

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA
Eduarda Demori Susin

Modelagem e Simulação de Mobilidade Celular

Porto Alegre
2013

Eduarda Demori Susin

Modelagem e Simulação de Mobilidade Celular

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Física.

Orientadora: Rita M. C. de Almeida

Porto Alegre

2013

Resumo

Encarando os processos internos de uma célula em migração com um ponto de vista estatístico, propõe-se um modelo matemático, no ambiente computacional CompuCell3D, para a migração e polarização de uma célula isolada sobre um substrato bidimensional plano e homogêneo. Neste modelo, leva-se em conta a inércia oferecida pelo núcleo e os mecanismos de transferência de *momentum*, entre as diversas estruturas, por meio de objetos matemáticos que possuem uma correspondência biológica direta com estas.

Palavras-chave: migração celular, mobilidade celular, polarização, CompuCell3D, modelo computacional.

Abstract

Looking at the internal process of a migrating cell from a statistical point of view, we propose a mathematical model, in the computational environment CompuCell3D, for the migration and for the polarization of an isolated cell over a bidimensional, homogeneous and flat substrate. In this model, we take into account the inertia offered by the nucleus and the mechanisms of momentum transference, between the different structures, by means of mathematical objects that have a direct biological correspondence with them.

Keywords: cell migration, cell motility, polarisation, CompuCell3D, computational model.

Objetivo

Construir um modelo computacional que reproduza quantitativamente o comportamento de uma célula migratória sobre um substrato bidimensional plano e homogêneo, incluindo o processo de polarização. O modelo deve possibilitar a determinação das estruturas necessárias e suficientes para a mobilidade celular.

Conteúdo

1	Revisão Bibliográfica	p. 9
1.1	Mecanismos de Mobilidade em 2D	p. 9
1.1.1	Conceitos e informações	p. 9
1.1.2	Caracterização do Movimento	p. 13
2	Metodologia	p. 20
2.1	Modelo Celular de Potts: uma generalização	p. 20
2.1.1	Modelo de Ising	p. 20
2.1.2	Modelo de Potts	p. 21
2.1.3	Modelo Celular de Potts	p. 21
2.2	CompuCell3D	p. 21
2.3	O Hamiltoniano	p. 24
2.3.1	Módulo de Contato: Energia de Superfície e Membrana Celular	p. 24
2.3.2	Campos	p. 27
2.3.3	Módulo de quimiotaxia	p. 27
2.3.4	Módulo de volume	p. 28
2.3.5	Módulo <i>FocalPointPlasticity</i>	p. 28
3	O Modelo	p. 29
4	Considerações Finais	p. 40
	Apêndice A – Implementação do Modelo: <i>simulacao.py</i>	p. 42
	Apêndice B – Implementação do Modelo: <i>simulacaoSteppables.py</i>	p. 47

Introdução

A mobilidade celular é um fenômeno inerente à vida. Nos animais ocorre principalmente pela reorganização do citoesqueleto e possui papel de destaque em diversos sistemas e processos. Dentre estes se pode citar a migração de células do sistema imunológico para regiões de infecção, a cicatrização de ferimentos, a embriogênese e a metástase do câncer [1][2][3]. Assim, a migração celular é uma importante área a ser estudada, já que é essencial para melhor compreensão destes fenômenos.

Uma célula estacionária recém depositada sobre um substrato plano, em uma cultura *in vitro*, é simétrica. Para que um movimento direcional ocorra é necessário que exista uma quebra de simetria. Essa quebra de simetria se dá pela organização da estrutura celular interna, que depende de complexas interações químicas e físicas auto-organizadas e altamente não lineares. A presença de tantos processos e estruturas em constante reorganização, transmitindo forças e torques e oferecendo resistência, impossibilita a análise de uma célula migratória como um corpo rígido, ou mesmo um fluido.

Historicamente, já em 1917, D'Arcy Thompson, em seu trabalho "*On Growth and Form*"[4], propôs que se poderia tratar a natureza de uma forma matemática. Infelizmente, naquela época, pelo fato de não existirem computadores, pouco se conseguiu explicar por meio desta poderosa ferramenta. Hoje modelos computacionais tornam viáveis o tratamento de processos tão complexos, como por exemplo, os da migração celular.

Embora já se conheçam muitos dos processos bioquímicos envolvidos na polarização de uma célula[5], até onde sabemos, poucos modelos, matemáticos ou computacionais, dedicaram atenção à polarização por meio de mecanismos internos no contexto da migração celular. Os únicos que tomamos conhecimento foram os trabalhos de Sambeth,R. e Baumgaertner,A. [6] e Marée, A.F *et al.* [7]. A maior parte dos modelos sobre migração celular propostos até o momento partem de uma configuração inicial polarizada [8][9].

Esta monografia é parte de um projeto de pesquisa, que ainda está em andamento, envolvendo vários membros deste instituto, em especial, a orien-

tadora deste trabalho, Profa. Rita M.C. da Cunha e os alunos de doutorado Gabriel Perrone e Ismael Fortuna.

Nesta propõe-se um modelo para a migração celular desenvolvido em um ambiente computacional com interface gráfica, o CompuCell3D [10]. Este modelo captura os principais fatos a respeito da mobilidade celular bem estabelecidos na literatura descrevendo os fenômenos internos de uma célula, que ocorrem em uma escala de nanômetros, por meio de conceitos estatísticos. Nosso objetivo é construir uma ferramenta útil para previsão quantitativa do movimento celular, estabelecendo uma correspondência entre os elementos matemáticos e os reais elementos biológicos.

O conteúdo exposto neste trabalho organiza-se da seguinte maneira. O primeiro capítulo procura organizar as principais informações a respeito da mobilidade celular presentes na literatura que foram relevantes para o desenvolvimento do modelo proposto. O segundo dedica-se a apresentar o programa CompuCell3D e suas ferramentas. O terceiro expõe as principais hipóteses de nosso modelo, a forma como o implementamos, a ligação biológica de cada elemento e nossos resultados. E o último capítulo discute brevemente os resultados obtidos.

1 Revisão Bibliográfica

A morfologia celular durante a migração depende tanto de fatores externos quanto internos. Dentre os fatores externos pode-se citar: a dimensionalidade, a topografia, a aderência e a rigidez do substrato, gradientes químicos, entre outros.

Neste trabalho focamos o movimento bidimensional de uma célula isolada sobre um substrato homogêneo e, portanto, direcionamos a nossa atenção aos fatores internos, como por exemplo, os mecanismos de organização do citoesqueleto.

Neste capítulo serão expostas informações químicas e biológicas a respeito dos complexos processos que levam à migração celular, que darão sustentação ao modelo desenvolvido.

1.1 Mecanismos de Mobilidade em 2D

Uma célula em movimento necessariamente deve estar polarizada, caso contrário um movimento direcional não seria estabelecido. Em geral, células em migração apresentam regiões bem determinadas, diferenciadas principalmente pela forma de seus filamentos de actina. Estas estruturas estão indicadas na Figura 1.1.

Alguns conceitos são necessários para a compreensão do nosso modelo, os quais apresentamos no que segue.

1.1.1 Conceitos e informações

- **Protrusão:** extensão de uma parte da célula por uma superfície.
- **Lamelipódio:** protrusão ampla e plana formada na parte frontal da célula¹. Caracteriza-se por conter filamentos de *actina* ramificada [5]. O la-

Actina: Proteína abundante em todos os eucariotos que pode organizar-se na forma de polímero, dando origem aos filamentos de actina do *citoesqueleto*[11]. Os filamentos de actina têm aproximadamente 8 nm de diâmetro.

Citoesqueleto: um sistema de proteínas filamentosas que cruzam o citoplasma e formam um sistema de vigas, fios e motores que dão à célula força mecânica e controle da forma [1].

¹Entende-se por parte frontal a parte da célula que gera uma protrusão, avançando no

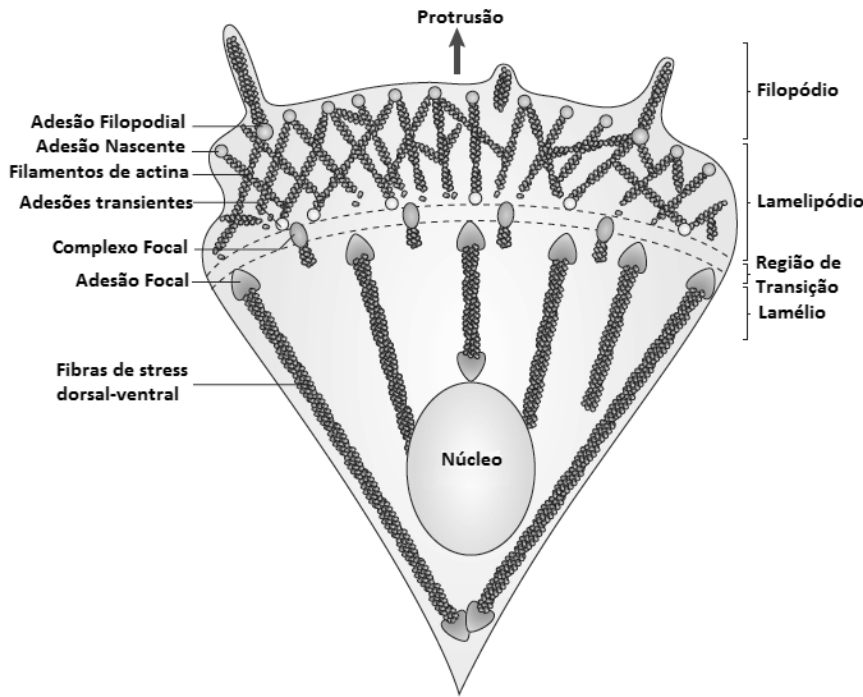


Figura 1.1: Esquema mostrando uma célula genérica polarizada em que as principais estruturas observadas, em diferentes tipos de célula durante a migração, estão indicadas. Figura adaptada de Parsons, J.T. *et al.* [5].

melipódio tem geralmente alguns micrômetros de comprimento e largura, mas apenas 0,1-0,2 micrômetros de altura [8]. Veja a Figura 1.2.

- **Filopódio:** protrusão comprida e fina. São induzidos pela ativação da *Cdc42* e são compostos por filamento de actina [5].

- **Fibras de stress:** actina estruturada em feixes contrácteis. A contratilidade deve-se à ligação da actina com a *miosina*, uma proteína motora [5]. As fibras de stress, também conhecidas como actomiosina, são classificadas em duas categorias: dorsais e ventrais. As primeiras estão ancoradas ao substrato por apenas uma de suas extremidades e as segundas em ambas [15].

- **Lamélio:** Região traseira da célula², caracterizada por conter fibras de *stress* [5].

- **Adesões nascentes:** são adesões pequenas e de curta duração (≈ 60 seg.) que se formam no lamelipódio próximas à borda da membrana [5].

- **Complexo focal:** pontos de adesão localizados na interface lamelipódio-

substrato sem ser arrastada. Veja a Figura 1.3. Em alguns experimentos com células migratórias, observa-se a presença de diversas estruturas protrusivas como estas que competem entre si para determinar uma direção preferencial na migração.

²Entende-se por região traseira a região da célula que sofre uma retração, isto é, é arrastada em direção à protrusão. Veja a Figura 1.3.

Miosina: Proteína motora que utiliza energia, a partir da hidrólise de ATP, para produzir trabalho ou movimentar-se [14].

Cdc42: proteína pertencente à família das *Rho GTPases*.

Rho GTPases: família de proteínas responsável por transmitir sinais para o citoesqueleto. Pertencem a esta família as seguintes proteínas: Rac, Rho e Cdc42.

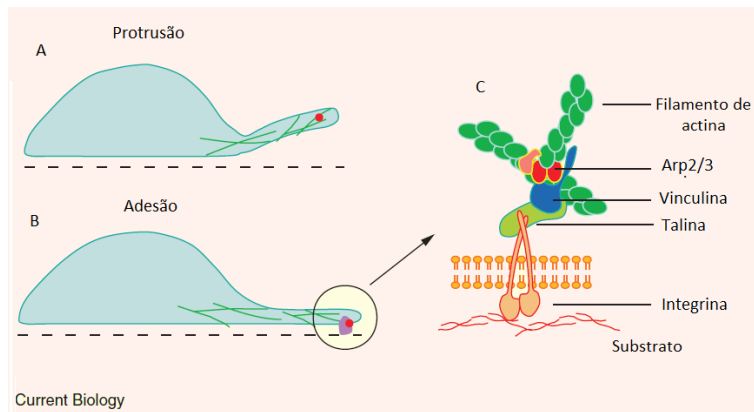


Figura 1.2: Esquema indicando o formato do perfil de uma célula em migração. Observa-se que o lamelipódio é extenso e extremamente fino. (A) Protrusão inicial do lamelipódio. (B) Protrusão estabilizada por uma adesão. (C) Esquema indicando a organização de proteínas em uma adesão. Todas (integrina, vinculina, talina e Arp2/3) são proteínas. As integrinas são as proteínas de ligação transmembrânicas que se grudam ao substrato ou à matriz extracelular, a vinculina e a talina são proteínas de ancoramento intracelular e Arp2/3 são proteínas que permitem a ramificação dos filamentos de actina [1]. Figura adaptada do trabalho de Craig,S.W. e Chen,H [12]

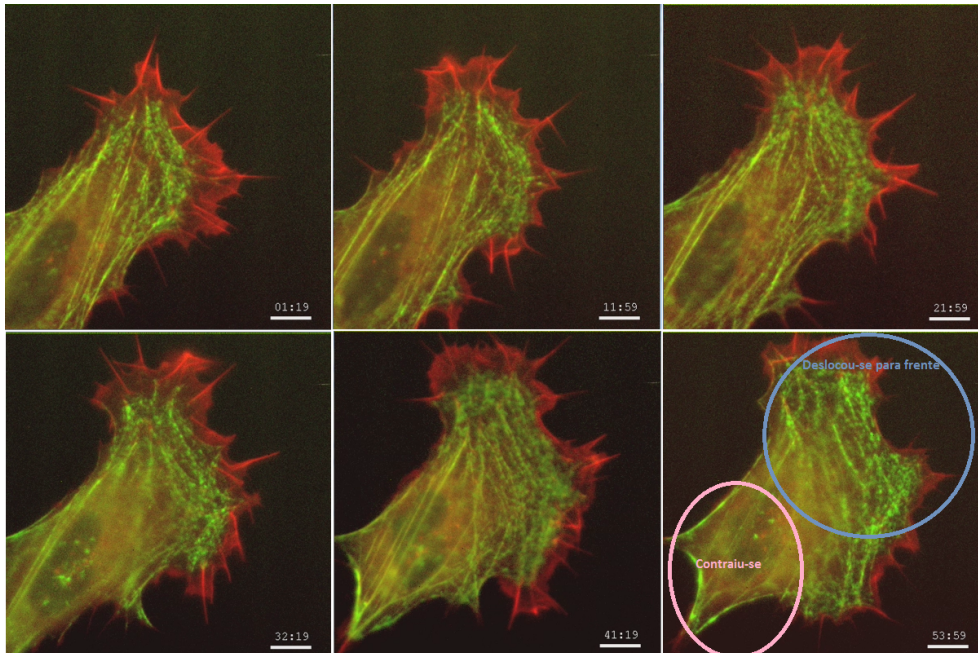


Figura 1.3: Sequência de imagens de fluorescência de um vídeo [13] de um fibroblasto de peixe expressando actina *mCherry* (vermelho) e miosina *lightchain* (verde). Observa-se que a miosina está ausente nas partes em vermelho, que indicam o lamelipódio e os filopódios, e que a parte traseira contém muito pouca actina, sendo arrastada no final do vídeo pela contração gerada pela miosina. A barra indica $10\ \mu\text{m}$ e, acima desta, está indicado o tempo de filmagem.

lamélio. São maiores e mais estáveis que as adesões nascentes ($\approx 1\mu m$), permanecendo por vários minutos [5].

- **Adesões focais:** São pontos de adesão mais estáveis que os complexos focais. Estão presentes no lamélio, nas extremidades das fibras de *stress* e apresentam uma largura de aproximadamente $2\mu m$ e $3\mu m$ de comprimento.[5]

- **Pontos de adesão:** é a denominação genérica para adesões nascentes, adesões focais e complexos focais. Estas não são classes distintas, mas sim uma mesma estrutura com diferentes quantidades de componentes proteicos [5].

- **Região de transição:** interface lamélio-lamelipódio. Nesta região a actina ramificada do lamelipódio é despolimerizada e reorganiza-se em feixes.

- **Maturação das adesões:** à medida que o sistema evolui adesões nascentes e complexos focais podem desaparecer ou transformarem-se em complexos focais e posteriormente em adesões focais. Este processo, em que as adesões tornam-se maiores e mais estáveis, é denominado maturação.

É importante destacar que estas estruturas não estão, necessariamente, presentes em todas as células em movimento sobre substratos 2D. Cada tipo de célula tem suas características particulares. Veja, por exemplo, a Figura 1.4:

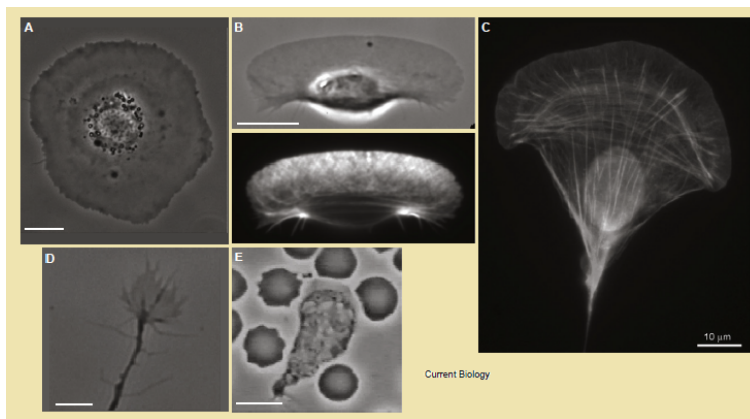


Figura 1.4: Formatos de diferentes células em migração. (A) Imagem de contraste de fase de um queratócito estacionário em cultura. O núcleo da célula está no centro, rodeado por um fino lamelipódio. (B) Imagens de contraste de fase (superior) e de fluorescência (inferior) de um queratócito móvel. Feixes de actina aparecem na parte traseira e um amplo lamelipódio é observado na parte da frente. (C) Imagem de fluorescência de um fibroblasto de embrião de rato. Pode-se ver o núcleo, os feixes paralelos de actina no lamélio e a rede do lamelipódio. (Biblioteca de Imagens: <http://biologyimagelibrary.com.br/> / imageId = 48799). (D) Cone de crescimento neural de rato (Imagem doada pela P.T. Yam, da Universidade McGill). (E) Um neutrófilo humano, rodeado por glóbulos vermelhos, perseguindo uma bactéria (imagem tirada de um filme de D. Rogers, Vanderbilt University). A imagem como um todo foi retirada do trabalho de Mogilner, A. e Keren, K. [8]. A barra indica $10\mu m$.

1.1.2 Caracterização do Movimento

Para que uma quebra de simetria ocorra, uma série de processos químicos e físicos acontecem dentro da célula. Estes modificam o seu citoesqueleto para permitir protrusões na parte da frente e retrações na parte de trás de uma forma coordenada.

Após a célula estar aderida ao substrato, o ciclo de movimento caracteriza-se pelas principais etapas: polarização, protrusão (por meio da polimerização de actina), surgimento de adesões (que estabilizam a protrusão) e desmontagem e deslizamento das adesões localizadas na parte traseira da célula devido à contração das fibras de *stress*.

Em uma célula móvel, pontos de adesão são criados continuamente no lamelipódio e nos filopódios [16][5]. Este fato também foi observado na periferia de células estacionárias³[18].

Acredita-se que a tensão provocada pela miosina é a principal responsável pela maturação das adesões [5][14][19][20]. Esta perturba diretamente a conformação das proteínas nos complexos de adesão, permitindo o envio de estímulos que atrairão as moléculas necessárias para a formação de adesões mais estáveis. Corroborando a esta ideia, mostrou-se que a inibição tanto de Rho⁴, quanto de miosina, leva à desmontagem das adesões, além da despolimerização das fibras de *stress* [19][21][22]. Além disso, segundo Small, J.V. *et al.* [16], se uma força é aplicada sem exceder um determinado nível, os contatos das adesões não se desmontam, mas, ao contrário, crescem rapidamente.

É consenso na comunidade científica que o grupo de GTPases monoméricas, pertencentes à família da proteína Rho, (Rho GTPases): Cdc42, Rac e Rho são os principais responsáveis pela polarização da célula. Um experimento muito interessante exposto no livro *Biologia Molecular da Célula* [1] mostra o efeito, no citoesqueleto, de cada uma destas proteínas separadamente. Como indica a Figura 1.5, células em repouso (A) apresentam fibras de actina, predominantemente em seu *córtex*, e nenhuma fibra de *stress*; células com Rho ativada (B) apresentam diversas fibras de *stress*; células com Rac ativada (C) apresentam um extenso lamelipódio que circunda a célula e células com Cdc42 ativada (D) apresentam diversas protrusões de filopódios [1].

³Em uma célula que está se espalhando não costuma-se classificar a estrutura que compõe a sua borda como Lamelipódio, porém sabe-se que nesta estrutura há uma grande concentração de Rac e CDC42 [17], assim como ocorre no Lamelipódio.

⁴A Miosina é estimulada pela Rho [16].

Córtex celular: é uma camada especializada do citoplasma na face interna da membrana plasmática, que funciona como um suporte mecânico da membrana plasmática. Em animais, é o responsável pelas flutuações de membrana. [1]

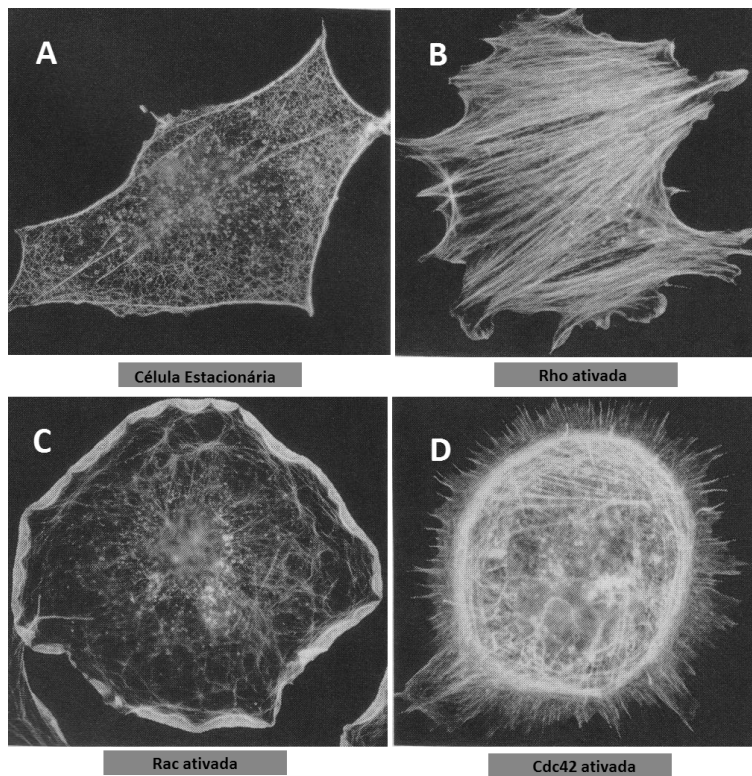


Figura 1.5: Imagens de fluorescência, marcando actina, de fibroblastos com diferentes Rho GTPases ativadas. (A) Célula estacionária. (B) Célula com Rho ativada. (C) Célula com Rac ativada. (D) Célula com Cdc42 ativada. Imagem retirada do livro *Biologia Molecular da Célula* de Alberts, B. [1].

No lamelipódio, o citoesqueleto forma uma matriz ramificada: complexos de Arp2/3 ligam filamentos de actina nascentes às laterais de filamentos já existentes, além de serem um dos responsáveis pela polimerização destes [8] [5]. Nesta região observam-se grandes concentrações de Rac e Cdc42. Rho também está presente, mas é mais abundante no lamélio [5]. Quando Rho está presente no lamelipódio ela promove a polimerização de filamentos de actina nascentes⁵ por meio de uma proteína da família das forminas: mDia1 [23] [24]. Rac e Cdc42 estimulam a polimerização da actina ramificada; e, mesmo quando Rho é inibida, podem induzir protrusões. O que mostra que a cooperação entre estas GTPases não é essencial [5].

No lamélio a actina encontra-se estruturada em feixes contrácteis paralelos uns aos outros, as chamadas *fibras de stress* [25]. Nesta região a concentração de Rho é expressiva e é responsável por ativar a miosina [26].

Como dito anteriormente, a miosina⁶ é responsável pelas contrações das fibras de *stress*. Como indica a Figura 1.6, à medida que a célula se movimenta, as cadeias da miosina movem-se em sentidos opostos, gerando uma

⁵ Necessários para a polimerização de actina ramificada.

⁶ É importante destacar que a miosina não está presente no lamelipódio.

força restauradora [5].

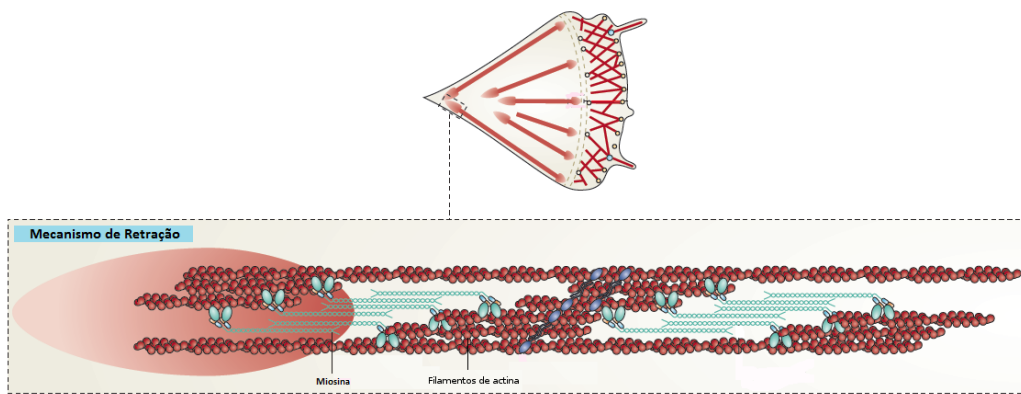


Figura 1.6: Esquema de como as proteínas motoras ligam-se aos filamentos de actina gerando as fibras de *stress* presentes no lamélio. Estas proteínas, quando tencionadas, funcionam como molas, tornando as fibras de *stress* elásticas. Imagem adaptada do trabalho de Parsons, J.T. *et al.* [5].

Evidentemente as Rho GTPases não atuam sozinhas, além de seus sinalizadores os processos são mediados por proteínas alvo que desencadeiam diversas cascatas químicas. Uma abordagem mais detalhada destas interações vai além do objetivo deste trabalho e não serão abordadas aqui.

A rede de filamentos de actina no lamelipódio, como um todo, sofre *treadmilling*, isto é, os filamentos de actina polimerizam novas subunidades⁷ na sua *extremidade farpada* e despolimerizam no outro extremo [11]. As extremidades farpadas localizam-se logo abaixo da membrana celular com uma orientação perpendicular à superfície desta [8][5]. Dessa forma, os monômeros empurram a membrana, à medida que se polimerizam. Porém como esta oferece resistência, observa-se um aumento dos filamentos de actina no sentido membrana-núcleo [27]. Veja a Figura 1.7.

O sentido do crescimento da actina no lamelipódio deve-se ao equilíbrio de três forças: duas puxando o filamento pra trás e outra o empurrando para frente. As forças para trás devem-se à força de resistência da membrana celular e à força de contração devido aos filamentos contrácteis de actina no lamélio. A força para frente deve-se às adesões. Quando um filamento de actina encontra uma adesão, esta adesão se opõe a estas duas forças para trás permitindo que uma protrusão ocorra. Assim, o nível de protrusões é determinado pela taxa de polimerização dos monômeros de actina [28][29]. Veja a Figura 1.8.

Uma evidência desta afirmação está descrita no trabalho de Smilenov, L.B. *et al.* [18]. Neste utilizando-se fluorescência observou-se que, em células esta-

Extremidade farpada: do inglês, *barbed end*, é definida como o extremo do filamento de actina em que a polimerização ocorre [5].

Proteínas de Capamento: proteínas que ligam-se às extremidades farpadas dos filamentos de actina, impedindo que novos monômeros sejam adicionados.

⁷Monômeros de actina.

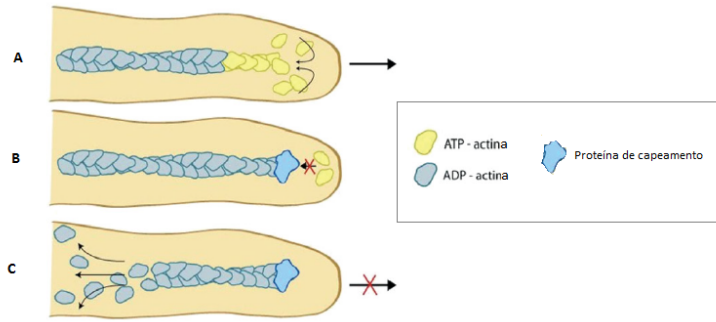


Figura 1.7: Esquema mostrando como ocorre o *treadmilling* nos filamentos de actina. Monômeros de actina polimerizam-se na *extremidade farpada* (parte da frente) (A) e despolimerizam-se na parte traseira (C). O crescimento é controlado pelas *Proteínas de Capeamento* (B e C). Imagem doada pelo *Mechanobiology Institute, National University of Singapore* e adaptada do trabalho de Ladoux, B. e Nicolas, A. [14].

cionárias, os pontos de adesão estavam distribuídos por toda a célula e que a maioria movia-se⁸ em direção ao centro desta. Veja a Figura 1.9.

Até o momento explicamos os processos que levam à mobilidade a partir de uma configuração polarizada de uma célula. Fatos como a menor existência de adesões na parte traseira de células migratórias nos levaram à hipótese de que esta quebra de simetria, mesmo em um meio homogêneo, é ocasionada pelas adesões. Já que, segundo um grande número de referências, para citar algumas [5], [1] e [30], as integrinas⁹ recrutam indiretamente proteínas andaime e de sinalização¹⁰, que indiretamente¹¹ regulam a sinalização das Rho GTPases, aumentando a polimerização de actina nesta parte da célula e portanto, contribuem para a formação de novas protrusões. Um mecanismo possível para tal seria uma flutuação interna, como, por exemplo, uma maior concentração de algum tipo de molécula que levaria a um maior número de adesões em alguma parte da célula.

Em acréscimo, mostrou-se que adesões focais nascentes na parte dianteira de células em migração exercem tração mais forte do que as adesões focais maiores e maduras, sendo que este fenômeno não ocorre na parte de trás [14].

Além disso, vários experimentos indicaram que as adesões têm papel importante na detecção do tipo de substrato. Por exemplo, em células estacionárias que estão se espalhando pelo substrato (processo anterior à polarização),

⁸No trabalho de Smilenov, L.B. *et al.* definiu-se *pontos de adesão móveis* como aqueles que deslocaram-se pelo menos um comprimento de adesão focal em 1 hora. Por este critério, $65 \pm 27\%$ das adesões em células estacionárias individuais foram consideradas móveis.

⁹Proteínas de adesão transmembrânicas.

¹⁰Tais como paxilina [31] e FAK [32], respectivamente.

¹¹Ao se associarem a outras moléculas.

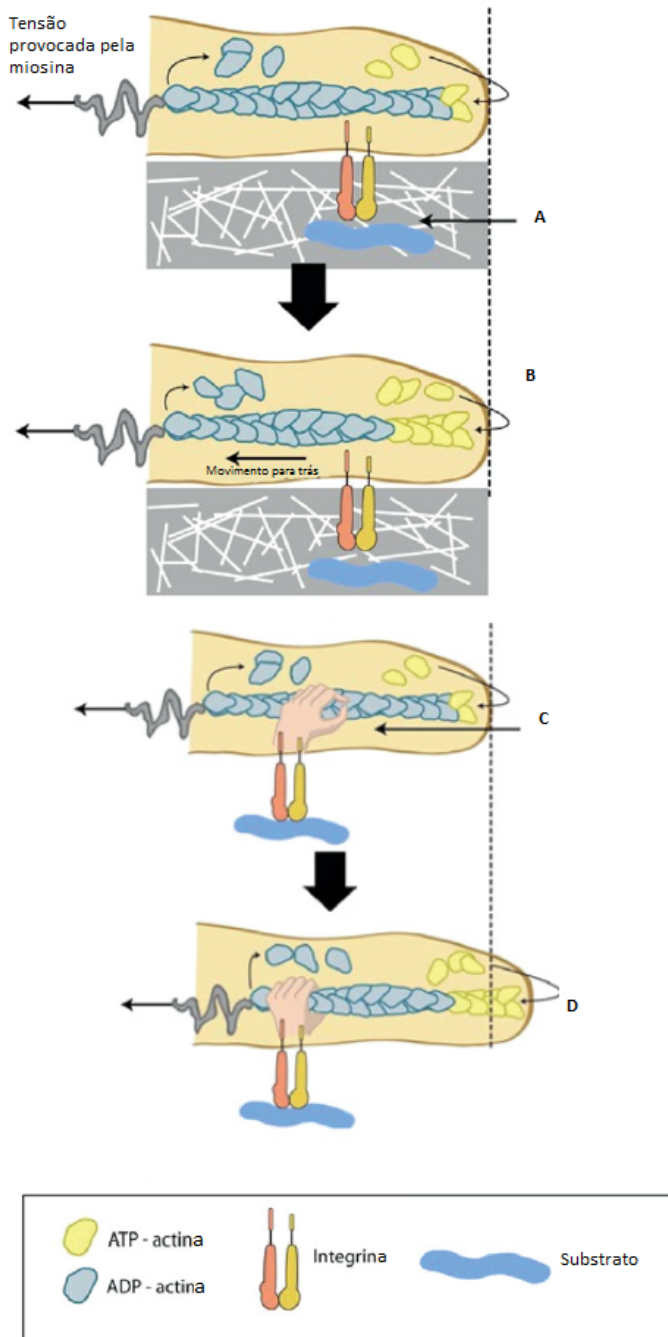


Figura 1.8: Representação do processo que gera uma protrusão. Quando não há adesões estabilizando a protrusão a resistência da membrana, juntamente com a força gerada pelas fibras de *stress* fazem com que o feixe cresça para trás (A e B). Quando uma adesão está presente, as duas forças para trás são compensadas por esta e uma protrusão pode ocorrer. Imagem doada pelo *Mechanobiology Institute, National University of Singapore* e adaptada do trabalho de Ladoux, B. *et al.* [14].

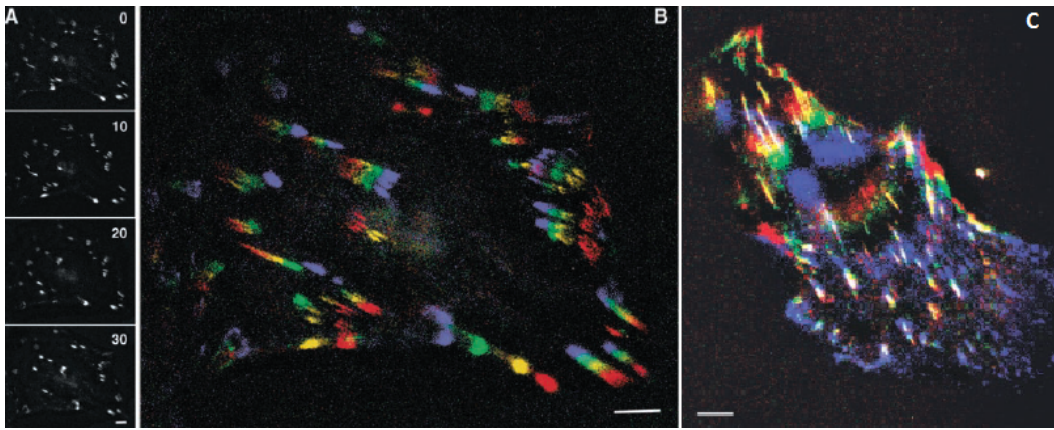


Figura 1.9: Imagens sobrepostas de fluorescência marcando integrina GFP de células migratórias e estacionárias. A integrina, por ser uma proteína de adesão transmembrânica, indica pontos em que há ancoragem da célula ao substrato. Cada cor representa um tempo diferente. (A) Quatro imagens de uma mesma célula estacionária sem serem sobrepostas. (B) Estas imagens sobrepostas com o seguinte esquema de cores: 0,10,20 e 35 min representadas pelas cores vermelho, amarelo, verde e roxo, respectivamente. (C) Imagens sobrepostas de uma célula em migração, com o seguinte esquema de cores: 0,10,20 min representados pelas cores vermelho, verde e roxo, respectivamente. Em todas as adesões observa-se um arco-íris, exceto pelas adesões dianteiras que são brancas ou roxas. Este resultado indica que as adesões brancas se mantiveram fixas durante a filmagem e que as roxas formaram-se perto da borda aos 20 min. A barra indica $5\mu\text{m}$. Figura retirada do trabalho de Smilenov, L.B. *et al.* [18].

observou-se que, em diferentes tipos de substratos, diferentes proteínas de adesão são recrutadas com maior ou menor intensidade [11]. Veja a Figura 1.9.

Em acréscimo, Parsons, J.T. *et al.* [33] mostraram que células que se movem em substratos macios contêm adesões menores e mais dinâmicas, enquanto que as células em substratos mais rígidos apresentam adesões maiores e mais estáveis.

Outro exemplo importante é o da Durotaxia, exposto também em diferentes trabalhos. A durotaxia é o fenômeno em que as células movem-se devido a um estímulo mecânico. Constatou-se que as células migram em direção a substratos mais aderentes e rígidos [14].

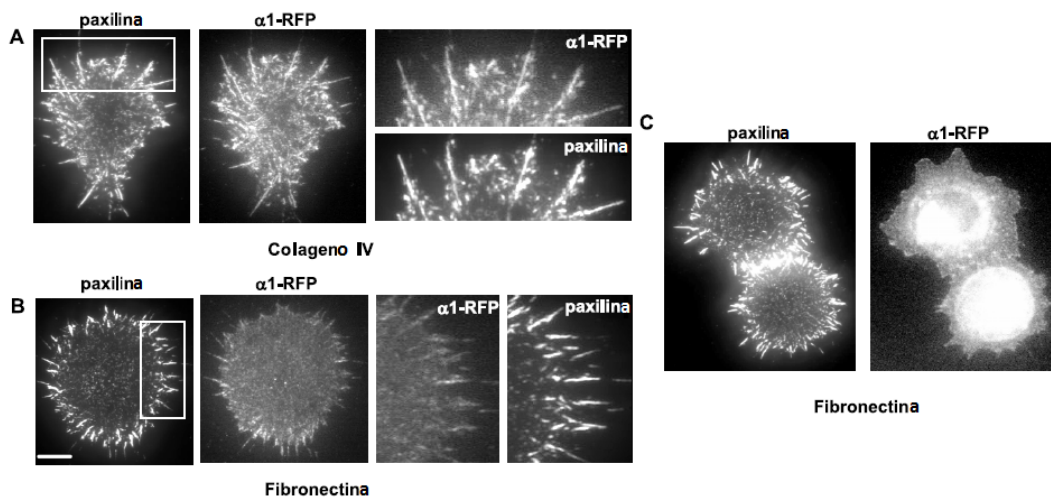


Figura 1.10: Imagens de fluorescência com microscopia TIRF, marcando integrina $\alpha 1$ -RFP e paxilina. Estas duas proteínas participam de complexos de adesão. As imagens mostram a comparação entre o espalhamento de células, com maior aderência em colágeno IV, durante intervalos de tempo entre 15 e 25 min, em diferentes substratos: colágeno IV e fibronectina. (A) Imagens após o espalhamento de 15 min em Colágeno IV. (B) Imagens após o espalhamento de 15 min em Fibronectina. Como a integrina não é o melhor ligante para a Fibronectina ela apresentou-se como um borrão nas bordas da célula. Este detalhe é mais bem visualizado na imagem (C) que mostra o espalhamento após 25 min em Fibronectina. As imagens ao lado de (A) e (B) mostram uma ampliação da parte indicada com o retângulo. A barra indica 5 μm . Figura retirada do trabalho de Partridge, M.A. e Marcantonio, E.E. [11].

2 Metodologia

Para a implementação de nosso modelo utilizamos um programa com interface gráfica chamado CompuCell3d. O CompuCell3d implementa o chamado modelo GGH (Glazier-Graner-Hogeweg) ou Modelo Celular de Potts por meio do *Algoritmo de Metropolis* [34].

Para permitir uma melhor compreensão de nosso modelo, apresentamos um pouco das origens do Modelo Celular de Potts, que é uma generalização do Modelo de Potts, baseado no célebre modelo de Ising.

2.1 Modelo Celular de Potts: uma generalização

2.1.1 Modelo de Ising

O modelo de Ising é um modelo para a magnetização de uma rede, em uma ou mais dimensões. Esta rede é composta por N partículas, enumeradas com um índice i variando de 1 a N , sem liberdade mecânica, interagindo entre si por meio de interações de curto alcance. A única propriedade destas é o *Spin* σ_i , que pode assumir apenas dois valores $\sigma_i \in \{+1, -1\}$. A energia de tal sistema, na ausência de um campo externo, é dada por:

$$H = -J \sum_{\langle ij \rangle} \sigma_i \sigma_j, \quad (2.1)$$

onde J é o peso da interação entre os *spins* σ_i e σ_j . $\langle ij \rangle$ denota que a soma é realizada sobre os pares de sítios vizinhos mais próximos, cada par sendo contado apenas uma vez. Se $J > 0$ as energias de interação produzem um estado ferromagneticamente ordenado, já que na natureza é válido o princípio de minimização da energia.

2.1.2 Modelo de Potts

O modelo de Potts é uma generalização do modelo de Ising. Neste os *spins* interagentes σ_i se orientam em um espaço d -dimensional gerado por d vetores ortonormais \hat{e}^{σ_i} . Ao invés de apenas duas possibilidades, os spins podem assumir d valores diferentes (qualquer inteiro entre 0 e $d - 1$). Na ausência de um campo externo, o Hamiltoniano é dado por:

$$H = -J \sum_{ij} \delta(\sigma_i, \sigma_j), \quad (2.2)$$

onde $\delta(\sigma_i, \sigma_j) = \hat{e}^{\sigma_i} \cdot \hat{e}^{\sigma_j}$ é a delta de Kronecker. Além disso, neste modelo pode-se considerar interações entre vizinhos de maior ordem.

2.1.3 Modelo Celular de Potts

O Modelo Celular de Potts, desenvolvido por Francois Graner e James Glazier [10], é uma extensão do Modelo de Potts. Neste além da propriedade de *spin* que pode assumir d valores diferentes, o sistema apresenta uma propriedade adicional denominada tipo $\tau(\sigma_i)$. Este modelo considera que domínios com sítios apresentando o mesmo valor de *spin* representam um mesmo grão, bolha ou célula. Assim, $\tau(\sigma_i)$ representa uma propriedade de um grão rotulado por σ_i . O Hamiltoniano mais simples do Modelo Celular de Potts, em três dimensões, composto por N pontos de rede, é dado por:

$$H = - \sum_{ij}^N J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))(1 - \delta(\sigma_i, \sigma_j)), \quad (2.3)$$

onde $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ é o fator de interação entre os pontos de rede i e j com spins σ_i e σ_j e tipos $\tau(\sigma_i)$ e $\tau(\sigma_j)$. $\delta(\sigma_i, \sigma_j)$ é a delta de Kronecker, indicando que só existe interação entre pontos com *spins* diferentes.

2.2 CompuCell3D

O CompuCell3D permite simular uma série de processos biológicos complicados, inclusive tecidos, tanto em 2D, quanto em 3D, pelo fato de utilizar objetos generalizados. Estes objetos generalizados são denominados *compartimentos* e são definidos por uma rede de *pixels* ou *voxels* com propriedades comuns (*spin* e tipo, como mencionado anteriormente). A utilização dos comparti-

mentos permite a abstração de detalhes biológicos mais profundos. Os compartimentos podem dividir-se, mover-se, desaparecer, exercer forças, mudar de forma, secretar e absorver produtos químicos e elétricos, dentre outras, por meio de módulos escolhidos pelo usuário. Os módulos são a implementação do algoritmo interno do programa. Estes são utilizados tanto para definir os elementos, quanto para inserir um termo adicional no Hamiltoniano do sistema. Estes termos representam diversos tipos de interações que podem ser interpretados como efeitos médios de interações biológicas. O programa dá como saída tanto dados brutos, quanto gráficos e fotos dos *pixels* da rede.

Cada ponto da rede corresponde a um *pixel*, denotado por um número inteiro i . Cada compartimento é composto por diversos *pixels* i que possuem um mesmo *spin*, isto é, um mesmo número associado σ_i , e um mesmo tipo, isto é, um mesmo nome $\tau(\sigma_i)$. Veja a Figura 2.1. Para deixar claro, é importante destacar que diferentes compartimentos podem ter o mesmo tipo, mas nunca o mesmo *spin* [34]. Os compartimentos podem representar uma célula biológica, partes de uma célula biológica, partes do substrato e etc.

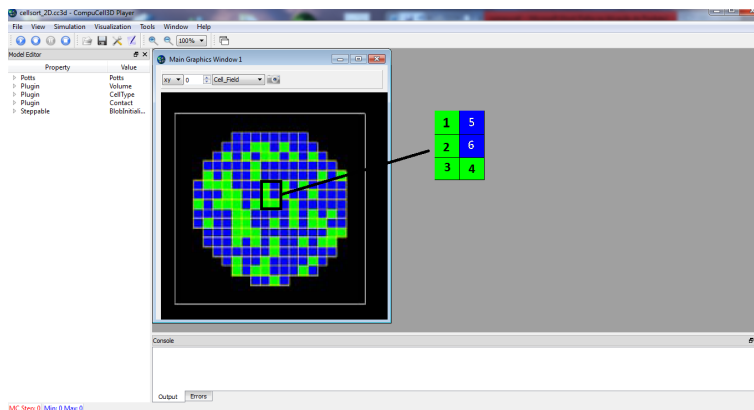


Figura 2.1: Imagem composta por uma foto mostrando a interface gráfica do *player* do CompuCell3D e um esquema em que cada quadradinho representa um compartimento, composto por vários *pixels*. As cores indicam tipos diferentes e os números, *spins* diferentes. Observa-se que as células 1, 2, 3 e 4 possuem o mesmo tipo: verde, e as células 5 e 6 possuem o mesmo tipo: azul.

Para implementar o Modelo Celular de Potts, o CompuCell3D utiliza o *Algoritmo de Metropolis* com aceitação de Boltzmann (um método de Monte Carlo) [34]. Resumidamente o algoritmo faz com que a rede de *pixels* evolua por meio de tentativas de troca na rede. Isto é, o programa copia um *pixel*, escolhido aleatoriamente, e o coloca sobre um de seus vizinhos, também escolhido aleatoriamente, sobrepondo a cópia ao antigo. Se esta nova configuração diminuir a energia total do sistema, então a troca é aceita, caso contrário, ela pode ser aceita com uma probabilidade dada por $P = e^{-\frac{\Delta H}{kT}}$. Esta expressão é

conhecida como função aceitação, em que ΔH refere-se à alteração da energia total do sistema devido à mudança configuracional, K é a constante de Boltzmann e T é a temperatura estatística. Um passo de Monte Carlo corresponde a N tentativas de troca, onde N é o número de pixels da rede. Veja a Figura 2.2.

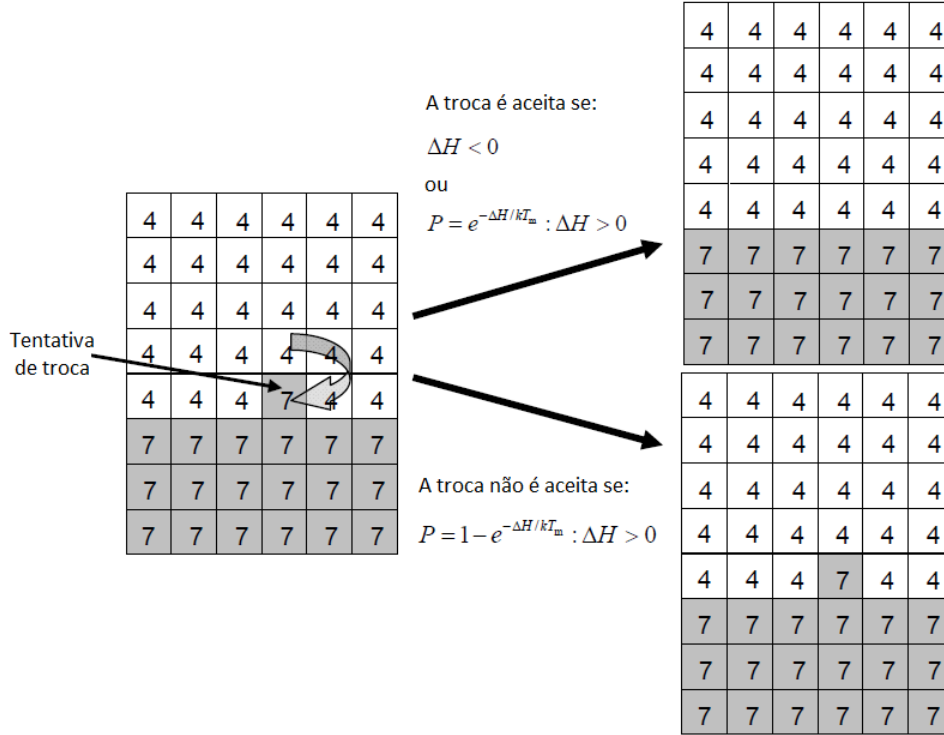


Figura 2.2: Representação da implementação do *Algoritmo de Metropolis* no CompuCell3d. Cada quadradinho representa um *pixel* com *spin* 4 ou 7 e um tipo branco ou cinza. Figura adaptada de Swat, M.H. *et al.* [35].

O CompuCell3d utiliza duas linguagens: XML e Python [34]. Em nosso trabalho optamos por utilizar somente Python. Neste caso, para se realizar uma simulação, com esta ferramenta, devem-se usar dois arquivos: um *arquivo.py* e outro *arquivostepables.py*. No primeiro são definidos os módulos utilizados com seus respectivos parâmetros e os parâmetros do método: número de passos, temperatura estatística e número de vizinhos interagentes. Este arquivo pode ser totalmente escrito por meio da interface gráfica. Basta que o usuário diga quais serão os parâmetros e módulos a serem utilizados que o próprio programa gera o código necessário. Todas as informações presentes neste arquivo não são modificadas pois este arquivo é chamado uma única vez no início da simulação. Assim, as condições iniciais são definidas neste. No segundo está presente o algoritmo que será chamado a cada passo de Monte Carlo. Este arquivo é quase que totalmente escrito pelo usuário, que recebe do CompuCell3D somente a estrutura do mesmo.

Nas simulações do CompuCell3D, existem dois tipos de objetos: os compartimentos, mencionados anteriormente, e os campos. Estes são utilizados para simular gradientes químicos biológicos que estão presentes, por exemplo, quando uma célula secreta algum tipo de substância ou movimenta-se devido a estímulos químicos, fenômeno conhecido como quimiotaxia. Estes campos evoluem por meio de uma equação de difusão e são resolvidos pelo algoritmo interno do CompuCell3d por meio do método de Euler [34].

São muitos os termos de energia que podem ser implementados pelos módulos oferecidos pelo CompuCell3d. Na próxima sessão descreveremos todos os termos do Hamiltoniano utilizado em nosso modelo de uma forma geral. No Capítulo 3 estes termos estarão contextualizados no âmbito da mobilidade celular.

2.3 O Hamiltoniano

2.3.1 Módulo de Contato: Energia de Superfície e Membrana Celular

Um dos mais importantes módulos utilizados no CompuCell3d e em nosso modelo computacional é o módulo de contato. Este módulo adiciona o principal termo de interação do Modelo Celular de Potts ao Hamiltoniano e representa uma energia de superfície efetiva.

$$H = - \sum_{ij}^N J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))(1 - \delta(\sigma_i \sigma_j)) \quad (2.4)$$

Fisicamente, energia de superfície (energia por unidade de área), ou equivalentemente tensão superficial (força por unidade de comprimento), é a energia necessária para se clivar um material *bulk*.

Em um material *bulk*, uma molécula em contato com outra molécula vizinha está em um estado de energia mais baixo do que se estivesse sozinha. Quando se cliva um material gerando novas superfícies, as moléculas que se encontram na superfície possuem um número menor de vizinhas com as quais podem se ligar, em relação às moléculas que se encontram no interior do material, e, portanto, têm uma energia superior.

No caso de um líquido, para se atingir um estado de menor energia, o número de moléculas de superfície é minimizado por meio da minimização da

área de superfície. É por esta razão que gotículas de água, em um substrato não aderente, apresentam formato aproximadamente¹ esférico, já que a menor superfície de um objeto 3D é a superfície de uma esfera.

Quando uma célula não está aderida ao substrato, por exemplo quando em suspensão no meio de cultura ou durante a mitose (processo no qual o citoesqueleto reorganiza-se para atuar exclusivamente na divisão celular), ela apresenta uma morfologia aproximadamente esférica.

A membrana celular é formada por proteínas e por uma bicamada de lipídeos. Todas as moléculas lipídicas da membrana plasmática são anfífilas, isto é, apresentam uma parte polar e uma parte apolar [1]. Moléculas polares dissolvem-se facilmente em água, pois podem formar ligações eletrostáticas favoráveis ou ligações de hidrogênio. Moléculas apolares, por outro lado, não possuem esta habilidade e são insolúveis em água. Dessa forma, a membrana celular dispõe-se de uma maneira tal que a superfície de contato entre a água e a parte apolar de seus constituintes lipídicos seja minimizada, apresentando um formato aproximadamente esférico. Veja a Figura 2.3.

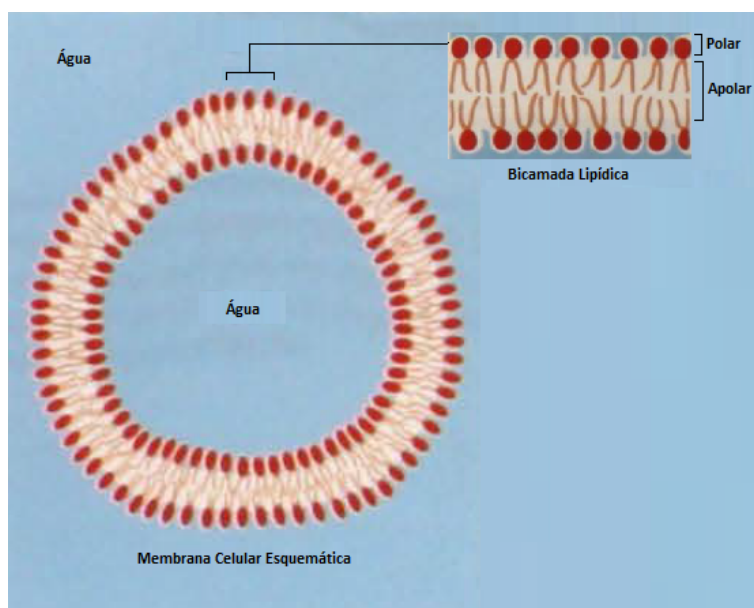


Figura 2.3: Esquema indicando a organização da bicamada lipídica da membrana celular. A parte apolar é envolta pela polar de maneira que esta não entre em contato com a água. Esta configuração funciona como uma barreira impermeável, dessa forma a célula pode somente trocar nutrientes com o meio externo por meio de proteínas transmembrânicas, que não estão mostradas na Figura. Figura adaptada de Alberts, B. [1].

Pelo fato de uma célula ser um material complexo, composto por diversas moléculas e estruturas², para se explicar a aderência de uma célula é necessário

¹Uma gotícula de água é perfeitamente esférica em um substrato perfeitamente não aderente e na ausência de gravidade.

² Como por exemplo, o citoesqueleto e as proteínas de adesão que ligam-se fortemente a

levar em conta todas estas características, não sendo possível pensá-la como uma gotícula de água.

Em 1993 Graner, F. [36] propôs que, ao se trabalhar com fenômenos em escalas da ordem do tamanho de uma célula, baseado na hipótese de que, em uma célula, as adesões em pontos discretos com o substrato³ são distribuídas uniformemente⁴, é possível atribuir à superfície de uma célula uma energia de superfície. Nesta energia estariam incluídos tanto efeitos devido às propriedades da membrana celular como os das proteínas de adesão que encontram-se nesta. É neste sentido que o termo de contato do Hamiltoniano do Modelo Celular de Potts se enquadra.

O contato de um fluido com uma superfície, isto é, se o fluido espalha-se pela superfície ou mantém-se com um formato esférico, depende da interação entre as moléculas do próprio fluido (*coesão*) e, também, das interações entre as moléculas do fluido e as da superfície (*aderência*).

Para se quantificar o contato de um fluido com uma superfície utiliza-se o ângulo de contato deste com esta. Uma aderência forte e uma coesão fraca resulta numa região de contato grande e baixos ângulos de contato. Por outro lado, uma adesão fraca e uma coesão forte resulta em ângulos de contato altos e uma menor área de contato. Veja a Figura 2.4:

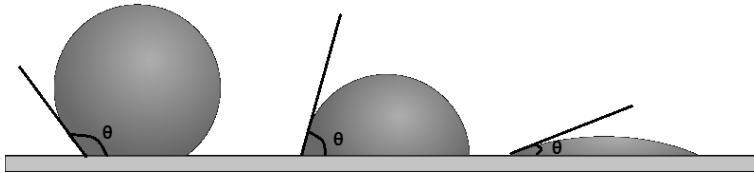


Figura 2.4: Método de medida da molhabilidade de um fluido em um determinado substrato. O ângulo de contato é definido como sendo o ângulo interno entre a linha tangente à curvatura do fluido e o substrato no ponto de contato.

O CompuCell3d simula este fenômeno por meio do módulo de contato. A coesão está associada a termos de energia entre compartimentos de mesmo tipo, no sentido que, para um dado $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$, a energia do módulo favorece a estas entidades permanecerem juntas. Já a energia entre compartimentos de tipos diferentes está associada à adesão.

certas moléculas presentes no substrato.

³Por proteínas de adesão.

⁴Isto é, com espaçamentos não muito maiores do que os tamanhos das próprias adesões.

2.3.2 Campos

Os campos no CompuCell3D não são termos de energia, mas um mecanismo para o cálculo destas, como será explicado nos próximos itens. Estes obedecem a diferentes equações de difusão: equações acopladas, equações de difusão advectivas e, no caso escolhido por nós, equações de difusão com um termo de decaimento e outro de fonte, como mostra a Equação 2.5:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C - kC + Sec, \quad (2.5)$$

onde k é a constante de decaimento, D é a constante de difusão e Sec representa um termo constante de fonte atribuído à secreção de campos pelos compartimentos, definida pelo *Módulo de secreção*.

Para resolver estes tipos de equações diferenciais parciais, o CompuCell3d apresenta em seu algoritmo interno vários *solvers* que utilizam o método de Euler. Para a resolução da Equação 2.5 utilizamos o *DiffusionSolverFE*. Escolhemos este *solver* dentre as outras opções pois este calcula a estabilidade do método em relação às constantes escolhidas, fazendo uma reescalonamento para garantir a sua estabilidade. Além disso ele é mais versátil que os outros pois permite escolher constantes diferentes para cada tipo de compartimento.

2.3.3 Módulo de quimiotaxia

Este módulo simula a quimiotaxia de células, isto é, a migração celular gerada por estímulos químicos [1]. Para cada troca na configuração de *pixel* do algoritmo, este módulo calcula a mudança de energia associada por meio da seguinte expressão:

$$\Delta H = \lambda(C(\vec{x}_{ref}) - C(\vec{x})), \quad (2.6)$$

onde $C(\vec{x}_{ref})$ e $C(\vec{x})$ denotam a concentração de algum campo, definido previamente no programa, no *pixel* referência (inicial) e no *pixel* em que o referência será copiado (final), respectivamente. Assim para um λ positivo as cópias de *pixel* na direção do gradiente do campo são favorecidas e os compartimentos, que foram definidos para sentirem a influência do campo, são atraídos para posições em que o campo é maior. Por outro lado, se λ for negativo estes são repelidos.

Módulo de secreção:

este módulo não representa um termo de energia. Ele apenas define quais células secretam, isto é, são as fontes de um determinado campo. Outros módulos desse tipo são, por exemplo, o *Módulo de tipo celular*, que define os elementos do sistema e o *Módulo de Potts* que define o número de passos, a temperatura estática, o grau de vizinhos interagentes, dentre outros.

2.3.4 Módulo de volume

O volume de um compartimento V_{comp} no CompuCell3d é definido como o número de *pixels* que este possui, seja em uma simulação 2D ou 3D. O *Módulo de volume* informa ao CompuCell3D que o Hamiltoniano terá mais um termo associado à conservação de volume. Isto é, exceto por algumas flutuações, o volume do compartimento se mantém em um valor alvo V_{alvo} . A expressão de energia deste módulo é

$$H = \lambda(V_{comp} - V_{alvo})^2, \quad (2.7)$$

ou seja, quando uma tentativa de cópia de *pixel* é realizada, um compartimento terá o seu volume aumentado e outro terá diminuído. Se $\lambda > 0$ qualquer desvio do volume alvo provocará um aumento da energia e a troca poder ser aceita ou não [35].

Este módulo é indispensável para qualquer simulação no CompuCell3D pois, sem ele, com termos de contato positivos, existe uma probabilidade muito grande de o volume dos compartimentos diminuir, ou mesmo desaparecer das simulações, já que estas configurações são energeticamente mais favoráveis. Como este fato não é observado biologicamente, em uma célula por exemplo, está justificada a sua utilização. Além disso, biologicamente o volume celular é aproximadamente constante em situações usuais. Já que a membrana celular não é elástica, embora maleável, e que uma célula tem em sua composição 70% de água [1], que é um fluido incompressível.

2.3.5 Módulo *FocalPointPlasticity*

Este módulo limita a distância entre os centros de massa de determinados tipos de compartimentos por meio de um termo harmônico adicional no Hamiltoniano [35].

$$H = \sum_{i,j} \lambda_{ij}(l_{ij} - L_{ij})^2, \quad (2.8)$$

onde l_{ij} é a distância entre os centros de massa dos compartimentos i e j e L_{ij} é a distância alvo de l_{ij} .

3 *O Modelo*

Um modelo, para ser útil e servir de previsão, deve possuir uma correspondência entre os elementos matemáticos e os reais elementos biológicos. No modelo desenvolvido, procuramos capturar os principais fatos sobre mobilidade celular na literatura . Dentre eles estão o importante papel das Rho GTPases¹, e as transferências de força (pelo citoesqueleto e pela membrana celular). Nesta sessão serão expostas as principais hipóteses de nosso modelo, a forma como o implementamos e a ligação biológica de cada elemento. O código do programa está presente nos Apêndices [A](#) e [B](#).

Para caracterizar um ambiente de cultura elegemos dois tipos de compartimentos: o *Substrato* e o *Meio*. O *Meio* toma o papel do fluido que envolve uma célula em uma cultura *in vitro*. Nestes tipos de experimentos o meio é essencial para a sobrevivência da célula, pois fornece os nutrientes necessários e promove um ambiente adequado para estas. O *Substrato* representa qualquer superfície aderente plana e homogênea em que uma célula pode se fixar.

À célula biológica associamos três compartimentos: o *Nucleo* , o *Front* e o *Cyto*. Optamos por dividir o corpo celular em duas estruturas, pois como sabemos, tanto uma célula se espalhando simetricamente sobre o substrato, quanto uma célula polarizada possuem duas principais estruturas diferenciadas pela organização do citoesqueleto e pela concentração das Rho GTPases [5][11].

O *Front* representa uma estrutura protrusiva em que existe uma maior probabilidade de surgirem adesões, e em que Rac e CDC42 são abundantes. Desse modo, o *Front* pode representar tanto o lamelipódio como as bordas de uma célula se espalhando. As características atribuídas ao *Front* são implementadas por diversos módulos que serão explicados a seguir.

Ao *Cyto* está associada uma região em que adesões se desmontam e em que não seja expressivo o aparecimento de novas adesões. Nesta região está

¹ As Rho GTPases tem importante papel na polarização de uma célula ou no seu espalhamento sobre um substrato.

contido todo o restante da célula: seu núcleo, seu citoplasma, suas organelas e etc. No caso de uma célula em movimento, estão presentes no *Cyto* fibras de *stress* e uma maior concentração de Rho. Novamente aqui, são os módulos que conferem ao *Cyto* estas características.

As propriedades do contato da membrana celular, bem como as ligações fracas e homogêneas de proteínas de adesão com o substrato estão incorporadas no termo de energia de contato, definidos pelo módulo de contato, como descrito anteriormente.

Antes de estar polarizada, uma célula deve estar aderida ao substrato. Para determinar os parâmetros $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$, da Equação 2.4, que melhor descrevem a situação biológica de uma célula estacionária, fizemos uma varredura parcial de parâmetros. Isto é, exploramos relações entre os parâmetros², mas não diferentes possibilidades destes para uma mesma relação.

Analisamos a interação de contato entre *Front*, *Cyto* e *Meio*, ambos com o mesmo volume alvo e o mesmo número de *pixels* iniciais, variando os parâmetros $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$. Os resultados obtidos estão expostos nas Figuras 3.1 e 3.2.

Comparando-se os resultados destas figuras (3.1 e 3.2) com a imagem de uma célula estacionária dada pela Figura 1.4A, constata-se que três intervalos da Figura 3.1 poderiam, a princípio, descrever o fenômeno biológico:

- A: $J_{cm} > J_{fm} > J_{cf} = 0$,
- B: $J_{cm} > J_{cf} > J_{fm} > 0$ e
- C: $J_{cm} > J_{fm} > J_{cf} > 0$.

onde J_{cm} denota o $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ entre *Cyto* e *Meio*, J_{fm} denota o $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ entre *Front* e *Meio* e J_{cf} denota o $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ entre *Cyto* e *Front*.

Medidas experimentais da energia de superfície de uma célula com o seu meio de cultura são complicadas e, até onde sabemos, ainda não foram feitas. Além disso, a energia de contato entre *Front* e *Cyto* incorpora diversas interações biológicas internas³ cujas medidas são ainda mais difíceis de realizar, se é que são possíveis. Assim não existem, por enquanto, argumentos físicos ou biológicos aceitáveis para que se possa escolher entre uma das três opções. Dessa forma, optamos por seguir a análise com o intervalo C, mas tendo em

²Ou seja, se determinada energia é maior ou menor do que outra.

³ Estas interações devem-se a, principalmente, trocas de forças entre o córtex celular, o citoesqueleto e a membrana plasmática. Além de efeitos ocasionados por reações químicas.

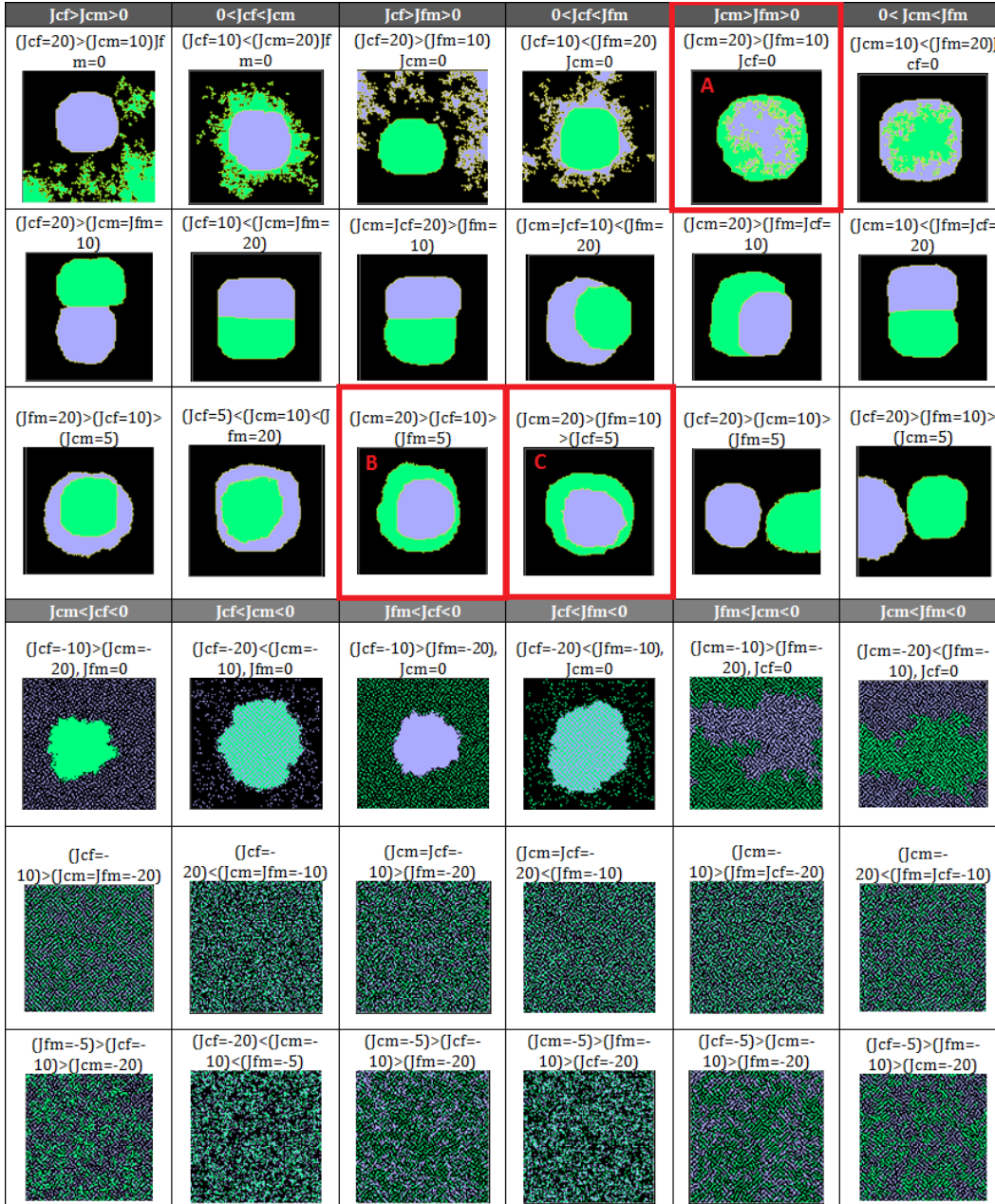


Figura 3.1: Resultados da varredura de parâmetros por intervalo. Variamos os parâmetros $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ da Equação 2.4, com valores 20,10 e 5 no caso de J_s positivos e -20,-10 e -5 nos caso de J_s negativos. J_{cm} denota o J entre *Cyto* e *Meio*, J_{fm} denota o J entre *Front* e *Meio* e J_{cf} denota o J entre *Cyto* e *Front*. As imagens foram obtidas por meio de um programa simplificado contendo apenas três compartimentos: o *Cyto* (lilás), o *Front* (verde) e o *Meio* (preto); e dois termos de energia, o de contato e o de volume. A rede utilizada foi de 100×100 pixels, em uma simulação bidimensional, com $T=10$ e interações até três vizinhos. O número de pixels iniciais e os volumes alvos utilizados para *Cyto* e *Front* foram os mesmos. As simulações foram rodadas até que uma configuração estável fosse obtida. As três morfologias obtidas biologicamente aceitáveis estão em destaque.

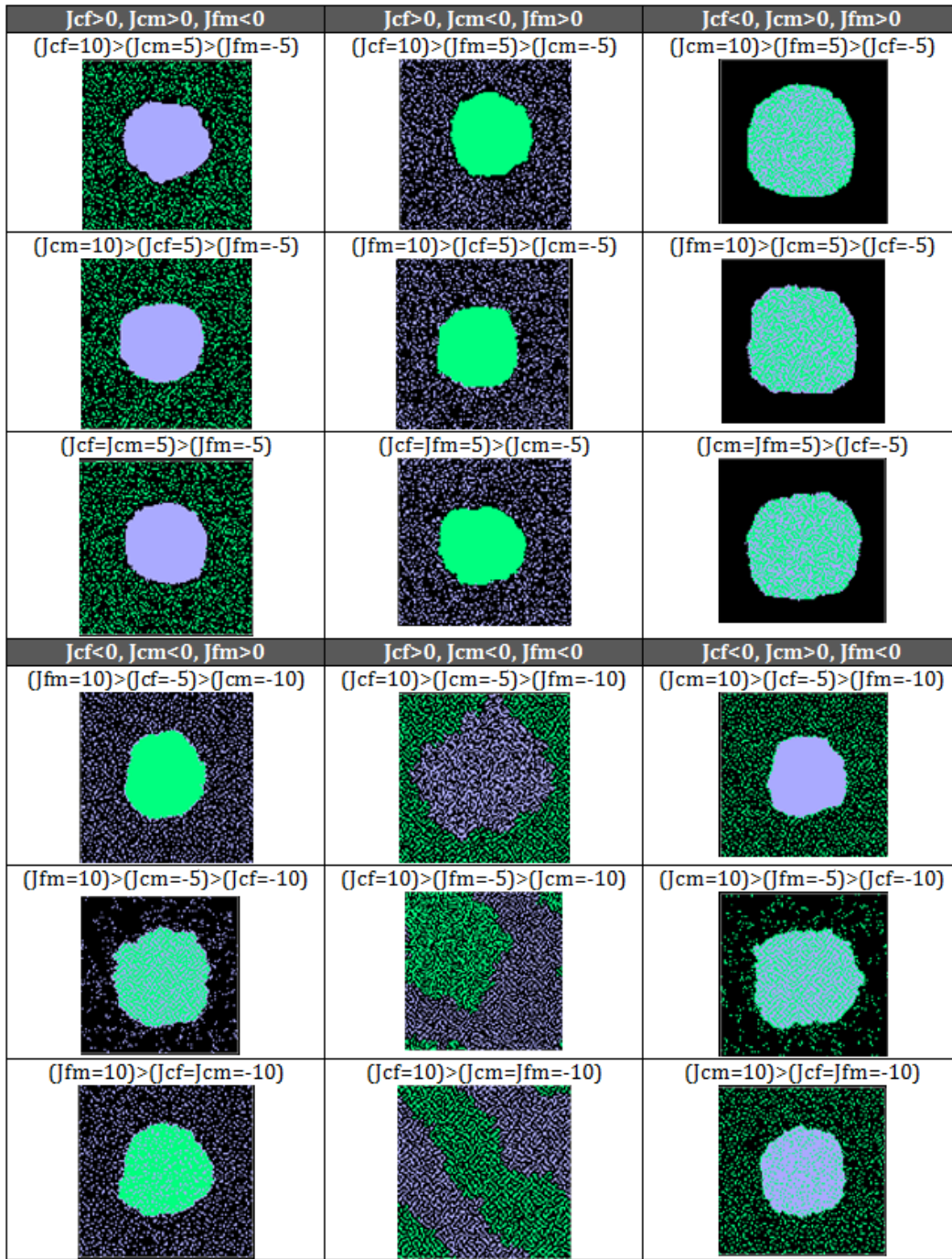


Figura 3.2: Resultados da varredura de parâmetros por intervalo. Variamos os parâmetros $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ da Equação 2.4, com valores 10, 5 e -5 no caso de dois Js positivos e 10,-5 e -10 no caso de dois Js negativos. J_{cm} denota o J entre *Cyto* e *Meio*, J_{fm} denota o J entre *Front* e *Meio* e J_{cf} denota o J entre *Cyto* e *Front*. As imagens foram obtidas por meio de um programa simplificado contendo apenas três compartimentos: o *Cyto* (lilás), o *Front* (verde) e o *Meio* (preto); e dois termos de energia, o de contato e o de volume. A rede utilizada foi de 100x100 *pixels*, em uma simulação bidimensional, com T=10 e interações até três vizinhos. O número de *pixels* iniciais e os volumes alvos utilizados para *Cyto* e *Front* foram os mesmos. As simulações foram rodadas até que uma configuração estável fosse obtida. Para esta varredura nenhum intervalo foi de interesse para a nossa simulação.

mente que os outros dois não podem ser descartados.

Analisamos, também, a interação de contato entre um dos elementos, *Front* ou *Cyto*, que chamamos de elemento X, com o *Meio* e o *Substrato*. Para tal, variamos os parâmetros $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ da Equação 2.4. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 3.3.

Esta figura (3.3) é um interessante resultado. Ela expõe os efeitos das interações de diferentes energias de superfície. Se pensarmos, por exemplo, que o elemento X é uma gota de um fluido a figura estaria mostrando um esquema para diferentes molhabilidades.

No caso de uma célula cada configuração dependeria do tipo de substrato e do tipo de meio. Como mencionado anteriormente, tanto *Cyto* como *Front* devem ser, em nosso modelo, estruturas aderentes (embora o *Front* apresente mais aderência do que o *Cyto*). Assim, excluindo-se as configurações: M, D, V, W e X da Figura 3.3; todas as outras possibilidades, a princípio, são válidas. Já que, para se descartar configurações, como as dadas pelos quadros: A, B, G, L, N, R, S, T e U, uma varredura mais fina seria necessária. Além disso, para as configurações restantes aplica-se o mesmo argumento citado anteriormente.

Uma relação de energia que nos deu bons resultados, e que foi a escolha para o restante deste trabalho, foi a seguinte:

$$(Jms=30) > (Jcm=20) > (Jfm=18) > (Jcs=5) > (Jcf=1) > (Jfs=0)$$

Correspondente ao quadro C, da Figura 3.3 (tanto para a interação do *Cyto* com o *Meio* e o *Substrato*, quanto para a do *Front* com estes) e ao quadro C, da Figura 3.1 (para as interações entre *Cyto*, *Front* e *Meio*).

Somente diferentes energias de contato não são o suficiente para a caracterização do *Front* como a parte protrusiva de uma célula em movimento e do *Cyto* como a parte traseira. Já que, para qualquer escolha de parâmetros, a morfologia é sempre simétrica. Assim, mais elementos e termos de energia são necessários.

Para incluir uma maior probabilidade de ocorrer adesões no *Front*, como menciona a Referência [18], definimos em nosso programa um campo chamado *Campo de Actina*. Este campo obedece à Equação 2.5 e é secretado pelo *Front*⁴. Dessa forma, regiões em que a quantidade de *Front* é mais elevada

⁴Este campo é ligado somente após 300 passos de Monte Carlo, quando a célula apresenta uma morfologia estável e característica de uma célula espalhada.

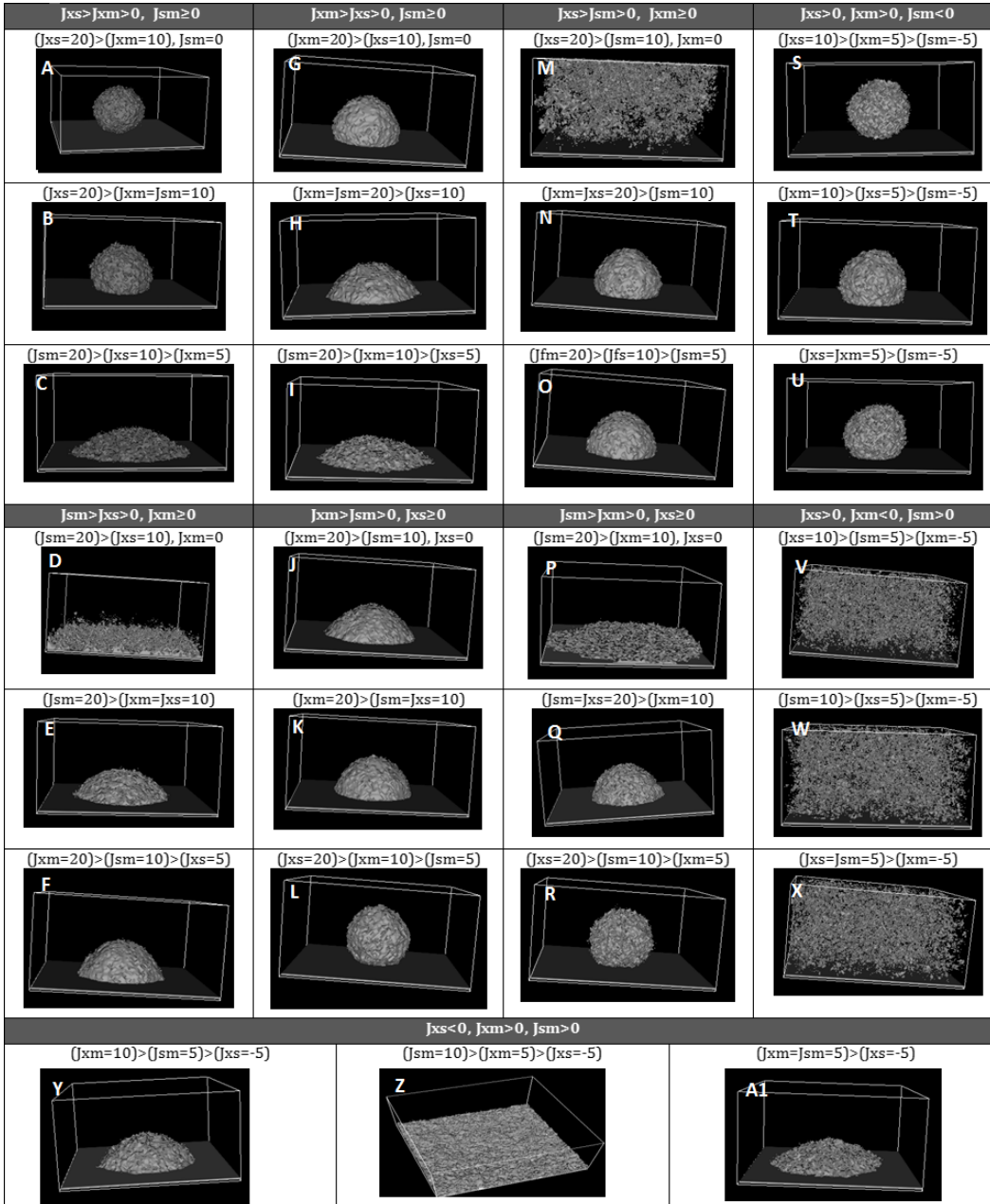


Figura 3.3: Resultados da varredura de parâmetros por intervalo. Variamos os parâmetros $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ da Equação 2.4, com valores 20, 10 e 5 no caso de J_s positivos e 10, 5 e -5 no caso de um J_s negativo. J_{xs} denota o J entre um elemento X (*Cyto* ou *Front*) e o *Substrato*, J_{xm} denota o J entre o elemento X e o *Meio* e J_{sm} denota o J entre o *Substrato* e o *Meio*. As imagens foram obtidas por meio de um programa simplificado contendo apenas três compartimentos: o elemento X (cinza claro), o *Substrato* (cinza escuro) e o *Meio* (preto); e dois termos de energia, o de contato e o de volume. A rede utilizada foi de $100 \times 100 \times 50$ pixels, em uma simulação tridimensional, com $T=100$ e interações até três vizinhos. O *Substrato* recebeu na simulação o atributo *Freeze*. Isto quer dizer que o *Substrato* não participa do sorteio de pixels a cada passo de Monte Carlo. As simulações foram rodadas até que uma configuração estável fosse obtida.

apresentam uma maior concentração deste campo. A escolha do nome deve-se ao fato de que se espera que, em regiões com uma maior concentração de monômeros de actina⁵ (e portanto, mais filamentos), haja uma maior probabilidade de surgirem adesões⁶. Como não conhecemos a distribuição de monômeros de actina e como esta distribuição apresenta flutuações estatísticas, é uma boa alternativa utilizar um campo para modelar este fenômeno. Em especial, porque este campo também sofre flutuações estatísticas devido ao fato de ser secretado pelo *Front* (cuja distribuição está sujeita à temperatura estatística do algoritmo). Além disso, a utilização de um campo permite a descrição de uma concentração média de monômeros de actina⁷.

Definimos então que, a partir de certa concentração, existe uma probabilidade de surgir um novo compartimento, que chamamos de *Adesao*, quebrando a simetria da célula. Os compartimentos *Adesao* representam biologicamente pontos de ancoragens fortes, da célula ao substrato: adesões nascentes, complexos focais e adesões focais.

Ajustamos os parâmetros de maneira que este campo exista somente no *Front* e que, após um transiente, a concentração máxima deste campo se mantenha aproximadamente constante, podendo variar a posição do espaço em que ocorre o seu pico. Isto é coerente com o observado experimentalmente, pois em uma célula existe uma quantidade finita, e aproximadamente constante, de monômeros de actina.

Para simular uma protrusão⁸ fizemos uso de um segundo Campo, o *Campo de F-Actina*⁹ e de um termo de energia. Este campo é secretado pelos compartimentos *Adesao* e repele o *Front* por meio do módulo de quimiotaxia. A descrição das protrusões por meio de um campo é razoável pois caracteriza um fenômeno que possui uma escala observável de micrômetros (ordem de grandeza do lamelipódio), por meio de um objeto médio que incorpora fenômenos que possuem uma escala da ordem de grandeza de nanômetros (ordem de grandeza dos filamentos de actina). Este módulo é muito conveniente, já que neste contexto, o Campo de F-Actina¹⁰ possui um caráter de energia potencial.

⁵Propriedade característica do lamelipódio.

⁶Já que as adesões sempre estão conectadas aos filamentos de actina, por meio de complexos como o indicado na Figura 1.2

⁷A utilização de um campo permite a descrição de uma concentração média de monômeros de actina pois estes são muito menores do que o lamelipódio.

⁸Isto é, o efeito da polimerização dos filamentos de actina juntamente com o equilíbrio de forças gerado pelas adesões.

⁹Campo de F-Actina também obedece à Equação 2.5

¹⁰F-Actina denota: filamentos de actina.

Basta olhar para a Equação 2.6 e lembrar o fato de que $\frac{\Delta H}{\Delta x} = \frac{\Delta E}{1\text{pixel}}$. Assim, se o parâmetro λ for negativo, o campo gera uma força de repulsão no *Front*. Isto é, trocas de *pixels* contrárias ao gradiente do campo são favorecidas.

À medida que o *Front* é repellido, a célula anda, pois as energias definidas favorecem que *Cyto* acompanhe o movimento do *Front*. Os compartimentos *Adesao* ficam fixos devido a uma baixa energia de contato com o *Substrato* e a um alto valor de λ na energia de volume. Assim, após certo período de tempo, as adesões passam a estar em contato com o *Cyto*. Além disso, à medida que a célula avança, algumas das adesões que passam a estar em contato com o *Cyto* desaparecem (devido às energias escolhidas), tal como ocorre biologicamente, e novas adesões vão sendo criadas nas bordas do *Front*. O mecanismo repete-se, estabelecendo assim, um movimento.

Julgamos necessária a presença de outro compartimento, o *Nucleo* (representando o núcleo biológico), devido a uma hipótese que quisemos testar. Dentre todas as referências pesquisadas pouca atenção é dada à transferência de *momentum* para o núcleo. Nós propomos que o núcleo deve estar conectado de alguma maneira ao citoesqueleto, caso contrário ficaria para trás.

Para simular esta suposta conexão fizemos uso do Módulo *FocalPointPlasticity*, conectando o *Nucleo* aos compartimentos *Adesao* por uma energia de mola¹¹. Um termo harmônico é razoável pois em boa aproximação modela muito bem vários fenômenos presentes na natureza. Assim, como não conhecemos o tipo de conexão, um *ansatz* harmônico é uma boa alternativa.

Um esquema para o nosso modelo, contendo todas as informações expostas até aqui, está indicado na Figura 3.4. A Figura 3.5 mostra a conexão dos elementos de nosso modelo, com os elementos biológicos. Além disso, uma série de imagens representativas retiradas de nossa simulação estão expressas na Figura 3.6.

¹¹Já que toda adesão biológica está conectada ao citoesqueleto, como mostra a Figura 1.2.

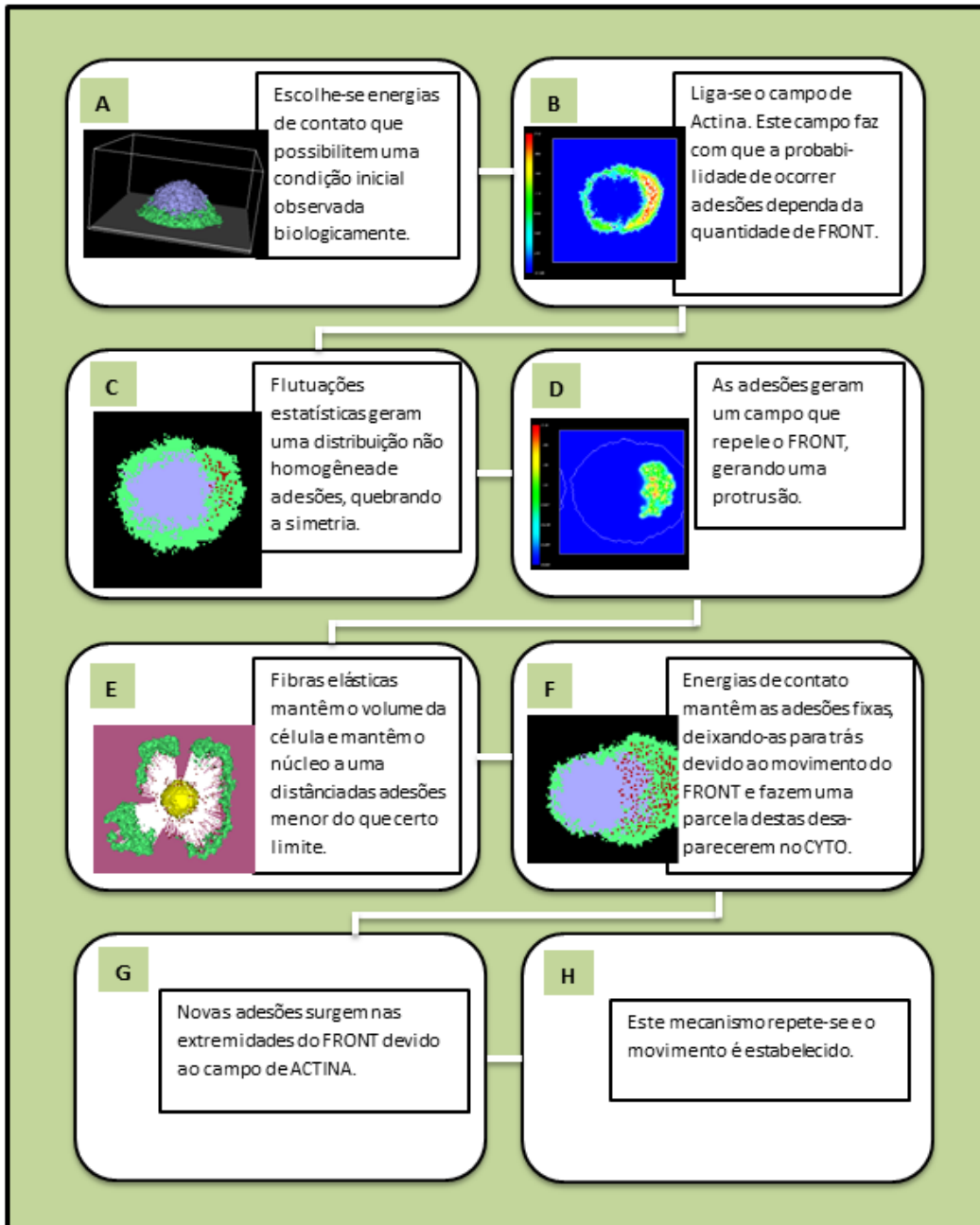


Figura 3.4: Esquema representando os principais aspectos de nosso modelo. As imagens em cada quadro foram retiradas de nossa simulação. O *Cyto* está representado em lilás e o *Front* em verde. A) Configuração estável, obtida após 300 passos de Monte Carlo sem a presença de qualquer Campo. B) Imagem de um corte no plano $z=1$ da distribuição do Campo de Actina. C) Imagem de um corte no plano $z=1$ mostrando a quebra de simetria ocasionada por uma maior concentração de adesões. D) Imagem indicando um corte no plano $z=1$ da distribuição do Campo de F-Actina. E) Imagem 3D, em que o CYTO está configurado para ser invisível, mostrando a conexão dos pontos de adesão ao núcleo. F) Imagem de um corte no plano $z=1$ da célula polarizada, em movimento indicando adesão que ficaram para trás.

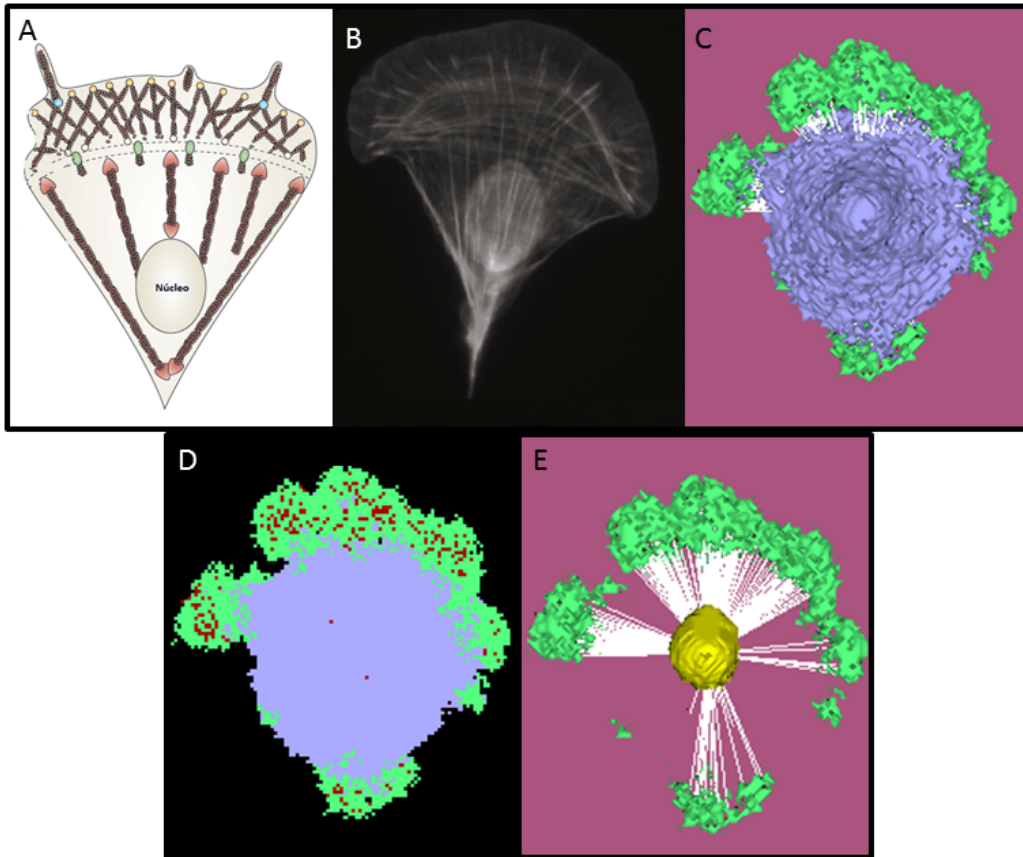


Figura 3.5: Conexão dos elementos de nosso modelo, com os elementos biológicos. (A) Modelo teórico mostrando as principais estruturas de uma célula migratória, (imagem retirada do trabalho de Parsons, J.T. *et al.* [5]). (B) Imagem de fluorescência de um fibroblasto de embrião de rato (Biblioteca de Imagens: [http://biologyimagelibrary.com.br / imageId = 48799](http://biologyimagelibrary.com.br/imageId=48799)). Pode-se ver o núcleo, os feixes paralelos de actina no lamélio e a rede do lamelipódio. As imagens (C), (D) e (E) foram retiradas da simulação do programa dos Apêndices A e B. O *Cyto* está representado em lilás e o *Front* em verde. (C) Foto da simulação no modo de visualização 3D. (D) Foto da simulação, no modo de visualização 2D (corte no plano $z=1$), mostrando as adesões (bordô). (E) Foto da simulação no modo 3D, com o *Cyto* invisível, permitindo a visualização das fibras de *stress* (implementadas por meio do Módulo *FocalPointPlasticity*).

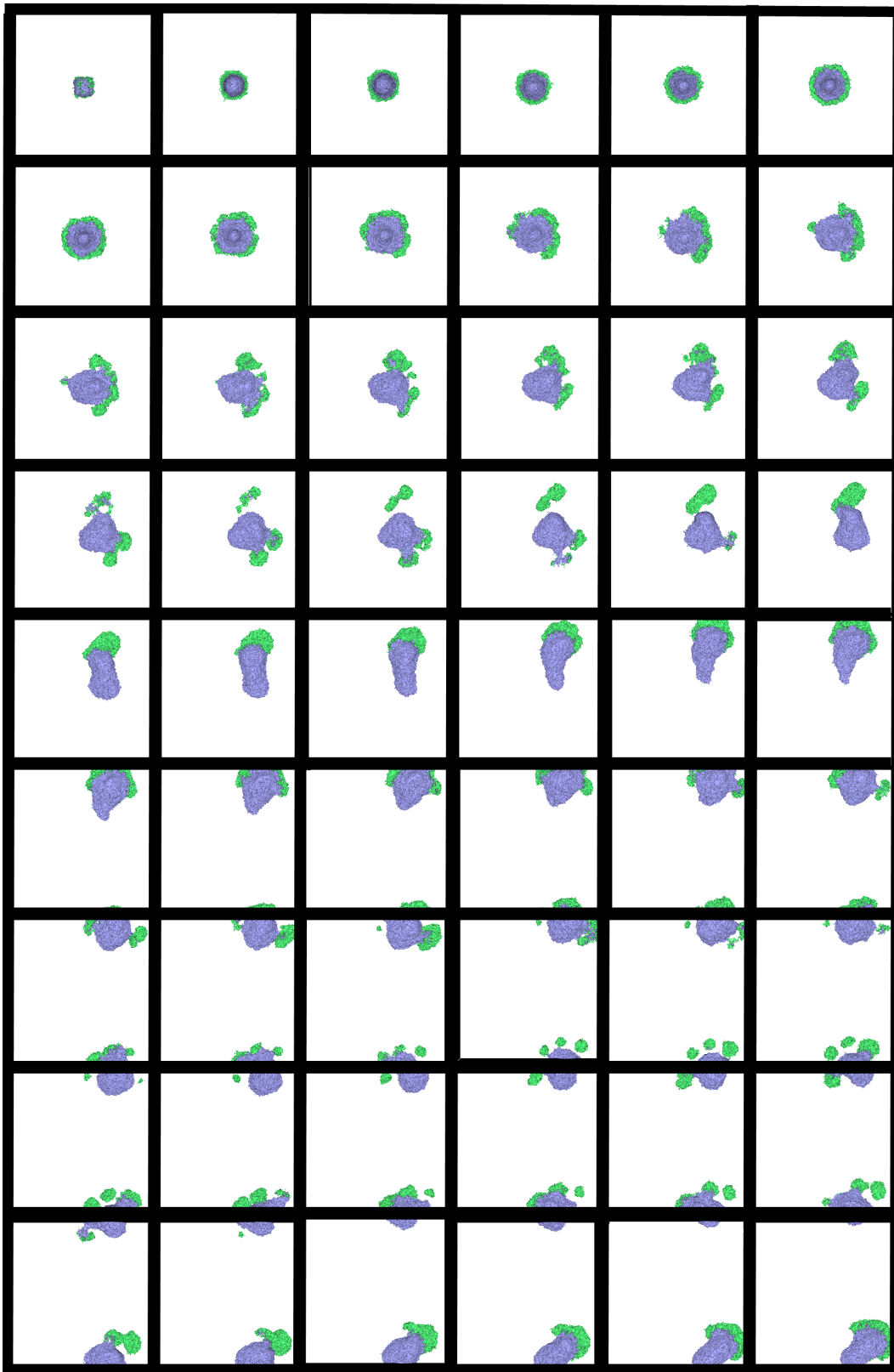


Figura 3.6: Fotos do *player* do CompuCell3D da simulação computacional de nosso modelo. A opção de visualização mostrada é a 3D. Utilizou-se uma rede de $400 \times 400 \times 40$ *pixels*, com condições de contorno periódicas, e uma célula composta por $30 \times 30 \times 30$ *pixels*. O *Cyto* está representado em lilás e o *Front* em verde. A primeira imagem refere-se ao passo de Monte Carlo de número 20 e a última ao de número 4340. As fotos foram tiradas a cada 80 passos de Monte Carlo. Uma descrição mais detalhada dos parâmetros pode ser encontrada no programa dos Apêndices A e B.

4 *Considerações Finais*

Neste trabalho definimos uma célula simplificada, na qual introduzimos apenas elementos que consideramos imprescindíveis ao movimento. O conjunto de componentes escolhidos foi capaz de quebrar a simetria da célula definida e vários comportamentos qualitativos foram compatíveis com os observados experimentalmente. Dentre eles, pode-se citar a morfologia mostrada na Figura 3.5 e o deslizamento das adesões.

Entretanto como uma varredura de parâmetros mais fina não foi realizada, é impossível afirmar que os elementos escolhidos são os elementos necessários e suficientes para a polarização e para o subsequente movimento da célula. Além disso, como foi mostrado nas fotos da simulação na Figura 3.6 alguns comportamentos estão muito em desacordo com a realidade biológica, já que uma célula não se despedaça e depois volta a se ligar à parte separada.

Em algumas simulações sem a presença das fibras de *stress*, o *Nucleo* foi deixado para trás. O que pode ser um indicativo de que, de fato, é necessário que exista uma conexão do núcleo biológico ao citoesqueleto. Porém, pelos dados obtidos até o momento, tudo que podemos afirmar é que, para aquela particular escolha de parâmetros, observou-se este comportamento.

Nosso modelo possui um grande diferencial em relação aos modelos matemáticos e computacionais presentes na literatura. Em geral [8][9], o que se têm feito é modelar processos específicos que ocorrem na migração celular em separado (como, por exemplo, a protrusão [37][38][39][40]) ou caracterizar a migração celular assumindo uma polarização e uma geometria pré-definidas, como em [41] ou em [42]. Até onde sabemos, os únicos trabalhos que se preocupam, no contexto de migração celular, com o mecanismo da polarização por processos internos são os trabalhos de Sambeth,R. e Baumgaertner,A. [6], em 1D, e Marée,A.F.*et al.* [7], em 2D. Sendo que este último se aplica somente a tipos de célula semelhantes ao queratócito¹ (além disso, embora os mecanismos

¹Veja a Figura 1.4.

sejam internos o modelo assume um estímulo externo alterando subitamente uma propriedade interna).

Nosso modelo, além de estudar o mecanismo de polarização, por possuir uma relação direta entre os entes matemáticos e biológicos e permitir que as células adquiram formatos decorrentes de mecanismos internos, dá a possibilidade de previsão de morfologias a partir de conhecimentos sobre a protrusão, a retração e a aderência (dados que poderiam ser obtidos experimentalmente). Além disso, por ser um modelo em 3D, possibilita a investigação de propriedades que seriam impossíveis de se analisar em simulações em 1D ou 2D, como, por exemplo, as diferentes espessuras do lamelipódio.

O trabalho exposto aqui permitiu uma investigação à cerca dos principais aspectos da mobilidade celular levando-nos a diversas hipóteses e questionamentos. Este modelo será a base para pesquisas futuras em que se possa procurar um modelo de equações constitutivas para uma célula em migração em função de parâmetros experimentais, e a partir daí, possibilitará um estudo quantitativo da migração e polarização celular.

APÊNDICE A – Implementação do Modelo: simulacao.py

```

global Ecc , Ecf , Ecm , Ecs , Eff , Efm , Efs , Emm , Ems , Ess

Ecc=0; Ecf=1; Ecm=20; Ecs=5; Eff=0 ; Efm=18; Efs=0
Emm=0; Ems=30 ; Ess=0

def configureSimulation(sim):
    import CompuCellSetup
    from XMLUtils import ElementCC3D
    CompuCell3DElmt=ElementCC3D(" CompuCell3D " , {" version " : " 3.6.2 " })
    PottsElmnt=CompuCell3DElmt.ElementCC3D(" Potts ")

    # Basic properties of CPM (GGH) algorithm
    PottsElmnt.ElementCC3D(" Dimensions " , {" x " : " 400 " , " y " : " 400 " , " z " : " 40 " })
    PottsElmnt.ElementCC3D(" Steps " , {} , " 4000000 ")
    PottsElmnt.ElementCC3D(" Temperature " , {} , " 100 ")
    PottsElmnt.ElementCC3D(" NeighborOrder " , {} , " 3 ")
    PottsElmnt.ElementCC3D(" Boundary_y " , {} , " Periodic ")
    PottsElmnt.ElementCC3D(" Boundary_x " , {} , " Periodic ")

    PluginElmnt=CompuCell3DElmt.ElementCC3D(" Plugin " , {" Name " : " CellType " })

    # Listing all cell types in the simulation
    PluginElmnt.ElementCC3D(" CellType " , {" TypeId " : " 0 " , " TypeName " : " Medium " })
    PluginElmnt.ElementCC3D(" CellType " , \
    {" Freeze " : " " , " TypeId " : " 1 " , " TypeName " : " Substrato " })
    PluginElmnt.ElementCC3D(" CellType " , {" TypeId " : " 2 " , " TypeName " : " FRONT " })
    PluginElmnt.ElementCC3D(" CellType " , {" TypeId " : " 3 " , " TypeName " : " CYTO " })
    PluginElmnt.ElementCC3D(" CellType " , {" TypeId " : " 4 " , " TypeName " : " ADESAO " })
    PluginElmnt.ElementCC3D(" CellType " , {" TypeId " : " 5 " , " TypeName " : " NUCLEO " })

    PluginElmnt_1=CompuCell3DElmt.ElementCC3D(" Plugin " , \
    {" Name " : " VolumeLocalFlex " })

    Plugin_com=CompuCell3DElmt.ElementCC3D(" Plugin " , {" Name " : " CenterOfMass " })

```

```

Steps_boxWatcher = CompuCell3DElmt.ElementCC3D\
("Steppable",{ "Type": "BoxWatcher" })
Steps_boxWatcher.ElementCC3D("XMargin",{ },4)
Steps_boxWatcher.ElementCC3D("YMargin",{ },4)
Steps_boxWatcher.ElementCC3D("ZMargin",{ },4)

# Module tracking center of mass of each cell

PluginElmnt_2=CompuCell3DElmt.ElementCC3D("Plugin",\
{"Name": "PixelTracker"})

# Module tracking pixels of each cell

PluginElmnt_3=CompuCell3DElmt.ElementCC3D("Plugin",{ "Name": "Contact" })
# Specification of adhesion energies
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "Medium", "Type2": "Medium"},Emm)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "Medium", "Type2": "CYTO"},Ecm)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "Medium", "Type2": "FRONT"},Efm)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "Medium", "Type2": "Substrato"},Ems)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "Medium", "Type2": "ADESAO"},"500.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "Medium", "Type2": "NUCLEO"},"750.0")

PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "CYTO", "Type2": "CYTO"},Ecc)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "CYTO", "Type2": "FRONT"},Ecf)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "CYTO", "Type2": "Substrato"},Ecs)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "CYTO", "Type2": "ADESAO"},"0.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "CYTO", "Type2": "NUCLEO"},"75.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "FRONT", "Type2": "FRONT"},Eff)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "FRONT", "Type2": "Substrato"},Efs)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "FRONT", "Type2": "ADESAO"},"0.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",{ "Type1": "FRONT", "Type2": "NUCLEO"},"75.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "Substrato", "Type2": "Substrato"},Ess)
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "Substrato", "Type2": "ADESAO"},"-25.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "Substrato", "Type2": "NUCLEO"},"750.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "ADESAO", "Type2": "ADESAO"},"5000.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1": "NUCLEO", "Type2": "NUCLEO"},"0.0")

```

```

PluginElmnt_3.ElementCC3D("Energy",\
{"Type1":"NUCLEO","Type2":"ADESAO"},"750.0")
PluginElmnt_3.ElementCC3D("NeighborOrder",{ },"3")
PluginElmnt_2=CompuCell3DElmnt.ElementCC3D("Plugin",\
{"Name":"FocalPointPlasticity"})
PluginElmnt_2.ElementCC3D("Local")
ParametersElmnt_1=PluginElmnt_2.ElementCC3D("Parameters",\
{"Type1":"ADESAO","Type2":"NUCLEO"})
ParametersElmnt_1.ElementCC3D("Lambda",{ },"10")
ParametersElmnt_1.ElementCC3D("ActivationEnergy",{ },"0.0")
ParametersElmnt_1.ElementCC3D("TargetDistance",{ },"5")
ParametersElmnt_1.ElementCC3D("MaxDistance",{ },"100")
ParametersElmnt_1.ElementCC3D("MaxNumberOfJunctions",\
{"NeighborOrder":"1"},"1")
PluginElmnt_2.ElementCC3D("NeighborOrder",{ },"1")

secretion=CompuCell3DElmnt.ElementCC3D("Plugin",{ "Name":"Secretion"})

# Specification of secretion properties of individual
#cells can be done in Python
FieldElmnt=secretion.ElementCC3D("Field",{ "Name":"ACTIN"})
FieldElmnt.ElementCC3D("SecretionOnContact",\
{"SecreteOnContactWith":"Medium","Type":"FRONT"},"0")
FieldElmnt.ElementCC3D("SecretionOnContact",\
{"SecreteOnContactWith":"Substrato","Type":"FRONT"},"0")
FieldElmnt_2=secretion.ElementCC3D("Field",{ "Name":"F-ACTIN"})
FieldElmnt_2.ElementCC3D("SecretionOnContact",\
{"SecreteOnContactWith":"Substrato","Type":"ADESAO"},"5.0")

chemotaxis=CompuCell3DElmnt.ElementCC3D("Plugin",{ "Name":"Chemotaxis"})

# Specification of chemotaxis properties of select cell types.
ChemicalFieldElmnt_1=chemotaxis.ElementCC3D("ChemicalField",\
{"Name":"F-ACTIN","Source":"DiffusionSolverFE"})
ChemicalFieldElmnt_1.ElementCC3D("ChemotaxisByType",\
{"ChemotactTowards":"Medium","Lambda":"-5.0","Type":"FRONT"})
SteppableElmnt=CompuCell3DElmnt.ElementCC3D("Steppable",\
{"Type":"DiffusionSolverFE"})

# Specification of PDE solvers
DiffusionFieldElmnt=SteppableElmnt.ElementCC3D("DiffusionField")
DiffusionDataElmnt=DiffusionFieldElmnt.ElementCC3D("DiffusionData")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("FieldName",{ },"ACTIN")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("GlobalDiffusionConstant",{ },"0.1")

```

```

DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("GlobalDecayConstant",{},{},"1e-03")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("DiffusionCoefficient",\
{"CellType":"Medium"},"1e-05")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("DiffusionCoefficient",\
{"CellType":"Substrato"},"1e-05")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("DiffusionCoefficient",\
{"CellType":"CYTO"},"1e-05")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("DecayCoefficient",\
{"CellType":"Medium"},"0.9")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("DecayCoefficient",\
{"CellType":"CYTO"},"0.9")
DiffusionDataElmnt.ElementCC3D("DecayCoefficient",\
{"CellType":"Substrato"},"0.9")

BoundaryConditionsElmnt=DiffusionFieldElmnt.ElementCC3D("BoundaryConditions")
PlaneElmnt=BoundaryConditionsElmnt.ElementCC3D("Plane",{ "Axis":"X"})
PlaneElmnt.ElementCC3D("Periodic")
PlaneElmnt_1=BoundaryConditionsElmnt.ElementCC3D("Plane",{ "Axis":"Y"})
PlaneElmnt_1.ElementCC3D("Periodic")

DiffusionFieldElmnt_2=SteppableElmnt.ElementCC3D("DiffusionField")
DiffusionDataElmnt_2=DiffusionFieldElmnt_2.ElementCC3D("DiffusionData")
DiffusionDataElmnt_2.ElementCC3D("FieldName",{},{}, "F-ACTIN")
DiffusionDataElmnt_2.ElementCC3D("GlobalDiffusionConstant",{},{}, "0.3")
DiffusionDataElmnt_2.ElementCC3D("GlobalDecayConstant",{},{}, "1e-03")
DiffusionDataElmnt_2.ElementCC3D("DiffusionCoefficient",\
{"CellType":"Medium"},"1e-05")
DiffusionDataElmnt_2.ElementCC3D("DiffusionCoefficient",\
{"CellType":"Substrato"},"1e-05")
DiffusionDataElmnt_2.ElementCC3D("DecayCoefficient",\
{"CellType":"Medium"},"0.9")
DiffusionDataElmnt_2.ElementCC3D("DecayCoefficient",\
{"CellType":"Substrato"},"0.9")
SecretionDataElmnt_2=DiffusionFieldElmnt_2.ElementCC3D("SecretionData")

BoundaryConditionsElmnt_2=DiffusionFieldElmnt_2.ElementCC3D\
("BoundaryConditions")
PlaneElmnt_4=BoundaryConditionsElmnt_2.ElementCC3D("Plane",{ "Axis":"X"})
PlaneElmnt_4.ElementCC3D("Periodic")
PlaneElmnt_5=BoundaryConditionsElmnt_2.ElementCC3D("Plane",{ "Axis":"Y"})
PlaneElmnt_5.ElementCC3D("Periodic")

SteppableElmnt=CompuCell3DElmnt.ElementCC3D("Steppable",\
{"Type":"UniformInitializer"})

```

```

# Initial layout of cells in the form of rectangular slab

RegionElmnt=SteppableElmnt.ElementCC3D("Region")
RegionElmnt.ElementCC3D("BoxMin",{ "x": "0", "y": "0", "z": "0" })
RegionElmnt.ElementCC3D("BoxMax",{ "x": "400", "y": "400", "z": "1" })
RegionElmnt.ElementCC3D("Gap", {}, "0")
RegionElmnt.ElementCC3D("Width", {}, "400")
RegionElmnt.ElementCC3D("Types", {}, "Substrato")

RegionElmnt=SteppableElmnt.ElementCC3D("Region")
RegionElmnt.ElementCC3D("BoxMin",{ "x": "0", "y": "0", "z": "1" })
RegionElmnt.ElementCC3D("BoxMax",{ "x": "400", "y": "400", "z": "40" })
RegionElmnt.ElementCC3D("Gap", {}, "0")
RegionElmnt.ElementCC3D("Width", {}, "400")
RegionElmnt.ElementCC3D("Types", {}, "Medium")

RegionElmnt=SteppableElmnt.ElementCC3D("Region")
RegionElmnt.ElementCC3D("BoxMin",{ "x": "185", "y": "185", "z": "1" })
RegionElmnt.ElementCC3D("BoxMax",{ "x": "215", "y": "215", "z": "31" })
RegionElmnt.ElementCC3D("Gap", {}, "0")
RegionElmnt.ElementCC3D("Width", {}, "30")
RegionElmnt.ElementCC3D("Types", {}, "CYTO")

CompuCellSetup.setSimulationXMLDescription(CompuCell3DElmnt)

CompuCellSetup.setSimulationXMLDescription(CompuCell3DElmnt)

import sys
from os import environ
from os import getcwd
import string

sys.path.append(environ["PYTHON_MODULE_PATH"])
import CompuCellSetup
sim, simthread = CompuCellSetup.getCoreSimulationObjects()
configureSimulation(sim)

CompuCellSetup.initializeSimulationObjects(sim, simthread)
steppableRegistry=CompuCellSetup.getSteppableRegistry()

from simulacaoSteppables import FIBRASSteppable
steppableInstance=FIBRASSteppable(sim, _frequency=1)
steppableRegistry.registerSteppable(steppableInstance)

CompuCellSetup.mainLoop(sim, simthread, steppableRegistry)

```

APÊNDICE B – Implementação do Modelo: simulacaoSteppables.py

```

from CompuCell import NeighborFinderParams
import CompuCell
from PySteppables import *
from math import *
import random
import sys
from PySteppablesExamples import MitosisSteppableClustersBase
from PySteppablesExamples import MitosisSteppableBase
from XMLUtils import dictionaryToMapStrStr as d2mss
import os
from PlayerPython import *
from random import *
import math
import cmath

class FIBRASSteppable(SteppableBasePy):

    def __init__(self, _simulator, _frequency=1):
        SteppableBasePy.__init__(self, _simulator, _frequency)
        self.field_actin = CompuCell.getConcentrationField\
            (self.simulator, "ACTIN")
        self.field_Factin = CompuCell.getConcentrationField\
            (self.simulator, "F-ACTIN")

    def start(self):
        import CompuCellSetup
        L=[]; pt=CompuCell.Point3D()
        for cell in self.cellListByType(self.CYTO): #Cyto
            L.append([]); L[len(L)-1].append(cell)
            pixelList=CellPixelList(self.pixelTrackerPlugin, cell)
            for pixel in pixelList:
                L[len(L)-1].append([pixel.pixel.x, pixel.pixel.y, pixel.pixel.z])

```



```

for j in range(len(L)):
    cell=L[j][0]
    pt.x=0; pt.y=0; pt.z=1
    FRONTcell=self.potts.createCellG(pt); FRONTcell.type=self.FRONT
    pt.x=1
    NuclCell=self.potts.createCellG(pt); NuclCell.type=self.NUCLEO
    for i in range(1,len(L[j])):
        pt.x=L[j][i][0]; pt.y=L[j][i][1]; pt.z=L[j][i][2]
        r=random()
        if r<0.2:
            self.cellField.set(pt,FRONTcell)
    for i in range(-1,2):
        for ii in range(-1,2):
            for iii in range(-1,2):
                pt.x=int(cell.xCOM)+i; pt.y=int(cell.yCOM)+ii;\
                pt.z=int(cell.zCOM)+iii
                self.cellField.set(pt,NuclCell)

#setting new parameter values:
#Cyto subcell
cell.targetVolume=(30.*30.*30.)*(0.7) + 0.5
cell.lambdaVolume=1
#Front subcell
FRONTcell.targetVolume=(30.*30.*30)*(0.15) +0.5
FRONTcell.lambdaVolume=1
#Nucleus subcell
NuclCell.targetVolume=int(30*30*30*0.15)+.5
NuclCell.lambdaVolume=5000
self.NuclRad=(NuclCell.targetVolume/4.2)**(1./3)

#Erasing temporary pixels
pt.x=0; pt.y=0; pt.z=1
self.cellField.set(pt,CompuCell.getMediumCell())
pt.x=1
self.cellField.set(pt,CompuCell.getMediumCell())

def step(self,mcs):

    if mcs>300:
        for cell in self.cellListByType(self.FRONT):
            secretor=self.getFieldSecretor("ACTIN")
            secretor.secreteInsideCell(cell,1)
        L=[]; pt=CompuCell.Point3D(); pt1=CompuCell.Point3D()
        for cell in self.cellListByType(self.FRONT):
            L.append([]); L[len(L)-1].append(cell)

```

```

        pixelList=CellPixelList ( self . pixelTrackerPlugin , cell )
    for pixel in pixelList :
        L [ len ( L ) - 1 ] . append \
            ( [ pixel . pixel . x , pixel . pixel . y , pixel . pixel . z ] )
    for j in range ( len ( L ) ) :
        cell=L [ j ] [ 0 ]
        for i in range ( 1 , len ( L [ j ] ) ) :
            pt . x=L [ j ] [ i ] [ 0 ] ; pt . y=L [ j ] [ i ] [ 1 ] ; pt . z=L [ j ] [ i ] [ 2 ]
            if pt . z==1 :
                ActinConc=self . field _ actin . get ( pt )
                r=random ( )
                if ( r < 0.15 * ( 1 + math . tanh ( 0.5 * ActinConc - 5 ) ) ) :
                    ADESAOcell=self . potts . createCellG ( pt ) ; \
                    ADESAOcell . type=self . ADES AO
                    ADES AOcell . targetVolume=1. + 0.4
                    ADES AOcell . lambdaVolume=5000
                    for cell in self . cellListByType ( self . NUCLEO ) :
                        self . focalPointPlasticityPlugin . \
                            createFocalPointPlasticityLink \
                                ( ADES AOcell , cell , 30.0 , self . NuclRad , 100.0 )

def finish ( self ) :
    pass

```

Bibliografia

- [1] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. [S.l.]: Garland Science, 2000.
- [2] FRIEDL, P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current opinion in cell biology*, Elsevier, v. 16, n. 1, p. 14–23, 2004.
- [3] BRAY, D. *Cell movements: from molecules to motility*. [S.l.]: Taylor & Francis, 2001.
- [4] D'ARCY, W. T. *On growth and form*. [S.l.]: Cambridge Univ Press, 1963.
- [5] PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 9, p. 633–643, 2010.
- [6] SAMBETH, R.; BAUMGAERTNER, A. Autocatalytic polymerization generates persistent random walk of crawling cells. *Physical review letters*, APS, v. 86, n. 22, p. 5196, 2001.
- [7] MARÉE, A. F. et al. Polarization and movement of keratocytes: a multiscale modelling approach. *Bulletin of mathematical biology*, Springer, v. 68, n. 5, p. 1169–1211, 2006.
- [8] MOGILNER, A.; KEREN, K. The shape of motile cells. *Current Biology*, Elsevier, v. 19, n. 17, p. R762–R771, 2009.
- [9] MOGILNER, A. Mathematics of cell motility: have we got its number? *Journal of mathematical biology*, Springer, v. 58, n. 1-2, p. 105–134, 2009.
- [10] GLAZIER, J. *CompuCell 3D*. 2013. Disponível em: <<http://www.compuCell3d.org/>>.
- [11] PARTRIDGE, M. A.; MARCANTONIO, E. E. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Molecular biology of the cell*, Am Soc Cell Biol, v. 17, n. 10, p. 4237–4248, 2006.
- [12] CRAIG, S. W.; CHEN, H. Lamellipodia protrusion: moving interactions of vinculin and arp2/3. *Current biology*, Elsevier, v. 13, n. 6, p. R236–R238, 2003.
- [13] NEMETHOVA, M. *A Video Tour of Cell Motility*. 2012. Disponível em: <<http://cellix.imba.oeaw.ac.at/>>.
- [14] LADOUX, B.; NICOLAS, A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on Progress in Physics*, IOP Publishing, v. 75, n. 11, p. 116–601, 2012.

- [15] HOTULAINEN, P.; LAPPALAINEN, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology*, Rockefeller Univ Press, v. 173, n. 3, p. 383–394, 2006.
- [16] SMALL, J. V. et al. How do microtubules guide migrating cells? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Nature Publishing Group, v. 3, n. 12, p. 957–964, 2002.
- [17] NOBES, C. D.; HALL, A. Rho, rac, and cdc42 gtpases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, Elsevier, v. 81, n. 1, p. 53–62, 1995.
- [18] SMILENOV, L. B. et al. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 286, n. 5442, p. 1172–1174, 1999.
- [19] CHRZANOWSKA-WODNICKA, M.; BURRIDGE, K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of cell biology*, Rockefeller Univ Press, v. 133, n. 6, p. 1403–1415, 1996.
- [20] GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current opinion in cell biology*, Elsevier, v. 13, n. 5, p. 584–592, 2001.
- [21] RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small gtp-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, Elsevier, v. 70, n. 3, p. 389–399, 1992.
- [22] HELFMAN, D. M. et al. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Molecular biology of the cell*, Am Soc Cell Biol, v. 10, n. 10, p. 3097–3112, 1999.
- [23] GOULIMARI, P. et al. G α 12/13 is essential for directed cell migration and localized rho-dia1 function. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 280, n. 51, p. 42242–42251, 2005.
- [24] PERTZ, O. et al. Spatiotemporal dynamics of rhoa activity in migrating cells. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 440, n. 7087, p. 1069–1072, 2006.
- [25] AMANO, M. et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by rho-kinase. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 275, n. 5304, p. 1308–1311, 1997.
- [26] MACHACEK, M. et al. Coordination of rho gtpase activities during cell protrusion. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 461, n. 7260, p. 99–103, 2009.
- [27] VALLOTTON, P. et al. Tracking retrograde flow in keratocytes: news from the front. *Molecular biology of the cell*, Am Soc Cell Biol, v. 16, n. 3, p. 1223–1231, 2005.
- [28] VICENTE-MANZANARES, M.; CHOI, C. K.; HORWITZ, A. R. Integrins in cell migration—the actin connection. *Journal of cell science*, The Company of Biologists Ltd, v. 122, n. 2, p. 199–206, 2009.

- [29] BROWN, C. M. et al. Probing the integrin-actin linkage using high-resolution protein velocity mapping. *Journal of Cell Science*, The Company of Biologists Ltd, v. 119, n. 24, p. 5204–5214, 2006.
- [30] AELST, L. V.; D’SOUZA-SCHOREY, C. Rho gtpases and signaling networks. *Genes & development*, Cold Spring Harbor Lab, v. 11, n. 18, p. 2295–2322, 1997.
- [31] BROWN, M. C.; TURNER, C. E. Paxillin: adapting to change. *Physiological reviews*, Am Physiological Soc, v. 84, n. 4, p. 1315–1339, 2004.
- [32] PARSONS, J. T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science*, The Company of Biologists Ltd, v. 116, n. 8, p. 1409–1416, 2003.
- [33] PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 9, p. 633–643, 2010.
- [34] SWAT, M. H. et al. Introduction to compucell3d version 3.6. 2. *Detail*, v. 7, n. 7, p. 7.
- [35] SWAT, M. H. et al. Compucell3d reference manual version 3.6. 2. *Bio-complexity Institute and Department of Physics*, 2012.
- [36] GRANER, F. Can surface adhesion drive cell-rearrangement? part i: Biological cell-sorting. *Journal of Theoretical Biology*, Elsevier, v. 164, n. 4, p. 455–476, 1993.
- [37] MOGILNER, A.; OSTER, G. Force generation by actin polymerization ii: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 84, n. 3, p. 1591–1605, 2003.
- [38] SCHAUS, T. E.; TAYLOR, E. W.; BORISY, G. G. Self-organization of actin filament orientation in the dendritic-nucleation/array-treadmilling model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 104, n. 17, p. 7086–7091, 2007.
- [39] SCHAUS, T. E.; BORISY, G. G. Performance of a population of independent filaments in lamellipodial protrusion. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 95, n. 3, p. 1393–1411, 2008.
- [40] PESKIN, C. S.; ODELL, G. M.; OSTER, G. F. Cellular motions and thermal fluctuations: the brownian ratchet. *Biophysical Journal*, Elsevier, v. 65, n. 1, p. 316–324, 1993.
- [41] BOTTINO, D. et al. How nematode sperm crawl. *Journal of Cell Science*, The Company of Biologists Ltd, v. 115, n. 2, p. 367–384, 2002.
- [42] RUBINSTEIN, B.; JACOBSON, K.; MOGILNER, A. Multiscale two-dimensional modeling of a motile simple-shaped cell. *Multiscale Modeling & Simulation*, SIAM, v. 3, n. 2, p. 413–439, 2005.