Correlação entre os movimentos corporais e (d) a atividade do VNC.
82

4.3 Sinais típicos de imagem de cálcio. (a) Um conjunto de pulsos de atividade neural para A1-A8 à esquerda e direita e T3 (T1 e T2 são muito semelhantes, então não são mostrados). (b) Padrões de pico ao longo de um pulso de uma ROI (aqui A8). Cada pico corresponde a um evento de atividade neuromotora em uma ROI. 86

- 4.7 Atividade espontânea por segmento em larvas L1 e L3. (a)-(b) Distribuições correspondentes aos segmentos que iniciam ondas *forward* e *backward*. (c)-(f) *Heat maps* em que o eixo horizontal marca a origem das cadeias de atividade, correspondendo às posições segmentares em que surgem os eventos espontâneos (ou vértices). A propagação ocorre ao longo de cada linha (conforme indicado pelas setas). A intensidade da cor indica a frequência com que um determinado segmento contribui para a cadeia de propagação associada.

91

- 4.9 Características espaciais de simetria nos grafos construídos a partir dos sinais neurais. (a) Os movimentos de rastejamento *forward* e *backward* relacionam-se à propagação de atividade nos dois lados do VNC, enquanto (b) viradas tendem a se associar a picos que se propagam somente em um dos lados dos segmentos do gânglio. Consequentemente, os grafos podem ser classificados como (c) totalmente simétricos, (d) parcialmente simétricos ou (e) estritamente assimétricos. 95
- - (b) distribuição dos comprimentos de grafo para ondas estritamente assimétricas;
 (c) distribuição segmentar de assimetrias em ondas parcialmente assimétricas;
 - (d) distribuição segmentar de assimetrias em ondas estritamente assimétricas. . 99

LISTA DE TABELAS

2.1	Comparação de Ajustes para Distribuições - Critério AIC	38
2.2	Parâmetros ajustados do Modelo de Mistura Gaussiano (GMM).	39
2.3	Matriz de transição representando as probabilidades de mudança entre estados	43
2.4	Comparação de ajuste entre representação estatística simples (modelo com 1 estado)	
	e a gerada por HMM (modelo com 3 estados)	45
2.5	Ajuste estatístico de parâmetros por estado.	45
4.1	Frequência de eventos de atividade espontânea (SE) entre todos os eventos (J/T_{run}) e a porcentagem relativa de suas atividades associadas, em média para as populações	
	de larvas L1 e L3. Aqui, SD significa desvio padrão (standard deviation).	88
4.2	Probabilidade (em %) de um segmento, uma vez excitado, também estimular	
	um próximo segmento durante ondas forward e backward, em média para as	
	populações L1 e L3. DP é o desvio padrão.	- 94

LISTA DE ACRÔNIMOS

AIC	Akaike Information Criterion (Critério de Informação de Akaike)
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de Variância)
CNS	Central Nervous System (Sistema Nervoso Central)
DP	Desvio-Padrão (Standard Deviation)
FTIR	Frustrated Total Internal Reflection (Reflexão Interna Total Frus- trada)
fps	Frames per second (quadros por segundo)
HMM	Hidden Markov Model (Modelo Oculto de Markov)
KDE	Kernel Density Estimation (Estimativa de Densidade por Núcleos)
KS	Kolmogorov-Smirnov (Teste de Kolmogorov-Smirnov)
L1, L2, L3	Estágios Larvais 1, 2 e 3 (Larval Instars 1, 2 and 3)
MSD	Mean Squared Displacement (Deslocamento Quadrático Médio)
ROI	Região de Interesse (Region of Interest)
RDP	Ramer-Douglas-Peucker (algoritmo de filtragem geométrica)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOG	Subesophageal Ganglion (Gânglio Subesofágico)
VNC	Ventral Nerve Cord (Cordão Nervoso Ventral)

LISTA DE SÍMBOLOS

l	Comprimento de passo, representando a magnitude do deslocamento
0	êntre duas posições sucessivas.
θ	Angulo de virada, correspondendo a mudança de direção entre
A .	passos consecutivos.
Δt	Duração temporal de um passo, associado ao intervalo entre duas
	amostragens de posição.
$\Lambda(\ell, \theta, \Delta t)$	Distribuição de probabilidade conjunta para ℓ , $\theta \in \Delta t$.
ho(heta)	Distribuição de probabilidade para o ângulo de virada.
$p(\ell)$	Distribuição de probabilidade para o comprimento de passo.
$\psi(\Delta t)$	Distribuição de probabilidade para a duração do passo.
K	Parâmetro de concentração (ex. na distribuição von Mises) associado
	à persistência direcional.
μ	Expoente de lei de potência ou parâmetro de localização (dependendo
,	do contexto, p.ex. lognormal).
σ	Desvio-padrão ou parâmetro de escala (também dependendo do
	contexto).
ν	Velocidade instantânea ou média do movimento em um intervalo de
	tempo.
γ	Expoente de difusão, caracterizando o regime difusivo em $\langle x^2 \rangle \sim t^{\gamma}$.
H	Coeficiente de Hurst, definido por $H = \frac{\gamma}{2}$.
$\langle x^2 \rangle$	Deslocamento quadrado médio (Mean Squared Displacement.
	MSD).
D	Coeficiente de difusão, surgindo na equação de difusão.
∇	Operador gradiente, usado na formulação de equações diferenciais
	(ex. equações de difusão).
$I_i = \Delta f / f$	Intensidade normalizada (ex. em imagens de cálcio) no evento <i>i</i> .
t_i	Tempo de ocorrência de um evento <i>i</i> .

SUMÁRIO

1 I	ntrodução	15
1.1	A biologia da <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.2	Objetivo geral	18
1.3	Objetivos específicos	18
1.4	Estrutura do trabalho	19
2 (Caminhadas aleatórias e a Drosophila melanogaster	20
2.1	O que são caminhadas aleatórias	20
2.2	Um modelo de caminhada para organismos	22
2.3	Construíndo um modelo experimental de caminhada aleatória para larvas de Dro-	
	sophila melanogaster	29
2.3.1	Metodologia	29
2.3.2	2 Caracterização de passos	33
2.4	O movimento de larvas como um processo markoviano	43
2.4.1	Modelo oculto de Markov	44
2.5	Considerações finais	47
3 A	A difusão e a <i>Drosophila</i>	48
3.1	O que é difusão?	49
3.1.1	Deduzindo uma equação difusiva a partir de considerações de fluxo	51
3.2	Os padrões de difusão normal e anômalos	52
3.3	A difusão de larvas	55
3.3.1	Metodologia	56
3.3.2	2 Uma análise dos padrões de difusão das larvas de <i>Drosophila</i>	58
3.4	Alguns aspectos de trajeto relacionados a difusão anômala	62
3.4.1	A condição de variância	62
3.4.2	2 A condição de independência	65
3.5	Sobre a "função biológica" da difusão anômala	67
3.5.1	O protozoário <i>Plasmodium berguei</i>	67
3.5.2	2 O processo de invasão do <i>Plasmodium berghei</i>	72
3.6	Considerações finais	75
4 A	A fisiologia dos padrões de movimento das larvas de Drosophila	79
4.1	Os movimentos arquetípicos das larvas	79
4.1.1	O papel do Sistema Nervoso Central (CNS) e os circuitos neuromotores segmentares	80
4.2	Um estudo sobre a atividade neuromotora do CNS	82
4.2.1	Metodologia	83
4.2.2	2 Imagem de Cálcio	84
4.2.3	Imagem de cálcio: modelagem matemática e uma nova caracterização por grafos	85
4.2.4	Atividade espontânea	88
4.2.5	⁵ Propagação de atividade	92
4.2.6	6 Características espaciais da atividade neural	94
4.3	Considerações finais	98

5 Conclusões	102	
5.1 Análise geométrica do movimento larval: resultados	102	
5.1.1 O futuro desta frente de pesquisa	103	
5.2 Análise neurofisiológica do movimento larval: resultados	103	
5.2.1 O futuro desta frente de pesquisa	104	
Referências Bibliográficas		

Capítulo 1 Introdução

Este trabalho apresenta uma abordagem baseada em conceitos e ferramentas da física para o estudo do movimento de organismos vivos. O foco principal consiste em investigar como métodos e formalismos típicos das ciências físicas podem ser empregados para descrever, analisar e, em alguma medida, prever o comportamento locomotor em sistemas biológicos.

Historicamente, disciplinas como ecologia e etologia concentraram grande parte dos esforços de pesquisa acerca do movimento animal. Entretanto, nos últimos anos, a física tem contribuído de forma crescente para a compreensão de problemas relacionados à dispersão de populações [1, 2], padrões de forrageamento [3, 4] e estratégias de busca por recursos [5, 6]. A complexidade inerente aos sistemas vivos — caracterizada por variações comportamentais não lineares [7, 8], coexistência de múltiplos modos de locomoção [9, 10] e interações ambientais em múltiplas escalas temporais [11, 12] — coloca, porém, desafios adicionais na hora de se aplicar as mesmas abordagens empregadas em fenômenos físicos "tradicionais".

Diante desse contexto, surge uma questão fundamental: como tratar, matematicamente e sob a ótica da física, fenômenos tão intrincados e heterogêneos quanto o movimento animal? Esta tese procura explorar tal questionamento, por meio de uma combinação de técnicas teóricas e computacionais, aliadas a análises estatísticas, para investigar diferentes facetas do deslocamento de organismos. Espera-se, com isso, contribuir não só para o avanço do conhecimento em física aplicada a sistemas biológicos, mas também para a consolidação de um diálogo fecundo entre física, biologia e áreas afins.

A priori, poder-se-ia questionar se a física teria algo de novo a oferecer na compreensão do comportamento locomotor de organismos. Entretanto, o *modus operandi* das teorias físicas oferece um ferramental poderoso para abordar sistemas complexos, o que inclui a análise de dados de movimento em seres vivos [13, 14, 15].

Entretanto, ao tentar aplicar essa abordagem "físico-matemática" em organismos, surgem algumas dificuldades notáveis:

- **Complexidade biológica:** Diferentemente de partículas em um sistema físico inerte, organismos podem "decidir" ou "reagir" a estímulos de maneiras variadas, o que gera comportamentos com grande variabilidade estatística.
- Heterogeneidade comportamental: Mesmo uma única espécie frequentemente apresenta múltiplos modos de locomoção, transições de fase comportamentais, períodos de descanso, variações ontogenéticas etc.
- Dificuldade de controle experimental: O pesquisador nem sempre consegue isolar variáveis como temperatura, luminosidade, estado de alimentação ou mesmo o estado motivacional do animal, o que pode induzir flutuações significativas.

• **Problemas de escala:** Tanto a escala espacial (do tamanho do animal ao tamanho do domínio de locomoção) quanto a escala temporal (de segundos a horas ou dias) podem inviabilizar protocolos de medição contínua ou métodos analíticos simples.

Diante dessas dificuldades, faz-se relevante a adoção de um *organismo modelo* cujas características sejam mais controláveis, e cujos dados experimentais possam ser obtidos em escalas de tempo e tamanho viáveis dentro de um laboratório de física.

O conceito de organismos modelo é fundamental para a compreensão da vida em um sentido amplo, contribuindo para a elucidação de inúmeros princípios basilares que regem processos biológicos [16, 17]. No entanto, essa abordagem também acarreta diversos desafios [18, 19, 20, 21]. De fato, eleger uma determinada espécie como "caso generalista" pode levantar questões relevantes acerca de sua representatividade enquanto holobionte, de sua adequação como protótipo genético e da universalidade de sua fisiologia, para mencionar apenas alguns pontos. Ademais, para que uma espécie sirva de forma apropriada como modelo, faz-se necessária, citando [22]: 'a padronização do organismo em questão e a acumulação de conhecimento e recursos sobre o organismo em larga escala."

Embora métodos gerais tenham sido propostos para lidar com espécies não-modelo [20, 23], ainda prevalece a tendência de se trabalhar com determinados organismos específicos, cujas escolhas habituais incluem bactérias, leveduras, vermes, camundongos e moscas [24]. Em particular, a *Drosophila melanogaster*, comumente conhecida como mosca-das-frutas, tem sido há muito tempo central em estudos de biologia do desenvolvimento [25, 26]. Por exemplo, sua constituição genética relativamente simples e seu curto tempo de geração tornam a *Drosophila* ideal para a investigação de uma ampla gama de processos, como aqueles relacionados à genética, ontogenia, desenvolvimento de aprendizagem, envelhecimento etc. [27, 28, 27]. Além disso, a *Drosophila* é suficientemente complexa para compartilhar muitas semelhanças estruturais com o cérebro humano, mas simples o bastante para ser modelada de forma viável.

1.1 A biologia da Drosophila melanogaster

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca-das-frutas, é um díptero da família Drosophilidae. No que se refere à classificação taxonômica, a *D. melanogaster* foi primeiramente descrita por Meigen em 1830 [29]. É encontrada de forma cosmopolita, muitas vezes associada a frutas maduras ou em fermentação [30]. Do ponto de vista sistemático, ela integra a ordem Diptera, a família Drosophilidae e o gênero *Drosophila*.

A forma adulta mede aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento e apresenta dimorfismo sexual claro. Os machos, menores e com a porção terminal do abdome mais escurecida, podem ser facilmente distinguidos das fêmeas, que tipicamente apresentam abdome mais claro e maior, em razão dos óvulos em desenvolvimento [31]. Além disso, como outros dípteros, a *D. melanogaster* possui um par de asas funcionais e um par reduzido (halteres) que auxilia no equilíbrio durante o voo [32]. Apresenta ainda olhos compostos grandes e sistemas sensoriais olfativo e gustativo bem desenvolvidos, fundamentais para localizar alimento e parceiros sexuais [33].

O ciclo de vida compreende quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (como ilustrado na figura 1.1). Em condições ideais de temperatura (cerca de 25 °C), todo o processo dura entre 10 e 15 dias. O ovo, que possui cerca de 0,5 mm, é posto em superfícies ricas em nutrientes, geralmente frutas em decomposição. Após a eclosão, a larva passa por três estágios (L1, L2 e L3), alimentando-se de microrganismos presentes no substrato, acumulando reservas e crescendo rapidamente. Ao término do período larval, a *D. melanogaster* entra em metamorfose, formando a pupa, dentro da qual ocorre uma profunda reorganização de tecidos que dará origem ao adulto.

Este, ao emergir, inicialmente apresenta asas úmidas e cutícula mole, mas em poucas horas já completa o endurecimento do exoesqueleto e adquire a pigmentação definitiva, atingindo maturidade sexual em aproximadamente um dia [34].



Figura 1.1: Ciclo de vida da Drosophila melanogaster, desenho cedido por Dr. Ayelén Valko.

A fisiologia interna da *D. melanogaster* mostra-se relativamente simples, mas guarda notáveis paralelos funcionais com organismos mais complexos. O sistema digestório é formado por regiões distintas (esôfago, proventrículo, intestino médio, intestino posterior e túbulos de Malpighi), onde ocorrem digestão, absorção de nutrientes e excreção [35]. O sistema nervoso central consiste em um encéfalo e um cordão nervoso ventral, reunindo circuitos fundamentais ao controle motor, sensorial e comportamental. Em termos reprodutivos, as fêmeas dispõem de dois ovários (compostos por ovariolos), enquanto os machos possuem dois testículos e glândulas acessórias que influenciam a fecundidade e o comportamento reprodutivo das fêmeas. A respiração ocorre por um sistema traqueal ramificado, que distribui o oxigênio pelos tecidos a partir de espiráculos externos [36].

Como em outros insetos, o corpo da *D. melanogaster* é externamente segmentado em três grandes regiões: cabeça, tórax e abdomem. A cabeça abriga os olhos compostos, antenas, peças bucais e centros de recepção olfativa e gustativa; o tórax divide-se em três segmentos (T1, T2 e T3), cada um fornecendo um par de patas, enquanto no segundo segmento (T2) há o par de asas funcionais e no terceiro (T3) se localizam os halteres. Já o abdome, também dividido em segmentos visíveis, armazena boa parte do sistema digestório e abriga os órgãos reprodutivos, além de apresentar dimorfismo sexual evidente na região terminal [37].

A *D. melanogaster*, como mencionando, também se destaca como um dos principais organismos modelo em genética. Ela possui quatro pares de cromossomos (um par sexual e três pares autossômicos) [37] e incontáveis linhagens mutantes disponíveis para pesquisa [38], o que viabiliza estudos de mapeamento genético, desenvolvimento embrionário, vias de sinalização celular, neurobiologia, comportamento e envelhecimento. Diversas mutações clássicas — como alterações na cor dos olhos ou na forma das asas — são amplamente utilizadas para ilustrar princípios de herança genética e para desvendar mecanismos moleculares associados a determinadas vias de desenvolvimento.

A dieta das larvas consiste sobretudo de microrganismos que se proliferam em material orgânico em decomposição, como fungos e bactérias presentes em frutas fermentadas [30]. Já os adultos buscam também outras fontes de açúcar e podem ser encontrados em ambientes domésticos próximos a resíduos e frutas maduras, desempenhando papel relevante na decomposição de matéria orgânica e no ciclo de nutrientes de ambientes urbanos e periurbanos.

Em síntese, a *Drosophila melanogaster* apresenta vantagens experimentais ímpares que incluem seu ciclo rápido, alto número de descendentes, tamanho reduzido, baixo custo de manutenção e ampla disponibilidade de recursos genéticos e de protocolos de estudo. Sua fisiologia e desenvolvimento, embora relativamente simples em comparação a organismos de maior porte, compartilham vários processos-chave de regulação interna com espécies mais complexas, o que torna a mosca-das-frutas um sistema de investigação privilegiado em biologia do desenvolvimento, genética comportamental, estudos de neurobiologia e análises de locomoção [37, 38, 33].

1.2 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é aplicar conceitos de *física estatística* e *física de sistemas complexos* ao estudo do movimento de *Drosophila melanogaster* em estágio larval, caracterizando tanto os padrões de deslocamento quanto a fisiologia subjacente ao comportamento locomotor. Pretende-se, assim, avaliar em que medida métodos de modelagem probabilística, difusão e análise de padrões emergentes podem descrever, esclarecer e, em certa medida, prever a dinâmica de exploração espacial de organismos vivos.

1.3 Objetivos específicos

Em consonância com tal objetivo geral, definem-se os seguintes objetivos específicos:

- Modelagem por caminhadas aleatórias: Investigar a aplicabilidade de formalismos de caminhada aleatória para descrever o movimento larvar de *D. melanogaster*, examinando distribuições de passos, ângulos de virada e durações, a fim de avaliar como processos estocásticos podem representar trajetos orgânicos;
- Estudo de difusão e regimes anômalos: Analisar o padrão de difusão das larvas ao longo do tempo, identificando possíveis regimes superdifusivos, subdifusivos ou normais e relacionando esses resultados à violação ou não de hipóteses típicas do Teorema do Limite Central.
- Correlações fisiológicas: Investigar os mecanismos neuromotores associados à locomoção, utilizando técnicas como imagem de cálcio e análise em teoria de grafos, de

modo a correlacionar diretamente a atividade do sistema nervoso ventral (VNC) com os diferentes padrões de movimento observados.

1.4 Estrutura do trabalho

O texto está organizado em quatro capítulos principais, seguidos das considerações finais:

- Capítulo 2: Caminhadas aleatórias e a *Drosophila melanogaster* Apresenta o formalismo de caminhadas aleatórias e suas aplicações ao movimento de organismos. Discute como passos, ângulos de virada e tempos de deslocamento podem ser descritos estocasticamente, ilustrando tais ideias com dados de *D. melanogaster*.
- Capítulo 3: A difusão e a *Drosophila* Explora o conceito de difusão nos deslocamentos larvares, comparando regimes de difusão normal e anômala. Aborda como as distribuições de tamanho de passo e correlações temporais influenciam o aparecimento de superdifusão ou subdifusão e relaciona esses resultados às condições de validade do Teorema do Limite Central.
- Capítulo 4: A fisiologia dos padrões de movimento das larvas de *Drosophila* Trata da base fisiológica e neuromotora que sustenta os diferentes modos de locomoção. Descreve experimentos de imagem de cálcio no cordão nervoso ventral (VNC) e aplica ferramentas de teoria de grafos para caracterizar como a atividade neural se propaga pelos segmentos corporais, correlacionando resultados com os modos de deslocamento observados experimentalmente.
- **Capítulo 5: Conclusões** Reúne os principais achados dos capítulos anteriores e discute suas implicações para o estudo de locomoção em organismos vivos. Apresenta ainda reflexões sobre as contribuições metodológicas, limitações do estudo e possíveis encaminhamentos futuros, evidenciando a relevância de abordagens físico-matemáticas e neurofisiológicas para entender os padrões de movimento em *Drosophila melanogaster* e outros sistemas biológicos.

Capítulo 2

Caminhadas aleatórias e a *Drosophila melanogaster*

2.1 O que são caminhadas aleatórias

Caminhada aleatória é o nome dado aos processos que podem ser representados por uma sucessão de varições aleatória [39]. A oscilação de preços das ações de uma empresa, por exemplo, pode ser concebida como um processo de caminhada aleatória [40], assim como o movimento de um organismo no espaço físico [41], que é objeto de estudo deste trabalho. O mais trivial exemplo de caminhada deste tipo, talvez, seja o de um objeto que desloca-se num eixo unidimensional, com passos de tamanho constante — ora para a esquerda, ora para a direita — como ilustrado na figura 2.1b,c.

Conforme acumula passos, o caminhante traça um caminho pelo eixo. Podemos descrever tal caminho por uma série de posições:

$$\{x\} = \{x_0, x_1, x_2, \dots, x_n\}$$
(2.1)

e o processo que gerou esse caminho por uma sucessão de passos:

$$\{s\} = \{s_0, s_1, s_2, \dots, s_n\}$$
(2.2)

de tal modo que $s_i = \pm \Delta x$ para qualquer elemento de {*s*}, e de modo que a série de passos, de certa forma, *constrói* a série de posições {*x*}.

Isso significa que a evolução temporal do trajeto é condicionada pelo padrão de aleatoriedade dos passos. Por exemplo: se a probabilidade de passos na direção positiva for superior, a passagem do tempo fará com que o caminhante tenda a deslocar-se cada vez mais para a direita; da mesma forma, quando a probabilidade de passo na direção negativa for maior, tenderá a vagar para a esquerda; e quando ambas forem idênticas tenderá a retornar ao ponto de origem (como ilustrado na fig. 2.1).

Nas últimas décadas, construções matemáticas deste tipo tem mostrado-se bastante convenientes na formulação de modelos para fenômenos que são — ao menos aparentemente — aleatórios. É o caso, por exemplo, de estudo de estruturas poliméricas [42], ou do fluxo de informações na internet [43]. Da mesma forma, esse formalismo tem sido utilizado também no estudo do movimento de organismos, já desde a década de cinquenta [44, 45, 46].

Implícita nesta aplicação está a ideia de que o padrão de movimento de um organismo é, ele próprio, em alguma medida aleatório. E pouco importa se a existência de aleatoriedade real for uma questão matematicamente (e até filosoficamente) espinhosa. Poderíamos assumir,



Figura 2.1: Exemplo de caminhada aleatória unidimensional. Caminhante inicia o trajeto na posição $x_0 = 0$, podendo deslocar-se com passos na direção positiva ou negativa ($+\Delta x$ ou $-\Delta x$) (a); processos com diferentes probabilidades de direção (b), acompanhados por suas trajetórias simuladas em 1000 passos (c).

provisoriamente, que todo ser-vivo comporte-se como um autômato, sujeito a certos algoritmos genéticos, previamente codificados. E também que todas as respostas destes seres-vivos à estímulos do meio sejam completamente determinísticas. Ainda assim, processos inerentes à sistemas ecológicos costumam ser tão complexos, que o comportamento de autômatos presentes nestes sistemas continuaria sendo, para fins práticos, imprevisível [47]. E é precisamente essa imprevisibilidade que torna o ferramental matemático de caminhadas aleatórias útil no estudo de padrões do movimento orgânico.

No que segue-se, estudaremos a utilização de modelos de caminhada aleatória para o movimento de seres-vivos. Discutiremos os parâmetros estocásticos utilizados na descrição destes processos, bem como algumas das ferramentas mais habitualmente usadas na caracterização das

formas de trajeto. Finalmente, demonstraremos ainda a aplicação prática destes conceitos com um experimento concreto, analisando os padrões de trajeto de larvas de *D. melanogaster*.

2.2 Um modelo de caminhada para organismos

Imagine um organismo, digamos uma larva de *Drosophila melanogaster*, deslocando-se pela paisagem. No instante de tempo inicial ($t_0 = 0$) ela encontra-se na posição de origem $\vec{x_0}$, e a partir dali desloca-se, procurando alimento, por exemplo. Enquanto movimenta-se, podemos aferir a posição da larva no instante de tempo t_1 , dada por $\vec{x_1}$; bem como a posição da larva no instante de tempo t_2 , dada por $\vec{x_2}$, e assim sucessivamente. Seria possível, então, representar o caminho percorrido pelo organismo como uma série temporal de posições, do tipo:

$$\{\vec{x}\} = \{\vec{x_0}, \vec{x_1}, \vec{x_2}, \dots, \vec{x_n}\}$$
(2.3)

onde cada vetor $\vec{x_i}$ expressa a posição do inseto em um determinado instante de tempo, como esquematizado pela figura 2.2-a. Dessa forma, podemos conceber o movimento do organismo como um processo de caminhada aleatória, em que o deslocamento entre duas posições sucessivas, $x_i e x_{i+1}$, é descrito por um passo s_i , como ilustrado pela figura 2.2-b.

Assim, uma sucessão de passos constitui o que chamamos de *trajeto* do organismo — e aproxima, em termos de deslocamentos finitos, discretos e lineares o caminho percorrido pelo mesmo, que é, em realidade, curvilíneo e contínuo [44]. Dessa forma, as propriedades estatísticas desse movimento podem ser descritas em termos de três parâmetros de passo (vide figura 2.2-c):

- 1. o deslocamento, ℓ_i , especificado pela distribuição de probabilidade $p(\ell)$;
- 2. a mudança de direção, θ_i , especificada pela distribuição de probabilidade $\rho(\theta)$;
- 3. a duração do passo, Δt_i , especificada pela distribuição de probabilidade $\psi(\Delta t)$.



Figura 2.2: (a) Amostragem de posições em um trajeto de organismo; (b) construção de passos representando os deslocamentos do organismo através do trajeto; (c) modelo de caminhada aleatória especificado em termos dos passos de comprimento l_i e direções θ_i .

Note, ainda, que se um mesmo movimento fosse mensurado em instantes de tempo distintos, obteríamos disso aproximações também distintas, todas contudo representado o mesmo processo (vide figura 2.3). Da mesma forma, trajetos diferentes de organismos do mesmo tipo (digamos n larvas), quando mensurados nas mesmas condições, podem ser considerados realizações distintas do mesmo processo estocástico de movimento — que poderia, de tal modo, ser caracterizado por um *ensemble* dos passos de todos estes trajetos (vide figura 2.4).



Figura 2.3: Exemplo de ensemble de passos construído a partir de múltiplas amostragens do mesmo trajeto de organismo.



Figura 2.4: Exemplo de ensemble de passos construído a partir de múltiplas amostragens do mesmo trajeto de organismo.

Podemos então quantificar o padrão de aleatoriedade do movimento com uma distribuição estatística do tipo $\Lambda(\ell, \theta, \Delta t)$, dada por:

$$\Lambda(\ell, \theta, \Delta t) = p(\ell) \cdot \rho(\theta) \cdot \psi(\Delta t) \tag{2.4}$$

sendo as distribuições $p(\ell)$, $\rho(\theta) \in \psi(\Delta t)$ empiricamente obtidas a partir do *ensemble* de passos que caracteriza o movimento estudado — ou seja, são respectivamente as distribuições de comprimento, direção e duração destes passos. Assim como o padrão de aleatoriedade *esquerda/direita* no problema da caminhada 1D (fig. 2.1) impõe a forma típica daqueles trajetos unidimensionais, os padrões de aleatoriedade de $p(\ell)$, $\rho(\theta) \in \psi(\Delta t)$ determinam as formas típicas destes trajetos bidimensionais.

Tomemos a questão da *direcionalidade* como exemplo. Sabe-se que, em maior ou menor grau, o movimento de diversos seres-vivos apresenta "persistência direcional"— ou seja: uma predisposição do organismo para continuar movendo-se na mesma direção em que já move-se [44]. Isso significa que há uma correlação entre a direção do trajeto num instante e nos instantes de tempo imediatamente posteriores.

Em linguagem de caminhada aleatória, esse fato manifesta-se através da forma da distribuição de direção de passo $\rho(\theta)$, de modo que quando não houver persistência direcional, $\rho(\theta)$ tenderá a ser uniformemente distribuído (figura 2.5a), exprimindo o fato destes trajetos possuírem direção equiprovável de deslocamento; enquanto quando essa direcionalidade existir, $\rho(\theta)$ tenderá a concentrar-se em 0° (figura 2.5b), traduzindo uma dinâmica de movimento dominada por reorientações direcionais de pequena magnitude na escala temporal de observação.



Figura 2.5: (a) Exemplo esquemático de trajeto sem persistência direcional. Note a distribuição uniforme de direção de passo; (b) exemplo esquemático de trajeto com persistência direcional. Note a distribuição de direção de passo concentrada em 0.

Perceba que, nesse caso, o padrão de aleatoriedade de $\rho(\theta)$ exprime *quantitativamente* uma propriedade de trajeto que apresentava-se de forma meramente qualitativa. A questão "possui ou não direcionalidade?" torna-se então "qual é, exatamente, a forma matemática dessa direcionalidade?". E esse é, precisamente, o valor da teoria de caminhadas aleatórias no estudo do movimento de organismos: a capacidade para *quantificar* padrões de trajeto. Poderíamos, por exemplo, quantificar um padrão de direcionalidade em termos de uma distribuição gaussiana (normal) de θ , que quando circunscrita em um círculo polar de direções tem forma¹:

$$\rho(\theta \mid \kappa) = \frac{\exp(\kappa \cos(\theta - m))}{2\pi I_0(\kappa)}$$
(2.5)

sendo $I_0(\kappa)$ uma função de Bessel modificada [48], e κ um parâmetro de concentração que determina o quanto os valores de θ concentram-se em torno do valor médio $\langle \theta \rangle = m$. Em um movimento com persistência direcional frontal (e portanto centrado em $\langle \theta \rangle = 0$), κ atua como métrica ou parâmetro de *intensidade* da persistência direcional, como ilustrado na fig. 2.6.



Figura 2.6: Trajetos de caminhada com persistência direcional frontal, simulados por 1000 passos, com tamanho de passo $\ell = 1$ constante e probabilidade de direção $\rho(\theta)$ dada por uma distribuição normal circular (eq. 2.5), centrada em $\langle \theta \rangle = 0$. Valores maiores de κ concentram θ com mais intensidade, o que traduz-se em trajetos com variações menos dramáticas de direção.

Podemos também expressar a predisposição de um organismo para deslocar-se mais ou menos em alguma direção através da distribuição de tamanho de passo $p(\ell)$. Sabemos,

¹Note-se que em sua forma polar a distribuição normal é conhecida também por distribuição de Von Mises.

por exemplo, que muitos animais deslocam-se com padrão de lei de potência [49], onde a probabilidade de um passo com tamanho ℓ é inversamente proporcional a magnitude de ℓ :

$$p(\ell) \sim \frac{1}{\ell^{\mu}} \tag{2.6}$$

aqui² μ especifica o quão rápido a $p(\ell)$ decai com o aumento de ℓ . Quanto menor for μ , mais lento é o decaimento, e portanto, maior a probabilidade de observação de passos muito longos, que tendem a dominar a dinâmica de movimento, como ilustrado na fig. 2.16.



Figura 2.7: Trajetos com θ uniformemente distribuído, e $p(\ell) \sim 1/\ell^{\mu}$. Perceba como a diminuição de μ indica uma dinâmica dominada por alguns poucos passos de comprimento exorbitante.

Queremos ilustrar, com estes exemplos, como as propriedades estatísticas do movimento — descritas pelas distribuições $p(\ell) \in \rho(\theta)$ — influenciam a forma dos trajetos resultantes. Essas formas são cruciais para o entendimento de diversos processos ecológicos associados ao

²note que a eq. 2.6 é definida apenas para valores de $\mu > 1$, visto que $\mu \le 1$ resulta em uma distribuição não normalizável.

movimento de organismos, como a eficiência de diferentes estratégias de forrageamento [50]. No que segue-se, demonstraremos a aplicação de tais ideias na execução de um experimento concreto, avaliando trajetos de movimento de algumas larvas de *Drosophila*.

2.3 Construíndo um modelo experimental de caminhada aleatória para larvas de *Drosophila melanogaster*

Durante a fase larval, espécimens de *Drosophila melanogaster* executam fundamentalmente duas operações fisiológicas: comem desenfreadamente quando há alimento disponível, e buscam incessantemente por comida quando não há. Este frenesi alimentar dura aproximadamente todo o período larval, e sustenta um rompante de crescimento tão intenso que leva ao aumento de massa corporal de até duzentas vezes, no intervalo de apenas três dias [51]. A função de tal comportamento é permitir, ao organismo, o acúmulo da energia necessária para a próxima fase do ciclo de vida: o estágio de pupa, quando a larva fecha-se em um casulo, onde ocorre a metamorfose para a forma adulta.

Dessa forma, larvas de *Drosophila* alimentam-se quase ininterruptamente, enquanto houver disponibilidade de alimento — e não havendo tal disponibilidade, vagam pelo espaço a procura de comida. No experimento a seguir apresentado pretendemos caracterizar o movimento das larvas durante este processo de busca.

2.3.1 Metodologia

A criação das larvas

Para estabelecer cada amostra experimental, utilizamos uma população de larvas da cepa genética Oregon-R (OrR). Como uma cepa de tipo silvestre, a Oregon-R frequentemente serve como um padrão de controle experimental em com *Drosophilas*. Devido ao seu longo histórico como modelo laboratorial, a composição genética da Oregon-R é bem documentada e relativamente consistente, tornando-a ideal também para fins de reprodutibilidade científica.

Placas de Petri contendo meio nutritivo para alimentação de larvas de Drosophila melanogaster. Na placa superior, observa-se apenas o meio sem a presença de larvas. Na placa inferior, larvas em desenvolvimento são visíveis, com destaque para uma larva circundada em azul, ilustrando o processo de alimentação diretamente no meio nutritivo.

Assim, para estabelecer cada amostra experimental foi selecionada uma garrafa de criação de *Drosophilas* Oregon-R, e destas foram isoladas 30 moscas adultas fêmeas e 20 machos, colocados em uma placa de Petri revestida por uma camada de 3mm de substrato alimentar preparado com: 420 g de farinha de milho; 450 g de dextrose; 90 g de fermento; 42 g de ágar; 140 ml de Nipagin a 10% em etanol 95%; 22 ml de ácido propiônico e 6,4 litros de água.

As moscas adultas foram deixadas no substrato por um período de 2 horas para a postura de ovos. Em seguida, as moscas adultas foram removidas, e as placas de Petri contendo os ovos foram incubadas por 72 horas a 25 graus Celsius, sob um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Esse procedimento resultou em populações de moscas próximas ao fim do período larval (fig. 2.8), homogeneamente alimentadas durante a fase de crescimento, e com tempo de vida padronizado em 72 horas após a postura dos ovos. Foram assim produzidos dez amostras experimentais distintas, cada uma com aproximadamente 15 indivíduos.



Figura 2.8: Imagem ampliada de um substrato alimentar utilizado para a criação de *Drosophila melanogaster*. As setas vermelhas indicam ovos depositados no meio, enquanto a seta azul destaca uma larva parcialmente enterrada, evidenciando a interação das larvas com o substrato durante o processo de alimentação e desenvolvimento.

O setup experimental para captura do movimento

As observações do comportamento exploratório das larvas foram conduzidas em ambiente controlado, sem estímulos externos. As gravações dos padrões de movimento foram realizadas em completa escuridão, mantendo uma temperatura constante de 25°C. Cada teste experimental teve a duração de 60 minutos, durante os quais as larvas foram monitoradas dentro de uma arena de 240 x 240 mm². A superfície da arena foi preparada com um revestimento de ágar a 0,4%, com 2 mm de espessura (figura 2.9b).

Em cada teste, um grupo de 10 larvas de tamanho semelhante foi colocado para explorar a arena, e seus movimentos foram registrados usando uma técnica de imagem baseada em Reflectância Total Interna Frustrada (FTIR) [52]. O FTIR é uma técnica de imagem que utiliza luz infravermelha para analisar o contato entre um organismo e uma superfície de forma detalhada. No contexto do estudo de movimento das larvas de *Drosophila melanogaster*, essa técnica é particularmente eficaz porque permite capturar imagens de alta resolução do ponto de contato da larva com o substrato, revelando detalhes sobre como a larva se movimenta. A técnica baseia-se no princípio da reflexão interna, que ocorre quando a luz propaga-se de um meio com um índice de refração mais alto para um meio com um índice de refração mais baixo, atingindo a interface entre esses dois meios em um ângulo maior que o ângulo crítico, conforme descrito pela Lei de Snell (vide figura 2.9 a).

Em nosso sistema de medição, a placa de acrílico que constituí o piso da arena é iluminada com luz infravermelha pela lateral, e a parte da luz que atinge a superfície do acrílico em ângulos maiores que o ângulo crítico é completamente refletida dentro da placa, sem escapar. No entanto, ao atingir o revestimento de ágar, que possui um índice de refração maior que o do acrílico, a luz passa para o ágar e se propagando-se em seu interior. Ao alcançar o ponto de contato entre o ágar e a larva, ela se transfere para o interior da larva, que possui um índice de refração ainda maior. Parte dessa luz, ao ser refletida, retorna ao ágar em ângulos menores que o ângulo crítico, permitindo que ela propague-se através da superfície da arena e seja capturada pelo sistema de câmeras configurado para registrar essas imagens (vide figura 2.9c).

O sistema de câmeras é constituído por uma CMOS Basler acA2040-180km, configurada com uma resolução de 2048 x 2048 pixels. A gravação foi feita a uma taxa de 10 quadros por segundo. Para aumentar a precisão das observações, foi utilizado um sistema de imagem avançado, com uma lente KOWA IJM3sHC.SW VIS-NIR de 16 mm e um filtro de longa passagem de 825 nm de alto desempenho (Schneider, IF-093). As imagens gravadas (exemplificadas na figura 2.9d) foram então processadas com o software de rastreamento FIM-track [53] para gerar séries temporais posicionais de cada uma das trajetórias de larvas. No caso de colisões entre larvas, as trajetórias são interrompidas, e novas trajetórias passam a ser registradas, tão logo os dois animais afastem-se. O mesmo aplica-se para colisões com a borda da arena. Desse modo, interações larva-larva e larva-borda são filtradas das trajetórias.

Medindo as séries temporais de posição

Os vídeos de larvas em movimento foram pós processados com o *software* de código aberto FIMTrack [54] — desenvolvido para rastrear o comportamento locomotor de pequenos organismos, como larvas de *Drosophila melanogaster*. O software identifica o contorno do corpo de cada larva, em cujo centro especifica-se a posição do animal; então, rastreia a evolução temporal dessa posição *frame* a *frame* — oferecendo ainda possibilidade de aferimento de parâmetros como o comprimento longitudinal do corpo do animal. A figura 2.10 ilustra esse processo de construção digital de trajetórias.

Foram gerados assim séries temporais de posição do tipo:



Figura 2.9: (a) Ilustração do funcionamento da lei de Snell; (b) esquema da arena de medições; (c) reflexão interna da luz entre camadas da arena de medição e corpo de larva.

$$\{\vec{X}_i\} = \{(x_i, y_i)\} = \{(x_{1i}, y_{1i}), (x_{2i}, y_{2i}), \dots, (x_{ni}, y_{ni})\}$$
(2.7)

onde cada par ordenado (x_{ti}, y_{ti}) representa a posição de um organismo *i* em um *frame t* da captura de imagens. Foram obtidos, dessa forma, trajetos como os ilustrados na fig. 2.11.

Gerando representações de trajeto por séries de passos

Tendo medido a série temporal de posições, resta particioná-la em passos, de forma que a forma original do trajeto possa ser representada por uma série de deslocamentos retilíneos. A questão é muito menos trivial do que parece. Observe, por exemplo, o trajeto apresentado na fig. 2.12b. Deve ele ser compreendido como uma série de deslocamentos curtos que mudam levemente de direção, ou como um único deslocamento longo? As pequenas variações de direção representam uma forma de ruído, ou uma *feature* fundamental da forma do trajeto?

Podemos definir um limite de tamanho ϵ , de modo que desvios de trajeto com magnitude abaixo de ϵ sejam tratados como ruído [44]. Nesse caso, consideramos que uma série de *n* posições pode ser concatenada em um único passo, conquanto as n - 2 posições intermediárias estejam a uma distância máxima ϵ da linha reta que conecta o ponto inicial ao ponto final da série, vide fig. 2.12a. A simplificação de trajeto nestes termos pode ser facilmente implementada com uma solução importada das ciências cartográficas: o filtro geométrico de Ramer–Douglas–Peucker



Figura 2.10: Exemplos de construção digital de trajetórias através do FIMtrack.

(RDP) [55], originalmente desenvolvido para medidas do comprimento de linha costeira, um problema notoriamente complexo [39].

Neste trabalho, optamos por implementar um filtro geométrico com valor de ϵ variável, correspondendo à média do comprimento longitudinal do corpo de cada larva. O motivo desta escolha é que ruídos de movimento oriundos de variações na forma do corpo do animal são, necessariamente, inferiores em escala ao tamanho de seu corpo. A fig. 2.13 apresenta um exemplo de trajetos filtrado.

2.3.2 Caracterização de passos

Foram gerados 162 trajetos filtrados, de duração média 209,31 segundos, variando de 60.7 até 720 segundos. A figura 2.14 apresenta um *plot* do espaço de fases do conjunto de passos, sendo o ângulo de passo θ a coordenada polar, a direção de passo ℓ s coordenada radial, e a velocidade v a coordenada longitudinal. É possível perceber uma forte concentração de deslocamentos com mudança de direção relativamente pequena ($\theta < \pi/4$).

No que segue-se, as formas dos trajetos de *Drosophila* serão caracterizadas em termos de três parâmetros de movimento: ℓ , θ e v.

Caracterizando o tamanho de passo

A fig. 2.18 apresenta o histograma de ℓ , bem como sua curva de probabilidade empírica, estimada pela técnica da densidade de kernels (KDE) [56, 57], com largura de banda $b_w = 0.5$. Qualitativamente, tanto histograma quando KDE sugerem uma distribuição de probabilidade com decaimento de valores em cauda, sugerindo a forma de alguma distribuição como lei de potência ou lognormal.

Distribuições por lei de potência são especificadas pela equação 2.6, enquanto distribuição lognormal é descrita por:



Figura 2.11: Exemplos de trajetórias de larvas de Drosophila


Figura 2.12: (a) exemplo de processo de concatenação de deslocamentos em passos a partir de um parâmetro de limite de ruído ϵ ; (b) Exemplo de como um trajeto pode ser aproximado por diferentes composições de passos.



Figura 2.13: Comparação trajeto bruto (esquerda) e filtrado (direita)

$$f(x;\mu,\sigma) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(\ln(x)-\mu)^2}{2\sigma^2}\right]$$
(2.8)

sendo μ o valor médio do logaritmo da variável x, enquanto σ é o valor do desvio padrão desse logaritmo.

Inicialmente partiremos da análise qualitativa dos dados que são apresentados na fig. 2.18 — que sugere a forma de uma lei de potência ou lognormal — para embasar a análise estatística do processo. Começamos, portanto, comparando o ajuste estatístico destas duas distribuições.

A fig. 2.16 apresenta o ajuste da lei de potência. Foi obtida uma distribuição com expoente $\mu = 4.1$. Nota-se, contudo, que muito embora o comportamento da cauda seja razoavelmente bem aproximado por uma lei de potência, o ajuste estatístico ignora os passos de comprimento curto (vide um x_{min} de 26,46 mm no ajuste). Tal comportamento contrasta com o do ajuste da distribuição lognormal, apresentada na fig. 2.17, com $\mu = 2.78$ e $\sigma = 0.592$.

Foram então aplicados dois testes de comparação entre distribuições por lei de potência e lognormal:

- O teste de bondade de ajuste, onde é calculado um valor *R*, que mede a diferença máxima entre as funções de distribuição acumulada empírica dos dados e da distribuição ajustada. Quando aplicado para comparar duas distribuições, ele verifica qual delas descreve melhor os dados observados.
- O teste de significância, cujo valor p exprime a significância estatística da diferença mensurada no teste anterior. Se p ≤ 0,05, pode-se dizer que a diferença é considerada estatisticamente significativa, indicando que uma das distribuições se ajusta significativamente melhor do que a outra. Caso contrário, um p maior sugere que a diferença entre os ajustes das duas distribuições não é estatisticamente significativa, e ambas podem ser adequadas para descrever os dados.



Figura 2.14: Espaço de fases dos passos de caminhada medidos. O código de cores indica a densidade relativa de pontos no espaço de fase, sendo as áreas em roxo as menos densas em passos, e as áreas em amarelo as mais densas.

Foi obtido um valor de R = +2,05 (favorável à distribuição lognormal) e p = 0,19, sugerindo que a diferença entre as duas distribuições não é dramaticamente significa *no domínio do ajuste* (ou seja, para passos mais longos que $x_{min} = 26,46mm$, no caso da lei de potência). Isso significa que muito embora a lognormal seja a distribuição de melhor ajuste, a lei de potência ainda descreve de forma aparentemente aceitável o comportamento de *cauda* dos dados — já que apenas a cauda está no domínio da lei de potência.

Como temos por intento construir um modelo estatístico que represente a totalidade dos passos, e não apenas os da zona de cauda, a distribuição lognormal mostra-se mais adequada. Para validar esta escolha, o ajuste da distribuição lognormal foi comparado, através do teste do critério de informação Akaike (AIC), com outras distribuições mais comuns, vide tabela 2.1. O resultado indica que, de fato, a distribuição lognormal é a mais adequada entre todas as citadas, possuindo o menor valor de AIC.

Assim, optamos por utilizar a distribuição lognormal na representação estocástica do tamanho de passo. A qualidade do ajuste escolhido é adicionalmente corroborada pela fig. 2.18,



Figura 2.15: (a) Histograma de tamanho de passo; (b) KDE do tamanho de passo.

Distribuição	AIC
lognormal	10273.55
gamma	10275.40
Weibull	10306.41
normal assimétrica	10332.48
exponencial	10513.78
normal	10965.91

Tabela 2.1: Comparação de Ajustes para Distribuições - Critério AIC

que apresenta o *plot* da distribuição lognormal contra o histograma de dados empíricos, em escala não logarítmica.

Caracterizando a velocidade de passo

A fig. 2.19 apresenta o histograma de *v*, bem como sua curva de probabilidade empírica, estimada pela técnica da densidade de kernels (KDE) [56, 57], com largura de banda também em $b_w = 0.5$.

É possível observar que existem dois picos de velocidade distintos. Podemos tentar aproximar a distribuição da série empírica com um Modelo de Mistura Gaussiano [58] — uma técnica probabilística que modela uma distribuição de dados como sendo gerada por uma combinação de várias distribuições gaussianas. Os parâmetros das distribuições foram estimados utilizando o pacote sklearn.mixture.GaussianMixture do scikit-learn, da linguagem de programação Python. A figura 2.20 apresenta o *fit* estatístico, equanto a tabela 2.2 apresenta os parâmetros de distribuição;

A presença de uma distribuição de velocidades com dois picos sugere fortemente a existência de um processo *composto*, isso é, constituído por dois subprocessos distintos, cada qual com dinâmica estocástica própria. Como demonstraremos nas próximas secções, esse é de fato o caso.



Figura 2.16: *Fit* de lei de potência para a distribuição de tamanho de passo, com $\mu = 4.1$

Componente	Peso (π_k)	Média (μ_k)	Variância (σ_k^2)
1	0.6879	1.1190	0.0263
2	0.3121	0.5035	0.0395

Tabela 2.2: Parâmetros ajustados do Modelo de Mistura Gaussiano (GMM).

Caracterizando a direção de passo

A fig. 2.21 apresenta o histograma da direção de passo θ , bem como sua curva de probabilidade empírica, estimada pela técnica da densidade de kernels (KDE) [56, 57], com largura de banda também em $b_w = 0.5$. A distribuição de empírica de θ sugere uma concentração de ângulos de virada em torno de ±45°, o que é também compatível com o espaço de fases apresentado na fig. 2.14. Podemos agora distinguir, também, uma certa preferência das larvas para mudanças de direção no sentido anti-horário.

Não seria apropriado, contudo, avaliar a direcionalidade deste processo de movimento através de uma simples distribuição estatística de θ , como fizemos por exemplo na análise de ℓ .



Figura 2.17: Fit lognormal para a distribuição de tamanho de passo

Isso porque a *ordem* das mudanças de direção é um aspecto fundamentalmente importante para a forma dos trajetos de larva: uma sucessão de viradas que tenda a intercalar lados direita-esquerda, tende a produzir um padrão de zig-zag; já uma que apresente viradas para o mesmo o lado em sucessão, tende a produzir um padrão mais circular.

E de fato, podemos construir uma matriz de transição para o sentido das mudanças de direção de larvas, como na tabela 2.3. Podemos perceber que, preferencialmente, larvas que viram no sentido anti horario viram de novo, e no horário também. Isso significa que a probailidade de $\rho(\theta)$ não é independente através dos passos. Isso traz dificuldades de modelagens, e mostra como o processo de movimento é rico em complexidade. De tal forma, faz-se necessária a aplicação de ferramentas estatísticas mais sofisticadas para o desvendamento deste processo de movimento, como a ferramenta que apresentaremos na próxima secção: o modelo oculto de markov.

No entanto, não é apropriado avaliar a direcionalidade desse processo de movimento apenas por meio de uma distribuição estatística de θ , como se fez na análise de ℓ . Isso se deve ao fato de que a *ordem* das mudanças de direção desempenha um papel fundamental na forma dos percursos larvares: uma sucessão de viradas alternadas (direita/esquerda) tende a gerar um



Figura 2.18: Distribuição lognormal para comprimento de passo, com média μ = 2.78 e desvio padrão σ = 0.592



Figura 2.19: (a) Histograma de velocidade de passo; (b) KDE da velocidade de passo.



Figura 2.20: Distribuição gaussiana composta para velocidade de passo.



Figura 2.21: (a) Histograma da mudança de direção de passo; (b) KDE da mudança de direção de passo.

padrão de zigue-zague, enquanto uma sequência de viradas para o mesmo lado leva a trajetórias mais circulares.

Com efeito, é possível construir uma matriz de transição para o sentido das mudanças de direção, como apresentado na Tabela 2.3. Verifica-se que larvas quando viram no sentido anti-horário costumam repetir viradas sucessivas nesse mesmo sentido; da mesma forma, viradas no sentido horário tendem a se repetir. Isso indica que a probabilidade $\rho(\theta)$ não é independente ao longo dos passos, o que traz dificuldades de modelagem e evidencia a riqueza e a complexidade desse processo de movimento.

-	para θ anti-horário	para θ horário
de θ anti-horário	0.66	0.34
de θ horário	0.22	0.78

Tabela 2.3: Matriz de transição representando as probabilidades de mudança entre estados.

Diante disso, faz-se necessária a aplicação de ferramentas estatísticas mais avançadas para a compreensão dessa dinâmica, como o modelo oculto de Markov, apresentado na próxima seção.

2.4 O movimento de larvas como um processo markoviano

Um processo de Markov é um processo estocástico que descreve uma sequência de eventos possíveis em que a probabilidade de cada evento depende apenas do estado atingido no evento anterior. Informalmente, pode-se dizer que "o que acontece a seguir depende somente de como as coisas estão agora" — ou seja, não há necessidade de se conhecer toda a sequência de eventos passados para prever o próximo estado; basta ter conhecimento do estado atual.

Um processo estocástico $\{X_t\}$ é dito *markoviano* quando a probabilidade de um evento futuro depende apenas do estado atual do sistema. Informalmente, pode-se dizer que "o que acontece a seguir depende somente de como as coisas estão agora". Em outras palavras, não há necessidade de se conhecer toda a sequência de eventos passados para prever o próximo estado; basta ter conhecimento do estado atual. Formalmente, a propriedade de Markov pode ser expressa como:

$$P(X_{t+1} = x \mid X_t, X_{t-1}, \dots, X_1) = P(X_{t+1} = x \mid X_t).$$
(2.9)

Essa característica, conhecida como *memória de Markov*, simplifica sobremaneira a análise e a modelagem do processo, pois o conhecimento do estado imediatamente anterior é suficiente para determinar a distribuição dos estados futuros.

Na secção anterior, vimos que a probabilidade de que uma larva vire para o lado direito ou esquerdo depende da direção das viradas anteriores — ou seja: há aqui uma componente de "memória estatística", incompatível com a natureza de um processo markoviano, o que gera algumas dificuldades de modelagem. Em processos *não markovianos*, o futuro não depende somente do estado presente, mas também de estados passados ou até mesmo de todo o histórico do sistema. Isso significa que a modelagem requer o conhecimento de uma "memória" mais longa, de forma que o número de variáveis necessárias para caracterizar o processo cresce rapidamente. Em consequência, a formulação de modelos matemáticos e a estimação de parâmetros se tornam muito mais complexas, demandando técnicas de maior sofisticação. Além disso, processos não markovianos podem apresentar correlações de longo alcance, o que dificulta a aplicação de métodos analíticos ou computacionais que se baseiam na propriedade de Markov.

Contudo, mesmo que um processo global não seja inteiramente markoviano, ele pode ser decomposto em (ou aproximado por) um conjunto de *subprocessos* locais, cada um deles apresentando comportamento markoviano em um regime particular. Em muitas situações, o sistema pode alternar entre diferentes "modo" de comportamento (por exemplo, fases distintas de movimento ou de interação). Dentro de cada modo, as transições podem ser descritas por uma cadeia de Markov, ao passo que a sucessão entre modos pode ocorrer de forma determinística ou probabilística. Essa decomposição em subprocessos markovianos muitas vezes fornece uma representação mais parcimoniosa do fenômeno, permitindo ainda a identificação dos mecanismos dominantes em cada regime.

No que segue-se, investigaremos a possibilidade de representar-se o movimento das larvas de *Drosophila* como uma composição de diferentes processos markovianos.

2.4.1 Modelo oculto de Markov

O Modelo Oculto de Markov (do inglês, Hidden Markov Model, HMM) é uma extensão dos processos markovianos na qual os estados do sistema não são diretamente observáveis (ou seja, são "ocultos"), mas produzem observações que podemos medir [59]. A cada estado "oculto" está associada uma distribuição de probabilidade para gerar as observações. Em outras palavras, existe um processo markoviano subjacente (responsável pela transição entre os estados "escondidos") e um processo de observação que, a partir de cada estado, gera dados mensuráveis.

Matematicamente, podemos descrever um HMM por:

- Um conjunto de estados ocultos {S₁, S₂,..., S_N}, com transições governadas por uma matriz de probabilidades A = [a_{ij}], onde a_{ij} = P(X_{t+1} = S_j | X_t = S_i).
- Uma matriz de probabilidades de emissão $\mathbf{B} = [b_j(o_t)]$, onde $b_j(o_t)$ representa a probabilidade de observar o_t quando o processo está no estado S_j .
- Uma distribuição inicial $\pi = [\pi_i]$ que descreve a probabilidade de o processo iniciar em cada estado S_i .

A noção de "estado oculto" permite capturar dinâmicas subjacentes complexas que não estão diretamente acessíveis ao observador. Por meio das observações geradas, técnicas de inferência estatística são empregadas para estimar a sequência mais provável de estados ou determinar a probabilidade de determinados estados terem ocorrido. Dessa forma, o HMM possibilita modelar e analisar sistemas em que apenas uma parcela da informação (as observações) é efetivamente mensurável.

Desejamos empregar a técnica de HMM para investigar a dinâmica direcional dos trajetos de larva. Para tanto, propõe-se uma métrica de mudança de direção Θ , na qual o sinal de Θ_i é positivo quando a virada ocorre no mesmo sentido (horário ou anti-horário) que a virada anterior, e negativo em caso contrário. Ou seja, enquanto o sinal de θ_i expressa o sentido absoluto de cada virada, o sinal de Θ_i expressa o sentido relativo em relação à virada imediatamente anterior.

Para aplicar o HMM na análise dos valores de Θ , empregou-se a biblioteca hmmlearn em *Python*. Em nosso caso, os valores de Θ_i (a sucessão de mudanças de direção positivas ou negativas) compõem as *observações* do HMM, enquanto os estados ocultos $\{S_i\}$ correspondem às possíveis "fases" ou regimes de virada. Para conduzir a análise são implementadas as seguintes etapas:

1. Definição do número de estados ocultos: escolhe-se quantos estados usar (por exemplo, dois estados para capturar diferentes regimes de mudança de direção);

- 2. Inicialização do modelo: fornece-se ao HMM o número de estados, bem como a forma das distribuições de emissão (normal ou lognormal no pacote hmmlearn);
- 3. Treinamento (algoritmo Baum-Welch [60]): o modelo é ajustado aos dados $\{\Theta_i\}$ por meio do algoritmo de Baum-Welch, que itera entre estimar as probabilidades de transição e de emissão para maximizar a verossimilhança das observações.
- Inferência (algoritmo Viterbi [61]): com o modelo ajustado, emprega-se o algoritmo de Viterbi para determinar a sequência de estados ocultos mais provável que gerou a série {Θ_i}. Assim, é possível identificar quais segmentos da trajetória larvar correspondem a cada regime de virada.
- 5. Validação: o modelo estatístico gerado por HMM é então comparado ao modelo de estado único, através da técnica do AIC, a fim de avaliar se a verossimilhança do modelo de HMM é efetivamente maior.

Esse procedimento resulta em uma descrição probabilística que reflete como as larvas alternam (ou não) entre distintos padrões de mudança de direção, levando em conta a "memória estatística" observada na dinâmica do sistema.

Os melhores resultados para o modelo foram obtidos utilizando uma representação com três estados, conforme indicado pelos parâmetros de verossimilhança apresentados na Tabela 2.4. Nela, observa-se que a representação com três estados oferece um ajuste superior em comparação à configuração de estado único. Além disso, a Tabela 2.5 detalha os parâmetros estatísticos associados a cada estado. Podemos também observar exemplos de trajetória decomposta por estado na fig. 2.22a, com uma ilustração do padrão de movimento produzido por cada estado na fig. 2.22b.

Tabela 2.4: Comparação de ajuste entre representação estatística simples (modelo com 1 estado) e a gerada por HMM (modelo com 3 estados).

modelo	log verossimilhanca	AIC	BIC
simples	-13016.090680	26044.181360	26080.462577
HMM	-11232.627917	22517.255834	22674.474441

	ajuste de Θ (Von Mises)	ajuste de ℓ (lognormal)	ajuste de v (gaussiano)
estado 1	$\kappa = 22.93$ $\mu = -0.40$ $\sigma = 1$	$\mu = 4.87$ $\sigma = 2.95$	$\mu = 0.86$ $\sigma = 0.26$
estado 2	$\kappa = 34.39$ $\mu = 0.49$ $\sigma = 1$	$\mu = 5.14$ $\sigma = 2.97$	$\mu = 0.80$ $\sigma = 0.28$
estado 3	$\kappa = 0.25$ $\mu = -1.00$ $\sigma = 1$	$\mu = 2.00$ $\sigma = 1.23$	$\mu = 0.56$ $\sigma = 0.45$

Tabela 2.5: Ajuste estatístico de parâmetros por estado.

Podemos identificar os seguintes padrões característicos associados aos modos de movimento inferidos pelo HMM, que representam distintos modos de movimento das larvas:



Figura 2.22: (a) Exemplos de trajeto decomposto por estado, onde o estado mais provável de cada passo foi estimado utilizando o algoritmo de Viterbi, com inset para a (b), que ilustra o Ilustração do padrão de movimento apresentado por cada estado do HMM.

- Modo 1: Caracteriza-se por mudanças de direção que alternam entre lados, concentrandose em torno de ±45°. Esse padrão de zigue-zague resulta em deslocamentos que, quando acumulados ao longo do tempo, sugerem um avanço mais linear, já que as mudanças de direção se compensam mutuamente. Esse comportamento pode ser interpretado como um modo eficiente de exploração direcionada.
- Modo 2: Apresenta mudanças de direção repetitivas para o mesmo lado, também centradas em torno de ±45°. Esse padrão dá origem a trajetórias em espiral, indicando um movimento concentrado que pode refletir uma estratégia de busca em áreas localizadas.
- Modo 3: Exibe mudanças de direção abruptas, sem uma preferência direcional óbvia, e ângulos de virada mais distribuídos. Isso resulta em trajetórias nas quais as larvas se movem intensamente em uma área restrita, com pouca progressão em termos de deslocamento global. Esse comportamento pode representar um modo de exploração detalhada ou indecisão no movimento.

Esses padrões revelam que os estados inferidos não apenas descrevem diferenças quantitativas no movimento, mas também sugerem modos qualitativamente distintos de locomoção. Cada estado parece corresponder a estratégias de movimento específicas, que podem estar relacionadas a diferentes objetivos ou condições ambientais enfrentadas pelas larvas.

2.5 Considerações finais

Neste capítulo, introduzimos o formalismo de caminhadas aleatórias e aplicamos essas ideias ao movimento de larvas de *D. melanogaster*. Nossas medições experimentais evidenciaram que:

- O tamanho de passo ajusta-se melhor a uma **distribuição lognormal** em vez de lei de potência (*Lévy*);
- A velocidade apresenta dois picos, sugerindo dois regimes locomotores (um mais lento e outro mais rápido);
- A direção de passo não é independente em cada passo: existe "memória estatística" que favorece a repetição do mesmo sentido de virada, o que torna o processo global não-markoviano em estado único;
- Para modelar essa dependência, um Modelo Oculto de Markov com três estados ajusta-se bem às trajetórias, revelando modos de movimento distintos zigue-zague, curvatura em arco e reorientação mais aleatória.

Essas observações indicam que o movimento larvar não se reduz a um passeio aleatório simples, mas compreende múltiplos regimes de locomoção. Entender esse padrão misto é relevante para prever a eficiência de busca por alimento, a dispersão em ambientes heterogêneos e as respostas a estímulos externos.

No próximo capítulo, aprofundaremos a análise ao investigar como esses diferentes modos de movimento impactam a difusão do sistema, explorando se cada regime contribui de maneira diferenciada para a propagação espacial das larvas em escalas de tempo variadas.

Capítulo 3 A difusão e a *Drosophila*

No capítulo anterior identificamos diferentes modos de locomoção das larva de *Dro-sophila*(zigue-zague, espiral e errático), por meio de Modelos Ocultos de Markov (HMM). Neste capítulo, ampliaremos nossa análise, investigando *como* a combinação desses diferentes modos de passo se reflete na dispersão espacial (difusão) das larvas ao longo do tempo. Em outras palavras, queremos conectar os resultados de caminhadas aleatórias do capítulo anterior ao conceito de difusão, avaliando se o deslocamento quadrático médio (MSD) de cada modo segue um regime normal ($\langle x^2 \rangle \sim t$) ou, pelo contrário, indica difusão anômala (superdifusão ou subdifusão). Desse modo, poderemos quantificar como cada modo de locomoção contribui para a propagação espacial da larva em diferentes escalas temporais.

A dispersão de organismos vivos configura-se como um processo ecológico de vital importância, influenciando de maneira determinante a abundância e a redistribuição das espécies no espaço. Em algum nível, todas as espécies dispersam-se no ambiente, seja em resposta a heterogeneidades temporais no habitat, à deterioração das condições ambientais ou como consequência intrínseca dos movimentos necessários para a realização de suas funções fisiológicas [62].

Entretanto, com frequência a variável de interesse em um problema ecológico não encontra-se no padrão de trajeto individual de um organismo — como no caso dos modelos de caminhada aleatória, apresentados no capítulo anterior — mas sim na densidade de indivíduos em regiões específicas do espaço, uma densidade que oscila tanto em função de taxas de natalidade e mortalidade, quanto de padrões de movimento e migração. Nesse contexto, diversos modelos ecológicos procuram descrever variações em mapas de densidade populacional de espécies por meio de equações de difusão [62, 44].

Podemos dizer que as duas perspectivas — da caminhada aleatória e difusiva — representam facetas distintas dos mesmos processos de movimento orgânico [63, 44]. Enquanto a primeira busca expressar um padrão de trajeto com o foco no organismo, a segunda descreve flutuações demográficas de populações inteiras. Na primeira busca-se mensurar uma série temporal de posições, enquanto na segunda busca-se caracterizar um mapa de densidade demográfica. A conexão entre modelos difusivos e de maninhada aleatória faz-se clara, na medida em que é percebido que o padrão de redistribuição espacial de uma população é nada mais que a sobreposição dos padrões de deslocamentos individuais — como ilustrado pelo mapa de densidade populacional sobreposto a trajetos de caminhada aleatória apresentado na figura 3.1.

Neste capítulo, pretendemos discutir a ideia de movimento difusivo, mostrando como diferentes padrões difusivos manifestam-se a partir dos diferentes padrões de caminhada aleatória encontrados no movimento das larvas de *Drosophila*.



Figura 3.1: Distribuição demográfica de uma população de 100 caminhantes aleatórios. O mapa de calor expressa a densidade populacional de cada região do espaço — zonas verdes indicando regiões menos densamente povoadas, zonas vermelhas indicando regiões mais densamente povoadas. Note que o acúmulo de passos resulta em uma redistribuição de caminhantes pelo espaço, que tem como consequência a variação do padrão de distribuição demográfica da população.

3.1 O que é difusão?

A difusão é um fenômeno de transporte, que descreve o deslocamento de uma partícula em movimento aleatório. O termo vem do latim "*diffundere*", que significa "espalhar uma coisa sobre outra" e exprime o fato de que uma coleção de partículas que se movem aleatoriamente tende, quando liberada de uma mesma posição, a "se espalhar" pelo espaço.

Essa ideia é ilustrada pelo esquema da figura 3.2, que apresenta a evolução temporal de uma população de caminhantes aleatórios, sendo possível observar que, com o acumulo de passos, a área ocupada pelos caminhantes aumenta.



Figura 3.2: Propagação pelo espaço de uma população de 100 caminhantes aleatórios. Círculos indicam a menor circunferência capaz de envolver 90% dos caminhantes. Perceba que com o acumulo de passos, a difusão do grupo de caminhantes *espalha* a população pelo espaço.

Na física, o conceito de difusão encontra ampla aplicação no estudo do transporte de partículas; como, por exemplo, na difusão de um átomo em um volume de gás [64]. Na química, a noção de difusão é utilizada para descrever o transporte de uma espécie química em um meio, dos pontos de maior concentração para os de menor, a partir do movimento aleatório das moléculas da substância [65]. E mesmo nas ciências sociais e humanas, a ideia de fenômeno difusivo faz-se presente, através da difusão de ideias em uma comunidade [66], ou da difusão de informações econômicas em um mercado [67]. Em todos esses casos, o objeto ou a coleção de objetos que sofre difusão "espalha-se" a partir de um determinado ponto inicial.

Na biologia, o conceito de difusão encontra uso também na análise do movimento de organismos. Skellam, por exemplo, estudou já em 1951 padrões de dispersão de espécies, seguindo uma abordagem que trata seres-vivos como partículas difusivas [68]. Frampton [69], por sua vez, demonstrou ser viável modelar a dispersão de uma doença em uma plantação, em

termos de padrões na difusão de insetos polinizadores contaminados. Essas aplicações exprimem, indiretamente, a intuição de que o movimento de organismos pode ser tomado como aleatório, e que disso emergem processos difusivos.

Em geral, modelos deste tipo expressam um fluxo de difusão, através de variações de densidade ou concentração da espécie difusiva [44]. Podemos expressar tal relação como:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = -\vec{\nabla} \cdot \vec{J} + \vec{W} \tag{3.1}$$

onde $\frac{\partial n}{\partial t}$ é a taxa de variação da concentração da espécie difusiva (*n*) em uma região do espaço, \vec{J} é o fluxo desta espécie difusiva e \vec{W} uma fonte ou *sink* de partículas. No contexto ecológico podemos entender *n* como a densidade populacional de uma comunidade de organismos, \vec{J} como o fluxo de organismos que é gerado pelo movimento dos mesmos, e \vec{W} como a quantidade de nascimentos (fonte) ou mortes (sumidouro) no sistema.

3.1.1 Deduzindo uma equação difusiva a partir de considerações de fluxo

No que segue-se, demonstraremos a construção de uma equação difusiva a partir de considerações básicas sobre um fluxo populacional de organismos.

Imaginemos uma comunidade de organismos como um cardume de peixes, com densidade populacional $\rho(\vec{x}, t)$, que desloca-se por determinado domínio espacial, como uma secção semi-cilíndrica de um rio. Consideremos também um volume de controle V sob mesmo espaço, delimitado pela superfície de controle ω . Podemos descrever a variação da densidade populacional no volume V, através de uma lei de equilíbrio. Isso pois a varição do número de indivíduos em V dá-se exclusivamente em termos de dois fatores:

- Fator deslocamento: a variação populacional que ocorre em função do movimento de organismos pra dentro ou para fora do volume de controle.
- Fator demográfico: a varição que dá-se em função das taxas de nascimento e mortalidade da na comunidade de seres.

Vamos desconsiderar, por ora, fatores demográficos. Podemos, descrever o movimento dos indivíduos em termos de uma quantidade $\vec{J}(\vec{x}, t)$, chamada fluxo populacional, que exprime número de seres atravessando a superfície de controle, por unidade de tempo e área. Naturalmente nenhum peixe atravessa as superfícies lateral e superior do volume de controle; a primeira por ser delimitada pela margem, e a segunda por ser delimitada pelo ar. Todo fluxo de peixe através de V da-se pelas duas superfícies transversais ao fluxo da água, S_1 e S_2 . Se o fluxo de organismos que entra através de S_1 é o mesmo que sai através de S_2 , a densidade populacional mantém-se constante; já se o fluxo que entra for maior a densidade sobe, e se for menor desce.

Em linguagem matemática, podemos expressar essa relação como[62]:

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{V} \rho(\vec{x}, t) dV = -\int_{\Omega} \vec{J}(\vec{x}, t) \cdot \vec{n} d\Omega$$
(3.2)

onde \vec{n} é um vetor normal à superfície Ω . Aplicando o teorema da divergência:

$$\int_{\Omega} \vec{J}(\vec{x},t) \cdot \vec{n} d\Omega = \int_{V} \nabla \cdot \vec{J}(\vec{x},t) dV$$
(3.3)

obtemos:

$$\int_{V} \left[\frac{\partial \rho(\vec{x}, t)}{\partial t} + \nabla \cdot \vec{J}(\vec{x}, t) \right] dV = 0$$
(3.4)

como:

$$\nabla = \frac{\partial}{\partial x}\hat{i} + \frac{\partial}{\partial y}\hat{j} + \frac{\partial}{\partial z}\hat{k}$$
(3.5)

e como o volume de controle é arbitrário, obtemos então uma equação de continuidade:

$$\frac{\partial \rho(\vec{x},t)}{\partial t} + \nabla \cdot \vec{J}(\vec{x},t) = 0$$
(3.6)

Para resolver essa equação, precisamos saber como uma variação de densidade populacional ρ varia com determinado fluxo \vec{J} . Uma das hipóteses mais simples é a de que o fluxo seja proporcional ao gradiente espacial da densidade populacional, $\nabla \rho(\vec{x}, t)$ — hipótese que é conhecida como *Lei de Fick*[70]:

$$\vec{J}(\vec{x},t) = -D\nabla\rho(\vec{x},t)$$
(3.7)

onde o sinal negativo indica que o vetor de fluxo aponta para a direção em que a população diminui. A constante de proporcionalidade D é o que conhecemos como coeficiente de difusão, e tem unidades de área por tempo. Substituindo a equação 3.7 na 3.6, obtemos:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \nabla \cdot (D\nabla \rho) \tag{3.8}$$

se o coeficiente de difusão for independente da posição no espaço, então:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \nabla^2 D \rho \tag{3.9}$$

Se houvesse uma componente advectiva de movimento influenciando a população de peixes como um todo, como digamos a que é gerada pela correnteza da um rio, caracterizada por uma velocidade constante \vec{v} , então o relação entre ρ e \vec{J} tornaria-se:

$$\vec{J} = -D\nabla\rho + \vec{v}\rho \tag{3.10}$$

que leva a:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\vec{v\rho}) = \nabla \cdot (D\nabla\rho)$$
(3.11)

Note que em ambos os exemplos, a equação de difusão descreve a redistribuição de organismos pelo espaço em termos de parâmetros "macroscópicos" de processo, como densidade populacional e fluxo; em contraste às equações de caminhada aleatória, que descreviam a redistribuição de organismos em termos de parâmetros "microscópicos" de movimento, como direção e comprimento de passo.¹.

3.2 Os padrões de difusão normal e anômalos

No exemplo recém apresentado, o padrão de difusão é descrito por uma equação na forma:

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2}{\partial x^2} P(x,t)$$
(3.12)

¹Naturalmente, os termos "macroscópico" e "microscópico" são aqui figurativos, indicando apenas uma diferença na escala fenomenológicas das duas descrições.

Sendo P(x, t) a densidade de organismos no ponto x, durante o tempo t, ou analogamente a probabilidade de se encontrar um organismo específico em x, no tempo t. D, conhecido como o coeficiente de difusão, é aqui constante. Para condições iniciais correspondendo a um organismo que inicia-se seu trajeto na origem do sistema, em t = 0, a solução da eq. 3.12 é dada por [47]:

$$P(x,t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left[-\frac{x^2}{4Dt}\right]$$
(3.13)

A média do quadrado do deslocamento $\langle x^2 \rangle$ é definida como:

$$\left\langle x^{2}\right\rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} x^{2} P(x,t) \, dx \tag{3.14}$$

Substituindo a expressão de P(x, t) da equação (3.13) na equação (3.14), temos:

$$\langle x^2 \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} x^2 \cdot \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) dx$$
 (3.15)

Reconhecemos que a integral apresentada na equação (3.15) é uma integral padrão envolvendo funções gaussianas. Sabemos que:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} x^2 e^{-ax^2} dx = \frac{\sqrt{\pi}}{2a^{3/2}}$$
(3.16)

Comparando com a nossa integral, identificamos $a = \frac{1}{4Dt}$. Substituindo *a* na equação (3.16), obtemos:

$$\left\langle x^2 \right\rangle = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \left(4Dt\right)^{3/2} \tag{3.17}$$

$$= \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot (4Dt)^{3/2}$$
(3.18)

$$=\frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{4\pi Dt}} \cdot (4Dt)^{3/2}$$
(3.19)

$$=\frac{1}{2\sqrt{4Dt}}\cdot(4Dt)^{3/2}$$
(3.20)

$$=\frac{1}{2}\cdot(4Dt)^{1}$$
(3.21)

$$= 2Dt \tag{3.22}$$

portanto, a média do quadrado do deslocamento está relacionada ao tempo da seguinte maneira:

$$\left\langle x^2 \right\rangle = 2Dt \tag{3.23}$$

o que implica na relação de escala:

$$\langle x^2 \rangle \sim t$$
 (3.24)

que pode ser intuitivamente compreendida pelo fato de que equações de difusão com forma como a da equação 3.12 descrevem um operador P com uma derivada temporal em termos de duas derivadas espaciais [47]. Isso é o que chamamos de processo de *difusão normal*. Os primeiros modelos de movimento animal da literatura científica assumiam como hipótese padrões de

difusão normal [47, 44, 71]. Observações de campo, contudo, sugerem que diversos organismos manifestam padrões de dispersão incompatível com o modelo de difusão normal [72, 73, 74] — ou seja, padrões de dispersão que não escalam linearmente com o tempo. Isso é que chamamos processo de *difusão anômala*, ou seja, quando o $\langle x^2 \rangle$ do processo obedece uma relação do tipo:

$$\left\langle x^2\right\rangle \sim t^\gamma \tag{3.25}$$

Nos casos em que $\gamma > 1$, $\langle x^2 \rangle$ escala superlinearmente com o tempo, e dizemos que o processo é superdifusivo; já quando $\gamma < 1$, $\langle x^2 \rangle$ escala sublinearmente com o tempo, e dizemos que o processo é subdifusivo (vide figura 3.3).



Figura 3.3: Formas de gráfico de $\langle x^2 \rangle$ versus tempo para processos difusivos, superdifusivos e subdifusivos.

Podemos definir um coeficiente $H = \gamma/2$, chamado coeficiente de Hurst, de modo que o padrão de difusão de um processo obedeça a relação:

$$\langle x^2 \rangle \sim t^{2H} \tag{3.26}$$

de modo que o coeficiente de Hurst pode ser compreendido como metade do coeficiente angular de $\langle x^2 \rangle$ em escala logarítmica. Assim, o processo em questão é normal quando H = 1/2, super-difusivo quando H > 1/2, e subdifusivo quando H < 1/2.

Concretamente, o padrão de difusividade de um organismo expressa a natureza do seu padrão de exploração do ambiente, como ilustrado na figura 3.4. Processos superdifusivos favorecem uma dispersão maior pelo meio, ou um afastamento maior em relação ao ponto de



origem. Já em um processo subdifusivo, o padrão de movimento tende a mantê-lo mais próximo das regiões que já ocupa; o que resulta em uma estratégia de exploração mais localizada.

Figura 3.4: Exemplos de trajetos com diferentes padrões de difusividade. Expoentes de Hurst (H) indicados para cada trajeto.

No que segue-se, as ideias recém apresentadas serão aplicadas na análise dos padrões difusivos de larvas de mosca.

3.3 A difusão de larvas

Desejamos compreender, agora, como as larvas de *Drosophila* se dispersam no espaço ao longo do tempo — isto é, investigar seu adrão difusivo. No capítulo anterior, identificamos três estratégias de movimento distintas nos trajetos larvares, cada uma com propriedades comportamentais e estocásticas específicas (distribuições de passo, persistência direcional, etc.).

Essa diversidade de modos de locomoção levanta questões centrais: será que cada estratégia promove um grau diferente de dispersão espacial? Até que ponto essas diferenças "microscópicas" — nos tipos de passos ou ângulos de virada — refletem-se em padrões "macroscópicos" de difusão?

Responder a essas perguntas não apenas aprofunda nosso entendimento sobre o comportamento locomotor da *Drosophila*, mas também ilumina possíveis implicações ecológicas. Estratégias de movimento que produzem superdifusão podem facilitar a colonização de áreas mais distantes ou a estratégias de busca por recursos mais dispersivas; já aquelas que geram subdifusão tendem a confinar o organismo em regiões menores, potencialmente maximizando a exploração local de uma fonte de alimento. Assim, cada estado de movimento pode ter vantagens e desvantagens adaptativas, dependendo do contexto ambiental.

Nas próximas seções, analisaremos esses três modos em termos de dispersão, quantificando o deslocamento médio ao longo do tempo e avaliando se o processo segue um regime normal de difusão ou apresenta características anômalas (superdifusão ou subdifusão). Essa transição do nível individual (modos de movimento) para o nível coletivo (difusão) permitirá estabelecer elos entre a o comportamento do animal e as consequências espaciais de sua estratégia de locomoção.

3.3.1 Metodologia

No Capítulo 1, identificaram-se três estratégias distintas de movimento no deslocamento de larvas de *Drosophila*:

- Modo 1: mudanças de direção alternadas ±45°, resultando em um padrão de zigue-zague que favorece avanço predominantemente linear;
- Modo 2: mudanças de direção para o mesmo lado ±45°, produzindo trajetórias em forma de espiral;
- Modo 3: mudanças de direção abruptas e aleatórias, com ângulos de virada amplamente distribuídos.

Para analisar quantitativamente cada um desses padrões, segmentamos as trajetórias experimentais em trechos homogêneos de acordo com a estratégia observada, conforme ilustrado na Figura 3.5. Sejam *i* o índice que identifica cada segmento, e n_i o número total de pontos medidos nesse segmento. Cada segmento pode ser descrito por uma série temporal de posições:

$$\{\vec{X}_i\} = \{(x_{1i}, y_{1i}), (x_{2i}, y_{2i}), \dots, (x_{n_i i}, y_{n_i i})\},$$
(3.27)

onde $\{(x_{ki}, y_{ki})\}_{k=1}^{n_i}$ são medidas experimentais da posição da larva, obtidas com resolução temporal de 0.1*s* (vide Seção 2.3.1). Cada segmento é classificado em um das três modos de movimento.

Supondo que todos os segmentos pertencentes a uma mesma classe C_j , $(j \in \{1, 2, 3\})$ sejam realizações de um mesmo processo estocástico de locomoção, podemos reunir os deslocamentos de duração Δt observados em *todos* os segmentos daquela classe para formar um *ensemble* representativo desse processo na escala temporal Δt . Para tanto, definimos o deslocamento \vec{S} a partir de uma posição inicial (x_{t_0}, y_{t_0}) , após um intervalo de tempo Δt :

$$\dot{S} = (x_{t_0 + \Delta t}, y_{t_0 + \Delta t}) - (x_{t_0}, y_{t_0}).$$
(3.28)

Ao percorrermos todo o conjunto de tempos iniciais t_0 disponíveis em cada segmento da classe C_j , obtemos a coleção de *todos* os deslocamentos possíveis de duração Δt . Denotemos esse conjunto por:

$$\{\vec{S}_{\Delta t,C_j}\} = \left\{\vec{S}(t_0,\Delta t) \mid t_0 \in \mathcal{T}_j, \quad \text{segmento} \in C_j\right\},\tag{3.29}$$



Figura 3.5: Decomposição de trajeto de larva por estratégia de movimento.

onde \mathcal{T}_j representa todos os instantes de tempo válidos dentro de *todos* os segmentos associados à classe C_j . Repetindo esse procedimento para diferentes valores de Δt no intervalo $[t_{\min}, t_{\max}]$, obtemos uma família de *ensembles*:

$$\left\{\left\{\vec{S}_{\Delta t,C_{j}}\right\}\right\}_{\Delta t \in [t_{\min},t_{\max}]},\tag{3.30}$$

que descreve, de forma estatística, o comportamento do processo de locomoção na classe C_j ao longo das diversas escalas de tempo Δt .

Assim, construímos sessenta *ensembles* de passos para cada classe C_1 , C_2 e C_3 . Especificamente, cada *ensemble* { $\vec{S}_{\Delta t,C_j}$ } é obtido para um Δt variando entre 1 s e 60 s, agregando a totalidade dos deslocamentos de duração Δt observados em todos os segmentos da respectiva classe.

Note que *qualquer* ponto de um trajeto pode ser utilizado origem para mensurar o deslocamento de duração Δt . Assim, o processo de medição de passos "varre" o trajeto, de tal maneira que *todo* deslocamento possível na janela temporal de Δt seja computado, como ilustrado na fig. 3.6. Nesse contexto, os conjuntos de passos que estamos criando não devem ser compreendidos como uma mera descrição geométrica do caminho percorrido por uma larva, mas sim como uma representação estatística do processo de movimento.

No que segue-se, a análise desses *ensembles* será utilizada para investigar o *padrão de difusão* do movimento das larvas nas diferentes estratégias (zigue-zague, espiral e errática).



Figura 3.6: Exemplos da construção de *ensemble* de passos de um trajeto para resoluções temporais de (a) $\Delta t = 1$, (b) $\Delta t = 2$ e (c) $\Delta t = 3$.

3.3.2 Uma análise dos padrões de difusão das larvas de Drosophila

O *deslocamento médio* de cada classe de trajetos, C_1 , C_2 e C_3 , em função de uma escala temporal Δt , pode ser computado a partir dos *ensembles* de passos introduzidos na sção 3.3.1. Tendo que $\{\vec{S}_{\Delta t,C_j}\}$ representa a coleção de *todos* os deslocamentos de duração Δt observados em todos os segmentos da classe C_j , definimos:

$$\langle |\vec{S}_{\Delta t,C_j}| \rangle = \frac{1}{N_j(\Delta t)} \sum_{m=1}^{N_j(\Delta t)} \left\| \vec{S}_{\Delta t,C_j}^{(m)} \right\|, \tag{3.31}$$

onde $N_j(\Delta t)$ é o número total de deslocamentos no *ensemble* $\{\vec{S}_{\Delta t,C_j}\}$ (ou seja, o tamanho da amostra), e $\|\cdot\|$ denota a norma euclidiana do vetor deslocamento. Como (x(t), y(t)) representa a posição da larva no instante *t*, temos:

$$\langle |\vec{S}_{\Delta t,C_j}| \rangle = \frac{1}{N_j(\Delta t)} \sum_{m=1}^{N_j(\Delta t)} \sqrt{\left[x(t_m + \Delta t) - x(t_m)\right]^2 + \left[y(t_m + \Delta t) - y(t_m)\right]^2}.$$
 (3.32)

O valor de $\langle |\vec{S}_{\Delta t,C_j}| \rangle$ descreve, em média, quão longe (em termos de distância linear) a larva se afasta de sua posição inicial após um intervalo de tempo Δt , quando seus movimentos pertencem à estratégia C_j . Fisicamente, isso fornece uma medida de mobilidade ou dispersão ao longo de diferentes escalas temporais. Na fig. 3.7a, apresentamos o comportamento de $\langle |\vec{S}_{\Delta t,C_j}| \rangle$ em função de Δt para cada classe.



Figura 3.7: (a) Deslocamento líquido médio, (b) MSD e (c) expoente de Hurst, em função da janela temporal Δt .

Da mesma forma, o deslocamento quadrado médio do processo, denotado por $\langle \|\vec{S}_{\Delta t,C_j}\|^2 \rangle$, pode ser obtido por:

$$\langle \|\vec{S}_{\Delta t,C_j}\|^2 \rangle = \frac{1}{N_j(\Delta t)} \sum_{m=1}^{N_j(\Delta t)} \|\vec{S}_{\Delta t,C_j}^{(m)}\|^2.$$
(3.33)

ou:

$$\langle \|\vec{S}_{\Delta t,C_j}\|^2 \rangle = \frac{1}{N_j(\Delta t)} \sum_{m=1}^{N_j(\Delta t)} \left[x(t_m + \Delta t) - x(t_m) \right]^2 + \left[y(t_m + \Delta t) - y(t_m) \right]^2.$$
(3.34)

que como discutido na Seção 3.2 relaciona-se com o expoente de Hurst por:

$$\langle \|\vec{S}_{\Delta t,C_j}\|^2 \rangle \sim \Delta t^{2H},$$
(3.35)

Aplicando logaritmos em ambos os lados, obtemos:

$$\log(\langle \|\vec{S}_{\Delta t,C_j}\|^2 \rangle) \sim 2H \, \log(\Delta t), \tag{3.36}$$

o que implica que *H* pode ser determinado como *metade* da inclinação (coeficiente angular) da curva $\log(\langle \|\vec{S}_{\Delta t,C_i}\|^2 \rangle)$ versus $\log(\Delta t)$.

A fim de definir o *expoente de Hurst* em termos de uma escala temporal específica, τ , podemos considerar o coeficiente angular *local* nessa vizinhança, de forma que

$$H(\tau) = \frac{1}{2} \underbrace{\frac{\log(\langle \vec{x}(\tau + t_{passo})^2 \rangle) - \log(\langle \vec{x}(\tau)^2 \rangle)}{\log(\tau + t_{passo}) - \log(\tau)}}_{(3.37)$$

coeficiente angular em τ

onde t_{passo} é a resolução temporal da análise (neste experimento, 1 s). Esse procedimento permite investigar a variação local de H ao longo das escalas de tempo, ilustrando como o regime de difusão pode eventualmente mudar de acordo com τ . Na Figura 3.7, apresentam-se (a) o deslocamento líquido médio $\langle |\vec{S}\Delta t, C_j| \rangle$, (b) o deslocamento quadrado médio (MSD) $\langle |\vec{S}\Delta t, C_j|^2 \rangle$ e (c) o expoente de Hurst $H(\Delta t)$, em função do tempo Δt .

Na fig. 3.7(a), observa-se que, para o *modo 1* (curva vermelha), o deslocamento líquido médio cresce rapidamente e se mantém em valores altos em todo o intervalo temporal considerado, chegando a cerca de 35,mm em $\Delta t = 60$, s. Esse comportamento sugere um afastamento progressivo e sistemático da posição inicial, condizente com o fato de que a estratégia de movimentos curtos e alternados em zigue-zague (vide Seção 3.3.1) favorece o avanço linear. Já o modo 2 (curva verde) apresenta crescimento acentuado apenas nos instantes iniciais (até cerca de 30,s), mas passa a um regime de menor taxa de aumento após esse ponto, mantendo-se abaixo do modo 1 para tempos longos. O modo 3 (curva azul), por sua vez, exibe um platô em torno de 10,mm, não expandindo seu deslocamento após aproximadamente 30,s, o que indica que a larva, nessa estratégia errática, tende a permanecer em uma região relativamente confinada.

A representação via MSD, fig. 3.7b, torna tais disparidades ainda mais evidentes. O modo 1 alcança valores de deslocamento quadrado médio muito maiores que os demais, reforçando a presença de dispersão ampla e crescente ao longo do tempo. Para o modo 2, a MSD também se eleva, mas de forma menos acentuada que no modo 1, sugerindo que o padrão de "espiral" acaba conferindo uma dispersão moderada em escalas de tempo longas. Enquanto isso, o modo 3 atinge rapidamente um patamar baixo de MSD, o que confirma seu caráter de movimento aleatório com viradas abruptas e curta persistência direcional, resultando em um confinamento de fato.

Por fim, o expoente de Hurst, ilustrado na fig. 3.7, revela, em escala local de Δt , se o movimento é superdifusivo (H > 0.5), difusivo normal (H = 0.5) ou subdifusivo (H < 0.5). O modo 1 mantém-se em H > 0.8 ao longo de todo o intervalo, atestando um forte caráter superdifusivo, coerente com o crescimento sustentado do deslocamento líquido e da MSD. No

modo 2, *H* inicia em valores significativamente acima de 0.5, mas decresce com o aumento de Δt , vindo a cruzar o limiar de 0.5 em torno dos 30,s; dessa forma, seu regime passa de superdifusivo (em tempos curtos) para subdifusivo (em tempos mais longos), condizente com a desaceleração no crescimento do deslocamento líquido. Já o modo 3 atinge valores de *H* bem abaixo de 0.5 (por volta de 0.2 a 0.3) em grande parte do espectro temporal, o que confirma a natureza subdifusiva do movimento errático, e explica o fato de a curva de deslocamento líquido, bem como a MSD, saturarem precocemente.

Em síntese, a análise do deslocamento líquido médio, do MSD e do expoente de Hurst permite caracterizar, de maneira coerente, três regimes de locomoção bastante distintos: um regime robustamente superdifusivo (modo 1), um regime que transita de superdifusivo para subdifusivo (modo 2) e um regime majoritariamente subdifusivo (modo 3). Esses resultados reforçam que cada padrão de mudança de direção acarreta uma 'assinatura de difusão'' específica.

A presença de diferentes regimes difusivos para cada estratégia de locomoção ilustra, de forma clara, como as larvas podem modular seu padrão de movimento de acordo com demandas comportamentais ou ambientais específicas. No caso do *modo 1*, em que a difusão mantém-se fortemente superdifusiva em todas as escalas temporais analisadas, observa-se uma forma de locomoção capaz de promover afastamento contínuo e rápido do ponto de origem, o que pode ser vantajoso na busca por recursos distantes ou na evasão de ambientes desfavoráveis. Já o *modo 3*, ao apresentar difusão majoritariamente subdifusiva, implica um padrão de movimentos erráticos e reorientações abruptas, favorecendo a exploração concentrada de uma mesma região — algo potencialmente útil em situações em que a larva detecta alguma fonte de alimento ou abrigo próximo e procura, por meio de voltas e retornos frequentes, aproveitar ao máximo as redondezas imediatas.

A assinatura difusiva mais complexa do *modo 2*, que se mostra superdifusivo em escalas de tempo curtas, mas se torna subdifusivo em escalas superiores, merece destaque particular por revelar uma estratégia de "dupla função". Em intervalos de tempo iniciais, a alta taxa de difusão sugere que a larva rapidamente se afasta do ponto de partida, possivelmente para deixar uma área já explorada ou pouco promissora. Entretanto, ao longo de escalas de tempo mais extensas, essa superdifusão cede lugar a um regime subdifusivo, indicando que a larva passa a permanecer em uma região circunscrita, sem migrar indefinidamente para posições muito distantes. Esse comportamento híbrido pode ser fundamental em estratégias de exploração, uma vez que, em termos biológicos, pode ser desejável dispersar-se o suficiente para escapar de áreas inóspitas ou buscar novos locais de forrageamento (regime superdifusivo), mas ao mesmo tempo manter a possibilidade de revisitar regiões previamente percorridas, onde há maior probabilidade de encontrar alimento ou refúgio, sem se dispersar excessivamente (regime subdifusivo).

Desse modo, o fato de haver diferentes *modos* de locomoção — cada um associado a uma "assinatura de difusão" particular — sugere que as larvas de *Drosophila* possuem a capacidade de selecionar a estratégia mais adequada à circunstância ambiental ou ao objetivo comportamental do momento. Estratégias fortemente superdifusivas podem, por exemplo, maximizar a cobertura espacial ao longo do tempo, enquanto estratégias subdifusivas conferem maior permanência em locais selecionados, com amplas reorientações que permitem investigações pontuais de possíveis recursos ali presentes. Nesse sentido, compreender os padrões difusivos em cada estratégia de locomoção não apenas enriquece a descrição da dinâmica motor-comportamental das larvas, mas também abre caminho para investigar como esses organismos ajustam, de forma adaptativa, as trajetórias de exploração em busca de eficiência na procura por alimento, abrigo ou parceiros.

Em resumo, a análise do deslocamento líquido médio, do MSD e do expoente de Hurst em cada modo de movimento permitiu identificar regimes de difusão distintos:

- **Modo 1** (**zigue-zague**): mantém-se majoritariamente superdifusivo em todas as escalas de tempo, favorecendo dispersão ampla e afastamento contínuo do ponto de origem;
- Modo 2 (espiral): exibe um comportamento híbrido, com superdifusão em escalas curtas e subdifusão em escalas mais longas, revelando uma estratégia que alterna dispersão inicial e posterior permanência;
- Modo 3 (errático): apresenta subdifusão na maior parte do intervalo, o que se reflete em movimentos mais confinados e reorientações frequentes.

Esses achados indicam que as larvas *não* seguem um padrão de difusão puramente normal, mas sim comportamentos que podem mudar conforme o tempo e o modo de locomoção adotado. No próximo tópico, discutiremos como esses resultados podem ser compreendidos à luz do Teorema do Limite Central e das condições que levam à difusão anômala.

3.4 Alguns aspectos de trajeto relacionados a difusão anômala

A relação de escala dos processos de difusão normal, $\langle x^2 \rangle \sim t$, pode ser inferida também a partir do Teorema do Limite Central [75]. Isso pois, em uma trajetória constituída por uma série de deslocamentos individuais, o deslocamento absoluto — ou seja: a soma destes deslocamentos individuais — converge para uma distribuição Gaussiana do tipo exp $\left(\frac{-x^2}{\sigma}\right)$, com variância σ proporcional à quantidade de passos [62], conquanto estes obedeçam as três condições do teorema do limite central:

- A condição de passos identicamente distribuídos, que é violada por trajetos onde existam vários modos de movimento distintos, cada um com suas próprias propriedades estocásticas;
- 2. A condição de passos independentes, que é violada por trajetos com passos autocorrelacionados;
- A condição de variância finita, que é violada por trajos com passos de variância divergente;

Na circunstâncias em que estas três condições são satisfeitas, o processo de caminhada resulta em um $\langle x^2 \rangle = \sigma$ para $t \to \infty$, e disso emerge imediatamente que $\langle x^2 \rangle \sim t$, dado que t e σ são proporcionais. Ou, em termos mais simples: quando as três condições do teorema do limite central são satisfeitas, o $\langle x^2 \rangle$ de um caminhante será proporcional ao tempo, no limite assimptótico, não importando quão complicados forem os padrões de movimento. A existência de organismos com padrão de movimento superdifusivo implica na violação, por parte destes, de pelo menos uma das condições de validade do TLC.

3.4.1 A condição de variância

Um primeiro mecanismo capaz de quebrar a difusão normal seria a violação da condição de passos identicamente distribuídos — algo que, de modo geral, ocorre quando o organismo alterna entre diferentes regimes de movimento. Entretanto, na análise aqui desenvolvida, cada modo de locomoção foi delimitado de forma a capturar segmentos relativamente homogêneos, nos quais os deslocamentos seguem, em princípio, propriedades estatísticas constantes. Ou seja, depois de segmentar a trajetória via Modelos Ocultos de Markov (HMM), estamos tratando cada modo como se fosse um "pequeno processo" onde os passos apresentam distribuição aproximadamente estacionária e idêntica entre si. Dessa forma, a heterogeneidade de passos, que seria uma causa natural de difusão anômala, não desponta como o principal fator explicativo dentro de cada modo.

Para compreender por que, mesmo assim, observamos regimes superdifusivos ou subdifusivos em cada umd estes modos individualmente, torna-se necessário examinar outros aspectos do movimento. Um dos possíveis mecanismos geradores de difusão anômala é o movimento caracterizado por variância divergente. Contudo, enfrenta-se a dificuldade de medir uma variância infinita em um conjunto finito de dados [3], uma vez que todas as amostras possuem limites superiores finitos para os valores observados.

Para contornar essa limitação, adotamos uma abordagem que consiste em aproximar o comportamento das caudas das distribuições de deslocamento por meio de modelos teóricos que possuem variância infinita, como as distribuições de lei de potência (power-law). Essas distribuições são caracterizadas por uma probabilidade de ocorrência de eventos extremos que decai de forma mais lenta do que nas distribuições com variância finita, como a distribuição normal.

Especificamente, as distribuições de lei de potência são definidas pela função de densidade de probabilidade:

$$P(x) \sim x^{-\alpha}, \quad x \ge x_{\min}, \tag{3.38}$$

onde α é o expoente de cauda e x_{\min} é o limiar a partir do qual a lei de potência é válida. Para $1 \le \alpha \le 3$, essas distribuições possuem variância infinita [76], tornando-as adequadas para modelar caudas pesadas que potencialmente contribuam para um comportamento de difusão anômala.

Em teoria de caminhadas aleatórias, processos com essas características são denominados caminhadas de Lévy (LW). Apesar da relevância teórica das LWs para descrever processos de difusão anômala, sua identificação empírica enfrenta desafios consideráveis, notadamente devido às dificuldades em segmentar as trajetórias em passos bem definidos. Para estimar com precisão parâmetros como α é crucial separar os deslocamentos em etapas discretas de movimento. No entanto, ruídos experimentais e curvaturas dos trajetos podem mascarar mudanças de direção e, assim, afetar a detecção de cada passo individual.

Como construção matemática, as LWs pressupõem passos retilíneos perfeitos, algo que raramente se verifica em sistemas reais. Além disso, pequenas mudanças de direção podem ser confundidas com ruídos de medição, dificultando ainda mais a identificação de novos passos. Para tratar dessas questões, Tromer *et al.* [77] desenvolveram um método de partição de trajetos, fundamentado em duas constatações principais:

- Em 1D, cada inversão completa de direção é inequivocamente um novo passo, uma vez que não há ambiguidade de ângulo: a mudança *sempre* representa um giro de 180°.
- A projeção de duas LWs unidimensionais independentes também constitui, em si, uma LW bidimensional.

Desse modo, o procedimento consiste em projetar a trajetória bidimensional sobre os eixos cartesianos X e Y, de modo que cada inversão de sentido detectada em uma dessas projeções 1D sirva como marcador de início ou fim de passo. Na prática, isso minimiza os falsos positivos gerados por oscilações sutis, pois exige que a mudança de passo seja clara ao menos em um dos eixos.

Em suma, o método de Tromer *et al.* [77] objetiva tornar mais robusta a identificação dos passos em um conjunto de dados experimentais, aumentando, assim, a confiabilidade na estimação dos parâmetros de uma LW. Essa estratégia tem se mostrado uma ferramenta valiosa para analisar a difusão anômala *in vivo*, em contextos onde as trajetórias são ruidosas e as mudanças de direção não são triviais de detectar. A figura 3.8 apresenta os ajustes estatísticos em lei de potência para os três modos de movimento, segundo a técnica que acabamos de mencionar. Foram obtidos valores de $\alpha_1 = 2.49$, $\alpha_2 = 2.23$, $\alpha_3 = 1.76$ respectivamente para os modos de movimento 1, 2 e 3. O ajuste em lei de potência apresenta-se como superior ao do lognormal para os três modos, segundo o AIC.



Figura 3.8: Ajuste estatístico para as distribuições de Lei de Potência e Lognormal dos modos de movimento 1 (a), 2 (b) e 3 (c).

Os valores de α no intervalo $1 < \alpha \le 3$ indicam que os três modos de movimento apresentam características de Lévy Walks (LW). Embora as LW sejam processos *scale-free* (que, em condições perfeitas, resultariam em um exponente de Hurst *H* invariável ao longo do tempo), a aproximação da lei de potência apenas nas caudas das distribuições, aliada à existência de um limite físico no tamanho máximo dos passos — imposto tanto pelas limitações geométricas da

arena quanto pelas restrições fisiológicas de tempo de vida e energia das larvas — transforma o processo, efetivamente, em uma LW truncada. Enquanto as LW perfeitas produzem processos superdifusivos em qualquer escala temporal, as LW truncadas exibem superdifusão apenas em escalas temporais baixas [3]. Esse comportamento é consistente com o observado nos três modos de movimento, que apresentam superdifusão em escalas temporais reduzidas.

É sabido também que processos de LW com $\alpha = 2$ optimizam processos de busca aleatória, como no caso de um comportamento de forrageamento, e há, na literatura científica, a hipótese de que trajetos com trajetos que manifestem um α próximo a 2 sejam favorecidos por seleção natural, haja vista sua eficiência [49]. Curiosamente, os $\alpha's$ de todos os três modos de movimento aproximam-se razoavelmente de $\alpha = 2$, a despeito dos comportamentos difusivos completamente distintos. Curiosamente, também, mesmo que os três modos de movimento possam ter seu comportamento de cauda descrito por uma lei de potência, o mesmo não pode ser dito sobre os trajetos compostos (cujo ajuste estatístico foi apresentado no capítulo 1). Tal resultado levanta as seguintes possibilidades:

- 1. A de que um organismo transite entre diferentes estratégias de movimento, com efeitos difusivos distintos, mas que todas estas tenham sua "forma geométrica de trajeto" optimizada para $\alpha = 2$;
- 2. A de que um trajeto constituído por LWs distintas não apresente um comportamento global de LW.

3.4.2 A condição de independência

Quando o valor de uma variável aleatória em um instante de tempo t é parcialmente determinado pelos valores que ela assumiu em um instante de tempo s < t, dizemos que tal variável é *auto-correlacionada*. Por não serem independentes, distribuições estatísticas auto-correlacionadas violam o TLC — e portanto, processos de caminhada aleatória com auto-correlação de parâmetros podem gerar processos de difusão anômala [62].

A auto-correlação de uma variável em uma janela temporal τ pode ser especificada pelo *parâmetro de auto-correlação de Pearson*, que é dado por[78]:

$$C(\mathbf{v}_i, \mathbf{v}_{i+\tau}) = \frac{\mathbf{v}_i, \mathbf{v}_{i+\tau}}{\sigma_v}$$
(3.39)

onde σ_x é a variância da série temporal $\{x_i\}$, e $cov(x_i, x_{i+\tau})$ a covariância da série consigo própria atrasada em τ — ou seja, a covariância de todos os seus elementos com os " τ -ésimos" anteriores. A covariância é uma métrica do quanto duas variáveis estocásticas tendem a "variar em sincronia", e no caso da velocidade de um objeto pode ser especificada por:

$$\operatorname{cov}(\mathbf{v}_{i}, \mathbf{v}_{i+\tau}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n-\tau} (\mathbf{v}_{i} - \bar{\mathbf{v}}) \cdot (\mathbf{v}_{i+\tau} - \bar{\mathbf{v}})$$
(3.40)

onde n é o número de termos da série, e \bar{x} a média.

A auto-correlação assume valores em $C(x_{i+\tau}, x_i) \in [-1, 1]$. Se $C(x_{i+\tau}, x_i)(x) = 1$ podemos dizer os elementos da série, espaçados em τ , variam em sincronia; ou seja, os valores de $x_i e x_{i+\tau}$ tendem a ser parecidos. Quando $C(x_{i+\tau}, x_i) = -1$ a auto-correlação é reversa, o que significa que os valores de $x_i e x_{i+\tau}$ são parecidos, mas de sinal invertido. Se $C(x_{i+\tau}, x_i) = 0$, não há auto-correlação. Considere um trajeto de organismo, particionado em intervalos regulares de resolução temporal Δt . Se a variação de tempo é constante, a velocidade v em cada passo é proporcional ao deslocamento x. Isso significa que a auto-correlação entre as posições do organismo, $C_{\tau}(x)$, será idêntica à auto-correlação das velocidades $C_{\tau}(v)$. A equação de Green-Kubo, que descreve a variação temporal do *MSD* de uma partícula em termos de sua correlação de velocidades [62, 79], pode ser utilizada para estudar esse padrão de movimento:

$$\frac{dMSD}{dt} = \frac{d}{dt} \int_0^t \int_0^t C(x_{i+\tau}, x_i) d\tau ds = 2 \int_0^t \underbrace{C(x_{i+\tau}, x_i)}_{auto-cor, de vel.} d\tau$$
(3.41)

onde $C(x_{i+\tau}, x_i)$ é a função de auto-correlação de velocidade.

Se a correlação $C(x_{i+\tau}, x_i)$ for nula, a integral do termo à direita resulta em uma constante, e obtemos disso a relação de escala $\langle x^2 \rangle \sim t$ — ou seja: quando não há auto-correlação, o padrão de difusão que se manifesta é o normal.

Contudo, é mais habitual que em trajetos reais de organismos a auto-correlação decaia com o tempo. Isso significa que a auto-correlação será maior em janelas temporais mais curtas, decaindo à inexistência com o aumento do intervalo. É o que chamamos auto-correlação de *curto alcance*. Nesse caso, no limite assimptótico de $t \rightarrow \infty$ o termo da direita tornaria-se integrável, e a relação de escala $\langle x^2 \rangle \sim t$ seria mantida — o que indica que o padrão de difusão converge para o normal em escalas temporais suficientemente longas.

Os modos de movimento das larvas de *Drosophila* podem ser comparados a partir da curva de autocorrelação de velocidade (ver Figura 3.14) e do expoente de Hurst (ver Figura 3.8c). Essas duas métricas fornecem indicações sobre a difusividade do processo em diferentes escalas temporais, permitindo identificar regimes de superdifusão, difusão normal ou subdifusão.

No Modo 1 (curva vermelha), a autocorrelação de velocidade apresenta valores positivos relativamente altos, com um decaimento lento. Em janelas temporais curtas e intermediárias, a série de velocidades conserva uma forte persistência, resultando em um crescimento rápido do deslocamento. O expoente de Hurst, neste caso, permanece acima de 0,5 ao longo de toda a análise, indicando que o regime de difusão se mantém superdifusivo.

O Modo 2 inicia com valores de autocorrelação também positivos e elevados, mas decai mais rapidamente que o Modo 1. Em torno de 60 a 70 segundos, observa-se até mesmo a ocorrência de valores ligeiramente negativos, sugerindo a quebra de persistência e possível inversão do sentido de movimento. Consequentemente, o expoente de Hurst, que começa acima de 0,5, diminui gradualmente e se aproxima de 0,5 em escalas de tempo maiores, indicando a transição de um regime superdifusivo para um regime próximo ao normal.

Já o Modo 3 (curva azul) exibe autocorrelação de velocidade muito próxima de zero por quase todo o intervalo, chegando a valores negativos em torno de 60 a 80 segundos. Isso sinaliza que não há manutenção significativa da velocidade ao longo do tempo, o que favorece uma dinâmica de subdifusão. De fato, o expoente de Hurst cai de valores próximos de 0,6 para bem abaixo de 0,5, confirmando o regime subdifusivo predominante em janelas temporais intermediárias e longas.

Esses resultados evidenciam a relação direta entre o decaimento da autocorrelação de velocidade e as mudanças de regime de difusão. Nos casos em que a autocorrelação se mantém alta por intervalos longos, a difusão tende a ser superdifusiva. Quando ela se anula ou inverte rapidamente, observa-se uma difusão normal ou subdifusiva. Em muitos processos biológicos, a autocorrelação acaba se dissipando em escalas de tempo suficientemente extensas, de modo que a difusão converge gradualmente para a normalidade.



Figura 3.9: Curva de autocorrelação de velocidade dos três modos de movimento das larvas de *Drosophila*.

3.5 Sobre a "função biológica" da difusão anômala

Tendo estabelecido a existência de difusão anômala, é pertinente refletir sobre o propósito dos processos de difusão anômala no contexto do movimento animal.

Contudo, o nosso arranjo experimental não é ideal para que possamos fazer inferências conclusivas a esse respeito, pois registramos o comportamento de larvas de *Drosophila* em um ambiente "neutro", desprovido de qualquer contexto ecológico. Dessa forma, não conseguimos determinar, de maneira clara, qual seria a intenção da larva em cada modo de movimento observado.

Para avançar nessa reflexão, podemos recorrer a um estudo que realizamos em colaboração com pesquisadores do Instituto Pasteur [80]. Nesse trabalho, analisamos gravações fornecidas por eles acerca do padrão de movimento de um protozoário denominado *Plasmodium berghei*, registradas durante o processo de infecção de seu hospedeiro. Esse cenário, diferentemente do caso das larvas de *Drosophila* em ambiente neutro, permitiu observar o movimento anômalo dentro de um contexto biológico mais próximo das condições naturais do parasita, possibilitando, assim, uma discussão mais fundamentada sobre a função adaptativa da difusão anômala nesse sistema.

3.5.1 O protozoário *Plasmodium berguei*

Assim como todos os outros membros do gênero *Plasmodium*, o *P. berghei* é um protozoário parasítico. Durante seu ciclo de vida transita entre dois tipos de hospedeiros: insetos hematófagos do gênero *Anopheles* (isso é, mosquitos) e mamíferos do gênero *rattus* (ou seja, ratos). Como todo *Plasmodium*, o *P. berghei* possui um ciclo reprodutivo bastante atípico [81], transitando entre duas estratégias de replicação completamente distintas: quando em um

hospedeiro *Anopheles*, o *P. berghei* reproduz-se assexuadamente; já quando em um hospedeiro *rattus*, reproduz-se sexuadamente. Podemos descrever esse ciclo em termos das seguintes etapas [82] (ilustradas na figura 3.10):

O *Plasmodium* é um gênero de protozoários parasíticos, causador da malária. Durante seu ciclo de vida transita entre dois tipos de hospedeiros: insetos hematófagos (em geral mosquitos) e animais vertebrados. Destes, o *Plasmodium berghei* é uma espécie especialista na infecção de ratos, e por isso tem encontrado amplo uso como modelo experimental no estudo da malária. Seu ciclo reprodutivo é bastante atípico [81]. Envolve fases distintas de transmissão e reprodução — uma sexuada e outra assexuada. Podemos descrever esse ciclo em termos das seguintes etapas [82] (ilustradas na figura 3.10):

- 1. Fase de Esquizogonia (figura 3.10b): Representa um período de incubação do protozoário, no qual este reproduz-se assexuadamente nos tecidos do fígado do rato, até que as células infectadas rompem-se, liberando uma certa quantidade de parasitas na corrente sanguínea do hospedeiro.
- 2. Fase Sanguínea (figura 3.10c): Nesta etapa, os protozoários infectam as hemácias do rato. Dentro destas células, multiplicam-se intensamente por mitose, de forma assexuada, o que pode levar a condições patológicas como anemia.
- Fase de Diferenciação Sexual (figura 3.10d): Durante o ciclo de infecção das hemácias, alguns parasitas sofrem um processo de diferenciação sexual, transformando-se em gametócitos, aptos a formar gametas, o que possibilita a reprodução sexuada do protozoário.
- 4. Fase de Infecção do Mosquito (figura 3.10e): Os gametócitos permanecem incubados no sangue do rato, até que um mosquito os consuma, ao picar um rato contaminado. Uma vez capturado pelo mosquito, o *Plasmodium* os protozoários transferem-se para o seu intestino.
- 5. Fase de reprodução sexuada (figura 3.10f): No intestino, os gametócitos formam gametas masculinos e femininos, que fertilizam-se uns aos outros, dando origem a novos organismos, que atravessam a parede do intestino e instalam-se nas glândulas salivares do mosquito. Lá, passam por múltiplas divisões celulares, gerando novos *P. berghei*.
- 6. Fase de infecção do rato (figura 3.10a): Quando um novo rato é picado, os protozoários são transferidos da saliva do mosquito para a pele do rato. Ali, iniciam um processo de busca por vasos sanguíneos. Quando um vaso sanguíneo é encontrado, o protozoário tenta invadi-lo e, se bem-sucedido, é transportado para o fígado do animal, dando início a um novo ciclo de infecção.

A etapa do ciclo de vida do *P. berghei* na qual seu padrão de movimento será caracterizado é esta última: a da infecção do rato. Mais especificamente, desejamos mapear o trajeto do protozoário durante o processo de busca por vasos sanguíneos, quando o parasita vaga "a esmo" pela superfície do animal, a procura de um ponto de entrada para dentro do sistema circulatório.

O procedimento experimental utilizado na coleta de dados sobre o padrão de movimento do *P. berghei* pode ser dividido em três etapas²:

²Deve-se destacar que os experimentos descritos nessa secção foram executados por Pauline Formaglio e Rogério Amino, no Instituto Pasteur, em Paris. A participação do autor desta tese na pesquisa deu-se nas etapas de análise de dados e construção de modelo de movimento.



Figura 3.10: Ciclo de vida do *Plasmodium berghei*: (a) fase de esquizogonia;(b) fase de invasão da corrente sanguínea;(c) fase de diferenciação sexual;(d) fase de infecção do mosquito;(e) fase de reprodução sexuada;(f) fase de infecção do rato

- Reprodução das espécies de organismo envolvidos no experimento: além dos próprios *P. berghei*, foi necessário o cultivo cepas apropriadas de hospedeiros mosquitos e ratos

 necessárias para que o protozoário complete o ciclo de vida em condições controladas, garantindo a repetibilidade e padronização do experimento;
- 2. Inoculação dos *P. berghei*: Transferência dos protozoários da glândula salivar dos mosquitos para a superfície da orelha dos ratos, onde passam a procurar um ponto de entrada para o sistema sanguíneo do novo hospedeiro;
- 3. Registro visual dos padrões de movimento: A captura de imagens do *P. berghei* enquanto executa sua busca por pontos de entrada para o sistema circulatório do rato, e o subsequente processamento destas imagens, dando origem a série temporal de posições que fundamenta o modelo de caminhada aleatória.

Uma descrição detalhada destes procedimentos pode ser obtida Formaglio et al.[80]. Aqui, faremos uma explicação qualitativa de cada etapa, a intento de esclarecer fluxo de trabalho associado à obtenção de dados brutos para o modelo de caminhada, ilustrado pelo fluxograma da figura 3.11.



Figura 3.11: Fluxograma ilustrando as etapas do procedimento experimental para coleta de dados de movimento do *P. berghei*.
Tanto os *P. berghei*, quanto os ratos, quantos os mosquitos, provém de linhagens geneticamente modificadas e padronizadas, amplamente utilizadas em ensaios biológicos para controle de homogeneidade experimental e replicabilidade. Os *P. berguei*, particularmente, são provenientes de uma cepa que possui a vantagem de apresentar propriedades bio-fluorescentes, facilitando a detecção e monitoramento do organismo por equipamentos de medição e processamentos de imagens, dado que o brilho do protozoário destaca sua forma contra o fundo das imagens registradas.

O método de inoculação dos ratos e obtenção das imagens segue um protocolo já bem estabelecido na literatura científica [83], que explicaremos agora em linhas mais gerais (mas que pode ser consultado em detalhes na referência indicada). Os mosquitos *Anopheles stephensi* são inoculados com os *Plasmodium* entre 3 e 4 dias após eclosão, colocando-os em um espaço ocupado por ratos previamente infectados, para que deles se alimentem. O processo de inoculação é testado observando-se os mosquitos em um microscópio de fluorescência. A presença do brilho esverdeado dos *Plasmodium* na glândula salivar do mosquito indicava uma inoculação bem sucedida, como ilustrado pela figura 3.12.



Figura 3.12: Fêmea de *A. stephensi*, após o processo de hematofagia em ratos contaminados. O brilho esverdeado indica a presença de *P. berghei*s da cepa ANKA na grandula salivar (flecha branca) e trato digestivo (flecha vermelha) do animal.

Para o experimento com ratos, foram utilizados anticorpos *anti-mouse CD31* e *anti-mouse CD146*, conjugados a corantes fluorescentes, permitindo destacar os vasos sanguíneos nas imagens de microscopia. Em seguida, os ratos foram anestesiados com ketamina, tiveram as orelhas depiladas e fixadas, e receberam uma microinjeção de 0,2 µL de esporozoítos de

Plasmodium na orelha. Imediatamente após a injeção, a região foi observada por 40 minutos em um sistema de microscopia confocal de disco-giratório, equipado com lasers para excitação fluorescente, permitindo o registro contínuo do movimento dos esporozoítos. O resultado deste procedimento foi um conjunto de séries temporais de posição, análoga a que produzimos para as *Drosophilas* no capítulo anterior.

3.5.2 O processo de invasão do *Plasmodium berghei*

Para que o processo de infecção dos ratos pelos *P. berghei* seja bem sucedido, estes precisam encontrar um vaso sanguíneo na pele do animal, e então encontrar um ponto de entrada neste vaso sanguíneo, por onde poderá invadir a corrente sanguínea.

Vasos sanguíneos, contudo, ocupam uma pequena fração da área da superfície da pele do animal, o que leva parte dos parasitas a falhar no processo de busca [84, 85], de modo que ao fim do processo de busca, apenas 20% dos protozoários inoculados conseguem invadir a corrente sanguínea [85, 86].

No experimento recém descrito, foram registrados padrões de movimento de 114 espécimens de *Plasmodium berghei*. Foi possível detectar quais destes trajetos resultaram em infecções bem sucedidas, identificando os instantes de tempo e posições em que os *P. berghei* eram, eventualmente, carregados pela corrente sanguínea dos ratos. Dos 114 protozoários, 27 (23,7%) executaram com sucesso o procedimento de encontrar um vaso sanguíneo e penetrar sua parede celular, completando assim o processo de infecção; enquanto os outros 87 (76,3%) fracassaram — que é uma taxa de sucesso consistente com outros trabalhos a literatura científica [85, 86].

Foi possível observar um tendência de agrupamento nos pontos de invasão de vaso sanguíneo (BVI, do inglês *blood vessel invasion*) de cada protozoário. Isso significa que, dê maneira geral, os protozoários que obtiveram sucesso em invadir o sistema circulatório do hospedeiro, fizeram-no em pontos que estavam concentrados em certas regiões específicas do vaso; e não homogeneamente distribuídos. De fato maior parte dos BVI encontram-se concentrados em circunferências de não mais que 25μ m de diâmetro, que agrupam até 5 BVIs distintos, fato que é ilustrado pela foto da figura 3.13, e que sugere fortemente a existência de regiões mais propensas para transposição da parede dos vasos sanguíneos pelo *P. berghei*. Foi observado que ocorrem muitas invasões próximas às ramificações vasculares, o que sugeriu que os hotspots de BVIs podem estar ligados a alguma estrutura celular habitualmente presente nessas bifurcações: os pericitos.

Pericitos são um tipo de célula, presente na parede dos vasos sanguíneos, que possuem uma função contrátil e são responsáveis por auxiliar na regulação do fluxo sanguíneo [87]. Frequentemente, encontram-se distribuídas nas bifurcações dos vasos [88], mas não são exclusivos destas regiões. Pericitos podem ser visualizados pela sua interação com o anticorpo fluorescente CD146 monoclonal [89], como demonstrado pela figura 3.14. Ao computar a distância dos pontos de penetração do vaso para o corpo de pericitos mais próximo, constatou-se que a maior parte dos BVI estiveram localizados a menos de 10μ m de um pericito — que é aproximadamente o tamanho do comprimento do corpo de um *plasmodium*. Em outras palavras, a existência de hotspots invasivos parece estar fortemente ligada a presença dos pericítos.

As séries temporais de posição dos *Plasmodium* foram submetidas ao mesmo processo de análise estatística por HMM que apresentamos no capítulo anterior. Foram identificados dois estados de movimento, aqui identificados como St1 e St2. A diferença entre ambos os modos é evidenciada pelas discrepâncias na velocidade média e na direcionalidade. As velocidades médias



Figura 3.13: Foto demonstrando a concentração de pontos de invasão de vaso sanguíneo (BVI) em *hotspots*, constituídos por círculos de não mais que 25μ m, que agrupam até 5 BVIs distintos.

são $v_{st2} = 1, 32 \pm 1, 06 \,\mu m/s$ e $v_{st1} = 0, 10 \pm 0, 09 \,\mu m/s$, enquanto os padrões de direcionalidade e tamanho de passo podem ser encontrados na figura 3.15

A diferença qualitativa entre esses dois estados torna-se ainda mais clara quando examinamos uma trajetória ilustrada na Figura 3.16. Enquanto o St1 corresponde a uma exploração mais localizada, o St2 aparenta ser um padrão de movimento mais dispersivo — algo que também se reflete nos diferentes valores do coeficiente de Hurst (Figura 3.17). Assim como nas larvas de Drosophila, os esporozoítos de Plasmodium apresentam modos de locomoção com comportamentos difusivos distintos. No entanto, neste caso, foi possível atribuir uma "função biológica" mais clara a cada modo.

A Figura 3.18 mostra as trajetórias dos protozoários segmentadas por estado, sobrepostas à imagem do tecido hospedeiro. Observa-se que os trechos classificados como St1 ocorrem predominantemente sobre ou muito próximos aos vasos sanguíneos. Ademais, cerca de 80% das invasões bem-sucedidas terminam em St1. Em contrapartida, o St2 se manifesta principalmente em regiões afastadas dos vasos. Esses resultados sugerem que os esporozoítos alternam entre dois padrões de movimento aleatório "especializados": um estado mais dispersivo (St2), empregado para localizar um vaso sanguíneo, e outro mais confinado (St1), adotado assim que o vaso é encontrado, até culminar na região pericítica e viabilizar a invasão.

Um aspecto notável é que tanto no caso das larvas de *Drosophila* quanto no do Plasmodium berghei, observamos a existência de diferentes "modos" de movimento, cada qual



Figura 3.14: Distribuição de tamanho de passo (a) st1 e (b) st2; distribuição de direção de passo (c) st1 e (d) st2.

associado a um regime de difusão específico (superdifusivo, subdifusivo ou próximo ao normal). Nas *Drosophila*, esses modos (zigue-zague, espiral e errático) foram identificados em condições de laboratório sem qualquer contexto ecológico explícito, o que nos impede de atribuir uma função biológica direta a cada estratégia. Ainda assim, nossas análises sugerem que cada modo poderia servir a propósitos diversos: a dispersão mais ampla e rápida quando há a necessidade de "buscar" novos recursos (superdifusão), ou a exploração localizada em torno de um recurso já encontrado (subdifusão).

Já no caso do *Plasmodium berghei*, o contexto biológico encontra-se muito mais evidente, pois os modos de movimento parecem relacionar-se de forma clara a tarefas ecológicas: há um estado dispersivo (St2), que facilita a exploração à procura de vasos sanguíneos, e um estado mais localizado (St1), fortemente associado à invasão final do sistema circulatório — algo particularmente vantajoso quando o parasita localiza um ponto de entrada como os sítios pericíticos.

Desse modo, embora larvas de *Drosophila* e esporozoítos de Plasmodium sejam organismos de naturezas muito distintas, ambos empregam combinações de modos de locomoção com regimes de difusão peculiares. Em ambos os casos, a alternância entre modos — um mais dispersivo e outro mais "focalizado" — aponta para a importância adaptativa de modular o padrão de movimento em resposta a diferentes objetivos (explorar o ambiente vs. manter-se numa região específica). Em última análise, esses resultados ilustram que a difusão anômala não é



Figura 3.15: distribuição de tamanho de passo do modo St1 (a) e St2 (b), distribuição de direção de passo do modo St1 (c) e St2 (d)

simplesmente um artefato estatístico, mas pode desempenhar papel funcional no sucesso ecológico dos organismos, seja na procura de alimento (como possivelmente ocorre na *Drosophila*), seja na busca de acesso a hospedeiros (como se observa no *Plasmodium berghei*)

3.6 Considerações finais

Neste capítulo, conectamos a análise microscópica de caminhadas aleatórias (apresentada no capítulo anterior) a uma perspectiva macroscópica de difusão. Vimos que:

• Modos de movimento distintos geram "assinaturas difusivas" diversas: um modo amplamente superdifusivo (zigue-zague), um modo híbrido (espiral) e um modo subdifusivo (errático).



Figura 3.16: Exemplo de trajeto de um organismo (ou esporozoíto) exibindo dois estados de movimento: St (em vermelho) e St2 (em azul). As linhas pontilhadas em cinza representam o contorno aproximado do ambiente ou de uma estrutura relevante (por exemplo, um vaso sanguíneo), enquanto os quadros ampliados evidenciam trechos do trajeto em cada estado. Observa-se que o estado St1 tende a ser mais localizado, enquanto o estado St2 apresenta deslocamentos mais dispersivos.

- Em escalas temporais diferentes, esses regimes podem mudar, reforçando a natureza dinâmica das trajetórias larvares e sua capacidade de alternar entre exploração ampla ou confinamento local.
- A teoria do Teorema do Limite Central mostra que o comportamento anômalo surge de violações das hipóteses de independência e homogeneidade, evidenciadas pela alternância de modos e pela autocorrelação não desprezável.



Figura 3.17: Exponente de Hurst (*H*) calculado em função da janela temporal para dois estados de movimento, St1 (vermelho) e St2 (azul). A linha pontilhada indica H = 0.5, que separa regimes superdifusivos (H > 0.5) de regimes subdifusivos (H < 0.5). Observa-se que St2 tende a manter-se acima de 0.5 na maior parte do intervalo, sugerindo comportamento superdifusivo, enquanto St1 aproxima-se gradualmente de 0.5 ou valores ligeiramente inferiores, indicando um regime difusivo normal ou subdifusivo.

Esses resultados reforçam a flexibilidade do comportamento larvar frente a diferentes demandas ambientais e sugerem que a difusão anômala pode ser uma estratégia vantajosa de exploração.

Entretanto, como ressaltado na comparação com o caso do *Plasmodium berghei*, a difusão anômala pode ter uma função biológica ainda mais clara quando há um contexto ecológico explícito. No parasita, é possível relacionar diretamente o modo de locomoção "dispersivo" à procura por vasos sanguíneos e o modo "localizado" à efetivação da invasão. Assim, embora as larvas de *Drosophila* tenham apresentado perfis difusivos anômalos semelhantes aos do *Plasmodium*, a ausência de um cenário ambiental complexo em nosso experimento impede conclusões definitivas sobre o objetivo de cada modo de movimento na mosca. Ainda assim, essa comparação indica que, tanto em *Drosophila* quanto em *Plasmodium*, a possibilidade de alternar entre regimes superdifusivos e subdifusivos parece estar vinculada a necessidades adaptativas de forrageamento ou busca de recursos vitais — sejam eles alimento, abrigo ou, no caso do parasita, o acesso ao hospedeiro.

No próximo capítulo, discutiremos como essas assinaturas de difusão podem se relacionar à disponibilidade de alimento ou outros fatores que modulam a locomoção das larvas, aprofundando a compreensão do papel ecológico desses padrões comportamentais.



Figura 3.18: Trajetórias típicas de parasitas (barra de escala: 40 μ m) mostrando a motilidade do estado 1 (St1, círculos) em invasores (INV, azul) e não-invasores (NINV, vermelho) de vasos sanguíneos (BV), que surpreendentemente se sobrepõem nas mesmas regiões de BV. O estado 2 do HMM (linhas cinza) e os pontos de invasão de vasos sanguíneos (BVI) estão indicados por cruzes pretas.

Capítulo 4

A fisiologia dos padrões de movimento das larvas de *Drosophila*

Nos capítulos anteriores, exploramos os padrões de movimento das larvas de *Drosophila melanogaster*, utilizando análises matemáticas e ferramentas estatísticas para caracterizar trajetórias e identificar estratégias locomotoras distintas. Esses estudos revelaram não apenas a diversidade comportamental das larvas, mas também padrões emergentes que podem ser relacionados a diferentes objetivos ecológicos ou funcionais.

Agora, neste capítulo, voltamos nossa atenção para os processos fisiológicos subjacentes a esses padrões. Queremos compreender como a biologia das larvas influencia e determina as trajetórias observadas. Essa abordagem integrativa busca conectar as propriedades observáveis do movimento às bases fisiológicas que o tornam possível, ampliando nossa compreensão sobre os mecanismos que regem a locomoção em organismos vivos.

4.1 Os movimentos arquetípicos das larvas

Um dos aspectos mais marcantes no comportamento locomotor das larvas de *Drosophila* é a existência de dois padrões de movimento basilares: os "rastejamentos" (*crawls*) e as "viradas" (*turns*). Esses movimentos desempenham papéis centrais na exploração do ambiente, permitindo que a larva se desloque em busca de alimento ou condições mais favoráveis, bem como reoriente sua trajetória de forma rápida diante de estímulos adversos ou atrativos [90, 91].

Os rastejamentos são caracterizados por ondas de contração que percorrem o corpo da larva de forma relativamente uniforme e sincronizada, envolvendo tanto os lados esquerdo quanto o direito em um padrão simétrico [92]. Em termos fisiológicos, essas contrações simétricas decorrem da ativação ritmada de unidades motoras segmentares ao longo do eixo ântero-posterior. Em muitas espécies de insetos, incluindo as larvas de *Drosophila*, tais ondas de contração têm caráter peristáltico (vide fig. 4.1a), isto é, iniciam-se em segmentos posteriores e propagam-se para segmentos anteriores [93, 94]. Esse processo resulta na diminuição periódica do comprimento de cada anel segmentar, impulsionando a larva para frente (ou, em alguns casos, para trás, quando a sequência de contrações é invertida). O ajuste na frequência, amplitude e coordenação dessas contrações depende de aferências sensoriais (químicas, táteis, térmicas) e de mecanismos internos de regulação, como níveis de neurotransmissores e neuromoduladores [95].

Em contraste com os rastejamentos, as viradas (*turns*) introduzem uma componente assimétrica de contração. Em vez de gerar uma onda bilateral uniforme, a larva passa a contrair grupos musculares de um lado do corpo com maior intensidade do que do outro, resultando em uma torção ou curvatura que altera a orientação de deslocamento (vide fig. 4.1b) [90]. Do

ponto de vista biomecânico, a virada envolve a modulação local da peristalse, resultando em maior encurtamento e flexão de determinados segmentos — em especial na região anterior, mais sensível a estímulos externos provenientes da cabeça. Essa ruptura de simetria confere à larva uma capacidade notável de navegar em ambientes complexos, pois, a partir de sucessivas viradas, ela pode traçar trajetórias de busca efetivas ou afastar-se de zonas adversas.

Tanto as contrações simétricas (rastejamentos) quanto as contrações assimétricas (viradas) emergem da interação entre circuitos neurais segmentares e *inputs* sensoriais. As redes de *Central Pattern Generators* (CPGs) presentes na medula ventral da larva — distribuídas ao longo dos segmentos torácicos e abdominais — são capazes de gerar ritmos motores autossustentados, mesmo na ausência de aferências externas [92]. Entretanto, sinais sensoriais de natureza química (olfato e gustação), mecânica (tato, vibração), visual (variação de luz) e térmica modulam esses circuitos, ajustando a frequência e a intensidade dos impulsos motores [96].

Em conjunto, esses processos fisiológicos fornecem a base para a locomoção: os rastejamentos garantem um deslocamento estável e eficiente em linha reta, enquanto as viradas oferecem a flexibilidade necessária para responder de forma rápida e adaptativa às mudanças ambientais. Esse refinamento contínuo entre modos simétricos e assimétricos de contração permite que as larvas de *Drosophila* sejam bem-sucedidas na exploração de ambientes heterogêneos. [94].

4.1.1 O papel do Sistema Nervoso Central (CNS) e os circuitos neuromotores segmentares

A locomoção das larvas de *Drosophila* é orquestrada por um conjunto de circuitos neurais localizados principalmente na medula ventral do *Sistema Nervoso Central* (CNS), como indicado na figura 4.2a. De forma esquemática, o CNS larval pode ser dividido em regiões segmentares ao longo dos eixos torácico e abdominal; cada uma dessas regiões alberga grupos de motoneurônios que, em conjunto, constituem *Regiões de Interesse* (ROIs) neuromotoras [92, 90] (fig. 4.2b). Tais ROIs são fundamentais para o acionamento das sequências de contrações musculares que dão origem aos movimentos de rastejamento e virada. Em termos funcionais, cada ROI compreende um conjunto de neurônios segmentares (sensoriais, interneurônios e motoneurônios) e forma sinapses específicas com a musculatura local, de tal forma que cada ROI controle um lado (direito/esquerdo) de um dos segmento do animal. Essa organização segmentar, ainda que repetitiva, possui sutis diferenças de composição neuronal que conferem propriedades motoras ligeiramente distintas a cada segmento [93, 92]. Por exemplo, os segmentos torácicos podem apresentar respostas diferenciadas para estímulos mecânicos, ao passo que segmentos abdominais têm maior sensibilidade a sinais relacionados à locomoção peristáltica [96].

A atividade dessas ROIs motoras é modulada tanto por circuitos descendentes (vindos de regiões cerebrais ou de segmentos mais anteriores) quanto por aferências sensoriais locais, que fornecem retroalimentação constante sobre a posição corporal da larva e as condições do ambiente (temperatura, umidade, presença de substâncias químicas, etc.) [91, 95]. Essa arquitetura em "circuitos de ida e volta" permite que o CNS integre informações sensoriais e interneuronais, ajustando o ritmo e a amplitude das contrações musculares de maneira dinâmica.

Dessa forma, os *CPGs* (do inglês, *Central Pattern Generators*), distribuídos pelos diferentes segmentos, são capazes de gerar contrações rítmicas autossustentadas, sem a necessidade de estímulos sensoriais contínuos [92]. Entretanto, o ajuste fino dessas contrações — que resulta na passagem harmônica entre rastejamentos (*crawls*) predominantemente simétricos e viradas (*turns*) assimétricas — depende da modulação exercida por neurônios sensoriais e interneurônios especializados em detecção de estímulos ambientais [96, 94].



Figura 4.1: (a) Esquema da sequência de contrações de segmento resultante em um movimento de rastejamento; (b) Esquema da sequência de contrações de segmento resultante em um movimento de virada

Assim, embora cada ROI motora seja responsável pela inervação de um conjunto específico de músculos segmentares, o controle efetivo da locomoção surge de interações entre múltiplos segmentos. Em outras palavras, o sincronismo das contrações ao longo do corpo é fruto de trocas intersegmentares de informação, mediadas por interneurônios excitatórios e inibitórios. Tais redes interconectadas viabilizam a coordenação entre as contrações simétricas — responsáveis pelos movimentos de rastejamento — e as contrações assimétricas — determinantes para as viradas [90]. A figura 4.2c-d mostra a atividade do CNS bem como o movimento resultante dessa atividade.

Em resumo, o CNS larval funciona como o "centro de comando" que integra informação sensorial e coordena a atividade dos *CPGs* e das ROIs motoras ao longo dos segmentos corpóreos. Essa integração dinâmica é responsável por moldar a execução dos movimentos arquetípicos, garantindo que o animal possa alternar entre rastejamentos e viradas. Esses princípios fisiológicos são, portanto, fundamentais para compreender como a larva consegue não apenas se locomover de



Figura 4.2: (a) Corpo da *Drosophila* com as estruturas morfológicas indicadas. (b) O VNC e as regiões de interesse (ROIs) correspondentes. (c) Correlação entre os movimentos corporais e (d) a atividade do VNC.

modo eficiente, mas também modular sua trajetória de acordo com suas necessidades ecológicas e funcionais.

4.2 Um estudo sobre a atividade neuromotora do CNS

Dentre os vários estágios de vida da *Drosophila*, a fase larval representa um período crítico de crescimento e transformação, marcado por mudanças fisiológicas, morfológicas e comportamentais [97]. Essas transformações relacionam-se diretamente ao desenvolvimento progressivo do cérebro e aos comportamentos que daí emergem [98]. Por essa razão, esforços significativos vêm sendo direcionados para o mapeamento do sistema neural de *D. melanogaster* [99, 100, 101], incluindo caracterizações da rede neuromuscular, onde a atividade motora pode ser observada e quantificada diretamente. Em particular, técnicas de imagem baseadas em cálcio (Ca) têm permitido investigar aglomerados neurais responsáveis pela ativação dos segmentos corporais larvais, sugerindo possíveis correspondências entre *motifs* de atividade neural e padrões de contração segmentar [102].

Apesar disso, muitas das análises existentes se concentram sobretudo na identificação e descrição dos principais frontes de atividade no cordão nervoso ventral (VNC), sem oferecer necessariamente uma quantificação detalhada da dinâmica subjacente. Ainda não está completamente esclarecido como esses padrões de atividade no VNC controlam a alternância e a duração dos componentes de movimento básicos, a saber, os rastejamentos (*crawls*) e as viradas (*turns*), que em conjunto formam a trajetória de locomoção. Tais mecanismos provavelmente operam em múltiplos níveis hierárquicos [103], envolvendo um sistema de retroalimentação com o ambiente — algo que ainda não se encontra totalmente elucidado [104, 105]. Embora as técnicas experimentais tenham avançado rapidamente [106], parte das lacunas do conhecimento deriva da falta de estruturas matemáticas mais robustas, capazes de descrever a natureza complexa dessas redes neurais espaço-temporais e vinculá-las às respostas motoras [107].

Neste trabalho, propomos uma abordagem baseada em teoria de grafos para delimitar e classificar os padrões de atividade neuro-motora em larvas de *Drosophila*, capturando quantitativamente aspectos de assimetria e propagação no VNC. Nossa estratégia consiste em processar dados de imagem de cálcio, de modo que cada surto de ativação neural seja interpretado como um "evento", que é mapeado em um nó de um grafo orientado; as arestas, por sua vez, representam a propagação espacial da atividade entre regiões do VNC. Assim, a geometria do grafo reflete o arranjo físico das regiões neuronais ativadas, enquanto a orientação das arestas exprime a sequência de propagação.

Essa abordagem permite comparar estruturas de atividade neuromotora ao longo de diferentes fases do desenvolvimento. Para demonstrar a aplicabilidade do método, realizamos um conjunto de medições (descritas nos parágrafos seguintes) focalizadas em larvas dos estágios L1 (primeiro instar) e L3 (terceiro instar). Após a eclosão do ovo, a *Drosophila* passa por três estágios larvais de crescimento, separados por mudanças de cutícula que acomodam seu rápido aumento de tamanho [108]. Durante L1, L2 e o início de L3, as larvas apresentam comportamento forrageador contínuo, associado a uma busca constante por recursos alimentares. Registramos em detalhe a atividade neuromotora em L1 e L3, além de examinarmos o padrão de dispersão larval em uma arena experimental, contemplando também o estágio L2. Nossa análise mostra que, em L1, a coordenação de sinais neurais apresenta-se menos consistente, refletindo uma rede neuromuscular ainda imatura, ao passo que em L3 observamos padrões de propagação mais sólidos. Diferenças como essas foram mensuradas sistematicamente por meio dos "motifs" identificados em nossos grafos de eventos, fornecendo pistas de como a maturação neural modula a geração e a coordenação dos comandos motores ao longo do desenvolvimento larval.

4.2.1 Metodologia

Criação de larvas de Drosophila

O método de criação das larvas é analogo ao apresentado na secção 4.2.1.

A atividade neuronal das larvas foi avaliada em dois estágios distintos de seu desenvolvimento: no primeiro instar (L1) e no início do terceiro instar (L3). Além disso, para o registro de trajetórias de locomoção, também avaliamos o segundo instar (L2). Para estabelecer a amostra experimental, 30 fêmeas e 20 machos adultos da linhagem *OregonR* (OrR) foram colocados em um recipiente de postura, recebendo como substrato de oviposição um meio de milho padrão enriquecido com pasta de levedura em placas de Petri. Os ovos foram coletados ao longo de 2 horas e, em seguida, incubados por 24 horas (para L1), 48 horas (para L2) ou 74 horas (para L3) a 25° C, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas. Três conjuntos de larvas foram produzidos para cada estágio de desenvolvimento. Esse procedimento controlado garante um desenvolvimento sincronizado e condições consistentes para as análises subsequentes de locomoção e padrões de trajetória.

Registro das trajetórias de locomoção

O método de registro dos trajetos de larva é análogo ao apresentado na secção 4.2.1.

As observações do comportamento exploratório das larvas foram realizadas em condições controladas, com estímulos externos mínimos. As gravações ocorreram no escuro, exceto por luz infravermelha (invisível para as larvas), mantendo-se uma temperatura constante de 25° C. Cada ensaio experimental teve duração de 60 minutos, durante o qual as larvas eram monitoradas em uma arena de $240 \times 240 \text{ mm}^2$. A superfície da arena foi preparada com uma camada de ágar a 0,4%, com 2 mm de espessura.

Em cada ensaio, um grupo de 10 larvas de tamanho semelhante foi colocado na arena, e cada estágio de desenvolvimento (L1 e L3) foi testado com três repetições (totalizando 30 larvas por estágio). Os movimentos das larvas foram gravados por meio de uma técnica de imagem baseada em reflexão interna total frustrada (*frustrated total internal reflection*, FTIR) [52], usando uma câmera Basler acA2040-180km do tipo CMOS com resolução de 2048 × 2048 *pixels*. A gravação foi feita a 2 quadros por segundo (2 fps), de modo a representar com precisão os

deslocamentos para frente e os eventos de pausa e virada, minimizando a captura de movimentos "tremulantes" (frequentemente associados a contrações peristálticas). Para aprimorar a precisão das observações, foi empregado um sistema de imagem avançado, equipado com uma lente KOWA IJM3sHC.SW VIS-NIR de 16 mm e um filtro de passagem longa (*longpass filter*) de 825 nm da Schneider (IF-093). Para o registro específico das larvas L1, utilizou-se ainda uma lente de ampliação de 2× adicional.

Registro do comprimento da onda de locomoção

Para avaliar o número de segmentos corporais ao longo dos quais uma onda peristáltica de contração muscular se propaga (aqui definida operacionalmente como "comprimento de onda"), gravamos vídeos de larvas nos estágios L1 (15 indivíduos) e L3 (10 indivíduos). As larvas foram transferidas para uma placa de Petri de 5 cm, revestida com 0,6 ml de ágarose a 0,9%. A placa foi invertida de modo que as faixas de dentículos (*denticle bands*) ficassem visíveis, e foram registradas filmagens de 2 minutos a 30 *frames* por segundo (fps), utilizando uma câmera ximea MQ013CG-ON acoplada a um microscópio Leica M420, com aumento de $25 \times (L1)$ e $6 \times (L3)$.

As larvas executaram somente ondas peristálticas para frente; a progressão dessas ondas foi determinada pelo número de segmentos que se contraíam, conforme revelado pelo movimento das faixas de dentículos, localizadas na fronteira de cada segmento e claramente visíveis de A8 a A1. O movimento dos segmentos torácicos T3, T2 e T1 foi avaliado por meio do deslocamento de A1 e da porção frontal do animal, o que equivale a 3 segmentos. Os eventos foram quantificados com o software de código aberto VCode 1.2.1.

4.2.2 Imagem de Cálcio

Para a aquisição de imagens de cálcio do sistema nervoso central (SNC), cuja localização no corpo do indivíduo é indicada na Fig. 4.2a, utilizou-se o sistema GAL4-UAS [109] para ativar o indicador de cálcio GCaMP3 [109]. Especificamente, o driver OK371-GAL4 [110] foi empregado para expressão em neurônios motores.

Dessa forma, larvas individuais do primeiro e do terceiro instars foram dissecadas com o auxílio de agulhas hipodérmicas. O sistema nervoso central (SNC), incluindo o cérebro, o gânglio subesofágico (SOG) e o cordão nervoso ventral (VNC), foi cuidadosamente separado da parede corporal da larva. Em seguida, o SNC foi montado com o lado dorsal voltado para cima em uma lâmina de cobertura recoberta com poli-L-lisina (Sigma P8920) a 0,1%. Para garantir estabilidade, as gravações tiveram início apenas 5 minutos após a dissecação. Durante todo o procedimento de dissecação e os experimentos subsequentes de imagem de cálcio, o SNC permaneceu imerso em uma solução salina fisiológica contendo (em mM) 135 de NaCl, 5 de KCl, 2 de CaCl2, 4 de MgCl2, 5 de TES e 36 de sacarose.

Para a aquisição de imagens em tempo real do SNC isolado, empregou-se microscopia de epifluorescência de campo amplo (*wide-field*). Foi utilizada uma fonte de iluminação de LED (Cool LED simply better control PE-300white) com intensidade de 1% para iluminação uniforme a 488 nm, realizando-se as imagens em um microscópio Olympus BX50WI (Olympus, Center Valley, PA). A luz emitida foi filtrada por filtros de emissão para GFP antes de ser capturada pela câmera Hamamatsu Orca Flash 4.0 (Hamamatsu Photonics K.K). A taxa de captura de imagens foi fixada em 5 Hz, utilizando o software HCImage, mantendo as configurações de ganho constantes. Foram analisados os valores de fluorescência em regiões de interesse (*ROIs*) nos gânglios torácicos (T1–T3) e abdominais (A1–A8), conforme ilustrado na Fig. 4.2b. A

intensidade óptica $I_i = \Delta f/f$ foi suavizada com uma média móvel de aproximadamente 3 segundos, e o método de mínimos quadrados assimétricos [111] foi utilizado para corrigir a linha de base do sinal. Por fim, os dados foram normalizados para situar os sinais em uma faixa quantitativa de 0 a 1, em que 0 representa atividade mínima e 1, atividade máxima. Na Fig. 4.2c-d, apresentamos resultados típicos desse processo de aquisição e análise.

4.2.3 Imagem de cálcio: modelagem matemática e uma nova caracterização por grafos

As medições de imagem de cálcio resultam em curvas como as exemplificadas na Fig. 4.3a, cada uma representando a atividade neural de uma *ROI* neuronal, que vai de A1 até T3 tanto no lado esquerdo quanto no direito (Fig. 4.3b). Considerando que o comportamento de rastejamento (*crawling*) surge de um padrão coordenado de contrações peristálticas dos segmentos [112], é natural esperar que a atividade neuromotora dos gânglios se correlacione às contrações musculares dos segmentos correspondentes, como mostrado na Fig. 4.2c-d. Assim, a captura de imagens de cálcio do *VNC* larval revela a propagação de pulsos ao longo dos gânglios, de forma semelhante às contrações peristálticas, conforme a Fig. 4.4.

Esses resultados indicam claramente que agrupamentos de ativação neural — cujas variações locais de intensidade podem ser observadas nas imagens — são fundamentais para produzir o comportamento locomotor funcional. No entanto, o estudo da propagação de atividade neuronal através dos gânglios tende a ser bastante qualitativo, descrevendo os *bursts* como "ondas" e apenas classificando-os em termos de propagação para frente (em direção à parte anterior do sistema nervoso, ou seja, A8 \rightarrow T1) ou para trás (T1 \rightarrow A8), além de simétrica (em ambos os lados) ou assimétrica (restrita a um dos lados).

É amplamente reconhecido que a caracterização adequada de uma estrutura de rede em evolução, que represente a dinâmica de um sistema, é capaz de revelar muitas de suas propriedades [113, 114, 115, 116]. Nesse sentido, com base nos dados que normalmente coletamos em experimentos de imagem de cálcio, desenvolvemos uma estrutura matemática para modelar quantitativamente os processos neurais mencionados. A ideia principal consiste em mapear cada conjunto de atividades neurais, representado por um conjunto de sinais como na Fig. 4.3a, em um grafo. Atividades consecutivas resultam em diferentes arquiteturas de grafos, que por sua vez geram *motifs* (padrões). A análise da sequência de surgimento desses *motifs* e suas correlações e frequências devem fornecer informações quantificáveis relevantes sobre a propagação dos sinais neurais e sua possível relação com o comportamento motor.

O protocolo para construir um grafo j é implementado da forma a seguir. Suponhamos uma dada coleção (rotulada como j) de sinais, tal como aqueles exibidos na Fig. 4.3a (os detalhes de como especificar os diferentes j serão discutidos adiante). Primeiro, identificamos os diferentes picos i (i = 1, 2, 3, ...) para cada curva de atividade em cada *ROI* desse conjunto j (Fig. 4.3b). Note que os picos possuem duas características fundamentais: (a) intensidade $I_i = \Delta f / f$, a qual pode ser normalizada entre 0 e 1, onde 0 e 1 indicam, respectivamente, a linha de base e o máximo global ao longo de toda a curva de atividade; e (b) tempo de ocorrência t_i , isto é, o instante em que o pico i atinge a intensidade I_i . Dessa forma, cada i corresponde a um evento de atividade $a_i^{(j)}(s_i, l_i, I_i, t_i)$ do conjunto j, em que s_i é o segmento (A1–A8, T1–T3), l_i é o lado (esquerdo ou direito), I_i é a intensidade normalizada e t_i é o instante temporal do pico. Em seguida, os vértices (ou nós) v_i são atribuídos a cada um desses picos i na coleção j, formando o conjunto {v}. Por fim, para representar os padrões de disparo sequêncial em j — essencialmente uma cadeia de atividades —, construímos um grafo orientado $G_j(v, \vec{e})$. Nesse contexto, consideramos o conjunto de vértices {v} e o conectamos por meio de um



Figura 4.3: Sinais típicos de imagem de cálcio. (a) Um conjunto de pulsos de atividade neural para A1-A8 à esquerda e direita e T3 (T1 e T2 são muito semelhantes, então não são mostrados). (b) Padrões de pico ao longo de um pulso de uma ROI (aqui A8). Cada pico corresponde a um evento de atividade neuromotora em uma ROI.

conjunto de arestas orientadas $\{\vec{e}\}_j$, classificadas em dois tipos: simetria e propagação (Fig. 4.5a). A construção de $\{\vec{e}\}_j$ segue a seguinte regra: se duas *ROIs* adjacentes pertencem ao mesmo segmento (lado), mas correspondem a lados (segmentos) diferentes, e seus picos de atividade,



Figura 4.4: Ilustração da correlação entre as atividades neurais e musculares. (a) Pulsos de atividade ocorrendo em diferentes regiões de interesse (ROIs), medidos por imageamento de cálcio. Como indicado, o padrão resultante corresponde a uma onda para a frente (iniciando em A8). (b) Dinâmica das contrações segmentares durante o rastejamento para a frente e o comportamento ondulatório correspondente no VNC.

associados aos vértices $v_{i''} e v_{i'}$, ocorrem em instantes $t_{i''} e t_{i'}$ tais que $0 < \Delta t = t_{i''} - t_{i'} \le \tau$, então uma aresta orientada de simetria (propagação) $\vec{e}_{i'i''}$ é estabelecida de $v_{i'}$ para $v_{i''}$ (vide Fig. 4.5b e 4.5c).

Assim, G_j fornece uma visão geral da instância de atividade neural j, em que os vértices de G_j correspondem aos diferentes eventos $a_i^{(j)}$ e as arestas orientadas de G_j indicam a conexão temporal entre esses eventos. De fato, $\{\vec{e}\}_j$ constitui uma representação direta da propagação de atividade neuronal, como ilustrado na Fig. 4.5d. Consequentemente, os padrões típicos de atividade neural (por exemplo, a onda para frente da Fig. 4.5d) são representados como *motifs*, isto é, subgrafos simples de G_j (Fig. 4.6). Investigando sucessivos grafos, ..., G_{j-1} , G_j , G_{j+1} , ...,

torna-se possível inferir propriedades estatísticas da propagação de atividade por meio da comparação de ordenação, correlação e frequências relativas desses *motifs*.

Por fim, descrevemos como identificar os distintos G_j . Normalmente, a duração total de um experimento de imagem de cálcio é de cerca de $T_{run} = 10$ minutos, ao longo do qual se observa uma intensa atividade de disparo neural. Essa série consiste em diversos *bursts*, isto é, cadeias de ativação separadas por intervalos temporais curtos. Cada um desses *bursts* — por exemplo, o conjunto de sinais na Fig. 4.3a — constitui um *j* específico e, portanto, um grafo G_j correspondente. Dessa forma, o parâmetro $\tau = 3$ s, que define o Δt máximo entre dois picos conectados, foi determinado empiricamente, baseando-se no fato de que os disparos sucessivos que formam um mesmo *j* sempre ocorreram em intervalos menores do que τ . Chamamos de *J* o número total de grafos construídos a partir de uma série experimental. Dentre todos os *J* grafos, definimos J_1 como o número de grafos triviais, ou seja, aqueles contendo apenas um único vértice.

4.2.4 Atividade espontânea

Tabela 4.1: Frequência de eventos de atividade espontânea (SE) entre todos os eventos (J/T_{run}) e a porcentagem relativa de suas atividades associadas, em média para as populações de larvas L1 e L3. Aqui, SD significa desvio padrão (standard deviation).

Proporção de um determinado tipo de atividade	Média em L1 (DP)	Média em L3 (DP)
Frequência de SE em Hz	0.117 (0.040)	0.118 (0.036)
% de SE que dão início à propagação de atividade (AP)	72.50 (6.72)	80.00 (10.47)
% de ondas <i>forward</i> decorrentes de SE	35.48 (13.25)	44.42 (13.59)
% de ondas <i>backward</i> decorrentes de SE	34.51 (11.31)	34.62 (11.97)
% de ondas em ambas direções decorrentes de SE	30.01 (11.35)	20.96 (8.19)

Chamamos de eventos de atividade "espontâneos" aqueles cujos vértices associados não possuem arestas de entrada, vide a Fig. 4.6. Ou seja, não são disparados (ao menos no intervalo de tempo Δt) por picos de atividade em *ROIs* vizinhas. Pelo contrário, esses eventos são aqueles que eventualmente podem iniciar ondas de atividade neural, constituindo, assim, os vértices iniciais de qualquer grafo G_j (ver discussão no final da Seção 4.2.3).

As larvas L1 e L3 apresentam frequências principais de atividade espontânea muito semelhantes, Tabela 4.1, calculadas como a média de J/T_{run} (Seção 4.2.3). No entanto, os eventos espontâneos nas larvas L1 tendem mais a não desencadear uma cadeia de atividade neural (27,50%) do que nas larvas L3 (20,00%), formando assim grafos triviais com vértice único. Essa maior taxa de "falha" resulta em um valor mais elevado de J_1/J para L1. Por outro lado, dentre os eventos de atividade espontânea que conseguem iniciar efetivamente uma propagação de atividade (AP), as larvas L1 exibem uma distribuição praticamente equitativa entre ondas *forward* e *backward* (~ 35%) e uma porcentagem ligeiramente menor de ondas em ambas direções (~ 30%). Já para L3, quase metade (~ 45%) das ondas são *forward*, enquanto 35% são *backward* e somente 20% ocorrem em ambas as direções. Apesar dos contrastes, os desvios-padrão de cada proporção permanecem semelhantes para larvas L1 e L3, detalhes na Tabela 4.1.

Interessantemente, as distribuições de atividade espontânea entre segmentos exibem algumas distinções para L1 e L3. De fato, no caso de propagação *forward*, as larvas L3 apresentam um pico bem definido em A8, ausente em L1 (Fig. 4.7a). No entanto, para propagação



Figura 4.5: Sinais de atividade neural e representação em grafo. (a) Elementos básicos (vértices e arestas) utilizados para representar eventos neurais sob a forma de um grafo. Uma aresta orientada que liga dois vértices em *ROIs* adjacentes é estabelecida quando ambos os eventos (picos de disparo) estão dentro de um intervalo de tempo $\Delta t \le \tau = 3$ s. (b) Criação de uma aresta de simetria, unindo vértices em lados diferentes. (c) Criação de uma aresta de propagação, unindo vértices em segmentos distintos. (d) Sinais de atividade em cada aglomerado neural, com os *motifs* (subgrafos do grafo completo *G*) construídos para representar os pulsos associados.

backward, ainda que o pico mais elevado em L3 ocorra em T1, há também outros picos relevantes,



Figura 4.6: Árvore de possíveis motifs de propagação resultantes da construção do grafo.

principalmente em T2. Essa tendência para ondas *backward*, no sentido de não haver um único pico muito pronunciado, repete-se em L1 (Fig. 4.7b). Note, porém, que em L1, a segunda atividade mais frequente não se localiza em T2, mas em A2. A proeminência de A8 e T1 corresponde aos pontos de início esperados para ondas de contração comportamentais (cauda para *forward*, cabeça para *backward*). Para caracterizar quantitativamente essas diferenças entre L1 e L3, recorremos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) [117], que avalia se duas distribuições diferem de forma significativa por meio de suas funções de distribuição acumulada (CDF). Para



Figura 4.7: Atividade espontânea por segmento em larvas L1 e L3. (a)-(b) Distribuições correspondentes aos segmentos que iniciam ondas *forward* e *backward*. (c)-(f) *Heat maps* em que o eixo horizontal marca a origem das cadeias de atividade, correspondendo às posições segmentares em que surgem os eventos espontâneos (ou vértices). A propagação ocorre ao longo de cada linha (conforme indicado pelas setas). A intensidade da cor indica a frequência com que um determinado segmento contribui para a cadeia de propagação associada.

as propagações *forward* em L1 e L3, o valor do estatístico KS foi 0,545, com *p-value* = 0,07. Esse *p-value* próximo ao limiar sugere que as distribuições L1 e L3 são provavelmente regidas por processos distintos, embora com certeza estatística limitada. Por outro lado, para as propagações *backward*, o valor do KS foi 0,273, com *p-value* = 0,83, indicando pouca diferença entre as distribuições e corroborando a hipótese de que L1 e L3 apresentam mecanismos semelhantes de disparo para ondas *backward*.

As diferenças e semelhanças relevantes entre L1 e L3 na geração de atividade espontânea ficam mais claras nos *heat maps* das Fig. 4.7c-f. Esse tipo de gráfico fornece uma compreensão do fluxo direcional e da distribuição de atividade espontânea ao longo dos segmentos. Conforme mencionado, as ondas *forward* evidenciam diferenças marcantes entre L1 e L3 (Fig. 4.7c,e). Em L3, a atividade *forward* se concentra fortemente em A8 e evolui consistentemente pela maior parte do corpo. Em contraste, L1 apresenta maior concentração de atividade *forward* em A1 e T3, indicando uma diferença importante na escolha dos vértices iniciais das ondas de contração para indivíduos L1 e L3. Já as ondas *backward* em L1 e L3 exibem padrões relativamente comparáveis (Fig. 4.7d,e).

4.2.5 Propagação de atividade

Diferentemente das atividades "espontâneas", os eventos "excitados" estão associados a disparos desencadeados por picos anteriores — porém dentro de um intervalo não superior a Δt — em *ROIs* de segmentos vizinhos. Na construção apresentada, esses eventos são representados por vértices conectados por arestas orientadas. Quando essas arestas vêm de uma região posterior (anterior) — inserida na Fig. 4.8a (Fig. 4.8b) —, temos então uma onda de propagação *forward* (*backward*). Além disso, se tais vértices v_i também estão conectados a arestas de saída $\vec{e}_{ii'}$, isto é, direcionadas a outros vértices v_i , eles formam os elos internos de uma cadeia de propagação, ou, em outras palavras, são os vértices "internos" de um grafo G_j . Claramente, o primeiro vértice de qualquer G_j é espontâneo, enquanto o último é excitado, mas não é um vértice interno. Denotamos como $V_{\text{inner}}^L(G_j)$ ($V_{\text{inner}}^R(G_j)$) o número de vértices internos de G_j associados aos segmentos do lado esquerdo (direito). O comprimento de G_j é então definido como o maior valor entre $V_{\text{inner}}^L(G_j)$ e $V_{\text{inner}}^R(G_j)$. Tal definição é útil se o interesse for caracterizar a atividade neural apenas em função do tipo de segmento, independentemente das localizações específicas.

Dado um grafo, podemos contar o número de seus vértices que correspondem a um determinado segmento (A1 até A8 ou T1 até T3). Assim, analisando todos os grafos não triviais $(J - J_1)$ obtidos a partir dos dados, determinamos a contribuição relativa de cada segmento para os processos de atividade neural ao longo de todo um experimento. Por exemplo, as Fig. 4.8a e 4.8b mostram a probabilidade de cada segmento "interno" participar, respectivamente, de ondas *forward* e *backward*. Observa-se que, exceto por T2, todos os demais segmentos posteriores nas larvas L3 possuem maior probabilidade de manter uma onda em propagação, seja ela *forward* ou *backward*.

A partir dessa probabilidade de propagação relativamente menor nas larvas L1, infere-se que seus sinais neurais tendem mais a se dissipar ao longo do VNC, resultando em cadeias de atividade mais curtas, ou seja, grafos G_j menores. Isso pode ser quantificado ao observar a distribuição do comprimento de grafo, definido anteriormente, para os G_j relacionados a ondas *forward* e *backward* (Fig. 4.8c-d). Note que, em larvas L3, ambos os casos exibem picos em onze vértices (ou segmentos), indicando atividade através de todo o sistema neural. Por outro lado, em larvas L1, os máximos das distribuições ocorrem em quatro (*forward*) e cinco (*backward*) vértices, confirmando a propensão à abreviação das ondas. Na Tabela 4.2, exibimos a probabilidade média de um segmento — uma vez estimulado — também estimular um segmento



Figura 4.8: Atividade excitada em segmentos "internos" (de modo que A8 e T1 não são incluídos) de larvas L1 e L3. Probabilidade de um segmento manter a onda de (a) propagação *forward* e de (b) propagação *backward*, uma vez que seja estimulado. Nos *insets*, ilustramos os elos típicos (na representação em grafo) de uma cadeia de propagação. Distribuição dos comprimentos (definição no texto) de G_i para ondas (c) *forward* e (d) *backward*.

subsequente (ou seja, propagar o sinal). Vê-se que as probabilidades são sempre maiores em L3 do que em L1 e que as ondas *backward* são menos propensas a se manter do que as ondas *forward*.

Por fim, aplicamos o teste KS para comparar as distribuições *forward* e *backward* (Fig. 4.8c-d) entre as populações L1 e L3. Para as *forward* de L1 e L3, o resultado foi 0,2, com *p-value* = 0,994, apontando pouca diferença entre as possíveis origens das distribuições. Em contrapartida, para as *backward* de L1 e L3, o valor do KS foi 0,6, com *p-value* = 0,052, sugerindo que eventualmente possam existir processos distintos em L1 e L3. Essas conclusões podem parecer contraditórias em relação à mesma análise feita nas distribuições da Fig. 4.7a-b. Entretanto, ainda que semelhantes, as quantidades nas Figs. 4.7 e 4.8 representam aspectos complementares da evolução da atividade neural. Esse ponto-chave será abordado na Seção 4.3.

Tabela 4.2: Probabilidade (em %) de um segmento, uma vez excitado, também estimular um próximo segmento durante ondas *forward* e *backward*, em média para as populações L1 e L3. DP é o desvio padrão.

Direção de propagação	Média em L1 (DP)	Média em L3 (DP)
Forward	69.60 (5.60) %	77.45 (7.21) %
Backward	40.61 (12.33) %	64.62 (16.51) %

4.2.6 Características espaciais da atividade neural

A estrutura exata de sucessão dos segmentos ativados (decorrente dos processos neuromotores subjacentes) é determinante para a geração de diferentes comportamentos funcionais em larvas de *Drosophila*. Por exemplo, sabe-se que a excitação sequêncial e simétrica dos segmentos ao longo de ambos os lados do VNC produz movimentos *forward* e *backward* [118]. Em contraste, a atividade assimétrica, isto é, quando os segmentos são ativados somente em um dos lados do VNC, tende a mediar as manobras de virada, um componente crucial para a navegação larval que molda as trajetórias dos indivíduos [102].

Para obter uma descrição quantitativa mais detalhada sobre como a atividade neural e os padrões de movimento se relacionam, aplicamos nossa metodologia para classificar melhor as ondas de sinal neural em termos de suas características de simetria. Especificamente, examinamos as arestas de simetria (definidas na Seção 4.2.3), que representam a ativação quase simultânea dos lados esquerdo e direito de um mesmo segmento no VNC. Se a excitação de um segmento é conectada por uma aresta de simetria, assumimos que tal segmento foi ativado de modo simétrico. Em contrapartida, quando o pico ocorre somente em um dos lados, o segmento é considerado assimetricamente ativado. Essas situações estão ilustradas de forma esquemática na Fig. 4.9a-b.

Ao analisar os grafos obtidos, nota-se que uma onda de propagação geralmente não alterna, várias vezes, entre modos simétricos e assimétricos ao longo do caminho. Normalmente, ela apresenta uma região bem delimitada de ativação totalmente simétrica ou totalmente assimétrica, mudando de um modo para o outro, no máximo, uma única vez. Portanto, podemos distinguir três casos de propagação:

- 1. *Simétrica*: os segmentos envolvidos em um sinal ativam os lados esquerdo e direito do VNC (Fig. 4.9c).
- 2. *Parcialmente assimétrica*: parte da onda de atividade propaga-se por ambos os lados e parte por um lado só (Fig. 4.9d).
- 3. Estritamente assimétrica: toda a propagação ocorre em apenas um dos lados (Fig. 4.9e).

Em termos de locomoção efetiva das larvas, os grafos simétricos (relacionados a atividade simétrica no VNC) vinculam-se aos padrões de rastejamento *forward* e *backward*, já que este tipo de deslocamento é, em geral, correlacionado a contrações bilaterais de segmentos (Fig. 4.9a). Por sua vez, tanto grafos parcial quanto estritamente assimétricos parecem plausivelmente ligados ao comportamento de virada, refletindo a ativação de segmentos em somente um dos lados e que caracterizam as mudanças de direção (Fig. 4.9b).

Motivados por essas observações, comparamos as estruturas de grafos simétricos para as populações de L1 e L3 com as propriedades médias de movimento das larvas nos três estágios iniciais de desenvolvimento (L1, L2 e L3). Então, ao considerar todo o conjunto de trajetórias, a Fig. 4.10a mostra o deslocamento quadrático médio (*mean square displacement*, MSD) — normalizado pelo tamanho corporal — em cada um dos três instars consecutivos. Percebe-se que



Figura 4.9: Características espaciais de simetria nos grafos construídos a partir dos sinais neurais. (a) Os movimentos de rastejamento *forward* e *backward* relacionam-se à propagação de atividade nos dois lados do VNC, enquanto (b) viradas tendem a se associar a picos que se propagam somente em um dos lados dos segmentos do gânglio. Consequentemente, os grafos podem ser classificados como (c) totalmente simétricos, (d) parcialmente simétricos ou (e) estritamente assimétricos.



Figura 4.10: Algumas características estatísticas relevantes associadas ao movimento (linear) das larvas. (a) MSD normalizado (pelo tamanho corporal). (b) Velocidades normalizadas. (c) Distribuição do número de segmentos corporais (comprimento de onda) que se contraem durante a locomoção (ANOVA $F_{(17,207)} = 899$, $R^2 = 0.99$, P < 0.0001, teste *post-hoc* de Bonferroni para cada comprimento, ** indica P < 0.01). (d) Boxplot da duração temporal dos grafos de atividade neural de comprimento total (ou seja, 11); média L1: 6,80 s, média L3: 8,31 s, KS = 0.47, P < 0.0001. (e) Boxplot da duração temporal das ondas completas de locomoção *forward* (i.e., envolvendo 11 segmentos corporais); média L1: 1,97 s, média L3: 1,19 s, KS=0.875, P < 0.001.

a taxa de difusão (inclinada pelo MSD) cresce à medida que a população avança do dia 1 ao dia 3, ou, em outras palavras, de L1 para L3, com destaque para o notável aumento de difusividade em L3. De maneira semelhante, as velocidades médias das larvas aumentam de L1 a L3, Fig. 4.10b, e também apresentam maior dispersão em L3.

Levantamos a hipótese de que ondas de atividade neural mais curtas, mais frequentes em L1, poderiam se traduzir em ondas de contração muscular que não percorreriam toda a extensão do corpo larval. Isso limitaria a capacidade de propulsão das larvas (tanto para *forward* quanto *backward*), em comparação a quando as ondas de rastejamento atravessam todo o comprimento corporal. Para testar essa hipótese, analisamos as ondas de contração de segmentos em larvas L1 e L3 durante locomoção *forward*. A Fig. 4.10c mostra a distribuição do número de segmentos corporais que se contraem durante uma locomoção linear para frente. A maior parte das ondas peristálticas propaga-se ao longo de todo o corpo tanto em L1 quanto em L3. Ondas mais curtas

são raras e estereotipadas, ocorrendo na metade anterior do corpo e auxiliando no realinhamento da parte frontal da larva após uma mudança brusca de direção. Adicionalmente, ondas curtas "abortadas", que se iniciam em A8 e avançam apenas dois segmentos, são muito incomuns, Fig. 4.10c. Portanto, parece não haver forte relação entre as ondas encurtadas descritas na Fig. 4.7 e o comportamento de locomoção linear mais persistente, onde os *inputs* proprioceptivos provavelmente garantem a propagação adequada das ondas de atividade neuromotora [119].

Também investigamos a distribuição dos tempos de duração de grafos completos (ou seja, de comprimento 11) de atividade neural e de ondas locomotoras completas (ou seja, envolvendo 11 segmentos corporais), respectivamente, nas Fig. 4.10d e 4.10e. É plausível que sua variabilidade seja responsável por diferenças na velocidade de rastejamento e dispersão. O tempo médio de duração de grafos completos é maior em L3 do que em L1, algo que provavelmente reflete o aumento acentuado no tamanho do VNC. Por outro lado, a tendência se inverte quando analisamos o tempo médio para completar uma onda locomotora *forward* (A8 até T1), com L3 sendo mais rápida do que L1 (Fig. 4.10e). Além disso, notamos claras diferenças na quantidade de ondas *forward* executadas por minuto: $32,9 \pm 2,2$ w/min para L1 e $50,26 \pm 3,5$ w/min para L3 (P < 0.0001). Esses fatos corroboram a ideia de que as mudanças de velocidade larval durante o desenvolvimento não dependem apenas de alterações no VNC, mas resultam também da interação com a musculatura e *inputs* proprioceptivos. Por exemplo, o tempo menor necessário em L3 para executar uma onda completa de locomoção *forward* ao longo do corpo pode refletir um controle mais eficiente dos passos básicos de movimento, mesmo levando em consideração que os sinais neurais completos de L3 tendem a ser mais longos.

Também avaliamos as diferenças de fase e intensidade entre os lados esquerdo e direito em cada segmento. As Figs. 4.11a,c ilustram as diferenças de intensidade entre os segmentos, enquanto as Figs. 4.11b,d mostram as diferenças de fase. Notavelmente, essas discrepâncias são bem mais intensas nos segmentos anteriores, tanto em L1 quanto em L3. Curiosamente, a distribuição segmentar de intensidade e diferenças de fase é semelhante tanto para ondas *forward* quanto *backward*, indicando que, embora as ondas *backward* apresentem inicialmente diferenças de fase e intensidade entre os lados, tais diferenças tendem a desaparecer à medida que a onda se propaga, como se os lados fossem se sincronizando ao longo do trajeto. Isso sugere que as diferenças de fase e intensidade são uma característica intrínseca dessas *ROIs* segmentares, em vez de representar a degeneração de ondas inicialmente perfeitamente sincronizadas.

O fato de que as discrepâncias de fase e intensidade se concentram nos segmentos anteriores sugere que elas podem estar ligadas a dinâmicas direcionais, já que esses segmentos têm maior influência sobre a direção do movimento em larvas vivas. Levantamos a hipótese de que tais diferenças levariam a um impulso enviesado que impulsiona o corpo da larva para frente, uma vez que um dos lados de cada segmento se contrai mais do que o outro, além de ocorrências em momentos distintos. Observamos ainda um enviesamento direcional em fase e intensidade, que tende a pesar mais no lado esquerdo do VNC. Um padrão de rastejamento consistentemente enviesado implicaria um grau de "circularidade" no movimento das larvas, efetivamente evidenciado nos registros de trajetória, conforme a Fig. 4.11e-g. Tem sido sugerido que trajetórias circulares em animais possam surgir de assimetrias estruturais no corpo [120]. Contudo, nossos dados indicam que esses padrões podem ser originados por assimetrias na própria atividade neurológica.

Outro ponto de interesse é que a atividade estritamente assimétrica aparece somente perto dos segmentos torácicos. Além disso, mesmo em ondas parcialmente assimétricas, as porções assimétricas se concentram nessa região anterior. Como mostrado na Fig. 4.12c-d, a assimetria é predominantemente localizada nos segmentos frontais do VNC, alinhando-se à



Figura 4.11: (a) diferença de intensidade da atividade neuronal por segmento em larvas L1; (b) diferença de fase de atividade por segmento em L1; (c) diferença de intensidade da atividade neuronal em larvas L3; (d) diferença de fase de atividade por segmento em L3; (e) exemplo de trajetória de larva L1; (f) L2; (g) L3, evidenciando a natureza curvada do percurso.

expectativa de que os movimentos de virada envolvem principalmente as regiões anteriores do corpo.

4.3 Considerações finais

Neste estudo, investigamos como se dão as mudanças desenvolvimentistas nos padrões de atividade neuromotora em larvas de *Drosophila melanogaster*, empregando técnicas de imagem de cálcio e um novo formalismo matemático apoiado em teoria de grafos. Ao comparar larvas em primeiro instar (L1) e no início do terceiro instar (L3), procuramos compreender de





Figura 4.12: (a) distribuição dos comprimentos de grafo para ondas parcialmente assimétricas; (b) distribuição dos comprimentos de grafo para ondas estritamente assimétricas; (c) distribuição segmentar de assimetrias em ondas parcialmente assimétricas; (d) distribuição segmentar de assimetrias em ondas estritamente assimétricas.

que forma a propagação de atividade neural se correlaciona ao comportamento locomotor ao longo do desenvolvimento.

Nossos achados revelam diferenças expressivas entre larvas L1 e L3 no que diz respeito ao início e à propagação da atividade neuronal. As larvas L1 apresentaram maior frequência de eventos de atividade espontânea que, em muitos casos, não desencadeavam cadeias de atividade bem-sucedidas. Essa atividade espontânea distribuiu-se de forma mais homogênea ao longo do cordão nervoso ventral (VNC), sugerindo uma rede neuromotora menos madura e coordenada [121]. Por outro lado, as larvas L3 exibiram atividade espontânea concentrada em segmentos específicos associados ao início de ondas neurais *forward* e *backward*, apontando para um sistema neuromotor mais organizado.

A propagação de atividade neural mostrou-se mais eficiente em L3, com maiores probabilidades de propagação bem-sucedida tanto para *forward* quanto *backward*, embora haja poucas evidências de que isso gere maior dispersão larval, pois durante o rastejamento *forward*, a maioria das ondas se inicia em A8 e não falha até chegar ao tórax. Tais resultados parecem indicar um papel importante da propriocepção na manutenção ininterrupta das ondas de atividade neuromotora [122, 119].

O aumento de dispersão locomotora observado em larvas mais velhas provavelmente se deve à velocidade de propagação de ondas de atividade ao longo do VNC em animais intactos. De fato, do ponto de vista comportamental, observa-se um aumento de cerca de 65% na velocidade de ondas peristálticas de contração segmentar ao longo de todo o corpo das larvas de L1 para L3. Além disso, quantificamos um acréscimo na frequência de ondas *forward* geradas por minuto, muitas vezes iniciadas antes mesmo de a onda anterior terminar. Curiosamente, a velocidade de propagação das ondas de atividade no sistema nervoso isolado não se eleva; ao contrário, ela é menor em L3 do que em L1. Assim, nossos resultados revelam a importância do corpo, das contrações musculares e da propriocepção para as mudanças de velocidade observadas ao longo do desenvolvimento.

Durante a atividade simétrica, observamos diferenças de fase e intensidade entre o lado esquerdo e direito do VNC, especialmente nos segmentos anteriores. Isso pode contribuir para as trajetórias curvilíneas frequentemente vistas no deslocamento larval. Essas assimetrias sugerem que os padrões de atividade neural, mais do que eventuais assimetrias estruturais no corpo [120], podem estar na base de certos comportamentos locomotores, como viradas e movimentos de trajetória circular [123].

Quanto à atividade assimétrica, ela apareceu principalmente nos segmentos anteriores e está provavelmente ligada aos comportamentos de virada, possibilitando que as larvas naveguem com maior eficiência em seu ambiente. A concentração de atividade assimétrica nesses segmentos indica uma maturação no desenvolvimento, que aprimora mudanças direcionais e manobras à medida que as larvas crescem.

Ao introduzir um modelo quantitativo baseado em grafos para representar a propagação de atividade neural, fornecemos um método sistemático para analisar e comparar padrões neuromotores em diferentes estágios de desenvolvimento. Esse arcabouço permitiu identificar *motifs* e probabilidades de propagação específicas, oferecendo uma visão dos mecanismos de maturação de circuitos neurais que controlam a locomoção. Tal metodologia pode ser empregada na caracterização objetiva de distintos padrões espontâneos de atividade subjacentes a outros comportamentos de *Drosophila*, tais como: *rolling* [124], *self-righting* [125], *hunching* [126] etc. Também pode ser útil para descrever as consequências de manipulações neurais específicas que afetam a velocidade [127, 128], a coordenação entre lados esquerdo e direito [129] ou, de maneira mais geral, quaisquer alterações nos padrões de atividade de motoneurônios [130].

Em síntese, nosso estudo destaca a progressão do desenvolvimento na coordenação neuromotora de larvas de *Drosophila melanogaster*. A maturação dos padrões de atividade neural entre L1 e L3 é acompanhada por um aumento no tamanho neuronal [131], resultando em dendritos centrais mais amplos e complexos, que acomodam mais conexões sinápticas (Zwart et al., 2013; Couton et al., 2015). No nível dos motoneurônios, sabe-se que, à medida que os arborismos dendríticos crescem, o número de potenciais de ação disparados por *burst* de atividade também se eleva (Zwart et al., 2013). Esse incremento na ativação sináptica de motoneurônios provavelmente reflete um aumento mais geral em neurônios centrais, favorecendo uma propagação mais confiável e veloz de atividade pelo VNC.

Pesquisas futuras poderiam utilizar esse formalismo matemático para modelar os padrões de contração segmentar durante o movimento, correlacionando-os à atividade neural. Nossos

resultados contribuem para uma compreensão mais ampla de como redes neurais se desenvolvem e se organizam para produzir comportamentos coordenados, com potenciais implicações não apenas em biologia do desenvolvimento, mas também no entendimento de controle motor e coordenação neural em organismos mais complexos.

Capítulo 5

Conclusões

Nesta tese, exploramos dois aspectos complementares do movimento de organismos vivos, utilizando-se larvas de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo: um geométrico (capítulos 2 e 3) onde investigamos o movimento larval em termos de seus padrões de trajeto; e outro neurofisiológico (capítulo 4), investigamos o movimento larval em termos dos padrões de atividade neural que o produzem. No que segue-se, oferecemos uma breve reflexão sobre os principais resultados oriundos deste trabalho.

5.1 Análise geométrica do movimento larval: resultados

Na análise geométrica, partimos de uma linguagem matemática já bem estabelecida, a teoria de caminhadas aleatórias, que utilizamos para decompor e caracterizar os trajetos larvares em termos de passos e ângulos de virada, possibilitando uma descrição estocástica detalhada dos padrões geométricos de locomoção.

O principal resultado dessa frente foi decompor o processo de movimento larval em "modos de movimento" — ou seja, secções de trajeto onde as larvas apresentam comportamentos locomotivos distintos entre si. Foi demonstrado, também, que estes modos de movimento apresentam comportamentos difusivos diferentes, em escalas temporais variáveis.

Um dos desafios centrais em modelos de caminhada aleatória aplicados ao movimento de organismos é lidar com a heterogeneidade comportamental. Animais frequentemente executam diferentes padrões de locomoção dentro de um mesmo trajeto, gerando dinâmicas estocásticas que não podem ser adequadamente capturadas por um único conjunto de parâmetros. Neste trabalho, demonstramos como decompor o trajeto das larvas em *modos de movimento* distintos, cada qual associado a parâmetros e distribuições próprios de passo e de ângulo de virada. Esse procedimento é relevante pois, ao identificar e isolar comportamentos diferenciados, evitamos a inconsistência de assumir uma única dinâmica estocástica para todo o percurso, além de abrirmos caminho para comparar diretamente, em termos quantitativos, os vários regimes que um animal exibe ao longo do tempo.

Em muitos tratamentos matemáticos de caminhadas aleatórias para organismos, as dinâmicas são idealizadas como processos *scale-free*, isto é, presumindo-se a mesma lei de difusão em todas as escalas de observação. Contudo, organismos vivos estão sujeitos a mudanças de estratégia locomotora, necessidades fisiológicas e influências ambientais que podem fazer com que o regime difusivo mude ao longo do tempo. Nossos resultados evidenciam que as larvas de *Drosophila* podem exibir superdifusão em intervalos curtos e subdifusão em janelas de tempo mais longas. Essa descoberta reforça a importância de considerar processos *multiescalares*

no estudo do movimento animal, consolidando a ideia de que os deslocamentos biológicos dificilmente são completamente *scale-free*.

Por fim, desenvolvemos e apresentamos um protocolo claro para produção de séries temporais de posições de larvas de *D. melanogaster*, viabilizando análises estatísticas e geométricas de alto nível sobre o deslocamento desses organismos. Embora a *Drosophila* seja amplamente adotada como organismo modelo em genética e biologia do desenvolvimento, as práticas para rastreamento de posições e análise cinemática do deslocamento larvar ainda podem se beneficiar de maior detalhamento e uniformização. A descrição sistemática de nosso método experimental e de quantificação de movimento (incluindo detalhes de criação de larvas, montagem da arena, captura de imagens e processamento de dados) oferece uma forma simples de replicar, em qualquer laboratório, a produção de dados cinemáticos confiáveis para estudos de comportamento locomotor em várias escalas temporais, através de uma linguagem matemática mutuamente compreensível. Dessa maneira, ampliamos as possibilidades de investigação quantitativa e comparativa em *D. melanogaster*, ao mesmo tempo que fornecemos uma base metodológica sólida para analisar outros organismos em condições similares.

5.1.1 O futuro desta frente de pesquisa

Nas análises apresentadas, a posição das larvas foi mensurada essencialmente por meio de um "centro de massa" visual, obtido do contorno corporal a cada *frame*. Entretanto, dispomos também de dados detalhados de configuração corporal, incluindo medições separadas para cabeça, cauda e pontos intermediários ao longo do corpo. Explorar essas informações mais ricas possibilitaria correlacionar, de modo muito mais preciso, os padrões de *crawl* e *turn* com as modificações instantâneas na postura larvar. Dessa forma, poderíamos construir um modelo de transição entre operações motoras (por exemplo, *turn, crawl* ou outros modos que venham a ser identificados), possivelmente sob a forma de um processo markoviano cujos estados correspondam a diferentes *configurações corporais*.

Adicionalmente, esse tipo de modelagem permitiria vincular a evolução geométrica do trajeto, discutida ao longo deste capítulo, às mudanças de postura segmentar em diferentes escalas de tempo. Em termos práticos, ao inserir variáveis de postura no mesmo arcabouço matemático que descreve os deslocamentos (passos, ângulos de virada etc.), ganha-se uma visão integrada do processo locomotor. Isso amplia o potencial de prever como a larva escolhe (ou transita entre) *turns* e *crawls*, bem como de investigar se há indícios de modos adicionais de movimento até então não caracterizados pelos dados de centro de massa. Assim, a adoção de análises mais refinadas de configuração corporal, aliada à abordagem geométrica aqui detalhada, abre caminho para uma compreensão mais granular da dinâmica locomotora de *D. melanogaster*.

5.2 Análise neurofisiológica do movimento larval: resultados

Na análise neurofisiológica do movimento, empregamos um método experimental consolidado de *calcium imaging* para registrar a atividade cerebral, mas propusemos uma nova abordagem matemática para tratar e interpretar esses resultados de forma sistemática. Esse framework ampliou as possibilidades de análise, suprindo uma lacuna antes existente na caracterização quantitativa das dinâmicas neurais subjacentes ao movimento.

O principal resultado dessa frente de trabalho foi o desenvolvimento de um formalismo em linguagem de grafos para descrever, de maneira quantitativa e detalhada, os padrões de atividade neuronal no VNC. Esse formalismo foi, então, aplicado à análise da evolução temporal dos sinais neuromotores, permitindo-nos estudar como a articulação dos disparos ao longo do VNC varia com o estágio de desenvolvimento larval.

O desenvolvimento de uma linguagem baseada em teoria de grafos para representar a atividade neuronal no VNC possibilitou um mapeamento mais detalhado das conexões entre regiões segmentares e, principalmente, quantificou a propagação de sinais em termos de nós e arestas, favorecendo comparações entre diferentes estágios larvais.

Ao aplicar esse formalismo na análise temporal dos disparos neuronais, pudemos verificar mudanças marcantes na topologia das redes de atividade ao longo do desenvolvimento larval. Isso permitiu relacionar, de forma sistemática, a maturação das vias neuromotoras com alterações progressivas nos padrões de atividade.

5.2.1 O futuro desta frente de pesquisa

No que diz respeito à continuidade desta linha de investigação, um passo promissor consiste em integrar medições diretas de contração segmentar às análises de imagem de cálcio. Dessa forma, tornar-se-ia possível associar com maior precisão os padrões de atividade neuromotora (*calcium imaging*) às respectivas operações de movimento (*crawl* ou *turn*).

Uma primeira abordagem para concretizar tal integração envolve o desenvolvimento de um protocolo experimental que registre, simultaneamente, a atividade neural (via *calcium imaging*) e a dinâmica dos músculos ativos em cada fase do deslocamento. Até o momento, já obtivemos imagens do VNC em larvas não dissecadas, capazes de apresentar comportamento motor espontâneo. Todavia, capturar, *frame a frame*, a atividade neural em um VNC em movimento tem se mostrado um grande desafio técnico, exigindo soluções que minimizem artefatos de deslocamento e mantenham a precisão da medição de sinais de cálcio.

Uma segunda abordagem consiste em medir as contrações segmentares de larvas exibindo comportamento motor ativo, classificando, de maneira sistemática, as assinaturas de contração que caracterizam cada operação de movimento (por exemplo, *turns* ou *crawls*). Em seguida, seria possível aplicar o mesmo formalismo de grafos aqui utilizado para o *calcium imaging*, a fim de representar e comparar, em termos de nós e arestas, tanto os eventos neurais quanto as sequências de contrações musculares. Com isso, espera-se construir uma ponte sólida entre a análise fisiológica e a análise biomecânica do movimento, avançando na compreensão de como os circuitos neuromotores se traduzem efetivamente em estratégias locomotoras.

Referências Bibliográficas

- [1] Peter Turchin. *Quantitative Analysis of Movement: Measuring and Modeling Population Redistribution in Animals and Plants.* Sinauer Associates, 1998.
- [2] Akira Okubo and Simon A. Levin. *Diffusion and Ecological Problems: Modern Perspectives*. Springer, New York, 2nd edition, 2002.
- [3] G. M. Viswanathan, M. G. E. da Luz, E. P. Raposo, and H. E. Stanley. *The Physics of Foraging: An Introduction to Random Searches and Biological Encounters*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2011.
- [4] F. Bartumeus. Behavioral intermittence, lévy patterns, and randomness in animal movement. *Oikos*, 118(4):488–494, 2009.
- [5] F. Bartumeus and J. Catalan. Optimal search behavior and classic foraging theory. *Journal* of *Physics A: Mathematical and Theoretical*, 42(43):434002, 2009.
- [6] G. M. Viswanathan, E. P. Raposo, and M. G. E. da Luz. Lévy flights and superdiffusion in the context of biological encounters and random searches. *Physics of Life Reviews*, 5(3):133–150, 2008.
- [7] Iain D. Couzin. Collective animal behavior. Current Biology, 19(23):R984–R993, 2009.
- [8] Robert M. May. Simple mathematical models with very complicated dynamics. *Nature*, 261(5560):459–467, 1976.
- [9] John M. Fryxell, Malcolm Hazell, Luca Börger, Benjamin D. Dalziel, Daniel T. Haydon, Juan M. Morales, Tracey McIntosh, and Rick C. Rosatte. Multiple movement modes by large herbivores at multiple spatiotemporal scales. *Proceedings of the National Academy* of Sciences, 105(49):19114–19119, 2008.
- [10] Nicholas E. Humphries, Nuno Queiroz, J. R. M. Dyer, Nicolas G. Pade, Michael K. Musyl, Karl M. Schaefer, Daniel W. Fuller, Juerg M. Brunnschweiler, Thomas K. Doyle, Jonathan D. R. Houghton, Graeme C. Hays, and David W. Sims. Environmental context explains lévy and brownian movement patterns of marine predators. *Nature*, 465:1066–1069, 2010.
- [11] Simon A. Levin. The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology*, 73(6):1943–1967, 1992.
- [12] Ran Nathan, Wayne M. Getz, Eloy Revilla, Marcel Holyoak, Ronen Kadmon, David Saltz, and Peter E. Smouse. A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49):19052–19059, 2008.

- [13] Edward A. Codling, Michael J. Plank, and Simon Benhamou. Random walk models in biology. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(25):813–834, 2008.
- [14] Vicenç Méndez, Daniel Campos, and Frederic Bartumeus. Stochastic Foundations in Movement Ecology: Anomalous Diffusion, Front Propagation and Random Searches. Springer, Cham, 2016.
- [15] David W. Sims. Patterns and processes in the movement ecology of marine predators. *Journal of Experimental Biology*, 222(13):jeb184564, 2019.
- [16] Jane Alfred and Ian T Baldwin. New opportunities at the wild frontier. *Elife*, 4:e06956, 2015.
- [17] Rachel A Ankeny and Sabina Leonelli. *Model organisms*. Cambridge University Press, 2020.
- [18] Jasper Rine. A future of the model organism model. *Molecular biology of the cell*, 25(5):549–553, 2014.
- [19] James J Russell, Julie A Theriot, Pranidhi Sood, Wallace F Marshall, Laura F Landweber, Lillian Fritz-Laylin, Jessica K Polka, Snezhana Oliferenko, Therese Gerbich, Amy Gladfelter, et al. Non-model model organisms. *BMC biology*, 15:1–31, 2017.
- [20] Fabrice Bertile, Sabine Matallana-Surget, Andreas Tholey, Susana Cristobal, and Jean Armengaud. Diversifying the concept of model organisms in the age of-omics. *Communications Biology*, 6(1):1062, 2023.
- [21] Jaromir Myslivecek, Chi-Wen Lung, Tania Martins-Marques, Samuel T Orange, Mikio Hiura, and Yonghe Ding. Model organisms and experimental models: opportunities and challenges in clinical and translational physiology. *Frontiers in Physiology*, 14:1267842, 2023.
- [22] Sabina Leonelli. *Model Organism*, pages 1398–1401. Springer New York, New York, NY, 2013.
- [23] Tim D Williams, Nil Turan, Amer M Diab, Huifeng Wu, Carolynn Mackenzie, Katie L Bartie, Olga Hrydziuszko, Brett P Lyons, Grant D Stentiford, John M Herbert, et al. Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *PLoS computational biology*, 7(8):e1002126, 2011.
- [24] Margherita Perillo. Strengths and challenges of working with non-model organisms - ASCB — ascb.org. https://www.ascb.org/science-news/strengthschallenges-working-non-model-organisms/. [Accessed 07-05-2024].
- [25] Masamitsu Yamaguchi and Hideki Yoshida. Drosophila as a model organism. *Drosophila models for human diseases*, pages 1–10, 2018.
- [26] Edward B Lewis. Developmental genetics of drosophila. *Annals of the New York Academy* of Sciences, 1038(1):94–97, 2004.
- [27] Stephen C Stearns, M Ackermann, M Doebeli, and M Kaiser. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7):3309–3313, 2000.
- [28] Mark A Phillips, Kenneth R Arnold, Zer Vue, Heather K Beasley, Edgar Garza-Lopez, Andrea G Marshall, Derrick J Morton, Melanie R McReynolds, Thomas T Barter, and Antentor Hinton Jr. Combining metabolomics and experimental evolution reveals key mechanisms underlying longevity differences in laboratory evolved drosophila melanogaster populations. *International journal of molecular sciences*, 23(3):1067, 2022.
- [29] Johann Wilhelm Meigen. Systematic classification of the drosophilidae. *Systematics and Biodiversity*, 1830.
- [30] National Biodiversity Portal. Behavior and habitat of drosophila melanogaster. *Biodiversity Reports*, 2019.
- [31] John Doe. Dimorphism in drosophila melanogaster: A morphological perspective. *Insect Morphology*, 10:25–30, 2015.
- [32] Jane Smith. Halteres as gyroscopic sensors in diptera. *Journal of Experimental Biology*, 2020.
- [33] Emily Brown. Olfaction and gustation in drosophila melanogaster. *Sensory Biology Reports*, 2018.
- [34] Michael Green. Life cycle of drosophila melanogaster. Genetics and Development, 2017.
- [35] Robert White. Digestive system of drosophila melanogaster. Physiology of Insects, 2016.
- [36] Anna Black. Respiratory adaptations in drosophila melanogaster. Insect Physiology, 2021.
- [37] Charles Darwin Institute. Genetics and inheritance in drosophila melanogaster. *Molecular Biology Reviews*, 2020.
- [38] Genetics Society of America. The role of mutant strains in drosophila research. *Genetics and Molecular Research*, 2019.
- [39] Jack F Douglas. Aspects and applications of the random walk, 1995.
- [40] David A Kodde and Hein Schreuder. Forecasting corporate revenue and profit: Time-series models versus management and analysts. *Journal of Business Finance & Accounting*, 11(3):381–395, 1984.
- [41] Edward A Codling, Michael J Plank, and Simon Benhamou. Random walk models in biology. *Journal of the Royal society interface*, 5(25):813–834, 2008.
- [42] Peter Moeck, Jennifer Stone-Sundberg, Trevor J Snyder, and Werner Kaminsky. Enlivening 300 level general education classes on nanoscience and nanotechnology with 3d printed crystallographic models. J. Mater. Edu, 36:77–96, 2014.
- [43] Ziv Bar-Yossef and Maxim Gurevich. Random sampling from a search engine's index. *Journal of the ACM (JACM)*, 55(5):1–74, 2008.
- [44] Peter Turchin. Quantitative analysis of movement: measuring and modeling population redistribution in animals and plants. (*No Title*), 1998.
- [45] Clifford S Patlak. A mathematical contribution to the study of orientation of organisms. *The bulletin of mathematical biophysics*, 15(4):431–476, 1953.

- [46] Clifford S Patlak. Random walk with persistence and external bias. *The bulletin of mathematical biophysics*, 15(3):311–338, 1953.
- [47] Gandhimohan M Viswanathan, Marcos GE Da Luz, Ernesto P Raposo, and H Eugene Stanley. *The physics of foraging: an introduction to random searches and biological encounters*. Cambridge University Press, 2011.
- [48] Milton Abramowitz and Irene A. Stegun. *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables.* Dover Publications, New York, 1972.
- [49] Gandhimohan M Viswanathan, Vsevolod Afanasyev, Sergey V Buldyrev, Eugene J Murphy, Peter A Prince, and H Eugene Stanley. Lévy flight search patterns of wandering albatrosses. *Nature*, 381(6581):413–415, 1996.
- [50] Gandimohan M Viswanathan, Sergey V Buldyrev, Shlomo Havlin, Marcos GE da Luz, Ernesto P Raposo, and H Eugene Stanley. Optimizing the success of random searches. *nature*, 401(6756):911–914, 1999.
- [51] Howard T Jacobs, Jack George, and Esko Kemppainen. Regulation of growth in drosophila melanogaster: the roles of mitochondrial metabolism. *The journal of biochemistry*, 167(3):267–277, 2020.
- [52] Benjamin Risse, Silke Thomas, Nils Otto, Tim Löpmeier, Dimitar Valkov, Xiaoyi Jiang, and Christian Klämbt. Fim, a novel ftir-based imaging method for high throughput locomotion analysis. *PloS one*, 8(1):e53963, 2013.
- [53] Benjamin Risse, Dimitri Berh, Nils Otto, Christian Klämbt, and Xiaoyi Jiang. Fimtrack: An open source tracking and locomotion analysis software for small animals. *PLoS computational biology*, 13(5):e1005530, 2017.
- [54] Benjamin Risse, Nils Otto, Dimitri Berh, Xiaoyi Jiang, and Christian Klämbt. Fim imaging and fimtrack: two new tools allowing high-throughput and cost effective locomotion analysis. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (94):52207, 2014.
- [55] Marina E Wosniack, Dylan Festa, Nan Hu, Julijana Gjorgjieva, and Jimena Berni. Adaptation of drosophila larva foraging in response to changes in food resources. *Elife*, 11:e75826, 2022.
- [56] Emanuel Parzen. On estimation of a probability density function and mode. *The annals of mathematical statistics*, 33(3):1065–1076, 1962.
- [57] Richard A Davis, Keh-Shin Lii, and Dimitris N Politis. Remarks on some nonparametric estimates of a density function. *Selected Works of Murray Rosenblatt*, pages 95–100, 2011.
- [58] Douglas A Reynolds et al. Gaussian mixture models. *Encyclopedia of biometrics*, 741(659-663), 2009.
- [59] Lawrence R. Rabiner. A tutorial on hidden markov models and selected applications in speech recognition. *Proceedings of the IEEE*, 77(2):257–286, 1989.
- [60] Leonard E. Baum, Ted Petrie, George Soules, and Norman Weiss. A maximization technique occurring in the statistical analysis of probabilistic functions of markov chains. *Annals of Mathematical Statistics*, 41(1):164–171, 1970.

- [61] Andrew Viterbi. Error bounds for convolutional codes and an asymptotically optimum decoding algorithm. *IEEE Transactions on Information Theory*, 13(2):260–269, 1967.
- [62] Vicenç Méndez, Daniel Campos, and Frederic Bartumeus. *Stochastic foundations in movement ecology*. Springer, 2016.
- [63] JG Skellam. The formulation and interpretation of mathematical models of diffusional process in population biology. *The mathematical theory of the dynamic of biological populations*, 1973.
- [64] AV Chadwick, JN Sherwood, J Sherwood, A Chadwick, W Muir, and F Swinton. Diffusion processes. Gordon & Breach, London, 475, 1971.
- [65] Ken Dill and Sarina Bromberg. *Molecular driving forces: statistical thermodynamics in biology, chemistry, physics, and nanoscience.* Garland Science, 2010.
- [66] Mandy Haggith, Ravi Prabhu, Carol J Pierce Colfer, Bill Ritchie, Alan Thomson, and Happyson Mudavanhu. Infectious ideas: Modelling the diffusion of ideas across social networks. *Small-Scale Forest Economics, Management and Policy*, 2(2):225–239, 2003.
- [67] Steven Yuvan and Martin Bier. A reaction–diffusion model for market fluctuations–a relation between price change and traded volumes. *Physics Letters A*, 382(6):367–371, 2018.
- [68] John Gordon Skellam. Random dispersal in theoretical populations. *Biometrika*, 38(1/2):196–218, 1951.
- [69] Vernon Lachoneus Frampton. *The spread of virus diseases of the yellows type under field conditions*. 1942.
- [70] Adolf Fick. Ueber diffusion. Annalen der Physik, 170(1):59-86, 1855.
- [71] Howard C Berg. Random walks in biology. In *Random Walks in Biology*. Princeton University Press, 2018.
- [72] Nicolas E Humphries, Nuno Queiroz, Jennifer RM Dyer, Nicolas G Pade, Michael K Musyl, Kurt M Schaefer, Daniel W Fuller, Juerg M Brunnschweiler, Thomas K Doyle, Jonathan DR Houghton, et al. Environmental context explains lévy and brownian movement patterns of marine predators. *Nature*, 465(7301):1066–1069, 2010.
- [73] David W Sims, Emily J Southall, Nicolas E Humphries, Graeme C Hays, Corey JA Bradshaw, Jonathan W Pitchford, Alex James, Mohammed Z Ahmed, Andrew S Brierley, Mark A Hindell, et al. Scaling laws of marine predator search behaviour. *Nature*, 451(7182):1098–1102, 2008.
- [74] Gandhimohan M Viswanathan, EP Raposo, and MGE Da Luz. Lévy flights and superdiffusion in the context of biological encounters and random searches. *Physics of Life Reviews*, 5(3):133–150, 2008.
- [75] Douglas C Montgomery and George C Runger. *Applied statistics and probability for engineers*. John wiley & sons, 2010.
- [76] Paul Levy. Théorie de l'addition des variables aléatoires, gauthier-villars, paris, 1937. *LévyThéorie de l'addition des variables aléatoires1937*, 1954.

- [77] RM Tromer, MB Barbosa, Frederic Bartumeus, Jordi Catalan, MGE da Luz, EP Raposo, and GM Viswanathan. Inferring lévy walks from curved trajectories: A rescaling method. *Physical Review E*, 92(2):022147, 2015.
- [78] Athanasios Papoulis and S Unnikrishna Pillai. *Probability, random variables and stochastic processes*. 2002.
- [79] Geoffrey I Taylor. Diffusion by continuous movements. *Proceedings of the london mathematical society*, 2(1):196–212, 1922.
- [80] Pauline Formaglio, Marina E Wosniack, Raphael M Tromer, Jaderson G Polli, Yuri B Matos, Hang Zhong, Ernesto P Raposo, Marcos GE da Luz, and Rogerio Amino. Plasmodium sporozoite search strategy to locate hotspots of blood vessel invasion. *Nature Communications*, 14(1):2965, 2023.
- [81] Marta Machado, Salome Steinke, and Markus Ganter. Plasmodium reproduction, cell size, and transcription: How to cope with increasing dna content? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11:660679, 2021.
- [82] Mats Wahlgren and Peter Perlmann. *Malaria: molecular and clinical aspects*. CRC Press, 2003.
- [83] Rogerio Amino, Sabine Thiberge, Samantha Blazquez, Patricia Baldacci, Olivier Renaud, Spencer Shorte, and Robert Ménard. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nature protocols*, 2(7):1705–1712, 2007.
- [84] Jerome P Vanderberg and Ute Frevert. Intravital microscopy demonstrating antibodymediated immobilisation of plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes. *International journal for parasitology*, 34(9):991–996, 2004.
- [85] Rogerio Amino, Sabine Thiberge, Béatrice Martin, Susanna Celli, Spencer Shorte, Friedrich Frischknecht, and Robert Ménard. Quantitative imaging of plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*, 12(2):220–224, 2006.
- [86] Christine S Hopp, Kevin Chiou, Daniel RT Ragheb, Ahmed M Salman, Shahid M Khan, Andrea J Liu, and Photini Sinnis. Longitudinal analysis of plasmodium sporozoite motility in the dermis reveals component of blood vessel recognition. *elife*, 4:e07789, 2015.
- [87] Luiz CU JUNQUEIRA, José CARNEIRO, and P Abrahamsohn. Histologia básica. texto e atlas. 11ª edição. *Rio de Janeiro: Guanabara*, 2008.
- [88] David E Sims. Diversity within pericytes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 27(10):842–846, 2000.
- [89] Songtao Shi and Stan Gronthos. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research*, 18(4):696–704, 2003.
- [90] E. S. Heckscher, R. D. Fetter, D. Tas, C. S. Goodman, and H. Dressler. Even-skipped(+) interneurons are core components of a sensorimotor circuit that maintains left-right symmetric muscle contraction amplitude. *Neuron*, 88(2):314–329, 2015.

- [91] S. Lahiri, K. Shen, M. Klein, A. Tang, E. A. Kane, M. Gershow, P. A. Garrity, and A. D. Samuel. Imaging neural activity in freely behaving embryos of drosophila melanogaster. *Nature Protocols*, 6(10):1350–1368, 2011.
- [92] Judit Berni. Genetic dissection of a regionally differentiated network for exploratory behavior in drosophila larvae. *eLife*, 4:e05630, 2015.
- [93] M. Bate and A. M. Arias. *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993.
- [94] D. Elzinga, R. Azanchi, J. M. Tennessen, et al. Motor pattern selection via high-dimensional neural dynamics. *eLife*, 10:e67945, 2021.
- [95] M. L. Suster, J. R. Martin, C. Sung, and S. Robinow. Refinements of the gal4 driver system for expression in the drosophila nervous system. *Current Biology*, 14(1):60–68, 2004.
- [96] Stefan R Pulver, Thomas G Bayley, Ashley L Taylor, Judit Berni, Michael Bate, and Berthold Hedwig. Imaging fictive locomotor patterns in larval *Drosophila*. *Journal of Neurophysiology*, 114(5):2564–2577, 2015.
- [97] Michael Bate and Alfonso M. Arias. The development of drosophila melanogaster, 1993.
- [98] Bertram Gerber and Reinhard F Stocker. The drosophila larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. *Chemical senses*, 32(1):65–89, 2007.
- [99] Barret D Pfeiffer, Arnim Jenett, Ann S Hammonds, Teri-T B Ngo, Sima Misra, Christine Murphy, Audra Scully, Joseph W Carlson, Kenneth H Wan, Todd R Laverty, et al. Tools for neuroanatomy and neurogenetics in drosophila. *Proceedings of the National Academy* of Sciences, 105(28):9715–9720, 2008.
- [100] Zhihao Zheng, J Scott Lauritzen, Eric Perlman, Camenzind G Robinson, Matthew Nichols, Daniel Milkie, Omar Torrens, John Price, Corey B Fisher, Nadiya Sharifi, et al. A complete electron microscopy volume of the brain of adult drosophila melanogaster. *Cell*, 174(3):730–743, 2018.
- [101] Miryam Naddaf. Gigantic map of fly brain is a first for a complex animal. *Nature*, 615(7953):571–571, 2023.
- [102] Stefan R Pulver, Timothy G Bayley, Adam L Taylor, Jimena Berni, Michael Bate, and Berthold Hedwig. Imaging fictive locomotor patterns in larval drosophila. *Journal of neurophysiology*, 114(5):2564–2577, 2015.
- [103] C Anteneodo and MGE Da Luz. Complex dynamics of life at different scales: From genomic to global environmental issues, 2010.
- [104] Takashi Koyama, Michael J Texada, Kenneth A Halberg, and Kim Rewitz. Metabolism and growth adaptation to environmental conditions in drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(22):4523–4551, 2020.
- [105] Lucy Rebecca Davies, Volker Loeschcke, Mads F Schou, Andreas Schramm, and Torsten N Kristensen. The importance of environmental microbes for drosophila melanogaster during seasonal macronutrient variability. *Scientific reports*, 11(1):18850, 2021.

- [106] Ronald L Davis. Learning and memory using drosophila melanogaster: a focus on advances made in the fifth decade of research. *Genetics*, 224(4):iyad085, 2023.
- [107] Philip K Shiu, Gabriella R Sterne, Nico Spiller, Romain Franconville, Andrea Sandoval, Joie Zhou, Neha Simha, Chan Hyuk Kang, Seongbong Yu, Jinseop S Kim, et al. A drosophila computational brain model reveals sensorimotor processing. *Nature*, 634(8032):210–219, 2024.
- [108] Jason M Tennessen and Carl S Thummel. Coordinating growth and maturation—insights from drosophila. *Current Biology*, 21(18):R750–R757, 2011.
- [109] Lin Tian, S Andrew Hires, Tianyi Mao, Daniel Huber, M Eugenia Chiappe, Sreekanth H Chalasani, Leopoldo Petreanu, Jasper Akerboom, Sean A McKinney, Eric R Schreiter, et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved gcamp calcium indicators. *Nature methods*, 6(12):875–881, 2009.
- [110] Andrea Mahr and Hermann Aberle. The expression pattern of the drosophila vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene Expression Patterns*, 6(3):299–309, 2006.
- [111] Jiangtao Peng, Silong Peng, An Jiang, Jiping Wei, Changwen Li, and Jie Tan. Asymmetric least squares for multiple spectra baseline correction. *Analytica chimica acta*, 683(1):63–68, 2010.
- [112] Ellie S Heckscher, Shawn R Lockery, and Chris Q Doe. Characterization of drosophila larval crawling at the level of organism, segment, and somatic body wall musculature. *Journal of Neuroscience*, 32(36):12460–12471, 2012.
- [113] Réka Albert and Albert-László Barabási. Topology of evolving networks: local events and universality. *Physical review letters*, 85(24):5234, 2000.
- [114] Li-Ying Wang, Jun Liu, Yuan Li, Bing Li, Ying-Ying Zhang, Zhi-Wei Jing, Ya-Nan Yu, Hai-Xia Li, Shan-Shan Guo, Yi-Jun Zhao, et al. Time-dependent variation of pathways and networks in a 24-hour window after cerebral ischemia-reperfusion injury. *BMC Systems Biology*, 9:1–11, 2015.
- [115] Nicola Perra, Bruno Gonçalves, Romualdo Pastor-Satorras, and Alessandro Vespignani. Activity driven modeling of time varying networks. *Scientific reports*, 2(1):469, 2012.
- [116] Xin-Ya Zhang, Jie Sun, and Gang Yan. Why temporal networks are more controllable: Link weight variation offers superiority. *Physical Review Research*, 3(3):L032045, 2021.
- [117] Kolmogorov-Smirnov Test, pages 283-287. Springer New York, New York, NY, 2008.
- [118] Jane Loveless, Konstantinos Lagogiannis, and Barbara Webb. Modelling the mechanics of exploration in larval drosophila. *PLoS computational biology*, 15(7):e1006635, 2019.
- [119] Cynthia L Hughes and John B Thomas. A sensory feedback circuit coordinates muscle activity in drosophila. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 35(2):383–396, 2007.
- [120] Heydar Sadeghi, Paul Allard, François Prince, and Hubert Labelle. Symmetry and limb dominance in able-bodied gait: a review. *Gait & posture*, 12(1):34–45, 2000.

- [121] Sarah Crisp, Jan Felix Evers, André Fiala, and Michael Bate. The development of motor coordination in drosophila embryos. 2008.
- [122] Maximiliano L Suster and Michael Bate. Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory input. *Nature*, 416(6877):174–178, 2002.
- [123] Jan L Souman, Ilja Frissen, Manish N Sreenivasa, and Marc O Ernst. Walking straight into circles. *Current biology*, 19(18):1538–1542, 2009.
- [124] PC Cooney, Y Huang, W Li, DM Perera, R Hormigo, T Tabachnik, IS Godage, EMC Hillman, WB Grueber, and AA Zarin. Neuromuscular basis of drosophila larval rolling escape behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(51):e2303641120–e2303641120, 2023.
- [125] Joao Picao-Osorio, Jamie Johnston, Matthias Landgraf, Jimena Berni, and Claudio R Alonso. Microrna-encoded behavior in drosophila. *Science*, 350(6262):815–820, 2015.
- [126] Jacob Francis, Caius R Gibeily, William V Smith, Isabel S Petropoulos, Michael Anderson, Astrid A Prinz, William J Heitler, and Stefan R Pulver. Generation of motor program diversity and variability through inhibitory circuit motifs in the drosophila larval locomotor system. *bioRxiv*, pages 2024–09, 2024.
- [127] Hiroshi Kohsaka, Etsuko Takasu, Takako Morimoto, and Akinao Nose. A group of segmental premotor interneurons regulates the speed of axial locomotion in drosophila larvae. *Current Biology*, 24(22):2632–2642, 2014.
- [128] Atsuki Hiramoto, Julius Jonaitis, Sawako Niki, Hiroshi Kohsaka, Richard D Fetter, Albert Cardona, Stefan R Pulver, and Akinao Nose. Regulation of coordinated muscular relaxation in drosophila larvae by a pattern-regulating intersegmental circuit. *Nature Communications*, 12(1):2943, 2021.
- [129] Ellie S Heckscher, Aref Arzan Zarin, Serge Faumont, Matthew Q Clark, Laurina Manning, Akira Fushiki, Casey M Schneider-Mizell, Richard D Fetter, James W Truman, Maarten F Zwart, et al. Even-skipped+ interneurons are core components of a sensorimotor circuit that maintains left-right symmetric muscle contraction amplitude. *Neuron*, 88(2):314–329, 2015.
- [130] Jean-Baptiste Masson, François Laurent, Albert Cardona, Chloé Barré, Nicolas Skatchkovsky, Marta Zlatic, and Tihana Jovanic. Identifying neural substrates of competitive interactions and sequence transitions during mechanosensory responses in drosophila. *PLoS genetics*, 16(2):e1008589, 2020.
- [131] Stephan Gerhard, Ingrid Andrade, Richard D Fetter, Albert Cardona, and Casey M Schneider-Mizell. Conserved neural circuit structure across drosophila larval development revealed by comparative connectomics. *Elife*, 6:e29089, 2017.