

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA

Estudo do Estabelecimento de Configurações em Estruturas Celulares¹

Verônica Albers Grieneisen

Dissertação realizada sob orientação da Dra. Rita M. C. de Almeida e apresentada ao Instituto de Física da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Física.

Porto Alegre
Novembro 2004

¹Trabalho financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Estudo do Estabelecimento de Configurações em Estruturas Celulares

Verônica Albers Grieneisen

*“Mir ist das All, ich bin mir selbst verloren,
Der ich noch erst den Göttern Liebling war;
Sie prüften mich, verliehen mir Pandoren,
So reich an Gütern, reicher an Gefahr;
Sie drängten mich zum gabeligen Munde,
Sie trennen mich, und richten mich zu Grunde.” Goethe*

Sumário

Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	8
Agradecimentos	9
Resumo	11
Abstract	13
Parte 1. Fundamentos	15
Capítulo 1. Introdução Geral	17
1.1. Sinopse	17
Capítulo 2. Modelos	20
2.1. Modelos de Spin	20
Parte 2. Topologias/Morfologias	27
Capítulo 3. Topologia I: Espumas	29
3.1. Propriedades Gerais	29
3.2. Diferentes Tipos de Bolhas	39
3.3. Formação de Padrões Devido à Área	41
3.4. Conclusão Intermediária	45
3.5. Sugestões para Pesquisas Futuras	46
Capítulo 4. Topologia II: Hidras	47
4.1. A Biologia da Hidra	47
4.2. Morfogênese (e O que isto tem a ver com Física?)	56
4.3. Adesão Diferenciada	57
4.4. Medindo Tensões Superficiais	72
4.5. Metodologia Experimental para Hidra	80
4.6. Simulações de Modelo de Potts Celular	85
4.7. Sugestões para Pesquisas Futuras	100
Capítulo 5. Topologia III: Câncer	103
5.1. Introdução	103
5.2. Comportamento Celular como “Função” da Forma	108

5.3. Mais Mitose	115
5.4. A Fórmula de Gompertz e Outros Modelos	117
5.5. Experimental	123
5.6. Metadiscussão	137
5.7. Simulações	138
Parte 3. Discussão Final	151
Capítulo 6. Discussão e Perspectivas Gerais	152
6.1. Limitações e Soluções	152
6.2. Conclusões Finais	152
Apêndices	156
Abreviações	157
Condição de Young	158
Observações Experimentais com Hidras	159
Receitas para Experiências com Hidra	163
Meio de Cultura (HM)	163
Meio de Dissociação (DM)	164
Apoptose	165
Referências Bibliográficas	167

Lista de Figuras

2.1.1	Potts $q = 8$	24
2.1.2	Potts $q = 3$	25
3.1.1	Estabilidade de vértices em duas dimensões	30
3.1.2	A geometria de uma bolha	34
3.1.3	Transições topológicas	37
3.1.4	Lei de Aboav-Weaire	38
3.2.1	Energias de fronteiras curvas	40
3.3.1	Espuma esférica em 2D	44
4.1.1	Estrutura geral da hidra adulta	49
4.1.2	Células intersticiais	51
4.1.3	Fenômenos da hidra	54
4.3.1	Reagrupamento celular	59
4.3.2	Associatividade	60
4.3.3	Mudança de vizinhos	67
4.3.4	Flutuações de interface	71
4.4.1	Deformações	77
4.4.2	Medidas sobre um agregado comprimido	78
4.4.3	Arredondamento de agregados	79
4.4.4	Relaxamentos em agregados com cavidade	80
4.5.1	Agregado pequeno	81
4.5.2	Evoluções finais	83
4.5.3	Processos de bursts	84
4.6.1	Dinâmicas de segregação celular I	89
4.6.2	Dinâmicas de segregação celular II	90
4.6.3	Topologia Xadrez	94
4.6.4	Análise de uma progressão Xadrez	95
4.6.5	Diferentes concentrações de epitélios	96
4.6.6	Tecido em aglomerados distintos	97
4.6.7	Pontos tríplexes	98
4.6.8	Bursts	101

5.1.1	TNT's ancorados em pontos discretos	105
5.1.2	Fases e pontos de regulação do ciclo celular	107
5.1.3	Mitose sincronizada	109
5.1.4	Citoquinese com eixos bem definidos I	110
5.1.5	Citoquinese com eixos bem definidos II	110
5.1.6	Formas iniciais não triviais	111
5.2.1	Dependência de ancoramento ou de geometria?	111
5.2.2	Inibição de contato ou dependência de geometria?	113
5.2.3	Deformações desacopladas com área de contato	114
5.4.1	Curvas de descrições empíricas	120
5.4.2	Fases de crescimento tumor	121
5.5.1	Efeito da tripsina nas interações célula-célula	124
5.5.2	Parâmetro D	130
5.5.3	Proliferação de monocamadas	132
5.5.4	Correlação entre parâmetro de crescimento K e coeficiente D	133
5.5.5	Modelo de predição para as curvas de crescimento	135
5.7.1	Difusão de nutrientes e crescimento tumoral	141
5.7.2	Dinâmica não-Gompertziana de crescimento tumoral sem substrato	146
5.7.3	Interações célula-substrato	148
5.7.4	Interações célula-célula	149
6.2.1	Crescimento populacional em condições extremamente favoráveis	160
6.2.2	Passos do protocolo	162
6.2.3	Geometria apoptótica	165
6.2.4	Apoptoses	166

Lista de Tabelas

2.1.1	Submodelos do Hamiltoniano	22
4.3.1	Tipos de interações moleculares de adesão	62
5.5.1	Parâmetros de forma e de crescimento	131
5.5.2	Polaridade como função das densidades celulares de A549, NCI-H596 e NCI-H520	135

Agradecimentos

Agradeço (I Thank):

- Minha orientadora Rita M. C. de Almeida pela motivação e confiança depositada.
- Ao Marco Idiart, meu primeiro orientador, por ter aberto as portas da pesquisa e ao longo do mestrado ter me apoiado.
- Ao Henrique, cuja amizade para todos sempre foi além das festas e encontros, ao se dedicar constantemente a qualquer problema que pudéssemos ter. Não sei o que seria de todos nós sem a sua motivação e apoio técnico. Valeu!
- Ao Evy (idem) - belessa!
- Ao amigo Alysson, aos cafezinhos que tomamos juntos e por todos estes anos de amizade.
- A Silvana e ao Arturzinho, a quem eu adoro tanto.
- Jan Kees, who has made much of this possible, me and Pluk are greatly endowed - thank you for your talented help, but above all, for being such a fantastic person.
- Aos amigos da sala M208, um espaço que vai além do campus (e do país): Daniela e Márcio, Arlei, Marcinha, Guilherme, Baiano (a.k.a Alan), Marlon; e aos amigos da sala M205: Suzana, Janaína, Claudião, Anderson, Alex, Elisa e Cristiano.
- Ao Mauro Castro, pela fascinação de perceber que, mesmo tendo formações em áreas diferentes, nossos pensamentos convergem. Grato por ter pacientemente me explicado a biologia da qual eu inicialmente tão pouco sabia. É um prazer colaborar contigo.
- Ao talentoso colega Júlio Belmonte.
- A gentileza do Centro de Microscopia Eletrônica por ter hospedado o nosso laboratório no início deste mestrado.
- Ao suporte técnico dado pela oficina de eletrônica e a oficina de mecânica.
- Ao Waldomiro, pela ajuda nas impressões.
- Ao Prof. François Graner que durante curtos momentos de interação me estimulou pelo seu talento científico e principalmente por seus ideais. Obrigada por sua personalidade franca e apoio.
- À colaboração com Unisinos, através do Prof. José Mombach, de quem obtivemos não apenas uma linhagem nova de hidra, como também tardes inteiras de discussões frutíferas.

- Many thanks to the whole Theoretical Biology Group of Utrecht. I am very grateful for having had the opportunity to learn so much and perceive the horizons of biology expanded so unendingly by Prof. Paulien Hogeweg.
- A Nídia DeTemple e André de Luca, que cuidaram com tanto zelo do Fálada (e de mim!).
- Towards the exceptional friendship that I had the pleasure of sharing of Lenilson Coutinho, Rickie Lee and ‘Bagel’ Dave, you guys are fantastic!
- A Leslie e Fátima, pela sabedoria, amizade e humor - vocês foram como irmãs.
- Ao André Taurines, por termos transcendidos o solipsismo pelo encantamento e agora, pela alegria, confiança e amizade.
- To the Marée family, for having received me with so much warmth.
- Com muito carinho, agradeço aos meus irmãos Cosmas e Lucas, que ajudam formar os alicerces da minha vida.
- Aos meus pais, pela dedicação, paciência e amor.

Ao Athanasius, Jij mijn wereld mijn horloge dat geen uren aangeeft; de esquecê-las. Jij mijn lopen meu ar mijn eten mijn vasten. . .

Resumo

Esta dissertação investiga os processos que levam células a se organizarem em certas configurações, focando propriedades topológicas, geométricas e aquelas originadas na sua dinâmica. Para tanto, começamos revisando propriedades de topologia de equilíbrio de sistemas que minimizam áreas de contato entre células. Prosseguimos com o estudo de estruturas de células biológicas, incorporando as devidas modificações provenientes das propriedades biológicas, sendo introduzida, por exemplo, a Hipótese da Adesão Diferenciada formulada por Steinberg (1975). Suas implicações são estudadas utilizando o Modelo Celular de Potts ao realizar simulações de Monte Carlo. Mostramos resultados das dinâmicas de reagrupamento celular que é um dos processos que ocorre na embriogênese e morfogênese, em que células se redistribuem de modo a formar padrões típicos. É feita uma análise, tanto teórica quanto por simulações, de como interações adesivas entre tipos diferentes de células, e estas com o meio, influenciam a evolução destas configurações. A seguir, tornamos evidente analogias entre tecidos e fluidos imiscíveis, de modo a explorar não apenas a influência de coesões e adesões celulares, como também propriedades viscoelásticas e de tensões superficiais apresentadas pelos agregados - estruturas macroscópicas constituídas por muitas subunidades celulares. Acompanhando os resultados teóricos, apresentamos observações experimentais de reorganização celular a partir de agregados aleatórios de células de hidras. A reorganização celular destes agregados é estudada a partir das configurações iniciais aleatórias até o momento em que se estabelece uma esfera com cavidade formada por duas camadas epiteliais, endoderme e ectoderme. Neste estágio ocorrem os *bursts*, eventos de ruptura reversíveis do tecido superficial do agregado com expulsão do conteúdo contido na cavidade. É proposto um estudo via simulações deste fenômeno a fim de elucidar as propriedades básicas de deformações, adesões e movimentos de células num tecido. Ainda no contexto experimental, realizamos outras medidas nos agregados de hidra, como a obtenção de tensões superficiais e registro da dinâmica de arredondamento.

Finalmente, unimos as considerações sobre topologias de estruturas celulares com as propriedades emergentes de interações de adesão com mais um elemento, mitose. Apresentamos modelos de crescimento celular e discutimos suas características para a dinâmica populacional de células. Ao introduzir dados sobre comportamentos regulatórios de proliferação celular, colocamos ênfase no estudo das patologias ao estudar câncer utilizando

o Modelo de Gompertz como descrição da proliferação. Realizamos experiências utilizando 6 linhagens cancerígenas diferentes e propomos uma interpretação biológica dos parâmetros matemáticos que descrevem o crescimento. A hipótese por nós levantada é de que a forma da célula influencia no seu comportamento. Verificamos a viabilidade de tal hipótese através de uma série de simulações por Modelo Celular de Potts. Os resultados gerados se assemelham aos dados experimentais, de maneira que chegamos a conclusão final que processos intrínsecos regulatórios de uma célula (no caso o ciclo mitótico), propriedades adesivas de células, características fenotípicas e distribuições topológicas de um tecido, são intimamente interligados.

Abstract

The main concern of this dissertation is to shed light, within a physical conceptual framework, on the processes that guide cells towards auto-organized final configurations. We start the discussion by reviewing the underlying properties existent in equilibrium topologies that result as a consequence of energy cost minimization of contacts. The theory and formalisms here developed are extended to take into account configurations that arise from biological cells by incorporating within the developed models modifications that describe specific biological properties. Engaged in such procedure, we introduce the well known Differential Adhesion Hypothesis (DAH), formulated by Steinberg (1975). The consequences of this hypothesis will be scrutinized by using the Cellular Potts Model using Monte Carlo simulations. We show results of cell sorting dynamics, which is the process that occurs during morphogenesis, in which mobile cells redistribute themselves forming characteristic patterns. An analysis of how adhesive and cohesive interactions between different types of cells orchestrate such configurational evolutions is made, both through simulations as from a theoretical standpoint. Following this line of thought, analogies between cell sorting and immiscible fluid behavior is established, which broadens the discussion from cohesivity and adhesivity influences to surface tensions and viscoelastic properties revealed by cell aggregates (macroscopic structures formed by many subunits of cells). Experimental observations of reorganization of hydra cell aggregates are presented to backup all statements. The cell sorting that takes place within the aggregates is studied from the initial moment in which the random aggregate is formed up to the point in which a two-layered (ectodermal and endodermal membrane) spherical structure surrounding a cavity is established. At this stage occur a series of ‘bursts’, events characterized as reversible ruptures of the superficial tissue of the aggregate in which internal liquid and internal by-products are violently expelled. We propose future studies of this phenomena via simulations with the intention of elucidating basic deformation, adhesion and cell movement properties. Other experimental measurements concerning the estimation of surface tension values and registration of aggregate rounding dynamics are presented.

At last, we unite to the discussion of cellular topologies and emergent properties of interactions via adhesion a final element: mitosis. Cell growth models are introduced and their implications to population dynamics are discussed. As we insert data about regulatory mechanisms occurring in the

cell cycle, emphasis is put on the study of cancer by using the Gompertz Model as a description of the proliferation. Experimental observations using 6 distinct tumor lineages are done resulting in a biological interpretation of the mathematical parameters presented by the growth model. We propose a hypothesis in which the cell phenotype mediates the cells behavior. The viability of such hypothesis is investigated through a series of Cellular Potts Model simulations. The results obtained are in accordance with the experimental data, which leads us to conclude that intrinsic regulatory mechanisms of the cell (in this case its cell cycle), adhesive and phenotypic properties of the cell, and the topological distributions within a tissue are intimately intertwined.

Parte 1

Fundamentos

“If you have built castles in the air, your work need not be lost; there is where they should be. Now put foundations under them.”

Henry David Thoreau

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Estamos interessados em entender alguns dos princípios que delineiam o estabelecimento de estruturas e configurações em sistemas compostos por células biológicas. Em uma reformulação em termos físicos, buscamos entender a formação de padrões por entidades deformáveis, onde é necessário uma descrição própria, diferente da de corpos rígidos, devido à elasticidade, viscosidade, mobilidade individual, aglomeração e outras características próprias de células. Abordagens contínuas, por sistemas de equações diferenciais, não são adequadas para descrever os efeitos causados por sistemas finitos interagentes. Assim, será importante neste trabalho não apenas estudar propriedades individuais e emergentes de interações celulares, mas também buscar entender quais as técnicas que podem ser utilizadas para simular estes casos.

Trataremos da célula biológica não como uma entidade composta de milhares de cadeias bioquímicas, providas de complexos sistemas regulatórios genéticos, mas sim, como um corpo que possui certas características mecânicas. Assim, tratamos de interações por contato, compressibilidade, mobilidades e flutuações de membrana. Baseados nesta representação física da célula, queremos perguntar quais as conseqüências de interações entre células para as configurações resultantes. Vamos inquirir sobre os efeitos possíveis do tamanho, adesão, distorção e proliferação das células individuais no estabelecimento de topologias histológicas. Todas estas questões fundamentam a formulação de perguntas ainda mais “amplas”: o que rege a morfogênese e como se dá o estabelecimento de uma arquitetura saudável de tecido.

1.1. Sinopse

Seguindo a proposta acima para este mestrado, acabamos por reunir várias áreas de conhecimento que, à primeira vista, poderão parecer desconexas. Por isto tomamos este momento para expor de maneira sucinta a relevância de cada área neste estudo e a contribuição que a abordagem multidisciplinar acarreta, indo além daquilo que o conhecimento isolado permitiria. Temos em mente que a produção desta dissertação pode servir também como um guia introdutório para futuros estudantes do Laboratório de Estruturas Celulares do IF-UFRGS, provenientes tanto de cursos em física como das áreas biológicas. Assim, tentamos uma abordagem geral e completa dos tópicos necessários.

Esta dissertação está organizada em três partes, cada uma contendo diversos capítulos.

A primeira (na qual o leitor se encontra) tem por objetivo entender a motivação para o uso de simulações de Monte Carlo no Modelo Celular de Potts e suas origens históricas, propriedades e aplicações. A discussão sobre o impacto das simulações será melhor tratado nas conclusões finais.

Utilizamos estas simulações para estudar os casos topológicos apresentados ao longo da Parte II, que faz uma revisão de estruturas celulares de diferentes origens: espumas, células de hidra e neoplasias. Após traçar as linhas fundamentais a cerca dos modelos e teoria, entramos gradualmente no estudo das topologias. A fim de entender contribuições ‘puramente’ geométricas e topológicas, focamos a atenção em sistemas celulares. Mais precisamente, em espumas. Não buscando uma consistência formal, temos porém a intenção de introduzir os mecanismos básicos de organização de bolhas, tanto as leis que as regem quanto também os diferentes regimes sob os quais podem ser estudadas.

Seguimos com a organização de tecidos biológicos, na qual é introduzido o conceito de adesão diferenciada, tanto pelas suas definições físicas, como suas origens biomoleculares. Para a total compreensão dos fenômenos que ocorrem nos processos que definem a embriogênese são abordados ainda características hidrodinâmicas, em especial propriedades de líquidos imiscíveis. Em particular, nesta seção apresentamos resultados originais de simulação onde mostramos certas propriedades de dinâmica de reagrupamento celular, e o fenômeno de ‘burst’ apresentado no processo de regeneração de agregados de células de hidra e comparamos com experimentos realizados por nós no laboratório de Estruturas Celulares do IF-UFRGS (LabCel).

Finalmente, terminamos com estudos sobre os efeitos da divisão celular - mitose - em estruturas histológicas, dando especial atenção às dinâmicas de crescimento patológico (tumores). Neste contexto tratamos dos efeitos dos fenótipos individuais das células na regulação da mitose através de teoria, simulações e experimentos, estes últimos realizados em uma colaboração do LabCel com o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica-UFRGS. Esta colaboração já deu origem a um artigo publicado (Castro, Klamt, Grieneisen, Grivicich, e Moreira, 2003).

Na Parte III, finalmente concluímos e também discutimos aspectos gerais apontando direções para continuação deste trabalho.

Gostaríamos ainda ressaltar que, apesar da motivação de todo este estudo estar na formação de configurações por sistemas celulares visando o melhor entendimento de processos biológicos como a morfogênese por simulações de Monte Carlo, os três casos específicos abordados aqui servem

como sistemas paradigmáticos¹ para uma classe maior de topologias: espumas, hidras e câncer. Enquanto as topologias das espumas foram exploradas apenas por teoria e estimativas, realizamos experiências em Hidras e com células tumorais.

¹ 'paradigma' com a semântica introduzido por Thomas Kuhn, ao se referir a realizações científicas que geram modelos ou que estudam algum sistema que por certo tempo influenciam as pesquisas a focalizar em aspectos particulares àqueles modelos/sistemas, mas cuja intenção é, ao final poder ter evoluído o conhecimento a tal ponto, graças aos detalhes específicos, de tirar conclusões gerais que englobam outros sistemas/modelos. Exemplos: *Drosophila* na genética, Modelo de Ising em estado sólido, Modelo da Sacola em física nuclear, *Xenopus* para morfogênese, etc.

CAPÍTULO 2

Modelos

2.1. Modelos de Spin

Para entender o Modelo Celular de Potts, utilizado neste estudo, teremos que passar por conceitos da física de sólidos, área na qual estes modelos foram originados. Queremos também discutir os fenômenos mesoscópicos apresentados. Para os biólogos que lerem este capítulo espero que seja ilustrativo sobre este tópicos, e por isto a clareza. Para os físicos, tenho em mente que isto é uma revisão, mas espero tomar esta oportunidade para destacar terminologias que usamos nesta área, porém com conceitos levemente diferentes dos conceitos clássicos.

2.1.1. Modelo de Ising

Como pequena revisão e para dar uma explicação dos conceitos que iremos usar nos seguintes capítulos, iniciamos com o mais básico e impactante de todos os modelos, o de Ising. Em se tratando de um cânone da física de estado sólido, uma revisão dos conceitos pode ser facilmente encontrada em livros texto (por exemplo, em Garrod (1995)).

O modelo de Ising trata de uma rede, em uma ou várias dimensões, de partículas localizadas em cada sítio. Não existem graus de liberdade mecânicos para estas partículas, apenas atribuímos a elas um valor, o do spin, que pode ter duas possibilidades. As partículas são enumeradas, com um índice i variando de 1 a N , em um total de N variáveis, $\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N$. Estes assumem os valores correspondentes à direção do seu spin, $\sigma_i = +1$ (spin para cima) ou $\sigma_i = -1$. É tudo que precisamos para descrever todo o sistema.

O seguinte passo é definir uma regra para a dinâmica do sistema: como os spins se alteram? Isto é regido pela energia de interação. Um dado spin interage apenas com seus vizinhos mais próximos.

A energia de interação de um par de partículas vizinhas, com valores de spin σ_i e σ_j , denominada $h(\sigma_i, \sigma_j)$, tem a forma de

$$(2.1.1) \quad h(+1, +1) = h(-1, -1) = -V$$

e

$$(2.1.2) \quad h(+1, -1) = h(-1, +1) = +V,$$

que resumimos através da expressão: $h(\sigma_i, \sigma_j) = -V\sigma_i\sigma_j$.

A partir destas energias de interação entre pares de vizinhos, temos imediatamente a energia total de uma determinada configuração do sistema $(\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N)$, que é

$$(2.1.3) \quad E = -V \sum_{NN} \sigma_i \sigma_j,$$

onde o subscrito NN significa somar sobre os primeiros vizinhos.

Interpretação física

As variáveis σ_i , que descrevem o estado de spin de cada partícula são interpretadas como o estado de um momento magnético quantizado que pode se orientar paralela ou antiparalelamente ao eixo z . Certos cristais fortemente anisotrópicos podem ser descritos razoavelmente bem com este modelo.

O significado das energias entre pares de spins vizinhos se dá através do valor de V . Ele sendo positivo, pelas equações acima, a energia será negativa (portanto mais baixa) se a orientação entre os spins for a mesma. As interações tendem a alinhar spins para estarem na mesma direção. Um modelo de Ising com este parâmetro V positivo é chamado Ising ferromagnético, e é o mais simples modelo possível de um sistema ferromagnético.

2.1.2. Modelo de Potts

O Modelo de Potts é uma generalização do Modelo de Ising onde as variáveis associadas aos sítios da rede podem assumir $q > 2$ valores. Possui interessantes aplicações além de relevância teórica, especialmente na área de fenômenos críticos. Foi estudado por Ashkin e Teller (1943) em uma versão de modelo de quatro componentes ($q = 4$), o que seria, sob o ponto de vista cronológico, o primeiro estudo do Modelo de Potts. Porém, este modelo foi batizado para Potts por sugestão de Domb, devido ao modelo geral de q componentes ter sido a tese do seu aluno (Potts). Dito isto, nos anos subseqüentes não se deu muita atenção a este modelo, mas por volta da década 70 houve uma explosão de interesse. Com o intuito secundário de entender melhor suas propriedades, este modelo tem se tornado uma das principais ‘cobaias’ para experimentar diversos métodos no estudo da teoria de fenômenos críticos. Queremos delinear de modo rápido algumas razões que tornaram este modelo rico de análise.

Formalismo

O Modelo de Potts está relacionado com muitos problemas relevantes de estatística de redes, o seu comportamento crítico possui mais características interessantes além de ser mais geral que o modelo de Ising.

Como vimos em subseção 2.1.1 na página anterior, podemos considerar o modelo de Ising como um sistema de spins interagentes que podem

se orientar ora paralela ora antiparalelamente. Assim, uma primeira generalização desta idéia seria considerar este mesmo sistema confinado a um plano, mas com cada spin apontando para uma de q diferentes direções. Esta foi a idéia proposta por Domb. As direções são regidas pelos ângulos,

$$(2.1.4) \quad \Theta_n = \frac{2\pi n}{q}, \quad n = 0, 1, \dots, q-1,$$

e no caso mais simples - conhecido como simetria $Z(q)$ - a interação de primeiros vizinhos depende apenas dos ângulos relativos entre vetores. Assim, considerando dois spins de sítios vizinhos i e j , o ângulo entre eles é $\Theta_{ij} = \Theta_{n_i} - \Theta_{n_j}$ é o argumento da função $J(\Theta_{ij})$, que possui periodicidade 2π . Finalmente, o Hamiltoniano é

$$(2.1.5) \quad \mathcal{H} = - \sum_{\langle ij \rangle} J(\Theta_{ij}).$$

Este é o formalismo geral; a forma de J determina os diferentes submodelos.

TABELA 2.1.1. Submodelos do Hamiltoniano 2.1.5

	Definição de $J(\Theta_{ij})$	quem	nome do modelo	também conhecido por:
A	$J(\Theta) = -\varepsilon_1 \cos(\Theta)$	Potts 1952	M. de Potts <i>Planar</i>	M. vetorial de Potts; "Clock Model"
B	$J(\Theta_{ij}) = \varepsilon_2 \delta_{Kr}(n_i, n_j)$	Potts 1952	M. de Potts <i>Standard</i>	Modelo de Potts; M. Ashkin-Teller-Potts

No caso B na tabela 2.1.1: se $\varepsilon_2 > 0$ temos o Modelo de Potts ferromagnético, e antiferromagnético para $\varepsilon_2 < 0$. Para a interação refletir a simetria total num espaço $(q-1)$ -dimensional, isto é, incorporar os q vetores ortonormais (denotados por \hat{e}^α ; $\alpha = 0, 1, \dots, q-1$), apontando para as q direções do hipertetraedro $q-1$ dimensional, escreveu-se para o caso B :

$$(2.1.6) \quad \delta_{Kr}(\alpha, \beta) = \hat{e}^\beta \cdot \hat{e}^\alpha.$$

Considerando o Hamiltoniano 2.1.5 neste contexto, e imaginando ainda a possibilidade de termos um campo externo e interações de maior alcance, uma forma mais completa é

$$(2.1.7) \quad -\beta \mathcal{H} = L \sum \delta_{Kr}(\sigma_i, 0) + K_2 \sum_{(i,j)} \delta_{Kr}(\sigma_i, \sigma_j) + K_3 \sum_{(i,j,k)} \delta_{Kr}(\sigma_i, \sigma_j, \sigma_k) + \dots$$

com $\delta_{Kr}(\sigma_i, \dots, \sigma_k) = 1$ se $\sigma_i = \dots = \sigma_k$.

De outra maneira $\delta_{Kr}(\sigma_i, \dots, \sigma_k) = 0$ onde σ_i representa o estado de spin do i ésimo sítio podendo assumir valores inteiros de 0 a $q-1$. Os K_n 's se referem aos pesos de interação, e o subíndice indica o alcance (até que sítio vizinho), L representa a interação de primeira ordem.

Os modelos planar e standard coincidem para $q = 2$ - o que também é o modelo de Ising. A partir de agora, quando nos referirmos simplesmente ao Modelo de Potts, estamos referindo ao caso B .

Propriedades Críticas

A única solução exata para o Modelo de Potts é a de Onsager (1944) para $q = 2$ e $d = 2$. Podemos tirar ainda algumas informações de maneira analítica, mas a grande parte dos resultados para os casos mais complicados é feita de forma numérica.

Sabemos que para $d = 2$, teremos mudanças de fase marcadas por um $\beta \equiv \frac{1}{T}$ crítico, $\beta^* = \ln(1 + \sqrt{q})$. Para $q \leq 4$ a transição é de segunda ordem. A seguir, para demonstrar que o valor q pode influir nas propriedades das transições, ilustramos nas figuras 2.1.2 e 2.1.1 como evolução de um sistema sujeito a um ‘*annealing*’: a partir de um estado desordenado o sistema é deixado relaxar enquanto a sua temperatura é lentamente reduzida, dando tempo ao sistema de relaxar para cada temperatura. Os parâmetros da simulação estão especificados nas legendas das figuras. Podemos observar o surgimento de uma ordem de longo alcance abaixo da temperatura crítica, na figura 2.1.1, esta sendo de primeira ordem, e na figura 2.1.2, de segunda ordem.

2.1.3. Modelo Celular de Potts como método de controle de estruturas mesoscópicas

Vamos discutir um modelo que vem a ser uma extensão do Modelo de Potts, dada pela definição na subseção 2.1.2 na página 21. Como vimos anteriormente nos modelos de spin, estes descrevem e controlam apenas interações existentes numa escala microscópica que se dão entre vizinhos (sítios), como também ocorre em autômatos celulares, onde as regras são apenas localizadas e não dependem de imediato do comportamento de um grupo maior que a vizinhança.

Por outro lado, é característica dos modelos de spin servirem bem à abordagem da mecânica estatística, na qual definimos ensembles e tomamos médias sobre todo o sistema. É possível usar aproximações de campo médio, por exemplo, e obter observáveis termodinâmicos. Somos capazes de analisar o comportamento *global*. Neste processo perdemos porém as estruturas mesoscópicas emergentes.

No entanto, podem surgir defeitos e estruturas que possuem características individuais numa escala entre o microscópico (comportamento individual de cada sítio) e o comportamento global do sistema (observáveis termodinâmicos). É neste contexto que queremos introduzir o Modelo Celular de Potts, pois com ele estamos nos referindo a um formalismo que estipula *tanto a escala microscópica*, quanto controla o comportamento de *estruturas mesoscópicas*.

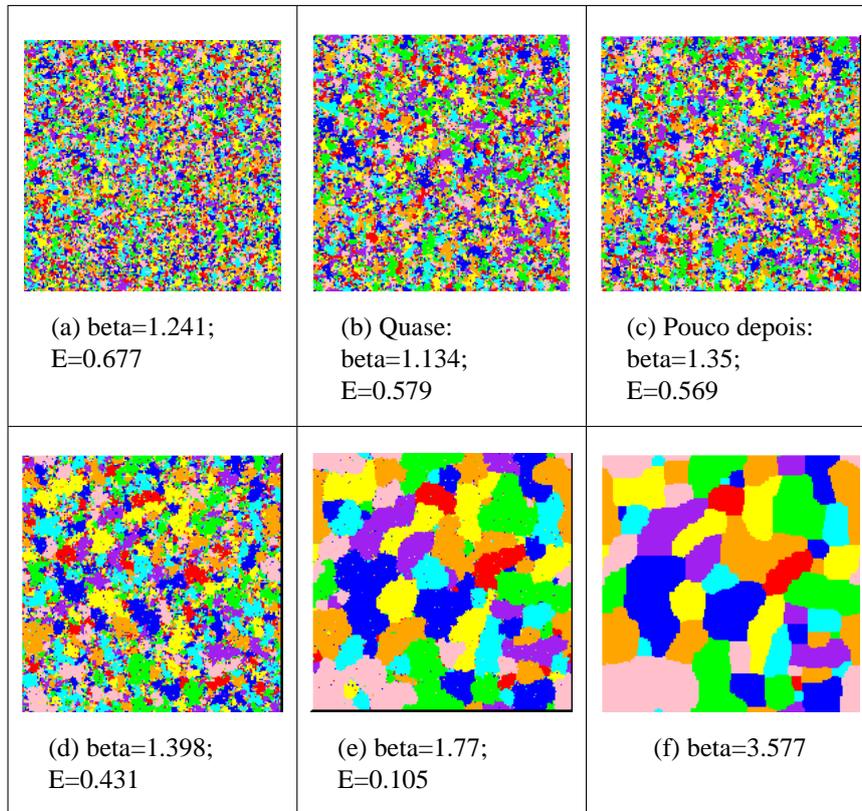


FIGURA 2.1.1. POTTS $q = 8$. A rede é de 190 por 190 sítios. Entre o segundo e o terceiro quadrinhos ocorreu uma mudança de fase de primeira ordem, no β crítico $\beta^* = \ln(1 + \sqrt{8}) = 1.342$.

Como muitos casos na natureza, tanto em sistemas puramente físicos e em especial em sistemas biológicos, existem entidades que possuem características regidas por certos vínculos, como por exemplo, restrições de tamanho, mobilidade, receptividade química etc. Portanto segue-se a extensão natural de transferir estas restrições ao modelo de Potts ao definir *regiões* que trataremos como entidades próprias. Estas regiões serão distinguíveis umas das outras pelos spins que as compõem. Na verdade, cada região topologicamente conexa que possui um determinado spin σ será tratada como uma estrutura, que chamaremos de célula (podendo representar ou não uma célula biológica), e lhe serão designados atributos dependendo do tipo. Mais especificamente, $\tau(\sigma)$ determinará o ‘tipo’ da célula, e o ‘tipo’, a lista de vínculos na escala mesoscópica que rege o comportamento desta célula. A ‘individualidade’ da célula é representada pelos spins que a compõe, de modo que nos referimos muitas vezes a estes spin como *índice*. Exemplificando: em um sistema composto por 10 células, podemos vir a ter 5 células, cada uma designada por um spin diferente pertencendo ao tipo

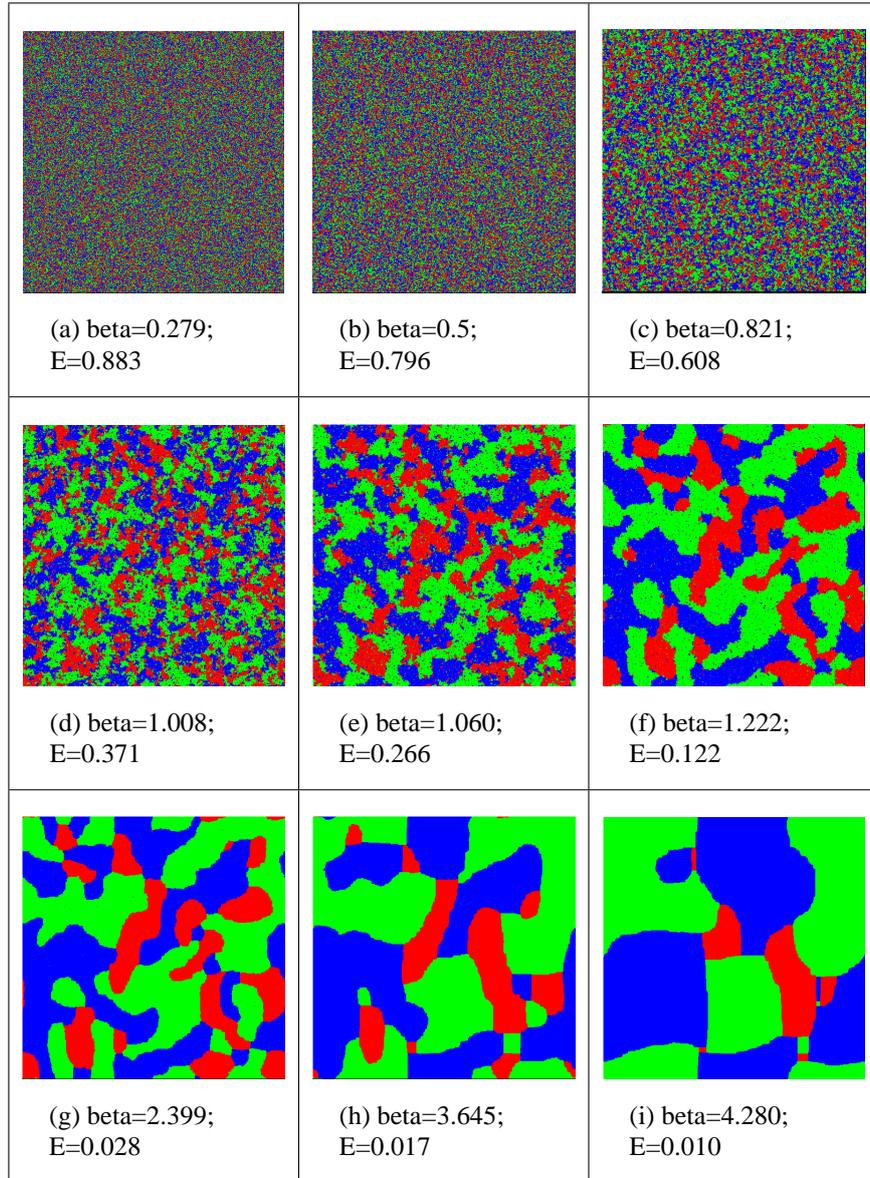


FIGURA 2.1.2. POTTS $q = 3$. Rede de 486×489 . Aqui temos uma evolução por esfriamento do sistema, para um sistema com três estados. O β crítico é de 1.005. Há uma transição de fase no quadradinho (d). Esta transição é de segunda ordem, devido o $q=3$.

A , enquanto as outras cinco correspondem ao tipo B . Assim, por exemplo, spins 1, 3, 6, 7, 8 poderiam corresponder ao tipo A .

Na última parte deste trabalho, voltaremos a discutir a importância destas estruturas mesoscópicas numa abordagem diferente que focaliza mais na dinâmica e evolução de sistemas biológicos. Para apreciar totalmente o impacto do Modelo *Celular* de Potts, vamos primeiramente estudar formações

de topologias e dinâmicas de reorganizações em sistemas como espumas, hidras, agregados de células de diferentes tipos, e tumores.

Parte 2

Topologias/Morfologias

“...São as formas sem forma
Que passam sem que a dor
As possa conhecer
Ou as sonhar o amor.”

Fernando Pessoa

CAPÍTULO 3

Topologia I: Espumas

É este o ponto de partida. Gostaríamos de começar a abordagem sobre configurações em tecidos biológicos e o estudo de morfogênese refletindo sobre as questões mais fundamentais da criação de topologias. Na busca do essencial, consideremos a situação onde temos apenas uma ‘força motriz’, a de energia de perímetro. Como a espuma possui uma estrutura que é dominada pela tensão superficial, ela se torna um modelo para uma classe de sistemas na qual a área interfacial é minimizada em equilíbrio, tornando-se o sistema ideal para inquirir sobre comportamentos básicos (às vezes escondidos) que acontecem em sistemas de alta complexidade. Uma das conclusões que queremos chegar e demonstrar por meio de exemplificações é que, enquanto a força motriz principal é a tensão de superfície, será a competição entre a tendência de minimizar área e a conservação de vínculos que dará origem aos padrões (Weaire, 1996).

Resumindo, o foco desta primeira parte será o estudo da formação de padrões tendo como um único parâmetro de controle a área.

3.1. Propriedades Gerais

3.1.1. Propriedades geométricas

Consideramos por espuma aquosa¹ um material bifásico - cuja fase contínua é líquida e a fase dispersa, gás - numa proporção na qual a fração de fase dispersa (gás) não é pequena frente à contínua (líquido). Nesta definição existe uma primeiríssima bifurcação quanto a configurações possíveis, pois tanto bolhas esféricas numa matriz líquida quanto bolhas poliédricas separadas por filmes relativamente finos são consideradas espumas. No primeiro caso, conhecido como emulsão de gás, existe uma baixa razão de expansão. Isto significa, que a razão do volume da espuma em relação ao líquido base é pequena². O segundo caso representa a situação de uma alta razão de expansão - teremos mais interesse neste último.

¹Por vezes utilizamos apenas ‘espuma’ se a observação física é também generalizada para outros sistemas semelhantes, como sistemas celulares, membranas de fosfolípidios, regiões magnéticas...

²Razão de expansão é uma maneira mais precisa de classificar regimes de espuma do que simplesmente a razão das massas gás/líquido. A razão de expansão depende da pressão, e, uma vez que bolhas menores possuem pressões internas maiores, ela depende do tamanho médio de bolhas. Ou seja, onde há distribuição de tamanho, razões de expansões podem variar consideravelmente.

Iniciaremos por discutir de maneira não tão rigorosa como é organizada a topologia de uma espuma em duas dimensões.

A configuração de uma espuma consiste de uma rede de fronteiras sobre uma superfície. Basicamente uma rede (também conhecida como grafo) é constituída por um grupo de pontos, denominados vértices, conectados por linhas que chamaremos de arestas. A coleção de arestas determinam os limites das bolhas, definindo uma região de certa área denominados de face (polígonos). As faces em $3D$ são as paredes da bolha (poliedro).³

A rede em duas dimensões possui a propriedade de unir três arestas (as fronteiras entre as bolhas) a cada vértice. Existe uma correspondência essencialmente direta entre a dinâmica do sistema e a topologia, já que a predisposição dominante de vértices de coordenação tripla é fruto da estabilidade estrutural inerente à presença de tensão superficial. Vértices de quatro arestas tendem a decair em pares com três arestas, pois o comprimento total das quatro linhas que se irradiam a 90° graus do único vértice para conectar 4 pontos é maior que o comprimento de 5 linhas se irradiando de 2 vértices (para conectar estes mesmos pontos), como está representado abaixo na figura 3.1.1. Como a tensão de superfície tende a minimizar o comprimento de paredes, a última configuração será dominante.

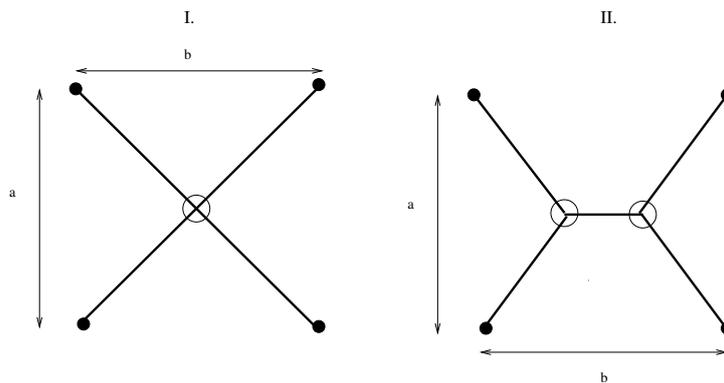


FIGURA 3.1.1. ESTABILIDADE DE VÉRTICES EM DUAS DIMENSÕES. Em I. temos um exemplo de algo que não ocorre em equilíbrio: o encontro de quatro filmes num vértice, formando ângulos de 90° graus. Já II. mostra a maneira que estas quatro bolhas se encontrariam, isto é, dois vértices unindo três filmes em ângulos de 120° graus.

Pode-se comparar a estrutura e as observações feitas acima em duas dimensões com o caso em três, porém, existe uma diferença muito importante: em $2D$ as paredes são aproximadamente seções de arco formando ângulos de 120° nos vértices, enquanto em $3D$ os vértices possuem 4 conexões cujos ângulos internos são de 109.47° , por seções de esferas.

³ outra maneira de conceitualizar estas definições, é que os vértices correspondem a nodos, os cantos às ligações e as faces, a *loops*.

Relação de Euler

Quantidades que caracterizam a rede de conexões de uma espuma, isto é, número de arestas, vértices e número de células, são relacionadas pela expressão

$$(3.1.1) \quad N_{vertices} - N_{arestas} + N_{faces} - N_{poliedros} = \chi.$$

Na equação acima, χ representa um invariante topológico, no caso planar $\chi \equiv 1$; diferentes situações topológicas, superfícies definidas por esferas ou por toros, são caracterizadas por outros valores desta constante (nestes exemplos, respectivamente $\chi = 2$ e $\chi = 0$). Esta fórmula é denominada relação de Euler.

A redução para duas dimensões é trivial: poliedros não existem em $2D$, e o que é denominado células em três dimensões, são apenas as faces em duas dimensões, nada mais que polígonos. Em nossos modelos em duas dimensões, estas estruturas bidimensionais são consideradas as células. Assim, como em 3.1.1,

$$(3.1.2) \quad N_{vertices} - N_{arestas} + N_{faces} = \chi.$$

Como já mencionamos, grande parte do estudo inicial em espumas que faremos será focalizado no caso bidimensional, no qual o número de coordenação é três. Nesta situação, podemos relacionar o número de vértices de uma espuma com o número de bolhas. Sendo $\langle n \rangle$ o número médio de lados (arestas) por bolha,

$$(3.1.3) \quad N_{vertice} = \frac{1}{3} \langle n \rangle N_{bolhas}.$$

É também diretamente verificável que cada parede (aresta) da espuma, faz fronteira com duas bolhas,

$$(3.1.4) \quad N_{aresta} = \frac{\langle n \rangle}{2} N_{bolhas}.$$

Inserindo as duas equações acima em 3.1.2, e lembrando que por definição $N_{faces} = N_{bolhas}$,

$$(3.1.5) \quad \frac{1}{3} \langle n \rangle N_{bolhas} - \frac{\langle n \rangle}{2} N_{bolhas} + N_{bolhas} = 1,$$

$$(3.1.6) \quad N_{bolhas} \left(1 - \frac{1}{6} \langle n \rangle\right) = 1.$$

A partir desta última expressão, se considerarmos uma espuma infinita, tomando $N_{bolhas} \rightarrow \infty$:

$$(3.1.7) \quad 1 - \frac{1}{6} \langle n \rangle \rightarrow 0,$$

$$(3.1.8) \quad \langle n \rangle = 6.$$

Indicando que a rede será hexagonal, no caso uniforme.

Além de considerações sobre os ângulos de encontro, existem também propriedades a respeito das próprias arestas (os filmes), a mais básica observada é que elas geralmente são curvas. De certo modo, as premissas que usamos até agora nada mais são que extensões das Leis de Plateau:

- (1) Filmes se encontram em ângulos de 120° graus formando vértices tríplexes.
- (2) A curvatura κ_{ij} de um filme separando duas bolhas i e j balança equilibra a diferença de pressão entre elas⁴:

$$\kappa_{ij} \sim \frac{\Delta P}{\gamma} = \frac{P_i - P_j}{\gamma}.$$

Cada filme é um arco de um círculo, e a soma das curvaturas num vértice é nula.

A curvatura apresentada pelas fronteiras geram diferenças de energia através das paredes o que, por sua vez, resulta em processos de difusão de gás através destas paredes e movimentação dos filmes. Tocamos agora num ponto de muita importância para espumas: difusão.

A difusão guiada por pressão é a responsável pelo crescimento e desaparecimento de bolhas, conseqüentemente, pelo processo chamado de *coarsening*. Consideramos por simplicidade o caso de uma bolha esférica, de volume interno V , e apresentamos uma derivação baseada numa aproximação termodinâmica na qual a função da energia livre de Helmholtz é minimizada. Neste caso ela é dada por

$$(3.1.9) \quad F = F_{G_{interno}} + F_{G_{externo}} + F_{liquido} + F_{f_{interno}} + F_{f_{externo}}.$$

$F_{G_{interno}}$ e $F_{G_{externo}}$ são as energias livres do gás contido dentro da bolha e do gás fora da bolha. $F_{liquido}$ é a energia livre do volume de líquido que compõe a parede da bolha que está limitada pela superfície interna de área A_1 e da superfície externa A_2 , que possuem, respectivamente, as energias livres $F_{f_{interno}}$ e $F_{f_{externo}}$. Minimizando a função 3.1.9, e considerando o fluido que compõe o filme como sendo incompressível de modo que $dF_{liquido} = -P_{liquido}dV_{liquido} = 0$, temos que

$$(3.1.10) \quad dF_{G_{interno}} + dF_{G_{externo}} + dF_{f_{interno}} + dF_{f_{externo}} = 0.$$

Escrevendo esta expressão em termos das pressões e tensões obtemos

$$(3.1.11) \quad -(P_{G_{interno}} - P_{G_{externo}})dV + \gamma(dA_1 + dA_2) = 0,$$

⁴Lei de Laplace. Sobre notação: κ_{ij} é a curvatura algébrica entre as bolhas i e j , sendo que $\kappa_{ij} = -\kappa_{ji}$. Considera-se positivo este valor quando a bolha i é convexa em relação a bolha j .

onde $P_{G_{interno}}$ e $P_{G_{externo}}$ correspondem às pressões dentro e fora da bolha e γ é a tensão superficial. Como $dV_{liquido} = 0$, os raios⁵ de curvatura ρ_1 e ρ_2 que correspondem às superfícies esféricas internas e externas, respectivamente, obedecem a relação $\rho_1^2 d\rho_1 = \rho_2^2 d\rho_2$. A equação 3.1.11, escrita como

$$(3.1.12) \quad \Delta P = P_{G_{interno}} - P_{G_{externo}} = \gamma \frac{dA_1 + dA_2}{dV},$$

pode ser reduzida a expressão conhecida como equação de Young-Laplace,

$$(3.1.13) \quad \Delta P = 2\gamma \left(\frac{1}{\rho_1} + \frac{1}{\rho_2} \right).$$

Sempre tratando de bolhas, e espuma, onde a espessura do filme pode ser ignorado, portanto, utilizamos a expressão resultante,

$$(3.1.14) \quad \Delta P = 4\gamma \left(\frac{1}{\rho} \right).$$

Observe que a diferença de pressão agindo sob um elemento de superfície (na qual se considera apenas um superfície, é a metade disto, $\Delta P = 2\gamma \left(\frac{1}{\rho} \right)$.

Lei de von Neumann

A Lei de von Neumann, concisa e simples, trata da dinâmica das espumas. Ela dá a taxa de crescimento ou diminuição⁶ de uma bolha como uma função somente do número dos seus lados. A derivação de von Neumann, para espumas em duas dimensões, se baseia em cinco hipóteses:

- (1) Ângulos de vértices de 120° (primeira Lei de Plateau).
- (2) Todas as paredes são seções de arcos circulares (segunda Lei de Plateau).
- (3) A diferença de pressão através de uma parede é inversamente proporcional ao raio de curvatura da parede.
- (4) A taxa de difusão do gás através da parede é igual ao produto do comprimento daquela parede com a diferença de pressão por ela.
- (5) Diferenças de pressões são pequenas de modo que a difusão de gás é equivalente à diferença em área.

Consideramos agora uma bolha de n lados. Como está indicado pela figura 3.1.2, o ângulo médio interno α é $\frac{2\pi}{n}$. Observa que n também descreve o número de polígonos internos aproximados da bolha. O ângulo interno médio β , que forma um triângulo com α obedece

$$(3.1.15) \quad 2\beta + \alpha = \pi,$$

⁵Aqui coincidem com os raios de curvatura do filme, a bolha esférica é constituída de apenas um filme.

⁶*coarsening*

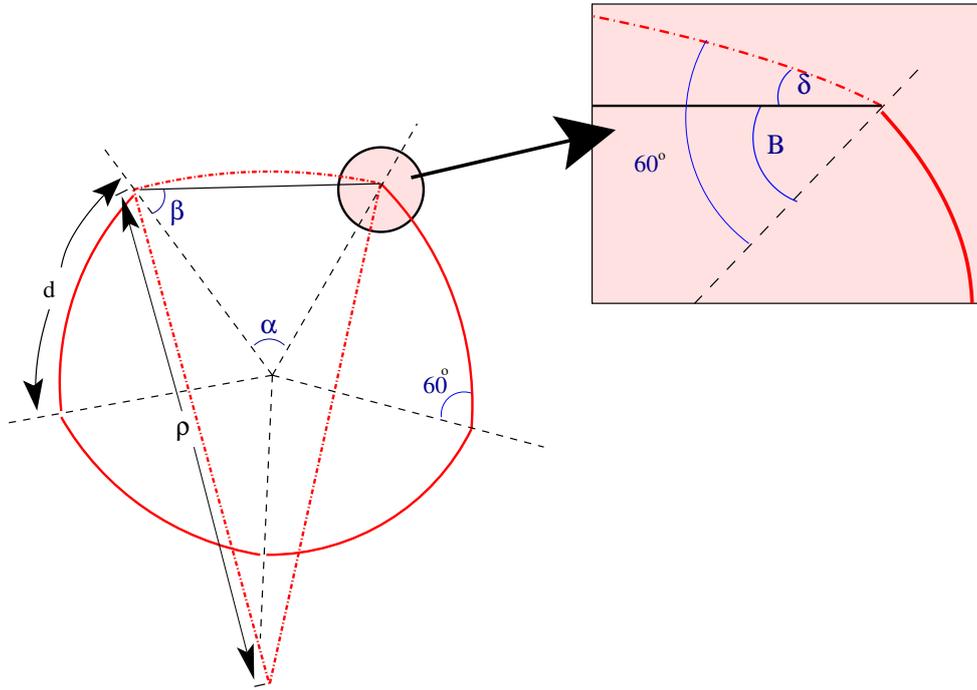


FIGURA 3.1.2. A GEOMETRIA DE UMA BOLHA. Eis uma bolha de cinco lados. β é a metade do ângulo interno médio da *aproximação por polígonos*. Os ângulos internos da bolha são de $\frac{2\pi}{3}$, assim, $\delta = \frac{\pi}{3} - \beta$. ρ é raio de curvatura, representado por linhas pontilhadas juntamente com a seção de arco. α é o ângulo central médio. d é a distância de cada lado da bolha, que corresponde ao arco sobre os polígonos.

dando lugar a

$$(3.1.16) \quad \beta = \frac{\pi}{2} \left(1 - \frac{2}{n}\right).$$

A diferença entre o ângulo interno real da bolha e o ângulo do polígono é consequência da curvatura dos filmes (pois se a bolha fosse apenas um pentágono, estes ângulos coincidiriam), dado por δ . Este ângulo pode ser obtido através da hipótese(1), na qual sabemos que os ângulos internos da espuma são de 120° , $\frac{2\pi}{3}$ radianos. Ou seja, como $\frac{2\pi}{3} = 2(\beta + \delta)$, e utilizando a expressão para β ,

$$\delta = \frac{\pi}{n} - \frac{\pi}{6}.$$

Seguindo no raciocínio inspirado pela hipótese(2), de que as paredes são seções de arcos de círculos, podemos calcular o raio de curvatura,

$$(3.1.17) \quad \rho = \frac{d}{2\pi\left(\frac{2}{n} - 1\right)}.$$

Tirando a hipótese 3 da manga - simplesmente reescrevemos,

$$(3.1.18) \quad \Delta P \propto \frac{\pi}{d} \left(\frac{6-n}{3n} \right).$$

Temos agora uma expressão para a diferença de pressão tirada de maneira completamente geométrica a partir das hipóteses. Ora, a difusão do gás se dará sempre no sentido de menor pressão. Utilizando com isto hipótese(4) para obter a difusão total de gás na célula, multiplicamos o comprimento do lado pela diferença de pressão, e isto pelo número de lados da bolha, de modo a obter a equação de evolução para concentração de gás, C_g

$$(3.1.19) \quad \left[\frac{dC_g}{dt} \right]_{total} = [d \cdot (-\Delta P)]n.$$

Recorrendo a última hipótese - da incompressibilidade do gás - escrevemos tudo em termos de taxa de variação de área:

$$(3.1.20) \quad \frac{dA_n}{dt} = \kappa(n-6),$$

onde κ é uma constante de permeabilidade Glazier (1989).

A Lei de von Neumann prediz que as únicas configurações estáveis é a espuma composta por bolhas hexagonais ou a ausência total de bolhas. Qualquer desvio da hexagonalidade irá causar difusões - mudanças nas áreas - até finalmente eliminar todas as bolhas. Portanto a configuração com parâmetro $n = 6$ (hexagonal) é a única que se encontrará em equilíbrio. Isto implica que o comprimento médio da escala irá crescer continuamente no tempo.

O que se mantém constante, neste 'equilíbrio de escala' é a correlação local, a probabilidade de uma dada bolha possuir n lados e o tamanho relativo das bolhas com n lados comparado com a população total. Enquanto os últimos dois itens tratam das funções de distribuição, a correlação local lida mais com a topologia - pois é definida como $m(n)$: o número médio de lados de uma bolha ao lado de uma bolha com n lados. Quando estas funções de distribuição permanecem constantes com o tempo (o que acontece num estado de escalamento), pela lei de von Neumann, a área média será proporcional ao tempo.

Podemos ver isto da seguinte maneira: supondo $\rho(n, a, t) da$ a densidade de probabilidade de encontrar uma bolha de n lados com área entre a e $a + da$. Podemos transformar esta densidade em uma função ϕ de variáveis adimensionais usando

$$(3.1.21) \quad \phi\left(n, \frac{a}{\langle a \rangle}, t\right) \frac{da}{\langle a \rangle} = \rho(n, a, t) da,$$

tal que

$$(3.1.22) \quad \phi\left(n, \frac{a}{\langle a \rangle}, t\right) = \langle a \rangle \rho(n, a, t),$$

onde $\langle a \rangle = \frac{A}{N}$ é a área média das bolhas.

O número de bolhas que desaparecem em um determinado intervalo de tempo dt é igual ao número de bolhas com área entre 0 e $\kappa(n-6)dt$ para $n = 3, 4$ e 5 . Assim, o número total N de bolhas diminui com o tempo como

$$(3.1.23) \quad \frac{dN}{dt} = \sum_{n=3}^5 N \rho(n, 0, t) \cdot \kappa(n-6),$$

usando equação 3.1.22 e o fato que no estado de escalamento $\phi\left(n, \frac{a}{\langle a \rangle}, t\right) = \phi\left(n, \frac{a}{\langle a \rangle}\right)$, uma função independente do tempo, temos que

$$(3.1.24) \quad \frac{dN}{dt} = N \sum_{n=3}^5 \phi_{esc}\left(n, \frac{a}{\langle a \rangle}\right) \frac{\kappa(n-6)}{\langle a \rangle},$$

o que dá lugar a $N \propto \frac{1}{t}$, se usamos que $\langle a \rangle = \frac{A}{N}$. Neste caso,

$$(3.1.25) \quad \langle a \rangle \propto t.$$

Aqui se chegou num dos pontos fundamentais da dinâmica de espumas (em duas ou três dimensões): seu escalamento assintótico linear.

Apesar de ser uma boa descrição, ela está longe de ser completa. Aliás, muitas suposições foram feitas que negam, ou esquecem de propriedades importantes na dinâmica de espuma: durante a evolução, bolhas tendem a mudar o número de vizinhos muitas vezes. Qualquer descrição realista do processo de *coarsening* terá que explicar como a redistribuição de bolhas, o desaparecimento de fronteiras, a reorganização de vértices funcionam. Uma descrição destas implicaria em muitas hipóteses a mais - por isto a grande importância nesta área de observações empíricas em espumas.

Certas transições são características desta dinâmica. Elas são classificadas segundo propriedades topológicas e servirão como base para descrever o processo de transições no *coarsening* (ver figura 3.1.3 na página seguinte).

Funções de distribuição

Uma das tentativas de quantificar as propriedades geométricas da espuma se concentra nas propriedades macroscópicas através de funções de distribuição ao invés dos detalhes topológicos. É um formalismo bastante

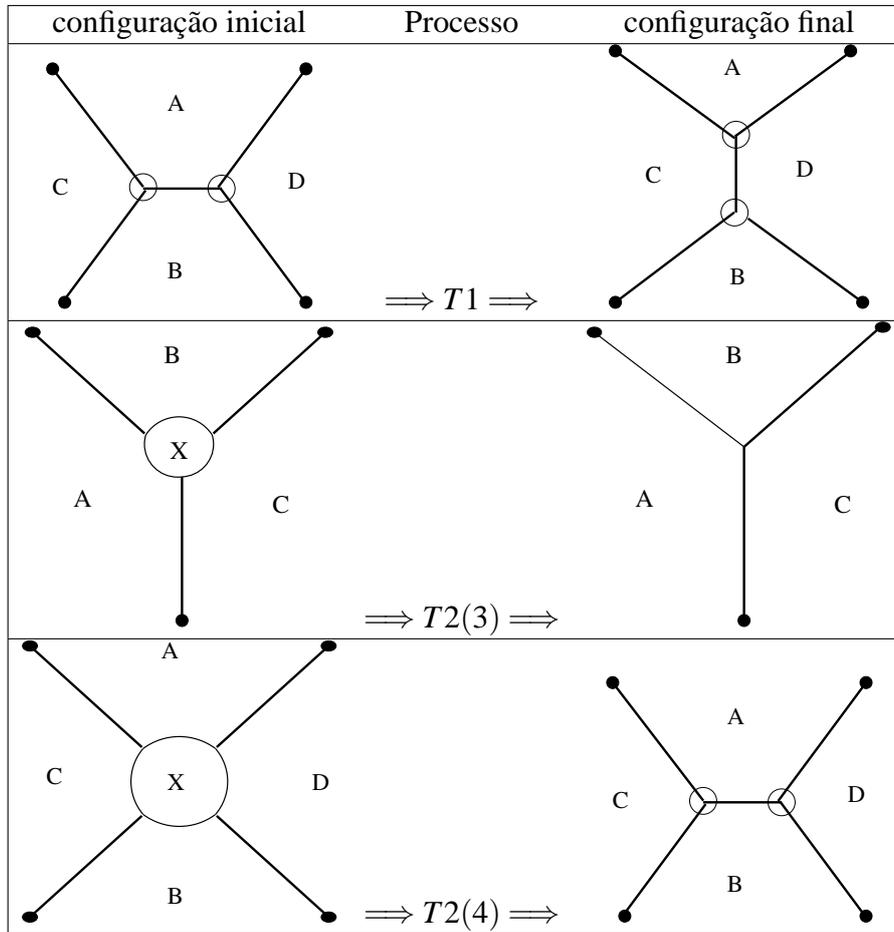


FIGURA 3.1.3. TRANSIÇÕES TOPOLÓGICAS. O processo $T1$ se caracteriza por uma inversão de pares. Os vizinhos se trocam, porém a estrutura topológica se mantém a mesma. Num processo $T2(3)$ continuamos com as mesmas vizinhanças, porém uma bolha, a do meio X , desaparece. No seu lugar permanece um vértice de três lados. A eliminação da bolha também ocorre no processo $T2(4)$, onde ela vem a ser de 4 lados.

poderoso, pois nele se incorporam as transformações topológicas (que descrevem as transformações possíveis) e a lei de von Neumann (Iglesias e de Almeida, 1991; Mombach *et al.*, 1993b).

Uma das relações curiosas que é empiricamente universal tanto em experiências como em diversas simulações é a lei de Aboav-Weaire que dita que o número médio $m(n)$ de lados (arestas/paredes/filmes) dos vizinhos de uma célula de n lados é

$$(3.1.26) \quad nm(n) = (6 - \alpha)n + (6\alpha + \mu_2),$$

na qual a função μ_2 representa o segundo momento em relação ao número médio de lados $\langle n \rangle$.

Existem várias maneiras de chegar a esta expressão, uma vez que certas considerações estatísticas e propriedades do alcance das interações foram estipuladas (Lambert e Weaire, 1981). Considere o caso hipotético na qual estamos interessados no número médio de lados dos vizinhos de uma bolha de n -lados. Imaginamos que esta bolha tem como um dos vizinhos uma bolha de 3 lados, e representamos os dois vizinhos em comum por bolha A e B , de n_A e n_B lados respectivamente. Desta maneira, escrevemos a média do número total dos lados dos vizinhos da bolha de n -arestas como

$$(3.1.27) \quad nm(n) = n_A + n_B + 3 + n_{outras},$$

equação que pode ser observada diretamente através da figura 3.1.4. Ao

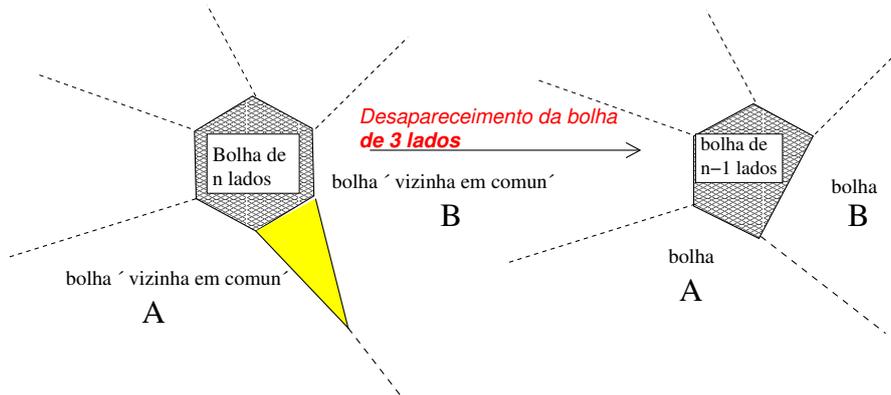


FIGURA 3.1.4. LEI DE ABOAV-WEAIRE. Consideramos uma bolha de n lados (preenchido), com um dos vizinhos possuindo três lados (representado em amarelo). Estas duas bolhas têm em comum dois vizinhos: A e B , de n_A lados e n_B lados, respectivamente. Quando a bolha amarela desaparece, tanto a bolha central quanto cada uma das bolhas A e B irão perder um lado, sendo que a diferença total de lados dos vizinhos da bolha central será 2.

se perder a bolha de três faces, os números de lados das outras bolhas se alteram, resultando em

$$(3.1.28) \quad (n-1) \cdot m(n-1) = (n_A-1) + (n_B-1) + n_{outras}.$$

Se o sistema se encontra no estado de escalamento, como acreditamos que esteja, então esta função de correlação deve permanecer igual antes e depois do desaparecimento da bolha de três lados, sendo assim possível igualar equações 3.1.27 e 3.1.28:

$$(3.1.29) \quad nm(n) = (n-1) \cdot m(n-1) + 5,$$

$$(3.1.30) \quad m(n) = 5 + \frac{const}{n}.$$

A equação 3.1.30 resultante desta análise, é um caso particular da situação mais geral na qual, mesmo considerando interações de longo alcance com correlações locais fracas,

$$(3.1.31) \quad m(n) = const2 + \frac{const1}{2},$$

onde, devido a aspectos de origem físicas, se restringe a

$$(3.1.32) \quad m(n) = 6 - \alpha + \frac{6\alpha + \mu_2}{n},$$

equação deduzido por Weaire, sendo exatamente a equação 3.1.26, ou seja, a Lei de Aboav-Weaire. Recentemente, esforços tem sido colocado em estimar analiticamente o valor de α dependendo da distribuição de bolhas nas espumas (Szeto *et al.*, 2002).

A característica fundamental desta lei é sua ocorrência ampla em diversos sistemas celulares. De fato, é uma das leis mais universais. Como a sua validade depende fortemente na habilidade da espuma, ou qualquer outro sistema celular em estudo, de equilibrar tensões localmente, apenas modelos que possuem uma realimentação entre níveis - local e mesoscópica, vão poder reproduzir a Lei de Aboav-Weaire. Isto é, modelos como Voronoi não poderão reproduzir estas funções de correlação, enquanto o Modelo de Potts se mostra excelente para isto (Glazier, 1989).

Lei de Lewis

Originalmente observada em células epiteliais, esta lei dita que a área de uma célula que possui forma poligonal possui uma dependência linear com o número de lados, isto é

$$(3.1.33) \quad \bar{a}_n = c_1 + c_2 n.$$

Apesar que desta lei descrever bem muitos epitélios poligonais, em espumas ela não reproduz bem as funções de correlação entre lados e área quando as bolhas possuem muito pouco lados (Mombach *et al.*, 1993a,b).

3.2. Diferentes Tipos de Bolhas

Em espuma aquosa e sistemas de bolhas magnéticas o tempo de relaxação das fronteiras é curto comparado com a taxa na qual as bolhas expandem e se retraem. Isto possibilita um estudo no qual consideramos a configuração totalmente relaxada, num estado de equilíbrio. Em sistemas

granulares metálicos, as taxas de difusão através e ao longo das fronteiras granulares são comparáveis. Nestes sistemas porém, a tensão superficial pode ser anisotrópica (enquanto nos outros citados é sempre isotrópica).

Também a lei de Plateau (a da curvatura), pode ser entendida via conceitualização de crescimento granular em policristais. Assim como um filme curvo possui uma energia de superfície maior que um filme plano, também uma fronteira curva possuirá uma energia de superfície superior a de uma fronteira plana. Apesar que no grão não existe mais o conceito de tensão superficial da maneira pura como nós a conhecemos em espumas aquosas, existe porém uma energia de superfície. Átomos que estão localizados numa região convexa de uma interface de um grão estarão mais expostos a defeitos, e por isto terão uma energia de superfície maior que os átomos de outro lado da interface (no lado côncavo), pois estes ‘enxergam’ muito mais vizinhos ‘favoráveis’ (figura 3.2.1). Em vista disto, será energeticamente favorável que átomos pulem da superfície convexa para a côncava.

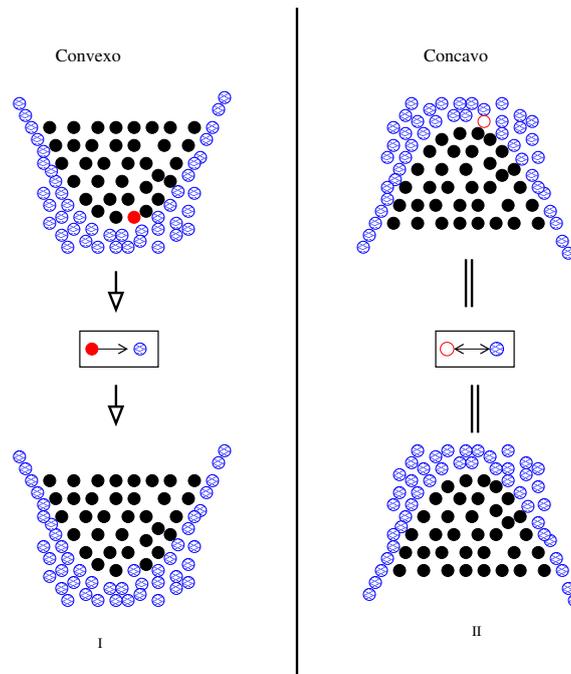


FIGURA 3.2.1. ENERGIAS DE FRONTEIRAS CURVAS.

Esta diferença de energia, da conformação convexa para a côncava, é proporcional à superfície de curvatura. Quando os átomos começam a se movimentar para o outro lado da fronteira devido a esta difusão, surge uma dinâmica. A velocidade pela qual a fronteira local (num ponto \vec{x}) se movimenta, $\vec{v}(\vec{x})$ é dado por

$$(3.2.1) \quad \vec{v}(\vec{x}) = \mu(\vec{x}) \frac{\hat{n}(\vec{x})}{\rho(\vec{x})}.$$

Nesta descrição temos como fatores decisivos a descrição da dinâmica,

$\mu(\tilde{\mathbf{x}})$: mobilidade local, podendo depender do tempo, temperatura e orientação da fronteira;

temperatura: fator que pode alterar a mobilidade local devido à energia de ativação;

orientação de fronteira: dependendo da existência ou não de anisotropia de rede, este fator (orientação), gera diferenças para a mobilidade.

$\hat{\mathbf{n}}(\tilde{\mathbf{x}})$: vetor normal à superfície

$\rho(\tilde{\mathbf{x}})$: raio de curvatura local

Quando as analogias se tornam válidas

Existe um limite no qual podemos considerar crescimento de grãos como espumas aquosas. A analogia obviamente só possui sentido quando, tomando-se a média sob um número grande de orientações granulares, a energia de superfície pode ser reduzida a uma tensão superficial efetiva e pressão diferencial. Quais são as exigências que precisam ser cumpridas para esta redução ter validade? A temperatura terá que se manter alta suficiente de modo que a anisotropia orientacional seja muito menor que kT , enquanto que a mobilidade de fronteira terá que ser constante com o tempo. Caso kT estiver na mesma ordem da anisotropia, certas orientações de fronteira irão se estabilizar e o crescimento granular tenderá a ficar mais lento. Se outros efeitos, como refinamento de zonas, alterarem a mobilidade local da fronteira, também o crescimento granular se modificará, ora completamente parando ora crescendo de maneira explosiva. Eis um exemplo da riqueza de padrões que podem se originar devido a estes parâmetros de controle. Nós, porém, não vamos nos aprofundar nestes aspectos de crescimento granular. Vale a pena porém a argumentação acima, para ilustrar como este sistema pode ser reduzido a espumas aquosas, e como é possível entender a Lei de Laplace do ponto de vista de um sistema discreto (átomos). Na verdade, em filmes, a tensão de superfície também possui sua origem em interações atômicas, mesmo que de outra natureza.

3.3. Formação de Padrões Devido à Área

A idéia de subdividir o espaço está muito conectada à natureza da espuma - em particular, à questão de como criar regiões de áreas (ou volumes, em 3D) iguais, de modo a utilizar o mínimo possível de fronteiras, que foi primeiramente formulada por Kelvin. Ele percebeu de imediato que tal problema fundamental compartilha na sua base as características com as bolhas.

Desde sua formulação, e antes mesmo disto, questionava-se apenas como repartir o espaço de maneira ótima em regiões de espaço *iguais*. Em duas

dimensões, o problema aparentemente é muito simples, pois temos a topologia de hexágonos como resposta. Este resultado era conhecido como solução há muito tempo, mas foi apenas em 2001 que foi provado.

Já em três dimensões este problema se torna mais complicado. Em 1887 Kelvin, por raciocínio intuitivo, propôs uma estrutura de energia-mínima, que ele chamou de tetracaidecaedro⁷ que consiste de octaedros truncados com faces hexagonais curvas.

Quando em 1994 Weaire e Phelan demonstraram que era possível obter uma configuração de ainda menor de energia utilizando dois tipos de poliedros ao invés de apenas um, porém cada um ainda com mesmo volume, se percebeu que os horizontes, mais especificamente - o piso energético - de possibilidades de configurações possíveis eram muito mais amplos (Weaire, 1996). Esta nova estrutura possui uma energia 0.2% menor que o tetracaidecaedro. Ainda não se tem uma prova que ela seja o menor mínimo possível, fazendo com que esta questão ainda está em aberto.

Nas seções anteriores, vimos que espumas apresentam distribuição de tamanhos, podendo estas inclusive evoluir com tempo. Também ao nosso redor observamos que as abelhas não utilizam redes hexagonais constantes, tampouco espumas consistem em número infinito de bolhas com tamanhos fixos. Tanto do lado puramente teórico, quanto de interesse aplicável, é muito importante começar a estudar as extensões do problema original observando outros tipos menos homogêneos de distribuições de área e forma. Para fim de consistência da linha desta dissertação, estamos apenas interessados em mostrar a importância do parâmetro área, e rapidamente descrever os efeitos de se manter números reduzidos de bolhas. Escolhemos para isto focalizar nossa atenção numa nova reformulação do problema,

Problema de Kelvin “versão 2.1.2”:

Quais são as configurações mais favoráveis em espumas que possuem dois tipos de bolhas, cada qual tendo uma área definida?

Tais espumas são conhecidas como *bidispersas*.

Energias de topologias de bolhas

Em condições onde podemos considerar o gás incompressível, a energia de um aglomerado de bolhas bidimensionais pode simplesmente ser escrita como

$$(3.3.1) \quad E = L\gamma,$$

onde L é o comprimento de contato total de filme separando bolhas vizinhas enquanto γ é a tensão do filme. Caso esta análise for feita em 3 dimensões, basta substituir o comprimento pela área das interfaces. Topologias diferentes na qual existem números altos de bolhas de um dado tamanho (área ou volume) não influenciam significativamente a energia; os metaestados

⁷*tetrakaidcahedra*

de certas configurações se encontram muito perto do mínimo geral (Graner *et al.*, 2001; Fortes *et al.*, 2002; Fortes e Vaz, 2003). No entanto, ao tratarmos com números finitos de bolhas - aglomerados - ou situações onde uma diferença entre as áreas possíveis das bolhas é mantida, vemos que as topologias alteram significativamente as energias. Uma das causas desta sensibilidade, no caso de aglomerados, é o fato de termos uma relação agora entre o número de bolhas que se encontram na periferia e as bolhas que se encontram distribuídas no centro da espuma. Bolhas localizadas na borda vão apresentar energias maiores, e por isto, o formato do aglomerado, como também a distribuição interna da espuma heterogênea e o formato individual das bolhas dependendo da localização, se tornam fatores importantes na energia total.

No caso da razão de número de bolhas periféricas relativo ao número total de bolhas de um aglomerado ser pequeno ao ponto de ser desprezível, Fortes *et al.* (2002) propuseram uma aproximação (na verdade o limite inferior energético de aglomerados grandes) da equação 3.3.1 para o caso bidimensional,

$$(3.3.2) \quad E \approx \frac{3.722}{2} \gamma \sum_i A_i^{1/2},$$

na qual a soma é feita sobre todas as bolhas do aglomerado, com A_i representando a área da i -ésima bolha. O fator multiplicativo representa o perímetro de um hexágono (topologia estável segundo lei de von Neumann) de área igual a unidade. Divide-se por 2 para não somar contribuições energéticas duas vezes, uma vez que interfaces coincidem entre bolhas adjacentes. As figuras correspondentes a outras células de Plateau que possuem n lados (em vez do caso 'ideal' de hexágonos) não variam muito o fator multiplicativo da equação 3.3.2, que se mostra fracamente dependente de n :

$n = 3$ 3.742 número mínimo para se formar uma bolha com área não nula

$n = \infty$ 3.712 círculo perfeito

Ou seja, desvios aumentam à medida que a variância das áreas de células e o número de lados aumenta. Percebemos que a situação de hexágonos (no caso de áreas regulares) é o de mínima energia configuracional para a situação de de aglomerados grandes. Introduzimos duas modificações:

- aglomerados reduzidos
- bolhas de áreas diferentes

Dependência de número e de área

Partiremos da situação anterior, descrita aproximadamente pelo limite inferior da equação 3.3.2, de aglomerados grandes, para o caso agora de espumas finitas em tamanho. A contribuição adicional da interface externa para a energia se torna necessária. Na mesma linha da equação 3.3.1, escrevemos a energia de fronteira do aglomerado como

$$(3.3.3) \quad E_{\text{fronteira}} \equiv E_f = s_f \gamma_f,$$

com o comprimento total s_f agora correspondendo ao perímetro macroscópico de toda a fronteira (do aglomerado) e γ_f sendo a tensão de superfície do aglomerado, mais precisamente a média da energia livre associado à fronteira. Estes valores foram estimados por Fortes *et al.* (2002) para aglomerados na qual todos as bolhas possuem a mesma área, tendo sido obtido para a média das energias de fronteira de hexágonos, onde

$$(3.3.4) \quad \gamma_f = 0.576\gamma.$$

A expressão 3.3.4 varia conforme a distribuição de hexágonos, entre os valores 0.522γ e 0.604γ . Pode-se considerar, para fins de qualificação de valores, a equação 3.3.4 como uma média de aglomerados arbitrários.

Existe a tendência de um aglomerado minimizar sua superfície, por isto é vantajoso considerar as topologias de espumas finitas que possuem já formas esféricas. Indicamos na figura nesta página um exemplo simples.

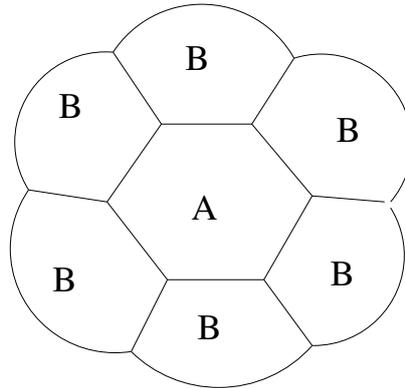


FIGURA 3.3.1. ESPUMA ESFÉRICA EM 2D. Exemplo de uma espuma de 7 bolhas, uma central e 6 fazendo fronteira. A bolha indicado com 'A' possui área a_A e as bolhas do tipo 'B', possuem área a_B . A razão entre estes valores é controlado por um parâmetro que caracteriza o sistema, $\lambda = \frac{a_A}{a_B}$, com N_A representando o número de bolhas do tipo 'A', e N_B controlando o número de bolhas do tipo 'B'. Isto é portanto um exemplo de uma espuma, (i) finita, pois existe uma porcentagem considerável de bolhas que se encontram na periferia e (ii), espuma bidispersa.

Para espumas análogas àquela apresentada na figura, ou seja, arredondadas e com eixos simétricos, a área da interface macroscópica pode ser escrita como

$$(3.3.5) \quad s_f = 2 \sqrt{\pi \sum_i A_i}.$$

Assim, a energia de fronteira de um aglomerado redondo, utilizando a média da tensão na equação 3.3.4, é dado por

$$(3.3.6) \quad E_f = s_f \gamma_f = 2.0418 \gamma \sqrt{\sum_i A_i}.$$

Unindo considerações a respeito de diferenças de áreas e dos efeitos de borda, isto é, juntando as equações 3.3.2 e 3.3.6, sugerido por Fortes e Vaz (2003), a expressão de energia para aglomerados redondos em duas dimensões finalmente será dado por

$$(3.3.7) \quad E = E_f + \frac{3.722}{2} \gamma \sum \sqrt{A_i} = \gamma \left(\frac{3.722}{2} \sum \sqrt{A_i} + 2.042 \sqrt{\sum_i A_i} \right).$$

Introduzindo outras considerações geométricas, como tratando da situação de hexágonos regulares de mesma área e combinando isto ainda ao caso energético de aglomerados sem fronteiras, é possível obter a estimativa de menor energia possível (lower bound) para um aglomerado grande e finito:

$$(3.3.8) \quad E_{\text{piso}} = \gamma \left(\frac{3.692}{2} \sum_i A_i^{1/2} + 1.943 (\sum_i A_i)^{1/2} \right).$$

Cálculos analíticos foram feitos por diversos autores (Cox *et al.*, 2003; Fortes e Vaz, 2003; Gopal e Durian, 2003; Fortes *et al.*, 2002) considerando diversas topologias de espumas constituídas por N_A número de bolhas de área a_A e N_B bolhas de área a_B , verificando-se que as configurações de mínima energia vão depender de $\lambda = \frac{a_A}{a_B}$, e do número N_A e N_B . A estimativa mínima se mostrou também satisfatória para estes casos (equação 3.3.8).

3.4. Conclusão Intermediária

Formas de equilíbrio e estados estacionários são fundamentais para a compreensão de certos aspectos descritivos da biologia. Tanto analogias de espuma com configurações de estruturas granulares em metais, sistemas magnéticos e convectivos, ou tecidos biológicos se mostram muitas vezes válidas pois resultam todos de minimização de energia de superfície.

No contexto de espumas, tem se mostrado que configurações polidispersas podem representar configurações de energias menores que as situações de estruturas regulares. Isto sugere que tanto as áreas quanto as concentrações de estruturas celulares são determinantes para estabelecer as configurações de mínima energia. Algumas situações - isto é, topologias específicas, monodispersas e polidispersas - podem ser determinadas analiticamente. Mais comum no entanto, é estimar as energias de estado fundamental, que

ditará qual será a configuração de menor energia. Em três dimensões uma abordagem analítica não é possível, devido à complexidade dos cálculos. Porém, tem se proposto configurações ‘candidatas’ e por meio de cálculos numéricos verificado suas configurações de equilíbrio. Com estes processo, Weaire e Phelan puderam chegar a uma estrutura em 3D de energia menor que as bolhas de Kelvin, até então considerados a solução do problema da minimização do espaço compartimentalizado. O ponto interessante é que esta estrutura consiste em repetições de bolhas de *tamanhos diferentes*.

O seguimento deste trabalho se focalizará mais especificamente nos sistemas biológicos. Vamos ver que não será suficiente trabalhar com as suposições que foram feitas com espumas para entender as configurações geradas em tecidos biológicos, mas também, vamos discutir os efeitos topológicos semelhantes a espumas que são possíveis de se encontrar nestas situações mais complexas (biológicas). Um aspecto importante é que as concentrações dos tipos de células, suas relações de áreas e a fronteira que elas fazem com o meio, podem também ser fatores relevantes, tanto quanto são as interações intercelulares de ordem puramente biológicas.

3.5. Sugestões para Pesquisas Futuras

Falta averiguar a possibilidade de reproduzir o gráfico de fases em 2D obtido analiticamente por Teixeira *et al.* (2002) por simulações de Potts. Se for possível, então a extensão para 3D, onde métodos analíticos não são mais possíveis será importante.

CAPÍTULO 4

Topologia II: Hidras

Esta pequena criatura revelou fatos tão incomuns, tão contrários às opiniões costumeiras a respeito da natureza dos animais, que para aceitá-las requerem-se as provas mais claras. Mais de uma vez têm a pressa e a predileção para o fantástico induzido naturalistas ao erro e têm ocultado assuntos deles que de outra maneira seriam identificados com facilidade. Não é suficiente então, que se tenha visto isto e aquilo. Isto não terá nenhum sentido se não vier acompanhado ao mesmo tempo pelo relato do observador indicando como os fatos foram vistos, de maneira que possibilita o leitor a avaliar a validade da observação.

Quanto a mim, preciso aderir a esta regra com rigor, e mais rigor que qualquer outro. Os fatos que eu estou reportando são extraordinários demais para esperar que alguém os acredite por minha palavra. Portanto, vou expor da maneira mais clara possível cada consideração que tem me guiado, e cada precaução que tomei para evitar a auto-ilusão.¹

Estudo das formações de padrão com a introdução de um novo elemento: adesão diferenciada.

4.1. A Biologia da Hidra

A hidra é um cnidário, grupo de animais que se originou muito cedo na evolução metazoária. Ela se tornou um sistema paradigmático para várias áreas da morfogênese, tais como regeneração, evolução, formação de gradientes morfológicos e de brotamentos. Também é muito bem utilizada para reagrupamento celular², objeto deste estudo, pois trata do estabelecimento de configurações de equilíbrio por adesões diferenciadas.

¹Memoires pour servir à l'histoire naturelle d'un genre d'eau douce à bras en forme de cornes - ABRAHAM TREMBLEY, 1744; Traduzido por Sylvia G. Lenhoff (University of California) para o inglês.

²cell sorting

4.1.1. A hidra imortal

Há uma diversidade de animais dotados de tecidos que possuem o poder da auto-regeneração pois são formados de células matrizes. Estas células conferem a natureza auto-regenerativa ao tecido pelo fato de possuírem uma alta capacidade (até indefinida) de divisão celular. A nossa pele (dos vertebrados em geral) é um exemplo de um destes sistemas, porém ela é relativamente simples pois as células matrizes geram apenas um produto diferenciado. Outros sistemas mais complexos podem expressar diversas formas de produtos de diferenciação, através de células-tronco (que demonstram pluripotência). E neste contexto, onde se insere a hidra? Como um drástico exemplo destes sistemas: todos seus tecidos são auto-regenerativos. Num processo de perpétua renovação na qual suas células são continuamente substituídas, incluindo neurônios. Como consequência a hidra não envelhece e não ‘morre de morte morrida’. Toda célula da hidra faz parte de um dos três possíveis sistemas de células-tronco: a linhagem das células endodérmicas, ectodérmicas e intersticiais.

4.1.2. Morfologia

A hidra possui a forma de um cilindro, numa das extremidades apresentando um conjunto de tentáculos.

Duas monocamadas cilíndricas de células epiteliais separadas por uma membrana acelular formam suas paredes. Esta configuração trilaminar se estende do pé aos tentáculos. São estas camadas que circundam a cavidade gástrica, com a ectoderme fazendo contato com o ambiente externo, enquanto o endoderme reveste a cavidade gástrica (coelentron). Entre a ectoderme e a endoderme encontramos a matriz extracelular na qual elas estão aderidas, a mesogléia.

Além das células epiteliais que caracterizam a endoderme e a ectoderme, existem outros tipos de células que estão localizadas nos interstícios destas células epiteliais, e fazem parte das linhagem de células intersticiais. Ao total podemos contar com 20 a 25 tipos diferentes de células no animal, somando de 30000 a 200000 de células dependendo da espécie.

A cabeça da hidra é subdividida em duas partes - a mais apical corresponde à região oral, e a zona mais basal da qual emerge um anel de tentáculos. Na outra extremidade do organismo encontra-se o disco basal, que se localiza no pedúnculo, através do qual o animal se firma em superfícies.

4.1.2.1. Três camadas: endoderme, mesogléia e ectoderme

A hidra possui três camadas, duas epiteliais e uma acelular.

Os dois epitélios

Os cnidários são um dos primeiros grupos dos metazoários onde fica evidente a organização de células em tecidos. Cada epitélio possui sua linhagem de células correspondentes. Assim, falaremos das células da endoderme e da ectoderme. Elas possuem morfologias e funções específicas.

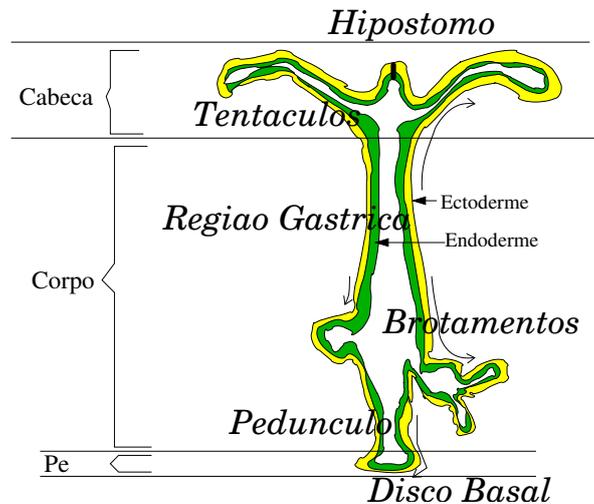


FIGURA 4.1.1. ESTRUTURA GERAL DA HIDRA ADULTA. Esta figura é uma adaptação de uma ilustração de Bode (2003), na qual vemos uma seção longitudinal de uma hidra. Indicamos as regiões e as camadas. Duas protrusões na coluna do corpo indicam brotamentos em diferentes estágios, e corresponde à reprodução assexuada. Indicado também está a movimentação geral das células epiteliais; células movem-se para as extremidades e também para os brotamentos em desenvolvimento.

Também permeado a cada um dos epitélios existe uma terceira linhagem, que não constitui um tecido próprio, as células intersticiais.

Os epitélios servem para proteção e digestão.

Mesogléia

É na mesogléia que células de ambos os tecidos se aderem. Esta camada acelular existe na hidra analogamente à matriz extracelular (ECM) dos epitélios em vertebrados, e como tal, vai influenciar na migração, diferenciação e proliferação das células. Entre os componentes principais da mesogléia encontramos a fibronectina, colágeno tipo IV e laminina. Estudos tanto bioquímicos quanto morfológicos das estruturas internas desta camada vem sugerindo que a mesogléia é evolucionariamente uma forma primitiva de membrana basal, mantendo também certas características de ECM das esponjas (Zhang *et al.*, 2002).

Características importantes em relação à mesogléia:

- É possível isolar a mesogléia da hidra, de modo a formar um substrato em placa de vidro. Sobre esta camada observa-se o comportamento de diversas células de hidra, que se aderem fortemente a ela. É possível observar formação de filopódios, lamelopódios etc.
- Foi identificado por diversos métodos, colágenos e outras moléculas similares às aquelas de matrizes de vertebrados na mesogléia.

Há também muitas moléculas comuns a grupos de invertebrados mais primitivos como também de alguns grupos mais complexos (Sarras *et al.*, 1993).

- A interferência na estrutura de arranjo molecular da mesogléia da hidra *in situ* por meio de certas drogas, altera o gradiente de concentrações de substâncias causando uma mudança na migração das células intersticiais ao longo da mesma, dado verificado por experiências em *in vivo* com hidra (Sarras e Deutzmann, 2001).

Seguem se das propriedades acima as seguintes conclusões:

- (1) *In vitro* a mesogléia exerce a função de matriz extracelular. Existe uma adesão forte do tipo célula-matriz. Ela pode ser experimentalmente determinada.
- (2) Mesogléia pode ser considerada no contexto evolutivo como uma forma primitiva de membrana basal.
- (3) Interações célula-matriz são decisivas para a migração de células na hidra, juntamente com outros efeitos também críticos para este processo como interações célula-célula, e gradientes quimiotáticos.
- (4) A mesogléia se torna relevante para as futuras discussões de modelamento pelo fato de haver uma interação célula-matriz que será essencial para a dinâmica celular, ou para qualquer outro modelo que vise explicar o processo da morfogênese da hidra.

Mas não é apenas na hidra adulta que este ingrediente acelular vai participar. Quando tratarmos de regeneração de agregados de células de hidra e de um fenômeno em específico associado a eles, o “*burst*”, teremos que novamente analisar o papel da mesogléia. Também não é completamente correto ignorar o papel da membrana basal na evolução para os últimos estágios de organização dos agregados, como foi provado por Zhang *et al.* (1994) ao mostrarem que certos fragmentos de fibronectina e colágeno interferem no desenvolvimento. Porém, pela natureza do problema que nós estamos focalizando neste estudo, não será necessário entrar nos aspectos da estrutura interna da mesogléia, e podemos assim, encerrar aqui a discussão.

4.1.2.2. Três linhagens celulares: células ectodérmicas, endodérmicas e intersticiais

A hidra possui apenas três linhagens. As ectodérmicas se concentram *apenas* no do epitélio externo, as endodérmicas *apenas* no epitélio interno e as intersticiais em ambos.

Linhagem intersticial

A terceira linhagem consiste em células tronco que estão localizadas nos vãos entre as células epiteliais de ambas as camadas de modo que ficam espalhadas ao longo do animal.

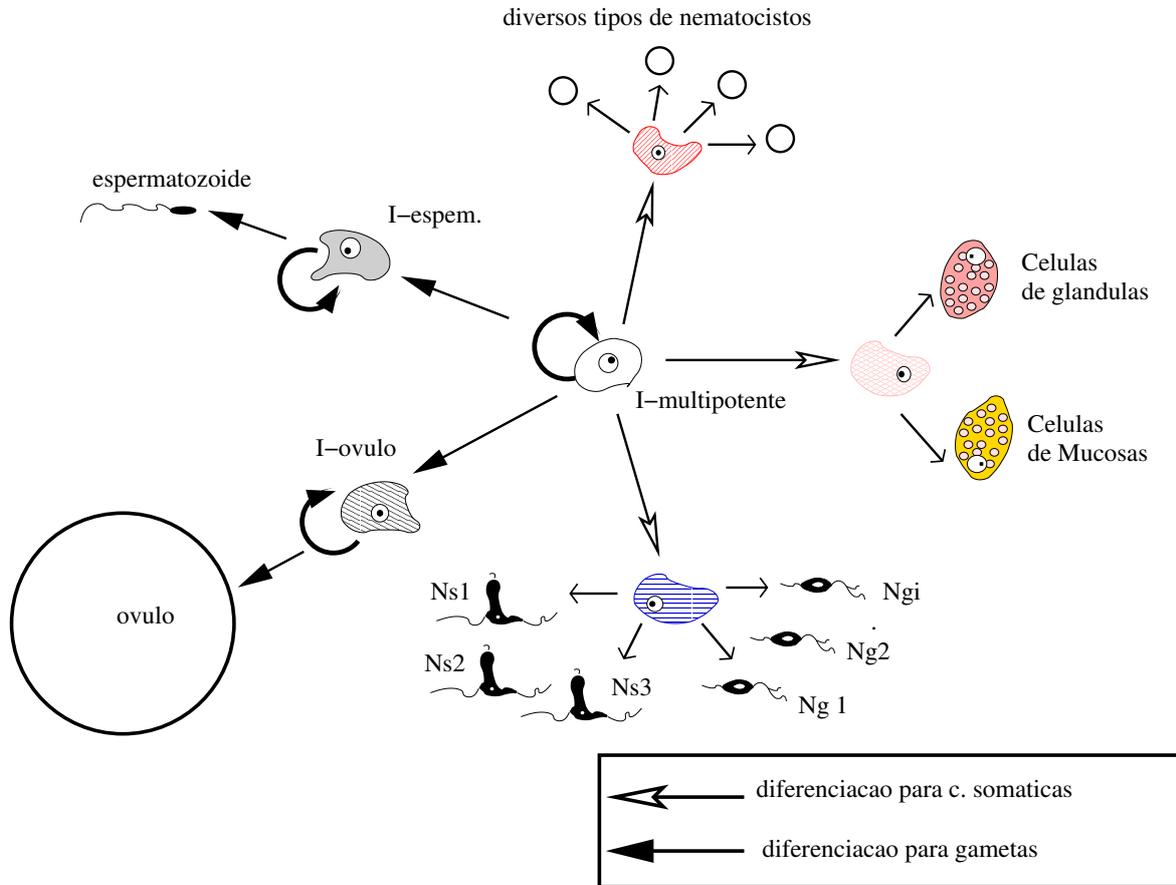


FIGURA 4.1.2. CÉLULAS INTERSTICIAIS. As células intersticiais são totipotentes e podem resultar em quatro produtos diferenciáveis: neurônios, células secretoras (glandulares), gametas e nematocistos.

As linhagens epiteliais

Conhecemos já a morfologia básica da hidra, com suas duas camadas de epitélio. Focalizando a atenção para a estrutura interna destes epitélios, vemos que ela não é estática, ao contrário, existe em um estado estacionário de produção e perda de células.

As células epiteliais³ se encontram permanentemente no ciclo mitótico. Mais exatamente, sua vida celular possui a curta duração de 3 dias de modo que a massa do tecido duplica num intervalo de 3-4 dias. A hidra em si, porém, continua do mesmo tamanho. Isto é explicado por uma estranha dinâmica interna: à medida que as células se dividem incrementando a massa da coluna, as camadas epiteliais se movem ao longo do corpo. Tecidos das extremidades se deslocam para as suas respectivas polaridades (cabeça ou

³Caso as hidras forem alimentadas regularmente, é claro...

pé) e eventualmente se perdem para o mundo externo. Este processo é responsável por aproximadamente 20% da perda de células do indivíduo. O restante é utilizado para a formação de brotamentos.

Já mencionamos o caráter pluripotente das células epiteliais da hidra. O que faz com que elas difiram do comportamento típico de células tronco é o fato delas não apenas se dividirem para manter uma certa população (que por sua vez possa se diferenciar resultando células específicas para exercer funções fisiológicas), mas também exercerem funções vitais. A linhagem da ectoderme, que forma a monocamada externa da hidra, funciona como um mecanismo protetor, enquanto a linhagem endodérmica possui atividade digestiva.

Dinâmica celular

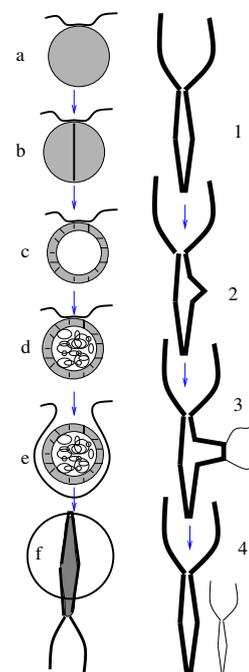
Aprofundando nos detalhes da movimentação das células *in vivo*, veremos que a dinâmica é uma consequência direta das propriedades de cada linhagem. As células epiteliais da ectoderme e da endoderme do corpo do organismo se encontram constantemente em mitose, gerando a partir dali movimentações (como um elevador) para a zona apical, onde, num limite muito bem determinado, elas param de se dividir e iniciam-se as diferenciações.

Quando movimentados para baixo, também vão mudar seu comportamento mitótico para um de diferenciação, desta vez na região do pedúnculo (Holstein *et al.*, 2003). Para acompanhar a proliferação dos epitélios e não diluir sua densidade entre estas populações constantemente em mitose, as células intersticiais também precisam acompanhar a divisão celular para se manter num estado estável.

4.1.3. Fenômenos curiosos da hidra

Reprodução

Pode ser tanto assexuada quanto sexuada. O que determinará a forma de reprodução que a hidra irá adotar, são as condições ambientais. Se o ambiente for favorável, fornecendo alimentos, luminosidade e uma temperatura adequada, os animais preferencialmente irão adotar a reprodução por brotamento. Em condições adversas, será implementada a reprodução sexuada. Brotamento (*budding*) é facilmente observado na hidra, iniciando-se por uma pequena protrusão no corpo do animal adulto. Segundo Berking (1972), a iniciação do brotamento de fato ocorre um dia anterior à sua primeira indicação visual. A ponta da protrusão se tornará a cabeça da hidra, crescendo à medida que adota tecido do corpo tubular do adulto. Neste processo também há proliferação das células no próprio brotamento. Da base, junção entre brotamento e o corpo do animal adulto, se formará o novo 'pé' e é a partir desta região que ocorre a separação dos indivíduos⁴. A morfogênese deste processo possui forte simetria: do momento que é determinado



Primeira coluna indica reprodução sexuada: (a) zigoto, que será fecundado, (b) duas células, (c) blástula, (d) estágio inicial da clivagem, (e) estágio do cutículo, onde células externas produzem filopódios, (f) nascimento. A segunda coluna indica reprodução assexuada: (1) hidra adulta, (2) início do brotamento (3) diferenciação do brotamento (4) isolamento da hidra nova.

⁴Que são na verdade, clones um do outro.

o ponto na qual iniciará a formação da protrusão - futura cabeça - o tecido que se encontra concêntrico a esta origem já se diferencia para organizar a formação da futura região gástrica e pé. Estas fortes tendências geométricas indicam a formação de pré-padrões morfogenéticos. Corroborando tal colocação, a característica morfológica de que a posição onde o ponto formador se manifestará possui também uma forte dependência espacial em relação ao pé e cabeça do adulto.

Observações e experiências a respeito destes dados (especialmente de transplantes), têm gerado inúmeras teorias que incorporam a existência de inibidores e ativadores morfogenéticos. Estudam-se muito os efeitos de gradientes dentro do corpo e dos brotamentos responsáveis pelas configurações simétricas finais (Berking, 2003; Meinhardt, 2002).

Gradientes morfogenéticos: transplantes⁵

Já foi mencionado na seção da reprodução as dependências espaciais ao longo do corpo da hidra quanto à formação de brotamentos. Esta polaridade é ainda mais notável ao se fazer experiências de regeneração, pois tecidos obtidos de diferentes localidades do corpo vão apresentar tendências próprias quanto à probabilidade de se transformar em cabeça ou pé quando transplantados em outro animal. Tecidos com maior propensão a formar cabeça (e menor capacidade de formar pé) são aqueles obtidos das posições mais apicais. Esta polaridade nos tecidos e a distribuição gradual das capacidades de transformação são determinados por um campo escalar, denominada de *valor posicional* por Wolpert ou *densidade de fonte*⁶ por Meinhardt (2002), que por definição possuem o valor máximo no ápice da hidra e o valor menor no disco basal.

O próprio fato da hidra se encontrar permanentemente num estado estável de contínua produção e perda de células indica a necessidade de um estabelecimento constante do padrão axial. Ela é satisfeita pelo gradiente morfogenético, mais explícito nas experiências de transplantes. O mecanismo ocorre em duas partes: existe o organizador na região apical e o gradiente ao longo do corpo do inibidor de cabeça e de ativador de cabeça.

Como é possível obter regeneração, inclusive reprodução assexuada, em hidras que não possuem a linhagem intersticial, os peptídios morfogenéticos derivados das células epiteliais (conhecidas como epiteliopéptídeos), são consideradas como os mais prováveis participantes responsáveis dos processos de regeneração de cabeça e pé.

Regeneração

Finalmente a característica mais marcante, a capacidade extraordinária de regeneração da hidra. Podemos bissecciona-la⁷ de modo que a parte

⁵ *grafting*

⁶ *source density*

⁷ Qualquer lugar da região que compreende os sete oitavos superiores da hidra.

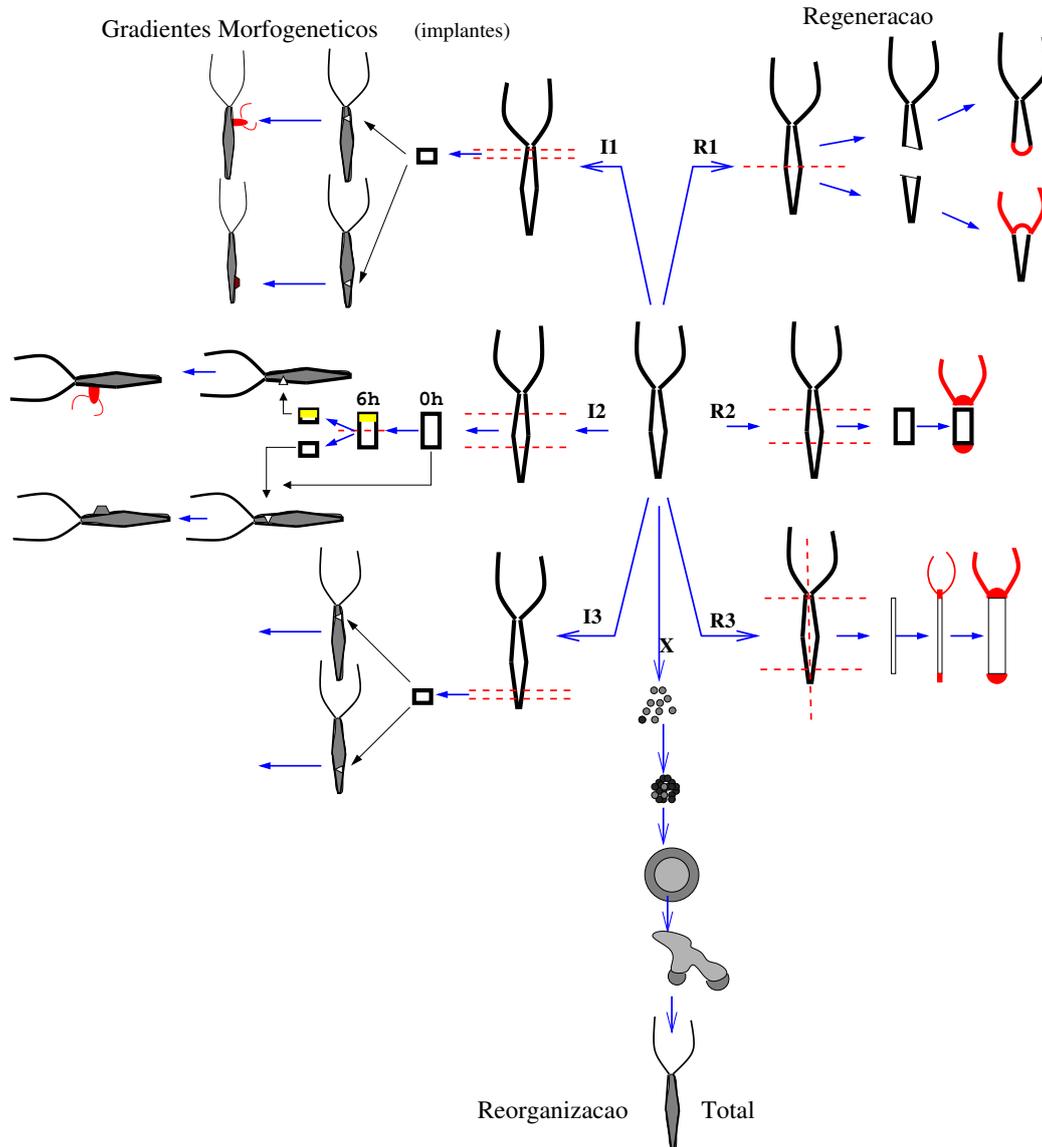


FIGURA 4.1.3. FENÔMENOS DA HIDRA. Ilustrações esquemáticas dos diversos fenômenos apresentados na hidra. **Regeneração - (R1)**: Regeneração das extremidades ausentes após biseção. **(R2)**: Regeneração de ambos pólos - cabeça e pé- depois da remoção de uma parte da coluna do corpo. **(R3)**: Formação de cilindro da coluna a partir de secção longitudinal, seguido pela regeneração das extremidades e finalmente estabelecimento das proporções. **Implantações** - Experiências que ilustram o estabelecimento de simetrias axiais. **(I1)** e **(I3)**: partes da coluna celular extraídos de localizações apicais (I1) ou basais (I3) transplantadas em uma segunda hidra, em localizações apicais (I1, I3) ou basais (I1, I3) indicam comportamentos inibitórios demonstrando a existência de um padrão pré-estabelecido que induz comportamentos diversos após implantações. **Reorganização Total - (X)**: Auto-organização e estabelecimento da morfologia do corpo a partir de agregados de células individuais.

superior formará o pé ausente e a parte inferior vai gerar uma cabeça. Também, ao se isolar apenas um cilindro da coluna, ambas as extremidades irão reaparecer. Estas propriedades novamente sugerem uma polaridade oral-aboral que é mantida mesmo depois da secção. Não apenas cortes transversais, como também longitudinais são regenerados. Ao se cortar a coluna do corpo ao meio (corte vertical), ele rapidamente regenera formando um cilindro de diâmetro menor que normal, seguida pela formação da cabeça e pé. Feito isto, o organismo lentamente recruta células e também regenera o tecido do corpo para estabelecer novamente a relação tamanho/circunferência apropriada.

Hídras também demonstram seus talentos regenerativos de outra forma mais dramática e elegante, que é afinal o assunto deste capítulo: a partir de aglomerações aleatórias de células, um animal completo é gerado (Gierer *et al.*, 1972; Technau e Holstein, 1992). O processo inicial apresentado, o de segregação conhecido como *inside-outside sorting* foi repetido apenas em tecidos embrionários de vertebrados, também em agregados aleatórios (Foty *et al.*, 1996).

Isto é, dissociando a hidra (ou hídras) numa suspensão de células viáveis, forma-se um agregado destes por centrifugação. Este agregado é o que referimos como aglomerado aleatório, em que qualquer informação de localização do tecido antigo se perdeu. Após algumas horas forma-se uma casca esférica composta de duas camadas, a ectoderme e endoderme. Passando este ponto, na qual ainda se mantinha uma simetria esférica visualmente distinta, percebe-se movimentações mais violentas, resultando em deformações. Já começam a surgir sinalizações polarizadoras para formar as cabeças. O material que circunda estas formações se organizam para formar a coluna do corpo, e por final, o pé - momento na qual a hidra nova se desprende do resto do tecido. Foi descoberto que estes centros organizadores são resultados de aglomerados de 5 – 15 células epiteliais que estabeleceram uma intercomunicação, expressando certos genes. Tais pontos locais coordenam as células vizinhas gerando um campo de inibição lateral que alcança $1000\mu m$ (Technau e Holstein, 1992).

Nós iremos focalizar o estudo de estabelecimento de configurações na parte inicial da reorganização, isto é, da segregação celular apenas. Todos os processos de diferenciação, formação de gradientes e sinalizações locais não serão tratados aqui. Deixamos registrados que nesta área existem vários modelos matemáticos, quase todos de reação-difusão (Berking, 2003, 1972; Bode *et al.*, 1999; Bosch e Fujisawa, 2001; Bosch, 2003; Fujisawa, 2003; Galliot e Schmid, 2002; Meinhardt, 2002; Schiffmann, 2001; Steele, 2002; Technau *et al.*, 2003), que formulam as polaridades. Voltaremos às polaridades ao descrever nossas experiências de reorganização de hídras na seção 4.5.1 na página 80, em maiores detalhes.

4.2. Morfogênese (e O que isto tem a ver com Física?)

A morfogênese é de forma geral o estabelecimento da organização complexa de tecidos e órgãos que ocorre pelo processo do desenvolvimento de uma estrutura (configuração) espacial pela coletânea de células envolvidas. O surgimento de topologias dentro dos tecidos (ou agregados) se dá via diferenciação e migração das células individuais.

A visão clássica do desenvolvimento do estabelecimento de padrões estruturais é baseado na premissa de que um proto-padrão tenha primeiramente se estabelecido e de que ele sinaliza para as células o que estas - por diferenciação, migração ou mudança de forma - devem fazer. A crítica atual é que esta abordagem é extremamente hierárquica e pressupõe uma total sujeição do comportamento das células a algo externo imutável, o que se torna insuficiente para explicar as interações complexas entre os muitos níveis da morfogênese. Por exemplo, sabemos que quando células migram elas emitem sinais dependentes da localização de modo a alterarem o gradiente externo, o que já não seria incorporado pela teoria clássica. Mas não é apenas esta a característica que faz da morfogênese um processo tão complexo e intrigante; segue-se abaixo alguns dos pontos que achamos cruciais para o entendimento maior do problema.

A Morfogênese apresenta-se como um processo:

- localizado. Nenhum componente (célula) é capaz de interagir com o sistema total, ao contrário, cada componente evolui apenas pela interação com os vizinhos. Neste ponto temos uma grande semelhança com a definição de autômato celular. Porém, aqui a regra individual pela qual esta evolução é guiada, além de poder ser estocástica, varia com tempo e com cada célula individual.
- não-conservativo. O número de componentes varia⁸. Esta característica se opõe violentamente a definições de Automata Celulares.
- de regulamento genético dependente da posição. Não confundir isto com a idéia arcaica que cada célula já ‘nasce’ com um manual de instruções morfogenético que estipula todo seu comportamento futuro. Na verdade a expressão genética em colaboração com outros fatores determinam as propriedades físicas das células, a resposta celular de cada uma e também a secreção de morfogens difusíveis, que levam a uma configuração topológica (estabelecimento de meio) que por sua vez novamente regula a expressão genética.
- de diferenças locais de origem mecânica. Células em interfase, mitose, em apoptose e células em estado quiescente muitas vezes coexistem no mesmo microambiente, de modo a sugerir que estas diferenças em destinos não podem ser atribuídos apenas a sinais

⁸Número que tende a crescer. No entanto, em muitos casos da embriogênese, apoptoses controladas exercem um papel essencial no estabelecimento da forma.

químicos. Na seção 5.2 na página 108 vamos mostrar que deformações mecânicas podem ter um papel muito importante nestes processos.

- inerentemente multi-nível. Pois nela estão envolvidas processos em escalas temporais e espaciais próprias, incluindo componentes subcelulares, celulares e supercelulares.
- robusto. Apesar de toda a complexidade, do emaranhado de processos, da configuração final, a topologia estável estabelecida, precisa sobreviver. Ou seja, mesmo com enormes erros e flutuações, a morfogênese tende a se autocorrigir.

Todos estes aspectos servem como evidência dos laços de realimentação não-lineares que permeiam o processo de morfogênese.

O que motiva o estudo do estabelecimento destes padrões biológicos em termos de modelos físicos, é a forte semelhança que eles possuem com configurações geradas por mecanismos físicos conhecidos. Nas próximas seções teremos muitas exemplos que ilustram estas analogias.

A estratégia para modelamento é a de procurar mecanismos físicos que quantitativamente imitam os processos biológicos individuais. Neste trabalho escolhemos um caso particular, a do reagrupamento celular em agregados aleatórios. As entidades fundamentais do modelo serão células (assim com no estudo do capítulo 5, sobre mitose).

4.3. Adesão Diferenciada

Como veremos exaustivamente durante esta dissertação, agregados multicelulares possuem a propriedade de se arredondar quando em suspensão (ou em contato com superfícies não aderentes), de modo a nos lembrar comportamento de líquidos, como por exemplo gotas de óleo em água. Também as células que constituem estes agregados muitas vezes se reagrupam de forma que temos uma distinta segregação, semelhante a uma mistura de dois líquidos imiscíveis que em equilíbrio se separam (Armstrong e Niederman, 1972; Steinberg, 1975; Thomas *et al.*, 1981).

Estas observações nos levam a pensar sobre a possibilidade de interpretar células e suas interações como um mecanismo semelhante a fluidos, e também sugere que termos como ‘tensão de superfície’ e ‘viscoelasticidade’ possam ser empregados para entender mecanismos morfogenéticos. Queremos ressaltar que nossa intenção não é considerar a célula como uma bolha homogênea - mas sim entender que sob uma escolha de certos parâmetros, podemos observar comportamentos que se apresentam semelhantes a líquidos.

Para apresentar estas características, o sistema celular deve satisfazer certos requisitos: deve ser constituído por muitas subunidades que possuem uma coesão mas devem ser móveis (Forgacs *et al.*, 1998; Foty *et al.*, 1994). Novamente uma comparação pode ser traçado: líquidos possuem subunidades de moléculas enquanto tecidos possuem células. Moléculas se movem

termodinamicamente, enquanto tecidos onde células estão se reagrupando, o movimento se dá de maneiras mais complicadas, por extensões, contrações, pseudópodos, enfim, movimento do tipo amebal.

Foi sob esta visão que Steinberg (1975) formulou a Hipótese de Adesão Diferenciada, na qual células de diferentes tipos poderiam ser tratados de maneira análoga a líquidos com suas distintas tensões superficiais. De acordo com esta hipótese, as células, possuindo certas forças características de adesão entre umas e outras, geram tensões interfaciais e de superfície, podendo se redistribuir.

4.3.1. A hipótese da adesão diferenciada e morfogênese

Uma vez que a morfogênese consiste em um processo que apresenta uma alta mudança nas formas e localização de células biológicas, a complexidade da dinâmica celular durante o processo de desenvolvimento embrionário é espantosa: existe grande quantidade de diferentes fatores de crescimento tomando parte, regulação genética, efeitos hidrodinâmicos etc. Felizmente, observamos também a formação de padrões em sistemas bem mais simples, ou seja, em condições com variáveis mais controláveis e um número de parâmetros muito menor. Em experiências *in vitro* com agregados formados por diferentes tipos de células misturadas, espontaneamente ocorre reagrupamento celular. Este comportamento reflete a capacidade de células embrionárias tomar forma e da reconstrução de órgãos funcionais. A hidra também pode-se regenerar completamente a partir de um agregado de células aleatoriamente misturadas.

Steinberg propôs a Hipótese de Adesão Diferenciada para explicar o fenômeno de reagrupamento celular. Ele sugeriu primeiramente que interações entre células consistem de uma energia de adesão de superfície que varia de acordo com os tipos de células participando da interação (Steinberg, 1978). Isto não é apenas uma suposição razoável, mas também possui fortes sustentações biológicas e desde então, inúmeras pesquisas já provaram a existência destas adesões diferenciadas, inclusive entendendo-as em nível molecular (vide subseção 4.3.2). A hipótese prossegue em explicar que as células, numa busca ergódica exploram várias configurações energéticas até chegar ao mínimo de energia. Mínimo que irá estabelecer a configuração final e estável.

Analiticamente, esta hipótese foi baseada em duas suposições. É estipulado uma energia de adesão ϵ a qualquer contato entre células dependente apenas dos tipos de células envolvidas. A próxima suposição é certamente mais sutil, e tem levado (ao meu ver) muitos pesquisadores a interpretações e críticas mal fundamentadas da Hipótese da Adesão Diferenciada (DAH): as células são consideradas capazes de alcançar um mínimo global de energia configuracional independentemente das condições iniciais (Harris, 1976). Ou seja, elas devem poder explorar ergodicamente a paisagem energética. Por isto, ao se fazer simulações baseadas nesta hipótese é importante que elas sejam feitas através de um estudo dinâmico (permitir

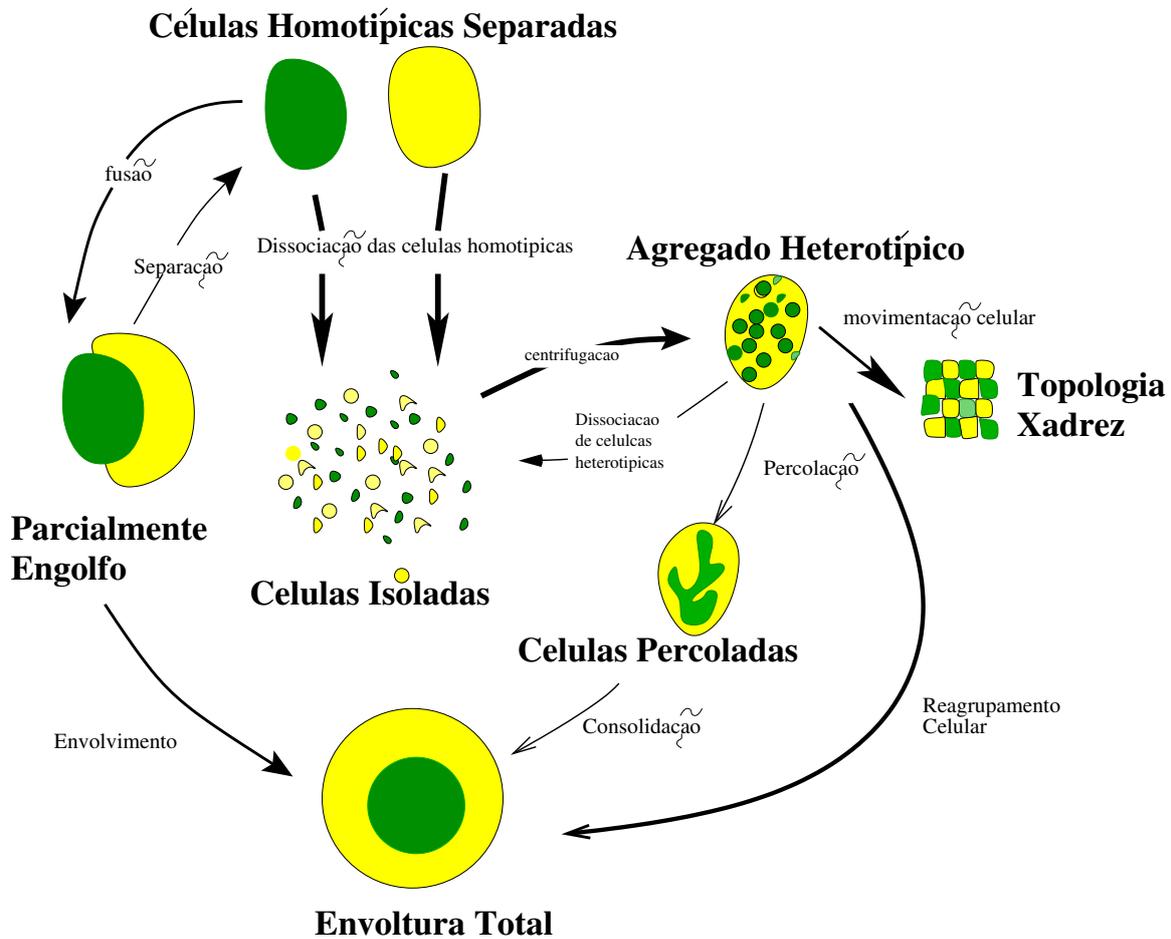


FIGURA 4.3.1. REAGRUPAMENTO CELULAR. Nos processos de redistribuição de células *in vitro*, a partir de configurações iniciais que jamais ocorreriam *in vivo* é possível alcançar estados (metaestados), como a topologia xadrez e outros processos de segregação parcial, que não observaríamos jamais em animais ou na embriogênese propriamente dita. Porém, servem para quantificar as interações entre células, traçar mecanismos da dinâmica o que leva a um entendimento melhor da natureza que está subjacente a estes processos.

movimentações das células) em contraposição a relaxações em uma configuração estática. É uma consequência, tanto da teoria como de experimentos, que restrição da mobilidade celular pode modificar a evolução e o estado de equilíbrio. Nos casos apresentando limitações de movimentações, as condições iniciais são determinantes para a predição da configuração final, pois indicam quais os possíveis mínimos locais.

O que incentiva a busca da validação da hipótese da adesão diferenciada é que muitas propriedades de tecidos são caracteristicamente semelhantes às propriedades mecânicas de líquidos, que são sabidamente capazes de segregação. Abaixo seguem os comportamento apresentados por populações de células embrionárias que mimetizam características de líquidos imiscíveis (Steinberg, 1996):

- (1) Arredondamento de fragmentos de tecido, que possuem formas iniciais irregulares, para uma forma esférica.
- (2) Reagrupamento de misturas de diversas células, alcançando certas configurações topológicas específicas (segregação por exemplo).
- (3) Envoltura de um aglomerado por outro.
- (4) Evolução do reagrupamento passa por estágios de menores aglomerados, que então percolam.
- (5) Alcançar a mesma configuração final por caminhos alternativos, como segregação celular e envoltura.
- (6) Relação hierárquica associativa dos tecidos a se estenderem um sobre o outro; figura 4.3.2.
- (7) Correspondência imediata entre a seqüência dos potenciais de envoltura com os valores de tensões superficiais obtidos.

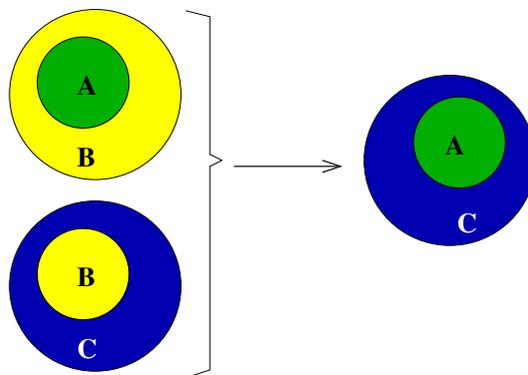


FIGURA 4.3.2. ASSOCIATIVIDADE. Propriedades associativas apresentados por tecidos mostrando que há uma clara hierarquia quanto aos potenciais de envoltura. Na figura está esquematizada esta propriedade: Se tecido A é envolto por B, que por sua vez é envolto por C, podemos concluir - teoricamente e por verificações experimentais (Foty *et al.*, 1996) - que o tecido (fase) C vai se estender sobre A.

Teorias que visam dar fundamentos para processos mais complicados da morfogênese, inevitavelmente terão que reproduzir estes sete pontos citados.

4.3.2. Mecanismos biológicos de adesão diferenciada

As interações entre células, assim como entre células e a matriz extracelular, são responsáveis pelo desenvolvimento, manutenção e funcionamento de um organismo multicelular. Para conseguir satisfazer tal demanda, existem várias formas de interações, desde as extremamente estáveis (citoesqueleto de células adjacentes ligados por pontos de adesão) até alguns bastante transientes (citoesqueletos não ligados).

No contexto de reagrupamento celular, estamos interessados primeiramente na classe de interações que se dá entre células. Como nossas simulações se baseiam na hipótese da adesão diferenciada, pois estaremos atribuindo energias de superfície diferentes para diversos contatos, é do nosso interesse saber como de fato estas interações se dão em nível molecular, para obtermos corroboração para nossas hipóteses e também verificar até que limite o modelo é válido. Também é nosso intuito fazer especulações sobre o que pode estar acontecendo em nível molecular a partir dos resultados do modelo. Especificamente tratando com hidras, Agbas e Sarras (1994) verificaram a existência de diversos tipos de proteínas de adesão.

A adesão entre células é um processo seletivo (Steinberg, 1986). Uma célula só irá aderir a outras de tipo específico, sendo este reconhecimento estabelecido por proteínas transmembrânicas que podem ser vistas formando quatro grupos básicos: selectinas, integrinas, Ig e caderinas. Além das moléculas de adesão que permeiam a membrana, existem também as intercelulares⁹, que são membros da categoria Ig e que são expressas na membrana. Dentre as interações que estamos estudando, existe uma categorização importante que será fundamental no estudo de reagrupamento celular:

- interações heterofílicas - Na qual uma molécula de adesão reconhece uma outra de tipo diferente na superfície de uma segunda célula.
- interações homofílicas - Ligação entre moléculas iguais de adesão em células diferentes. Exemplo destas são as caderinas, das quais se conhece mais que 50 tipos.

Interessa-nos as correspondências qualitativas entre estas interações e as energias de interação propostas. A família Ig possui interações homofílicas o que leva à seletividade adesiva, e contribuem com a embriogênese.

Selectinas: Importantes para o sistema imunológico, pois regulam interações entre leucócitos e células endoteliais. Não é do nosso interesse pois não participam de estabelecimento de topologias.

Integrinas: São responsáveis tanto por grande parte das adesões com ECM quanto interações célula-célula.

Ig - Imunoglobulinas: Os ICAMs em associação com integrinas (ou seja, dois tipos distintos de proteínas) formam junções heterotípicas. Porém, as que serão de relevância para a seletividade adesiva,

⁹*intercellular adhesion molecules (ICAMs)*

contribuindo na embriogênese, são as interações homofílicas apresentadas por esta categoria.

Caderinas: Apresentam afinidades seletivas entre elas. No entanto, não participam do processo de segregação (reagrupamento) em células embrionárias, sendo expressas mais em epitélios (E-caderinas), na qual mais de 20 tipos já foram reconhecidos.

Grupo	Ligantes	interação
Integrinas	EMC	Adesão Focal (estável)
Integrinas	Ig	heterotípicas (transiente)
Ig	Ig	homotípico (transientes)
Caderinas	Caderinas	Adherens e desmosomas

TABELA 4.3.1. TIPOS DE INTERAÇÕES MOLECULARES DE ADESÃO.

A capacidade das células de aderirem umas a outras, quando provenientes da mesma espécie, não está restrita apenas ao tipo celular, pois muitos dos sistemas de adesão moleculares estão expressos em diferentes tecidos. O que varia consideravelmente é a intensidade destas forças adesivas. Por outro lado, células que expressam apenas caderinas não são capazes de estabelecer adesões com aquelas apenas contendo imunoglobulinas. A habilidade de membros de famílias de moléculas de adesão a interagirem entre si aparece principalmente nas caderinas. Por isto subfamílias diversas de caderinas em tipos celulares diferentes podem interagir, porém com energias heterotípicas próprias (geralmente não tão fortes).

Adesão célula-célula em função do tipo celular é conhecido através de experimentos.

Embora a maioria das células possuam sítios especializados na membrana plasmática que formam os pontos de contatos com outras células (ou ECM), sendo estes estáveis ou não, achamos suficiente no estudo da Hidra fazer a aproximação de que as interações se distribuam homoganeamente pela superfície. Na verdade, o valor de acoplamento entre diferentes tipos de célula $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ é quase uma aproximação de campo médio da quantidade e valor de todos pontos focais. Esta 'média' mimetiza a interação entre células (Steinberg e McNutt, 1999).

É relevante também perceber a importância de entender as diversas escalas temporais que estão envolvidos nos diversos processos de adesão e interação. Conexões químicas necessitam desde alguns segundos até minutos para se estabelecerem. Junções possíveis de caderinas - adherens e

desmossomas - precisam de um período ainda maior (Bell, 1978). As interações físicas, no entanto, são instantâneas.

Apesar da importância de se entender melhor as interações em nível molecular (já que o grau de reconhecimento bioquímica regula as intensidades de adesão), as afinidade entre os tecidos em termos de imiscibilidade, que estudaremos a seguir com muito cuidado, não se restringem aos conceitos de interrelações entre moléculas homofílicas e heterofílicas. A segregação de populações celulares pode ser explicada independentemente da origem das diferenças energéticas das interações; segregação tanto pode ser obtida por razões de seletividade entre as moléculas como apenas por número de moléculas por célula. Teoricamente se pode facilmente concluir que duas populações de células são capazes de se segregar sem a necessidade de usar sistemas de adesão moleculares (apesar disto também poder ser utilizado). Experimentalmente se pode obter segregação utilizando apenas subclones que expressam números diferentes de um tipo único de molécula adesiva (como é o caso com células *L* expressando somente caderinas *P*), obtendo uma configuração final na qual as células com maior número de adesões formam a massa central (unidades mais coesas), cercados por uma camada de células menos coesas que possuem número reduzido da mesma molécula Ruoslahti e Obrink (1996); Duguay *et al.* (2003).

Experiências como estas são muito importantes, pois não apenas provam a universalidade dos conceitos de adesão diferenciada, como também fornecem um exemplo na qual outros parâmetros celulares como propriedades de contrações de membrana, velocidade, viscosidade ou sensibilidade quimotática foram eliminados.

4.3.3. Física da adesão diferenciada

Mesmo que já iniciamos a discussão sobre processos de minimização de energias e forças adesivas envolvidas em morfogênese, de modo que já nos encontramos utilizando termos físicos referentes a processos de reagrupamento celular, queremos nesta seção de maneira didática definir os termos físicos. A partir destes conceitos ficará mais claro os principais problemas gerados. Acreditamos que este parêntese será útil para evitar confusões de terminologia.

Grande parte das teorias elaboradas para tentar entender reagrupamento celular, são baseadas de alguma maneira no conceito de adesão. Esta pode ser expressa e manipulada de várias formas, a mais fundamental sendo a energia livre de adesão F . Esta energia livre é calculada ao se integrar o trabalho mecânico entre dois estados - o estado ligado (duas células aderidas por uma área de contato A) e o estado separado (Graner e Glazier, 1992). Isto gera $F(A) - F(0)$, que, ao dividir pela área de contato, é a energia livre de adesão por unidade de área de contato, $\frac{\partial F}{\partial A}$. A partir de agora, usaremos apenas esta última, chamando-a mais sucintamente de *energia livre de superfície*. É uma grandeza que se torna negativa ao favorecer ligações (células que grudam entre si) e positiva em eventuais casos de repulsão. Será

possível conectar a energia livre de superfície a mecanismos biológicos de adesão da membrana celular? De forma universal, não. Isto é, as propriedades da mobilidade das moléculas de adesão, suas possíveis configurações, tipos, interações e dinâmica são tão complexas que ainda não é possível prever a energia de adesão apenas por dados bioquímicos e termodinâmicos. Porém, existem grandezas mensuráveis que podem vir a ser úteis, e a energia em si poderia ser medida também de forma direta. Ressaltamos que tais medidas requerem muitos cuidados por serem propriedades extremamente não lineares (dependentes do regime de compressão, deslocamento e deformação) e muito sensíveis a elasticidade e flutuações da membrana (Evans *et al.*, 1991*b,a*).

Para definir uma energia total de adesão é necessário fazer uma série de aproximações. Queremos uma descrição da célula na qual evitamos os detalhes de escalas muito menores que a da própria célula - de fato, propomos uma célula em até certo grau abstrato. ‘A abstração é uma ignorância seletiva’¹⁰ e neste caso selecionamos escalas acima da ordem de $10\mu m$. Graner e Glazier (1992) primeiramente formularam a definição da energia total de adesão ao discutir que nas escalas apropriadas podemos juntar as contribuições microscópicas da entropia, provenientes das configurações de moléculas de adesão de superfície, numa energia de superfície efetiva ε .

Como já deve ter ficado evidente em seções anteriores, estávamos considerando a energia configuracional equivalente à energia livre - continuaremos fazendo isto, agora apenas de maneira mais consciente pois sabemos que não é necessário considerar a entropia configuracional. A energia total de adesão \mathcal{E} será a soma de todas as contribuições de interações entre os pares (c_i, c_j) que formam o conjunto, sendo que o sistema possui N células $c_i, i = 1, \dots, N$. Para fins demonstrativos, se apenas possuíssemos um tipo de células $\tau(c_i) = \tau$, de forma que a energia livre de adesão entre todas fossem iguais, escreveríamos:

$$(4.3.1) \quad \mathcal{E} = \sum_{\text{pares cel.}(i,j)} A_{ij} \cdot e(\tau(c_i), \tau(c_j)) + \sum A_{iM} e_{iM}(\tau(c_i), M)$$

$$(4.3.2) \quad = \sum_{\text{pares}(i,j)} A_{ij} e_{ij} + \sum A_{iM} e_{iM},$$

onde A_{ij} indica a área de contato entre a célula i e a célula j com energia livre de adesão e_{ij} ; A_{iM} representa a área entre cada célula e o meio, energia livre de adesão das células com o meio sendo e_{iM} . Usamos, tratando de simulações, de energias de acoplamento $J(\sigma_i, \sigma_j)$, que são análogas a energias livre de adesão. Estas terminologias distintas existem por razões históricas, porém estão de tal maneira enraizadas que usaremos ambas pela naturalidade.

¹⁰Andrew Koenig, “*C Traps and Pitfalls*” (Addison-Wesley)

Porém, ao utilizar os valores de acoplamento referem-se às interações entre os *spins* (sítios)¹¹ que definem as células. A equação 4.3.1 pode ser reescrita como

$$(4.3.3) \quad \mathcal{E} = \sum_{(i,j)} J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))(1 - \delta_{\sigma_i, \sigma_j}).$$

Nesta expressão, ao se somar sobre toda a rede automaticamente teremos a contribuição da área de contato.

Para os casos misturados, nos quais coexistem tipos diversos de células, as energia dependem do tipo das células. Também as energias de superfície com o meio serão próprios de cada tipo. Isto foi expresso já na equação 4.3.1 antes das simplificações. No caso da hidra que possui 2 tipos de células, as da linhagem ectodérmicas (**ecto**), e as da linhagem endodérmicas (**endo**), a expressão resulta em cinco termos de energia. A equação 4.3.1 especificamente se torna:

$$(4.3.4) \quad \begin{aligned} \mathcal{E} = & \left(e_{\text{endo, M}} - \frac{e_{\text{endo, endo}}}{2} \right) \sum_{\text{cel. endo}} A_{iM} + \left(e_{\text{ecto, M}} - \frac{e_{\text{ecto, ecto}}}{2} \right) \sum_{\text{cel. ecto}} A_{iM} \\ & + \frac{e_{\text{ecto, ecto}}}{2} \sum_{\text{cel. ecto}} A_i + \frac{e_{\text{endo, endo}}}{2} \sum_{\text{cel. endo}} A_i \\ & + \left(e_{\text{ecto, endo}} - \frac{e_{\text{ecto, ecto}} + e_{\text{endo, endo}}}{2} \right) \sum_{\text{interfaces ectoendo}} A_{ij}. \end{aligned}$$

As contribuições energéticas devido a diferentes interfaces ficaram explícitas. Identificando as áreas totais entre as fases com $I_{\text{ecto, M}}$, $I_{\text{endo, M}}$ e $I_{\text{ecto, endo}}$, podemos reescrever os termos em variáveis macroscópicas:

$$(4.3.5) \quad \mathcal{E} = \gamma_{\text{ecto, M}} I_{\text{ecto, M}} + \gamma_{\text{endo, M}} I_{\text{endo, M}} + \gamma_{\text{ecto, endo}} I_{\text{ecto, endo}} + \sum_{\text{todas}} A_i \frac{e_{ii}}{2}.$$

Que é exatamente a equação anterior. Identificamos as tensões de superfície γ 's como

$$(4.3.6) \quad \gamma_{\text{ecto, endo}} = e_{\text{ecto, endo}} - \frac{e_{\text{ecto, ecto}} + e_{\text{endo, endo}}}{2},$$

$$(4.3.7) \quad \gamma_{\text{endo, M}} = e_{\text{endo, M}} - \frac{e_{\text{endo, endo}}}{2},$$

$$(4.3.8) \quad \gamma_{\text{ecto, M}} = e_{\text{ecto, M}} - \frac{e_{\text{ecto, ecto}}}{2},$$

¹¹O sítio i corresponde ao ponto (x, y, z) da rede; o sítio j ao ponto (x', y', z') .

que vêm a ser basicamente as diferenças energéticas (por unidade de área) entre interfaces heterotípicas e homotípicas e vão servir para qualificar o quanto tensões estão envolvidas na diminuição de áreas de interface e relaxação de curvaturas. É importante ressaltar que estas tensões de superfície não estão descrevendo a tensão ‘física’ interna da membrana celular.

4.3.4. Exploração da paisagem energética

Estendemos os conceitos que motivaram as definições da seção anterior a situações topológicas locais. Consideramos uma transição topológica do tipo $T1$, como indicado na figura 3.1.3, na qual existe uma troca de vizinhos ecto-ecto por endo-endo. Em certo momento nesta transição o sistema terá que passar pela topologia desfavorável em espumas (na qual não existem adesões diferenciadas), correspondente à formação de um vértice de quatro paredes, como esquematizamos na figura 3.1.1. Agora porém, devido a energias de adesão diferentes, uma análise apenas geométrica não bastará, tornando imprescindível explorar as várias possibilidades de contribuições das adesões diferenciadas. Antes de prosseguirmos, tomaremos um momento para explicar as diversas situações.

Mais especificamente na hidra, Takaku *et al.* (2000) mostraram que, ao tratar interações entre células individuais, há uma probabilidade maior das células endodérmicas se aderirem entre si que as ectodérmicas. Por processos diferentes, Sato-Maeda *et al.* (1994) chegaram à conclusão, enquanto mediam as interações homotípicas destas linhagens, que a adesão entre pares de células endodérmicas são superiores (maiores que $50pN$) que entre pares de células ectodérmicas ($30pN$). Estipulamos portanto a interação homotípica entre endodermes como sendo favorável frente a interações homotípicas de células ectodérmicas ($e_{\text{ecto,ecto}} > e_{\text{endo,endo}}$), ou seja células endodérmicas são mais coesas¹².

Mesmo sabendo que interações entre células endo-endo são vantajosas, a situação intermediária (da transição $T1$) pode ser favorável (ou não), dependendo da energia livre de adesão entre ecto-endo (vide figura 4.3.3 na próxima página).

Caso os contatos heterotípicos sejam muito superiores energeticamente aos homotípicos, a troca de vizinhos (para alcançar o mínimo global) só poderá ocorrer após a superação da barreira energética. Isto acarreta em toda uma discussão sobre flutuações termodinâmicas e de membrana, temperatura e mobilidade ativa da célula (seção 4.3.6) para verificar a plausibilidade desta transição. Já com uma adesividade muito grande entre interfaces heterotípicas (uma energia muito favorecida, baixa) o sistema poderá ficar preso no estado misturado que maximiza interfaces entre células de tipos diferentes, exemplo esquemático sendo a da topologia xadrez indicado na

¹²Vamos manter esta convenção durante a dissertação, a não ser quando explicitamente supomos o contrário.

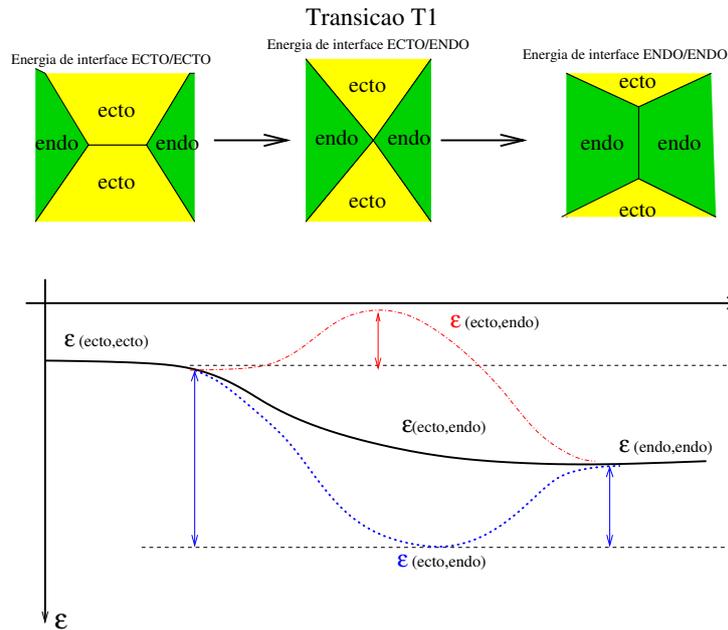


FIGURA 4.3.3. MUDANÇA DE VIZINHOS. Inicialmente o estado possui uma interface predominante homotípica ecto/ecto. Para atingir a configuração energeticamente favorável através da mudança de vizinhos (transição T1), é preciso passar pela topologia de um encontro de 4 interfaces. A curva traçada-pontilhada vermelha indica a evolução energética no caso das energias heterotípicas serem muito energeticamente desfavoráveis (pouco adesivas), indicando uma barreira de energia. Já a curva pontilhada azul representa o comportamento energético na qual as interações heterotípicas são mais favoráveis frente as duas possibilidades homotípicas a ponto de gerar um mínimo. A situação intermediária produz um função monotonicamente decrescente na qual se pode chegar sem barreiras ou poços ao estado final endo/endo.

figura 4.3.1 na página 59. Vemos com isto que a afirmação de que a segregação perfeita ocorre quando células ectodérmicas menos coesas cercam o aglomerado em formação de células endodérmicas mais coesas não é imediatamente suficiente para explicar este processo de redistribuição celular.

Nos agregados de hidra quase sempre ocorre engolfamento total, isto é, a partir de diversas configurações iniciais alcança-se a mesma topologia final: a das células ectodérmicas (as menos coesas) englobando as endodérmicas, numa simetria esférica e com a formação de uma cavidade interna¹³.

¹³O aparecimento da cavidade não é consequência direta das diferenças de adesão. Ela ocorre devido processos osmóticos e ativos de bombeamento que ocorrem somente após a completa segregação e arredondamento do agregado.

Esta dinâmica fica evidente na situação em que a energia de superfície de interfaces heterotípicas é mais favorável a ecto/ecto mas ainda menos estável que as endo/endo. Deste modo, as células endodérmicas, por serem tão mais adesivas, são capazes de expelir as ectodérmicas num processo de segregação. Caso a densidade de células endodérmicas for suficiente, elas irão se interligar por coalescência, percolando de modo que ao final do processo apenas um aglomerado se forma.

Utilizando energias de superfície, estudamos a paisagem energética em grande detalhe. A equação 4.3.5 deixa explícita que a mesma análise feita por tensões de superfície, apesar da perda das rugosidades locais, irá descrever os estados estáveis de equilíbrio, uma vez que elas servem melhor para descrever as configurações de energia mínimo global.

Experiências de reorganização e agrupamento celular *in vitro* são capazes de colocar as células em situações, (via controle da topologia inicial, número de células iniciais e tipos de células), que não ocorreriam naturalmente num animal *in vivo*. Nestes casos, é possível que o sistema fique preso num metaestado. Todavia, principalmente na hidra, é surpreendente a versatilidade de configurações iniciais que levam novamente à configuração viável, provando não apenas que este é o estado de menor energia, mas que a dinâmica pode explorar ergodicamente aquela região. Já em 1744, Trembley fez a experiência de inverter uma hidra viva sem danificá-la, de maneira a ficar do lado avesso, e verificou que em 24 horas a morfologia dos epitélios foi capaz de se restabelecer - o endotélio para dentro e o ectoderme na face exterior. Isto ocorre mesmo havendo mesogléia, o que sugere fortemente que não houve barreiras energéticas consideráveis para superar (frente à mobilidade celular).

Concluimos que baseados na teoria da adesão diferenciada não podemos tirar conclusões sobre a dinâmica apenas pelas tensões e das interações homotípicas, porém é necessária informação sobre

- as interfaces com o meio, que irão determinar a evolução e os estados finais,
- as condições iniciais, que muitas vezes determinam a que atrator se chega,
- e mobilidade celular, que poderá estimular ou não a exploração ergódica da paisagem energética.

Uma abordagem será feita na seção 4.4, sobre o último ponto.

4.3.5. Forças de adesão por medidas direta

Durante o período no qual a hipótese da adesão diferenciada foi proposta, não havia resultados empíricos que indicassem quantitativamente o comportamento de segregação dos diversos tecidos como consequência destes princípios fundamentais. Mesmo o fato que células expressando as mesmas moléculas de adesão poderiam ser imiscíveis, o que indicaria que este fenômeno não reside apenas na seletividade bioquímica mas sim nas forças

de adesão, não havia ainda sido reconhecido (Steinberg, 1996). Portanto foi de extrema importância para a teoria obter medidas diretas de adesividades intercelulares. No entanto, o que percebemos ao contemplar a extensa literatura nesta área, é uma ambigüidade macroscópica ao se definir “adesividade”, geralmente sendo empregado como um ‘termo informal sem uma definição física precisa’ (Steinberg, 1996). Resquícios desta época persistem, como é evidenciado ainda pela confusão de tratar tensões de superfície de populações de células como medida direta das adesões intercelulares (sem pesquisar contribuições das interações com o meio), e de estender definições que só atingem sua total validade quando interfaces macroscópicas entre tecidos são estabelecidas ao contrário de células em suspensão, na qual estas interfaces macroscópicas não existem (ver equação 4.3.5). Todavia, muita informação foi obtida pelas experiências propostas e são úteis para testar as hipóteses por simulações.

Existem quatro formas de medidas inerentemente diferentes:

Experiências de separação: Na qual se mede a força necessária para separar células aderidas. Complicações com tais resultados se devem ao fato que a área, (plano) na qual ocorre a separação da célula não coincide com o plano de adesão, as propriedades plásticas das células alteram os resultados e, mais grave, a maneira pela qual a força separadora é aplicada modifica a resposta.

Observações cinéticas: Através da observação da dinâmica de reagrupamento celular se obtêm indícios que revelam as intensidades das adesões. Dois cuidados devem ser tomados. Primeiramente, durante o processo de reagrupamento num agregado, Foty *et al.* (1996) verificaram que as adesões entre células continuam a se fortalecer depois que foram estabelecidas, de maneira que não se pode concluir que necessariamente a evolução das configurações intercelulares de um agregado sejam guiadas por interações fixas. E por final, o que guia a cinética celular não é apenas as intensidades estabelecidas pelas adesões, mas também a mobilidade celular e as interações das interfaces com o meio.

Considerações termodinâmicas: Aqui, por medidas dos efeitos macroscópicos das adesões manifestados por uma tensão superficial (ou interfacial), se espera estipular as energias de coesão e adesão dentro de um agregado.

Medidas hidrodinâmicas da membrana: O único tipo de experiência que não está indiretamente medindo a tensão superficial *de uma célula* através de sua dinâmica de adesão ou pela tensão manifestada pelo agregado de células. Gotículas de certo líquido coloidal são colocadas na superfície de uma célula, na qual aderem. Estas gotas irão formar ângulos bem definidos. Utilizando a condição de Young, é possível estimar as tensões entre as fases dos dois meios (meio e gotícula) e a energia de superfície da célula (Ravaine *et al.*, 2002).

As forças adesivas entre células epiteliais de hidras dissociadas foram medidas por Sato-Maeda *et al.* (1994) utilizando um manipulador de laser em 3D para células individuais. As intensidades de adesão obtidas pela abordagem de separação de duas células aderidas foram maior para células endodérmicas (maior que $50pN$), que entre as células ectodérmicas (ordem de $30pN$). Também Technau e Holstein (1992) realizaram experiências para quantificar as adesões em hidra, utilizando outra técnica, a de culturas rotacionais de células individuais em suspensão misturada. Os resultados de ambos sugerem que a força interativa é maior entre pares de células epiteliais da endoderme que de pares ectodérmicos¹⁴. No entanto, ao comparar estas adesões homotípicas à interação heterotípica ecto-endo, esta última aparenta ser menor¹⁵. Concomitantemente, observações morfológicas de adesões entre pares de células endo/endo e ecto/ecto revelaram que as distâncias entre as membranas celulares de pares endodérmicas é em média menor que das ectodérmicas. Dados morfológicos de estruturas ultrafinas das regiões de contato corroboram a idéia que as interações adesivas de maior intensidade são mais comuns nas ligações entre células endodérmicas (Takaku *et al.*, 2001).

Uma maneira alternativa para medir as forças de adesão entre as células foi realizada por Hobmayer *et al.* (2001), ao verificar que, sob rotação de uma suspensão de células ectodérmicas e endodérmicas, há uma formação inicial maior de aglomerados homotípicos endodérmicos perante o número de formações homotípicas ectodérmicas. Isto indica que a afinidade, probabilidade de se estabelecer uma conexão, entre células endo-endo é maior que ecto-ecto, sugerindo que $e_{endo-endo} < e_{ecto-ecto}$. No entanto, para manter o rigor da discussão, ressaltamos que a interação com o meio também influencia estas estatísticas, tornando-as inconclusivas.

4.3.6. Flutuações de membrana para guiar reagrupamento por adesão diferenciada

Reagrupamento requer flutuações de membrana.

Empiricamente já se verificaram movimentações de membrana em células que estão se ordenando em tecidos em duas dimensões, mostrando que a movimentação das células no processo de segregação pode ser ativa ou passiva (Armstrong e Parenti, 1972). Há medidas destas deformações em membrana em células adjacentes de hidra (Rieu *et al.*, 2000). Mombach *et al.* (1995) mostraram comparações entre as dinâmicas de reagrupamento na presença e na ausência de flutuações: primeiramente com experiências utilizando citocalasina B para inibir movimentações metabólicas de membrana, constataram que o processo de morfogênese se encontra prejudicado.

¹⁴Ou seja, $J_{endo,endo} < J_{ecto,ecto}$.

¹⁵Ou seja, $J_{ecto,endo} < J_{endo,endo} < J_{ecto,ecto}$.

Acompanharam estas averiguações de sustentações teóricos, ao implementar em simulações de Potts Celular a falta de flutuações devido a temperatura baixa.

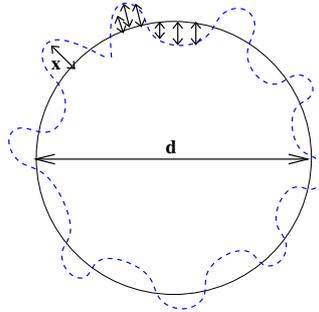


FIGURA 4.3.4. FLUTUAÇÕES DE INTERFACE. Gota de líquido apresentando flutuações. d representa o diâmetro da gota, e x as variações a partir da esfera. Na célula, deformações semelhantes mas de origem metabólica, correspondem a 20% da dimensão linear da celular, ou seja,

$$(4.3.9) \quad \langle x^2 \rangle = 0.04d_{cel}^2.$$

Sabe-se que uma gota de líquido (fase A), constituída de forma similar a agregados de células por uma população de subunidades coesas, irá se arredondar ao mesmo tempo que apresenta flutuações. Estas deformações são originadas por perturbações térmicas, e podem ser quantificadas através dos desvios normais x a interface por (Steyer *et al.*, 1992):

$$(4.3.10) \quad \langle x^2 \rangle = \frac{kT}{\sigma_A} \ln \frac{d_A}{l}.$$

A média é tomada sobre a área da gota. d é o diâmetro representado na figura 4.3.4 e l , o tamanho mínimo característico da largura média da interface (na equação 4.3.10 escrevemos o diâmetro como d_A , que se refere especificamente ao diâmetro da fase A que compõem a gotícula).

Podemos traçar uma analogia desta dinâmica da gotícula com um agregado celular, no qual também existem movimentações da interface, porém neste caso geradas pela influência do citoesqueleto de actina nas células individuais, e podem variar significativamente dependendo do tipo de células. Devido a estas forças internas, a membrana da célula explora mais possibilidades de formar e perder ligações adesivas com outras células. Beysens *et al.* (2000) sugeriram que se considere esta atividade metabólica como uma correspondência ao kT da situação hidrodinâmica da equação 4.3.10,

caracterizando-a por uma medida ε . Esta quantidade irá fornecer uma estimativa a respeito da energia total efetiva de interações entre células. Segundo observações experimentais (Steinberg, 1975), é possível medir a amplitude das movimentações da membrana celular. É crucial tomar cuidado com a escala espacial relevante, já que as flutuações da membrana podem variar significativamente, de escalas 1 nm , $0.1\ \mu\text{m}$ a $1\ \mu\text{m}$.

Considerando estes movimentos responsáveis pelas flutuações nas interfaces dos tecidos de agregados, então juntando-se a equação da figura 4.3.4 com 4.3.10, e introduzindo ε , temos que

$$(4.3.11) \quad 0.04d_{cel}^2 = \frac{\varepsilon}{\sigma_A} \ln \frac{d_A}{d_{cel}}.$$

Ou seja, podemos experimentalmente obter uma estimativa da energia média efetiva de ligação de um agregado, ao saber o diâmetro deste, a tensão superficial e o diâmetro médio das células que a compõe,

$$(4.3.12) \quad \varepsilon = \frac{\sigma_A \cdot 0.04d_{cel}^2}{\ln \frac{d_A}{d_{cel}}}.$$

Outra maneira experimental de se estimar esta energia é medir a constante de difusão apresentada pelas células no agregado. Células epiteliais encontradas em agregados de células neurais retiniais, movimentam-se aleatoriamente. Mombach e Glazier (1996) estudaram este comportamento e mediram uma constante de difusão, $D \approx 3 \times 10^{-12} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$. Tratando esta situação como a difusão de um líquido em outro, e usando-se o valor apropriado da viscosidade da célula (em subseção 4.4), pode-se usar a equação de Stokes-Einstein para avaliar ε (no caso, kT),

$$(4.3.13) \quad D = \frac{kT}{5\pi\eta\left(\frac{d_{cel}}{2}\right)}.$$

4.4. Medindo Tensões Superficiais

Se a hipótese da adesão diferenciada for verdadeira, encontramos-nos numa situação na qual, ao conhecer as forças interativas entre tipos diversos de células, podemos prever as configurações finais mais prováveis através de simulações.

Portanto, saber quais são as forças de ligação entre as moléculas de adesão das células é extremamente importante para se entender morfogênese. Porém, os pontos de aderência entre células se caracterizam por uma delicada relação das estruturas internas das células individuais (posicionamento do citoesqueleto, por exemplo) com processos do meio extracelular e ainda por aspectos regulatórios. Como resultado, é difícil mimetizar a resposta de uma célula fora do tecido ao analisá-la isoladamente, o que em muito dificulta a quantificação das forças (por exemplo, ao se utilizar microscopia

de força atômica). Motivados pela analogia entre reagrupamento celular e a segregação espontânea de líquidos imiscíveis, nós iniciamos uma pesquisa para determinar, através de certas medidas *in situ*, as energias efetivas de ligação entre células.

A próxima parte do trabalho foi iniciado por François Graner de Grenoble em colaboração com integrantes do LabCel e Ângelo Marrone do Grupo de Magnetismo do IF-UFRGS.

Agregados como fluido



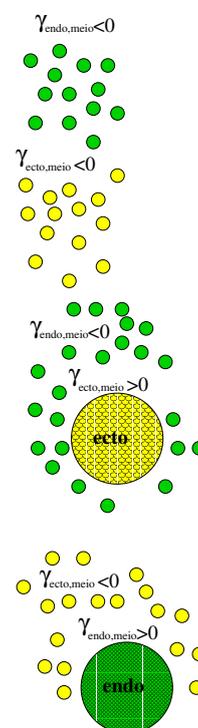
As mesmas forças que mantêm a unidade de uma gota d'água estão presente em sólidos. Se uma amostra for comprimida, tanto os líquidos quanto os sólidos resistem à compressão com magnitudes semelhantes e, apesar de sólidos em geral serem menos compressíveis, eles são muito mais resistentes a extensões que fluidos.

O conceito de pressão continua tão útil no estudo de sólidos quanto de líquidos e, também, em células e agregados de células. O assim chamado “stress” possui sinal negativo quando o stress tende a diminuir o volume da amostra, contrário à pressão para líquidos.

Há muitos estudos também a cerca das propriedades elásticas de agregados de células. Isto é feito conceitualizando o agregado como uma amostra sólida mas não rígida (o que de fato ela é), e observando a deformação devido a aplicação de forças que a mantêm com aceleração nula.

Estamos numa descrição de perturbação e resposta fenomenológica já que não podemos derivar seus efeitos de primeiros princípios. Assim também é com o estudo de todos os materiais, onde as respostas de um stress aplicado é apenas visto como um strain, mas as propriedades intrínsecas do material não são conhecidas. Queremos por isto supor certas hipóteses a respeito de características da célula individual e começar a construir de modo retroativo um modelo que descreve as interações possíveis intercelulares que resultariam nestes dados experimentais. O que se propõe é um estudo análogo à física clássica no qual se descobriu constantes elásticas de materiais que foram tabeladas (e usadas!) muito antes de calcular estas mesmas constantes a partir das forças interatômicas.

O estudo de células e de tecidos é, em certos aspectos, semelhante ao de fluidos e sólidos. Enquanto líquidos se constituem de moléculas sob um potencial de interação de Van der Waals, células possuem um potencial do tipo Leonard-Jones, no qual apresentam repulsão devido sua conservação de volume, uma atração de curto alcance que corresponde aos contatos por membrana feitos via moléculas de adesão. Em situações de baixa densidade celular existem ainda a possibilidade de interações mecânicas de maior alcance (interações longas) devido à formação de extensões membrânicas, como por exemplo filipódios¹⁶.



¹⁶A figura 5.1.1 mostra um exemplo deste tipo de interação.

Assim, num nível conceitual bastante básico, um tecido é análogo a um fluido associativo. Tem-se mostrado que tensão de superfície de tecidos é um parâmetro físico intensivo que caracteriza a forma de equilíbrio dos agregados multicelulares (Foty *et al.*, 1994), e justamente estes valores irão determinar o padrão morfológico de segregação e envoltura que irá se estabelecer nos tecidos correspondentes.

Reagrupamento celular como segregação de fluidos imiscíveis

Representada na equação 4.3.5 está a energia em função das variáveis macroscópicas de tensão de superfície e áreas de interface. Estes valores irão determinar as energias configuracionais mais estáveis do sistema - porém não possuem a informação da possibilidade (dinâmica) de se chegar a estas configurações. Com isto em mente, a análise das tensões é um método claro e direto para prever os estados de equilíbrio.

Denominamos por tensão de superfície de fases líquidas A e B a tensão interfacial entre A e o meio, e a tensão interfacial entre B e o meio simplesmente por γ_A e γ_B . Já a tensão interfacial entre elas, que independe do meio, é $\gamma_{A,B}$. A possível miscibilidade, separação de fases ou envoltura ficarão determinados pela relação entre estas tensões nas interfaces de contato.

No caso das tensões γ_A e γ_B serem negativas, tendemos a uma situação de células isoladas. Ou seja, estaremos num regime de células em suspensão.

Já com a tensão interfacial $\gamma_{A,B}$ entre elas negativa, ocorre uma situação de mistura. Nesta categoria reside a topologia xadrez, observada em diversos sistemas experimentais. Uma destas observações foi feita por Honda *et al.* (1986) em células de glândulas (menos coesas) e células ciliadas (mais coesas), durante a maturação sexual do oviduto de aves. O experimento parte de uma situação na qual existe uma boa porcentagem de células em contatos homotípicos, numa distribuição mais homogênea que simplesmente um arranjo aleatório. Em seguida, durante o processo de maturação, as células localmente se redistribuem de maneira a minimizar os contatos homotípicos, também modificando o seu formato para um mais retangular (Yamanaka e Honda, 1990).

A imiscibilidade das fases A e B é alcançada através de uma tensão interfacial positiva,

$$(4.4.1) \quad \gamma_{A,B} > 0.$$

Nesta categoria se encontra a maioria dos agregados. A segregação possui todas as tensões superficiais positivas, e a situação retratada na figura 4.3.1 demonstra claramente estes processos, que podem ainda se dar de maneira a haver dois agregados separados ou um cercando o outro. A fase com a menor tensão superficial será aquela que irá constituir do envoltório:

$$(4.4.2) \quad \gamma_{envolvido} > \gamma_{envolvedor}.$$

Esta relação também é válida para mais fases, apresentando ordem hierárquica e transitiva, propriedade que foi experimentalmente comprovada

por Foty *et al.* (1996). Como existem vários graus de envoltura (ver figura 4.3.1), existem ainda condições que determinarão a envoltura ‘total’. Para que fase B completamente se estenda sobre A (portanto $\gamma_A > \gamma_B$) será necessário que as tensões obedeçam a

$$(4.4.3) \quad \gamma_A > \frac{(\gamma_A + \gamma_B \cdot \gamma_{A,B})}{2} \geq \gamma_B.$$

Existe ainda a situação na qual os dois aglomerados ($\gamma_A > 0$; $\gamma_B > 0$) estão em contato um com o outro e ambos com o meio. As fases formam capas esféricas que se encontram numa linha tríplice, na qual se encontra meio, fase A e fase B . Nesta situação se aplica a condição de Young (ver Apêndice Condição de Young). Antes de chegar a esta configuração ainda estamos num regime de grande mistura, e isto implica numa área grande de contatos heterotípicos, situação que não pode ser bem descrita pela condição de Young,

$$(4.4.4) \quad \gamma_A \cos \theta = \gamma_B - \gamma_{A,B}.$$

As situações nas quais uma das tensões é superior à soma das outras não possibilita uma configuração na qual existe um ponto tríplice, pois nesta situação é vetorialmente impossível chegar a um equilíbrio para a equação 4.4.4. Há três maneiras disto ocorrer (supondo é claro que estamos no regime no qual todas as tensões são positivas): a segregação dos aglomerados, a envoltura da célula A sobre B , e a de B envolvendo A . Respectivamente isto corresponde a

$$(4.4.5) \quad \gamma_{A,B} > \gamma_A + \gamma_B,$$

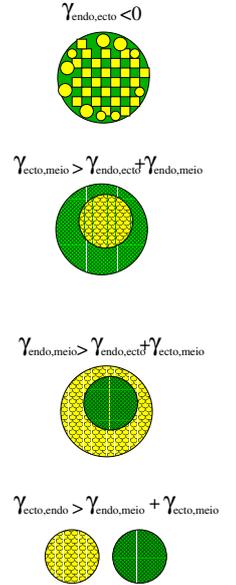
$$(4.4.6) \quad \gamma_B > \gamma_A + \gamma_{A,B},$$

ou

$$(4.4.7) \quad \gamma_A > \gamma_B + \gamma_{A,B}.$$

A primeira equação reflete a situação na qual a separação dos tipos celulares é vantajosa frente a interfaces heterotípicas. Inserindo na equação 4.4.5 as energias livres de adesão, a relação de energias para tal topologia dita que $e_{A,B} > e_A + e_B$. Desta perspectiva vemos claramente o quão sensível a dinâmica é perante a tensão heterotípica, podendo gerar desde coesão até dispersão.

Por clareza analisaremos um caso mais específico de reagrupamento celular no qual as células ectodérmicas se estenderão sobre as endodérmicas (equações 4.4.6 e 4.4.7), isto é, $\gamma_{endo} > \gamma_{ecto} + \gamma_{ecto,endo}$. Inserindo as equações 4.3.6, 4.3.7 e 4.3.8 nesta expressão, a condição de envoltura pela ectoderme também implica que $e_{ecto,meio} - e_{ecto,endo} > e_{endo,meio} - e_{endo,endo}$.



Uma maneira de interpretar isto é que as células endodérmicas se sentem ‘repelidas’ pelo meio mais fortemente que os ectodérmicas. O contrário também seria possível, $\gamma_{ecto} > \gamma_{endo} + \gamma_{ecto,endo}$, como a relação das energias de adesão $e_{endo,meio} - e_{ecto,endo} > e_{ecto,meio} - e_{ecto,ecto}$ o que indica que é viável (apesar que muitas vezes na literatura está sugerido o contrário) que mesmo células homotipicamente mais coesas podem cercar as células menos aderentes entre si.

Coalescência e propriedades viscoelásticas

Tratamos rapidamente do problema geral da cinética dos estágios de separação de fases.

A coalescência hidrodinâmica, dada pela percolação de domínios, é guiada pela tensão interfacial das duas fases (líquidos-gases) A e B , dada por $\gamma_{A,B}$, enquanto as viscosidades η_A, η_B a inibem. Quando a fração de volume da fase minoritária alcançar um valor crítico, há uma transição de fase e a coalescência ocorre. Os domínios coalescem, de modo que estas regiões crescem com o tempo de maneira linear. A teoria de Nikolayev e Beysens (2002) prediz que este tamanho dos domínios interconectados irá aumentar com

$$(4.4.8) \quad L = b \cdot \left(\frac{\gamma_{A,B}}{\eta_{>}} \right) \cdot t,$$

onde $b \approx 0.03$ é uma constante universal, e $\eta_{>}$ a maior viscosidade apresentada pelos tecidos. Beysens *et al.* (2000) registraram a cinética de percolação de um agregado formado por duas populações distintas de células embrionárias, e comprovaram a relação linear entre distância de domínios e tempo, segundo a equação 4.4.8. A similaridade na evolução do estabelecimento configuracional de líquidos imiscíveis com tecidos é portanto bastante forte, mesmo em vista da diferença de oito ordens de grandeza entre as viscosidades (líquido / células). Beysens *et al.* (2000) observaram uma viscosidade de $\eta \approx 10^6$ em células epiteliais embrionárias de galinha. Com hidras, Hobmayer *et al.* (2001) visualizaram a dinâmica da reorganização celular ao seccionar diversos agregados em diferentes tempos, e verificaram após 1,5h a formação de aglomerados com interfaces bem definidas de células ectodérmicas no interior do agregado com uma camada ectodérmica na sua volta. Através de amostras verificaram que estas regiões continuamente se fundiam.

Aparatus e metodologia

Vamos agora citar algumas características apresentadas pelos agregados. Mais tarde vamos explicar melhor as técnicas experimentais para se obter um agregado, no momento, basta entender que o agregado é um objeto macroscópico feito a partir da união aleatória de células dissociadas. Toda observação e medida feita com agregados vai portanto depender altamente do tempo de reorganização, isto é, do intervalo de tempo a partir

do momento que criamos o agregado aleatórios. Esta dependência se deve ao fato que todo observável macroscópico, resulta no final, da organização interna do agregado: da configuração estabelecida entre as células.

A metodologia para se medir a tensão superficial dos agregados consiste em aplicar uma força e esperar o equilíbrio na resposta, neste caso a do formato. Pela equação de Laplace, cujos parâmetros são caracterizações da geometria do agregado, e com a intensidade da força aplicada é possível obter a tensão superficial do agregado.

A força aplicada através do controle da voltagem de um piezo-elétrico, cuja distorção trará uma aproximação (ou afastamento) de um placa paralela a outra parede, no meio das quais se encontra o agregado. Desta forma, é possível comprimir a amostra, enquanto que esta, em resposta se deformará e exercerá uma força de resistência. O piezo-elétrico então irá sofrer nova distorção provocando uma diferença de potencial, que pode novamente ser interpretada em termos de força.

Qualitativamente, as primeiras observações a serem feitas são sobre os aspectos mecânicos apresentados pelo agregado. Num primeiro momento de compressão ele se comporta num regime elástico: isto é, quando se deforma o agregado por um curto período de tempo, ao se liberar esta força o agregado imediatamente retoma o formato original (esférico). Porém, ao se manter a deformação por longo período de tempo (mais que 10 minutos já percebe se grandes diferenças), as subunidades do agregado, as células, começam a se redistribuir para relaxar as tensões internas.

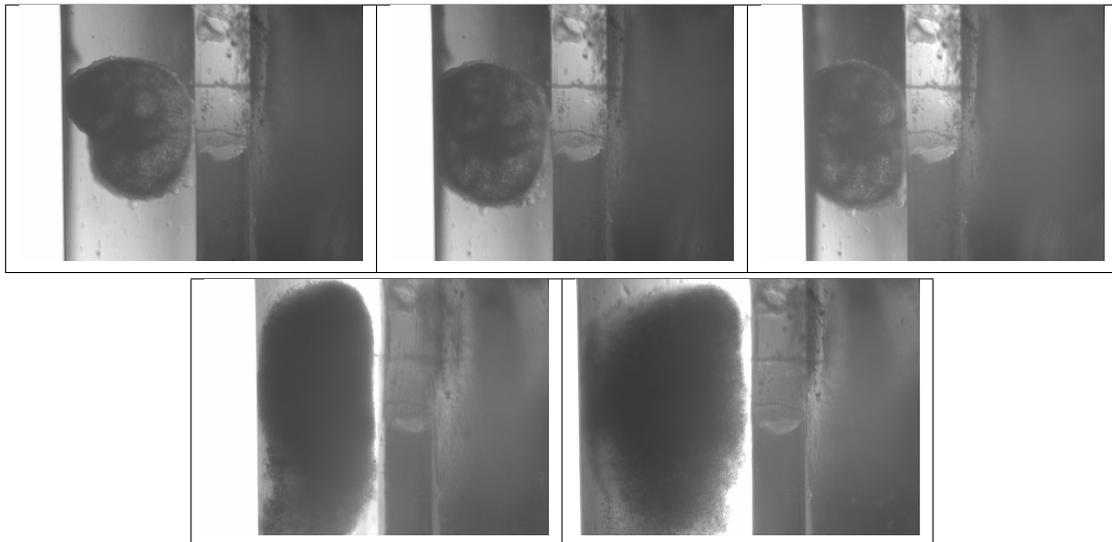


FIGURA 4.4.1. DEFORMAÇÕES. Comprimindo agregados contra um apoio de vidro, pelo piezo-elétrico.

Por técnicas de vídeo-microscopia acompanhamos a compressão, e sob a configuração do estado relaxado medimos as caracterizações geométricas

representadas na figura 4.4.2. Estes valores são embutidos na equação de Laplace (Foty *et al.*, 1994):

$$(4.4.9) \quad \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) + P_{ext} = \lambda,$$

onde P_{ext} é a pressão que a placa móvel exerce sobre o agregado. Como a área de contato entre a placa e o agregado forma um plano circular de raio R_3 , temos que a força aplicada em termos desta pressão é $\frac{P_{ext}}{\pi R_3^2}$. Após considerações de simetria e supondo aproximações da geometria do agregado, obtemos uma expressão da tensão:

$$(4.4.10) \quad \gamma = \frac{F}{\pi R_3^2} \left[\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right]^{-1}.$$

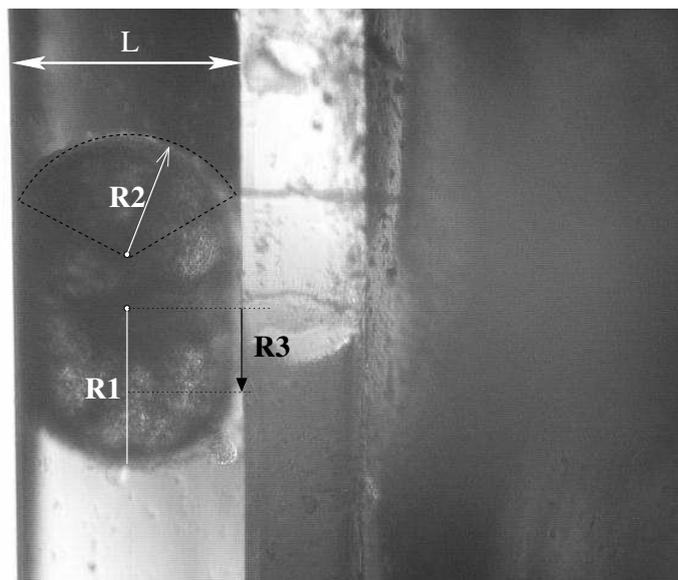


FIGURA 4.4.2. MEDIDAS SOBRE UM AGREGADO COMPRIMIDO. Ao agregado se relaxar a um formato de equilíbrio, são definidos os raios de curvatura R_2 e R_1 , como está demonstrado na imagem acima. O contato entre o agregado e as “placas” paralelas, que constitui uma área circular, é representado pelo raio deste círculo, R_3 . O espaçamento entre as placas é dado por L .

Uma dificuldade desta abordagem por vídeo-microscopia ao se obter os parâmetros para equação 4.4.10, é que existe uma incerteza bastante grande ao se medir R_3 . Esta limitação foi observado primeiramente por Foty *et al.* (1996), e podemos também perceber a incerteza associada a este comprimento nas imagens na figura 4.4.1 causadas pelos efeitos de difração que

ocorrem perto da interface agregado-placa. Por considerações trigonométricas, é possível substituir o valor R_3 por uma expressão incorporando R_1 , R_2 e a distância de separação entre as placas, L , todos variáveis mais precisos:

$$(4.4.11) \quad R_3 = (R_1 - R_2) + \sqrt{(R_2)^2 - \left(\frac{L}{2}\right)^2}.$$

4.4.1. Arredondamento de agregado

Uma das características mais fundamentais de agregados de células é que a dinâmica com a qual, a partir de uma configuração inicial não esférica, elas se aproximam para a configuração esfericamente simétrica onde há minimização de energia de interface, é semelhante novamente a líquidos imiscíveis. Isto é, podemos comparar a dinâmica, apesar de tratar de escalas de tempo bem diferentes, a uma gotícula previamente estendida que relaxa para formato de equilíbrio (na ausência da gravidade, para uma esfera).

Na figura 4.4.3 observamos um agregado durante um intervalo de tempo de 3 horas se aproximando a uma esfera de duas camadas epiteliais. No primeiro quadro, o tempo de criação é apenas de 1 hora.

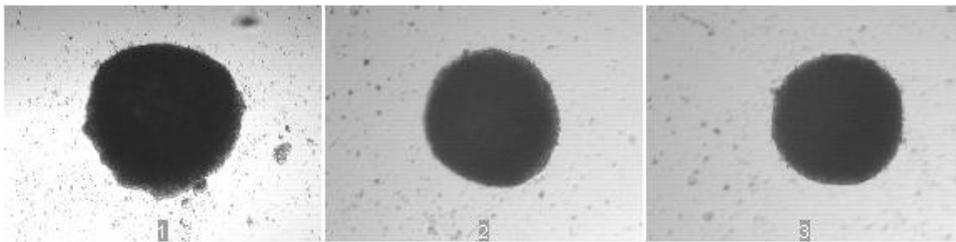


FIGURA 4.4.3. ARREDONDAMENTO DE AGREGADOS. O primeiro quadro mostra o agregado depois da primeira hora de criação, já se iniciou o processo de reagrupamento; a próxima figura é uma de maior arredondamento, com tempo 2 horas. Ao final, obtemos um agregado completamente definido e redondo, de 4 horas.

A fim de visualizar de forma mais extrema a tendência do agregado minimizar sua superfície com o meio, escolhemos iniciar os agregados com um buraco aproximadamente central, para também acompanhar a taxa com a qual esta desaparece. Deste modo iniciamos 7 agregados em forma de rosquinha, da qual dois exemplos estão indicados na figura 4.4.4 na página seguinte.

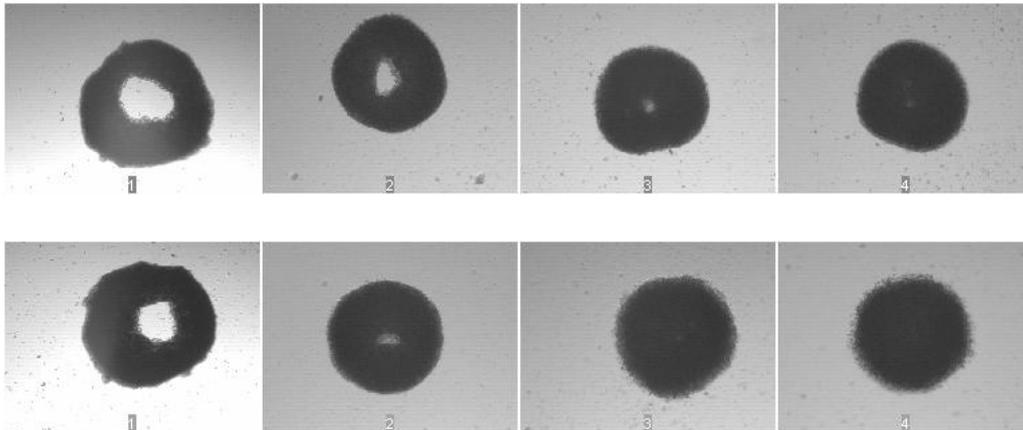


FIGURA 4.4.4. RELAXAMENTOS EM AGREGADOS COM CAVIDADE. Mostramos dois casos semelhantes em que ambos os agregados foram preparados a partir da mesma suspensão de células. Os primeiros quadros (1) mostram as estruturas depois de 1 hora de reorganização, (2) depois de 2 horas, (3) depois de 4 horas, e o último quadro (4) mostram a evolução depois de 5 horas.

4.5. Metodologia Experimental para Hidra

4.5.1. Experiências de reorganização

O estágio da reorganização que focalizaremos é o que começa com a formação do agregado aleatório, até a configuração das duas cascas esféricas epiteliais cercando a cavidade líquida. Ou seja, basicamente restringimos a dinâmica ao primeiro e segundo dias. Apesar da aparente simplicidade, pouca coisa é conhecida sobre os mecanismos que guiam este processos.

Metodologia

Na literatura encontramos diversas variantes de protocolo de obtenção de agregados aleatórios de células de hidra. Os protocolos de uma maneira geral trata de,

- (1) obter células de hidras isoladas em suspensão, em condições sadias
- (2) reagrupá-las através de centrifugação e
- (3) observar a regeneração do agregado obtido.

As técnicas utilizadas para isolar as células consistem em uma intervenção mecânica, onde pedaços de hidra são literalmente picados com o auxílio de uma lâmina e em métodos químicos, com a utilização de meios que dissolvem as moléculas de adesão na membrana.

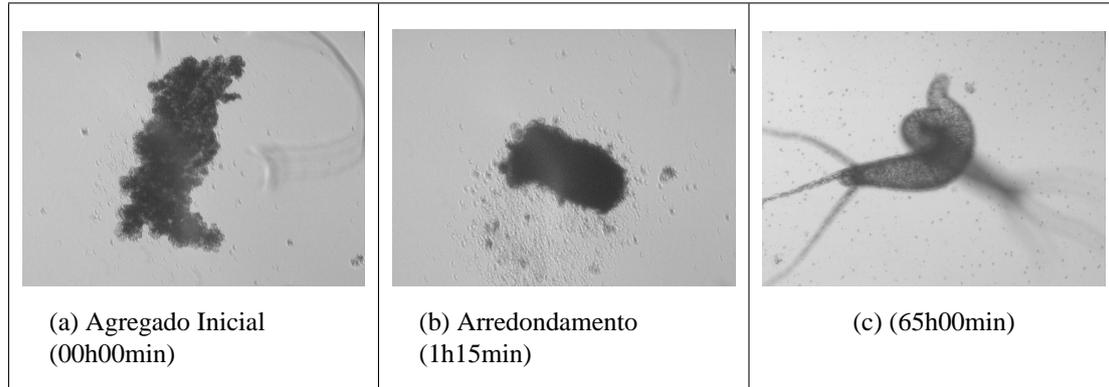


FIGURA 4.5.1. AGREGADO PEQUENO.

O protocolo que utilizamos foi modificada diversas vezes para verificar quais eram de fato os passos relevantes, e também para assegurar que o processo fosse eficiente. Vários aspectos foram revistos, pois, além de um agregado feito pela adesão aleatória de células individuais ao contrário de sub-agregados), também visamos manter a maior parte de células vivas ao final do processo em estado saudável. Isto significa, qualquer processo que nos parecesse estar demasiadamente nos afastando das condições naturais *in vivo* das células foram averiguadas. Tempo de permanência em temperaturas baixas (perto de zero Célsius) foi assim mantido ao mínimo necessário, assim como a exposição ao meio de dissociação. Testes em relação ao grau de intervenção mecânica com o bisturi para a obtenção de células isoladas foram realizados, pois a maceração exagerada pode danificar mais células do que apenas subdividir o tecido. Não entraremos nos detalhes destas análises (deixaremos alguns resultados no Apêndice), porém achamos interessante deixar aqui registrado os passos dos processos e indicar quais são os estágios nos quais maiores cuidados são necessários. As diversas maneiras de se realizar a experiência vão significativamente alterar a qualidade do agregado, e conseqüentemente modificar a dinâmica do reagrupamento celular, sobre a qual todo o estudo está baseada. Não achamos na literatura este grau de detalhe ao explicar o processo, portanto aconselhamos a leitura desta secção e do apêndice para quem deseja realizar experiências com hidras.

Procedimento geral:

Escolha das hidras: As hidras a serem utilizadas para formar o agregado devem previamente ter sofrido um período de 2-4 dias de jejum, no qual condições de absoluta limpeza são mantidas. Destas hidras pré-selecionadas deve-se ainda escolher apenas aquelas que não possuem brotamentos, ou pelo menos não muito desenvolvidos para a continuação.

Remoção das extremidades.: Para garantir que as células diferenciadas da cabeça e do pé não influenciam na dinâmica do reagrupamento celular, devem se extrair estas regiões (ver figura do Apêndice na página 162).

Maceração: Os cilindros de hidras resultantes devem ser cortados por uma lâmina em pedaços menores, quase indistinguíveis. Porém há o cuidado de não formar um estado homogêneo, pois isto indicaria que muito do tecido está começando a se danificar pelas batidas. Ver Apêndice na página 162, para obter um exemplo.

Dissociação hidromecânica: Juntar estes pedaços numa suspensão em DM¹⁷ e por forças de cisalhamento contribuir para a separação das células dos fragmentos de tecido.

Filtragem: Passado todos os passos anteriores, espera-se ter uma suspensão consistindo de grande porcentagem de células individuais. Nunca será possível obter exclusivamente células isoladas, por isto a filtragem por uma rede de 50 μ m de abertura, na qual excluimos os aglomerados pequenos e reduzimos em grande parte a concentração de pares de células aderidas.

Centrifugação: Finalmente a suspensão das células obtidas deve ser colocado sofrer rotação (~1000 rpm) por um tempo adequado (~10 min), enquanto em DM. Neste etapa ocorre a agregação aleatória; é opcional neste ponto deixar o agregado recém formado em temperaturas mais baixas para consolidar sua topologia.

Restabelecimento do Meio de Cultivo¹⁸: Há várias maneiras de restabelecer o meio ideal de cultivo do agregado, que agora se encontra num meio de dissociação (DM) para o meio de cultivo ideal (HM). Isto pode ser feito através de trocas de duas em duas horas, por apenas algumas trocas, ou até mesmo de uma só vez. Existem várias linhas experimentais quanto ao que seria favorável para a reorganização. Independentemente do método utilizado, ressaltamos que a concentração do DM/HM ao longo do processo de reorganização é crítico para a dinâmica, pois vai ditar quais são as tensões de superficiais da fase ectodérmica e endodérmica. Além disto, o DM é conhecido por alterar a expressão molecular nas membranas, que irá modificar interações homotípicas e heterotípicas. Pessoalmente, obtemos por restabelecer o mais rapidamente possível o meio de cultivo para um completamente sem efeitos dissociativos.

Vídeo-Microscopia: Toda evolução do estabelecimento de topologias é registrado por vídeo-microscopia.

Dinâmica interna da reorganização

Através de técnicas histológicas em agregados epiteliais, constatou-se que aglomerados maiores de células ectodérmicas começam a se estabelecer após 1,5h (Hobmayer *et al.*, 2001). Neste ponto da evolução já se formou

¹⁷Meio de dissociação das células, ver apêndice para detalhes.

uma camada de células de ectoderme para revestir a agregado. Após 6 – 10h, imagens internas do agregado revelam que a envoltura e segregação já se tornou completaram.

Formações de eixos em agregados

Uma vez que é estabelecida a dupla membrana no agregado, o processo morfogénico de formação de pólos inicia a partir da configuração esfericamente simétrica. Assim, a formação dos centros organizadores parece ser um processo estocástico, apesar de ser necessário pelo menos um aglomerado de 5-15 células epiteliais de alto potencial de ativação de cabeça para iniciar a formação da cabeça *de novo*.

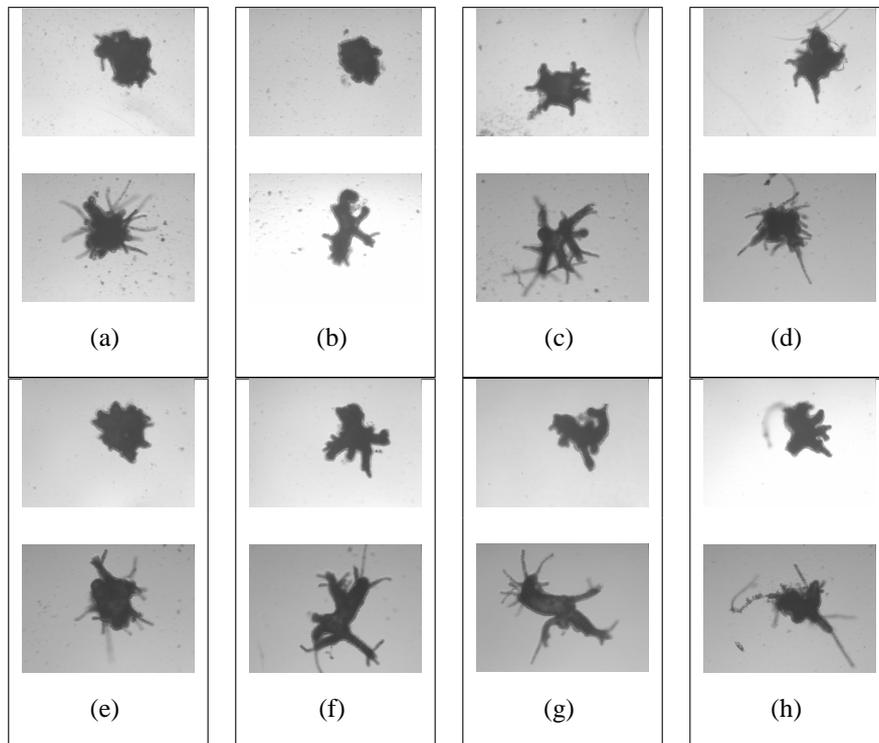


FIGURA 4.5.2. EVOLUÇÕES FINAIS. Estas imagens são de 2 momentos finais (as imagens superiores representam tempo de reorganização de 46h30min, as inferiores de 67h45min) de 8 agregados diferentes (a, b, c, d, e, f, g e h) que foram formados a partir mesma suspensão de células, e cujo formato inicial assemelhava-se a uma 'rosquinha' (figura 4.4.4). Apesar de não terem sido agregados grandes, houve uma formação exagerada de número de cabeças.

4.5.2. Experiências de bursts

Os agregados aleatórios de células de hidra se mostram completamente esféricos após 10 horas, e visivelmente se encontram numa configuração de segregação parcial, já que é visível uma camada de células claras se estendendo externamente. O reagrupamento celular continua formando duas camadas concêntricas de tecido cercado uma cavidade. Após o arredondamento, há um aumento do volume do agregado devido à formação e expansão de uma cavidade interna.

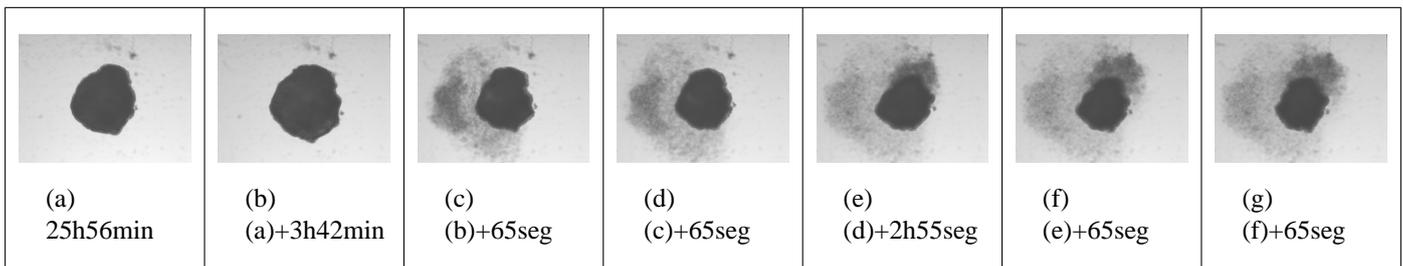


FIGURA 4.5.3. PROCESSOS DE BURSTS.

Nesta cavidade encontram-se outras células que não participam da formação do agregado. O aumento do volume é uma consequência de uma pressão interna de líquido maior que a pressão do meio externo sobre o agregado, que pode ser devido a processos passivos como osmose ou por bombeamento ativo através das células. Concomitantemente, as camadas ectodérmica e endodérmica continuam se reorganizando até estabelecer duas monocamadas. Entre eles se forma, ainda no estágio “esferóide”, a mesogléia.

O processo do aumento de volume continua até o momento crítico na qual ocorre um ‘burst’: um orifício é formado através do qual o líquido interno juntamente com células isoladas são expelidas violentamente. Este processo dramático pode se repetir várias vezes num agregado esférico até que os gradientes morfogenéticos influenciem a topologia de modo que o agregado se alonga e inicia a formação de cabeça. Os tempos de *burst*, contados a partir do momento que inicia-se um agregado aleatório, depende do tamanho inicial da massa celular, variando entre 14 – 20h. Na figura 4.5.3 temos um exemplo onde ocorrem dois bursts, na qual se observa a imediata diminuição de tamanho do agregado.

4.5.3. Experiências futuras

Observamos que aproximadamente após 15 horas o agregado da hidra sofre contrações bastante significativas. Inicialmente estas são causadas pelo influxo osmótico do meio e outros processos ativos de bombeamento. A formação da mesogléia também parece possuir importante papel nesta hidrodinâmica. Porém, resta a dúvida se em alguma fase a dinâmica do agregado não passa a ser resultado de contrações ativas do organismo a

formar. resultados pela rede neural recém reconstituída. Para eliminar esta possibilidade, teríamos que trabalhar com *hidras epiteliais*, ou seja, hidras nas quais não existem células da linhagem intersticial, portanto não havendo a possibilidade de se formar uma rede neural.

Pelas células intersticiais terem um ciclo celular apresentando um terço do período de ciclo das células epiteliais (1 dia versus 3), podemos reduzir seletivamente - até chegar ao estado de total eliminação da população - células intersticiais por tratamento de hidroxíureia ou colchicina. Isto seria feito em hidras adultas, que, apesar de reduzirem seu tamanho durante o tratamento pela perda também de células epiteliais, podem ser mantido indefinidamente vivas por alimentação 'forçada' e ainda conseguiriam se reproduzir asexuadamente. Ainda mais prático seria a utilização do mutante *nf-1* da *Hydra magnipapilata* que não possui estas células após permanecer alguns dias em temperaturas um pouco mais elevadas (Kasahara e Bosch, 2003; Sugiyama, 1994).

Os *bursts* das hidras epiteliais forneceria uma prova conclusiva quanto a que atividade estamos de fato observando, mas está além do escopo desta dissertação, ficando para investigações futuras.

4.6. Simulações de Modelo de Potts Celular

Durante a realização desta dissertação, foram feitas muitas simulações, principalmente do Modelo de Potts Celular, que possibilitou a realização de averiguações de hipóteses e motivaram a realização de certos experimentos biológicos. Algumas destas simulações foram feitas em colaboração com Dr. José C. M. Mombach e com o colega Júlio M. Belmonte, resultando em várias apresentações de iniciação científica (Grieneisen e Belmonte, 2004). Nas seguintes discussões, nós nos limitaremos à discussão de apenas alguns resultados e principalmente a algumas linhas preliminares de pesquisa que achamos serem importantes seguirmos em futuros trabalhos. Desta maneira, expomos simulações que foram realizadas com a ajuda valiosa do grupo de Biologia Teórica da Universidade de Utrecht, mediada por Dr. Athanasius F. M. Marée, que tem colocado esforços criativos ao otimizar precisão de cálculos, tempo de simulação e qualidade de visualização gráfica. Além disto, através de discussões críticas, tem contribuído a formalizar com maior precisão as idéias deste e de futuros trabalhos.

A simulação das topologias emergentes de células biológicas utilizando o Modelo de Potts Celular se baseia no mesmo princípio que a Hipótese de Adesão Diferenciada: a que existe uma energia livre de adesão de superfície no sistema, que será minimizada.

Na simulação, consideramos os pesos de acoplamento entre os sítios, $J(\sigma_i, \sigma_j) > 0$ como sendo positivos. Assim a contribuição energética de contatos será desfavorável ao sistema. Vimos no capítulo 3 sobre espumas que isto gera instabilidades, onde domínios sem restrições quanto a tamanho desaparecerem para minimizar a energia total. Um termo que imponha um

vínculo sobre o tamanho das células impede este processo de *coarsening*. Também é possível empregar valores de acoplamento negativos - gerando também configurações de minimização na qual células vão buscar contatos que contribuem com valores em módulo maiores (mais negativos). Uma das diferenças imediatas principais desta abordagem (com J 's negativos), é que a quantidade de membrana (em 2D correspondente ao perímetro, ou a área em 3D) das células vai tender a se maximizar. Isto não ocorre em células biológicas.

É um efeito diferente do *coarsening*, e na simulação, exige não apenas um vínculo para o tamanho da células, mas também para a 'quantidade' (perímetro/área) de membrana utilizada. Por considerações biológicas, na qual o restabelecimento do volume se dá por processos osmóticos instantâneos, enquanto a produção de membrana não é uma mecanismo de relaxamento direto, consideramos muito mais natural controlar apenas os parâmetros da célula através de um vínculo sobre o tamanho, permitindo a sua forma livremente se estabelecer como consequência natural da minimização das energias de superfície. Por isto, a escolha dos J 's positivos.

4.6.1. Simulações de segregação

Tratamos o problema de reagrupamento celular pelo Modelo de Potts Celular em 2D, que foi primeiramente realizados por Glazier e Graner (1993). Basicamente, estamos interessados em observar a evolução das configurações de um agregado composto por dois tipos de células, levando também em consideração a interação com o meio. Em todas as figuras durante esta dissertação referente a reagrupamento celular, células amarelas (mais claras) são definidas como endodérmicas (por abreviação 'endo') e as células verdes, ectodérmicas ('ecto'). A situação na qual as células amarelas estão engolfando as células verdes, é conhecida como envoltura completa. Se isto não acontece, mas existe alguma forma de segregação, referimo-nos a segregação incompleta. Quando o inverso ocorre, células 'verdes' cercando 'amarelas', ocorre a segregação inversa.

A inspiração e aspectos gerais do Modelo de Potts celular estão descrito na seção 2.1.3 na página 23. Resumimos e adicionamos alguns detalhes mais técnicos aqui.

Modelamos uma coleção de células biológicas sobre uma matriz bidimensional na qual cada ponto do sítio (i, j) é representado por uma variável de spin $\sigma_{i,j}$. Regiões topologicamente conexas (vizinhos adjacentes) com o mesmo $\sigma_{i,j}$ representam uma célula individual. As interações entre células são estipuladas por constantes de acoplamento, $J_{\sigma_{i,j}, \sigma_{i',j'}}$. Uma vez que supomos que as forças de adesão apenas dependem do tipo de células, simplificamos o modelo ao utilizando energias de superfície dependentes apenas do tipo, $\tau(\sigma_{i,j})$. Além destas energias controlamos o tamanho das células pelo termo adicional elástico. Desta forma, o Hamiltoniano se torna,

$$\mathcal{H} = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{i,j}), \tau(\sigma_{i',j'})} (1 - \delta_{\sigma_{i,j}, \sigma_{i',j'}}) + \sum_{\sigma} \lambda (a_{\sigma} - A_{\tau(\sigma)})^2.$$

(4.6.1)

O termo do delta de Kronecker simplesmente assegura que acoplamentos entre *spins* iguais não contribuem para a energia do sistema - pois dentro de uma célula a energia devido à superfície é nula¹⁹. O termo de energia de tamanho é composto pelo multiplicador de Lagrange, λ , e da área ‘alvo’, $A_{\tau(\sigma)}$, parâmetro que fixamos para cada tipo de célula e que pretende modelar o fato do tamanho de cada célula ser regulado por outros fatores, tais como genéticos, por exemplo.

Para efetuar simulações dos processos guiados pelo Hamiltoniano da equação 4.6.1, usamos o algoritmo de Metropolis. Isto é, selecionamos aleatoriamente um sítio (i, j) , em seguida um dos vizinhos deste, (i', j') . Caso estes sítios, (i, j) e (i', j') , se encontram na mesma célula, automaticamente escolhemos outros sítios. Quando escolhemos finalmente dois sítios que se encontram em células adjacentes, calculamos qual seria a contribuição energética se houvesse *spin flip*, ou seja, copiando $\sigma_{i,j}$ para o sítio (i', j') , de forma que a célula representada por $\sigma_{i,j}$ ‘cresce’ por uma unidade de área (um sítio) enquanto a célula $\sigma_{i',j'}$ diminui por um. Caso esta troca favoreça a energia total da configuração, resultando em um $\Delta\mathcal{H}$ negativo, a troca é aceita. No caso em que há um aumento positivo na energia, a modificação será aceita através de uma probabilidade dada por

$$(4.6.2) \quad p(\sigma_{i,j} \rightarrow \sigma_{i',j'}) = \begin{cases} = 1 & \text{if } \Delta H \leq 0 \\ = e^{-\frac{\Delta H}{kT}} & \text{if } \Delta H \geq 0 \end{cases}.$$

As seguintes simulações foram feitas numa matriz de 400 por 400 píxeis (sítios), sendo que um passo de Monte Carlo (MCS) é definido como o número de vezes que escolhemos aleatoriamente um par de vizinhos para a possível troca. Um passo é estipulado como um número de sorteios, igual ao tamanho da rede, L^2 . Mantivemos apenas interação de um spin com os primeiros e segundos vizinhos, num total de 8 vizinhos.

4.6.1.1. Detalhes das simulações

O objetivo das próximas simulações é apresentar os fenômenos básicos dos processos de reorganização celular. Mais especificamente, queremos quantificar certas propriedades da dinâmica do reagrupamento (como as células percolam e qual é a maneira que se chega a uma topologia final). Num primeiro momento abordamos a importância das tensões de superfície em

¹⁹Mas é importante notar que células diferentes do mesmo *tipo* interagem!

predizer as configurações estáveis finais. Porém, como a dinâmica da evolução depende da paisagem energética, temos por intenção entender melhor estes processos ao observar simulações de valores de energias de acoplamento diferentes que, no entanto, mantêm as mesmas tensões de superfície e interfacial.

Comparações destas evoluções são importantes já que comparamos situações que possuem exatamente a mesma configuração de maior estabilidade, mas, como a paisagem energética é outra, a dinâmica pode variar consideravelmente. Estas conseqüências podem ser tais, que não será sempre possível obter o mínimo local.

A primeira conclusão que podemos verificar por simulações, é que não é necessário que as células endodérmicas (verdes) sejam mais coesas para haver um reagrupamento do tipo engolfamento, com elas no centro. Na figura 4.6.1 na página seguinte mostramos alguns momentos na dinâmica de 4 simulações de células de energias de acoplamento diferentes, todos correspondendo a situação com $\lambda = 1$ e com tensões superficiais dadas por

$$\gamma_{endo} = 5.5; \gamma_{ecto} = 3.5; \gamma_{ecto,endo} = 1.$$

Esta escolha de parâmetros satisfaz o requerimento de reagrupamento total, no qual o tecido ectodérmico circunda o endodérmico,

isto é, $\gamma_{endo} > \gamma_{ecto} + \gamma_{ecto,endo}$. Ao mudar as energias de superfície homotípicas, percebemos claramente que a cinética deste processo se modifica. Para energias mais altas a reorganização se torna mais “lenta”, pois parece não haver tanta percolação (comparar último tempo, 200×10^2 MCS, do caso $J_{ecto,ecto} = 2, J_{endo,endo} = 2$ com o caso das energias, também iguais entre si, mas de valores, $J_{endo,endo} = 12, J_{ecto,ecto} = 12$).

4.6.1.2. Análises das configurações

Apesar de podermos seguir a evolução das configurações celulares visualmente, para melhor compreender como a topologia está evoluindo algumas medidas foram registradas periodicamente na simulação. Descrevemo-las abaixo.

Interface entre tecidos (interface entre fases)

A fim de comparar a percolação dos domínios com teorias e modelos de fluidos imiscíveis, para os quais se conhecem as leis que governam o decaimento da área de contato, medimos a extensão total interfacial entre os tecidos.

Número de aglomerados

Temos acesso, pela estrutura do programa, ao número de aglomerados a cada tempo. Definimos como aglomerado as regiões topologicamente conexas que se estendem por células do mesmo tipo. São espécies de ilhas. Caso o reagrupamento celular for do tipo observado em hidra, este número vai diminuir logaritmicamente. Já uma topologia do tipo xadrez tenderá

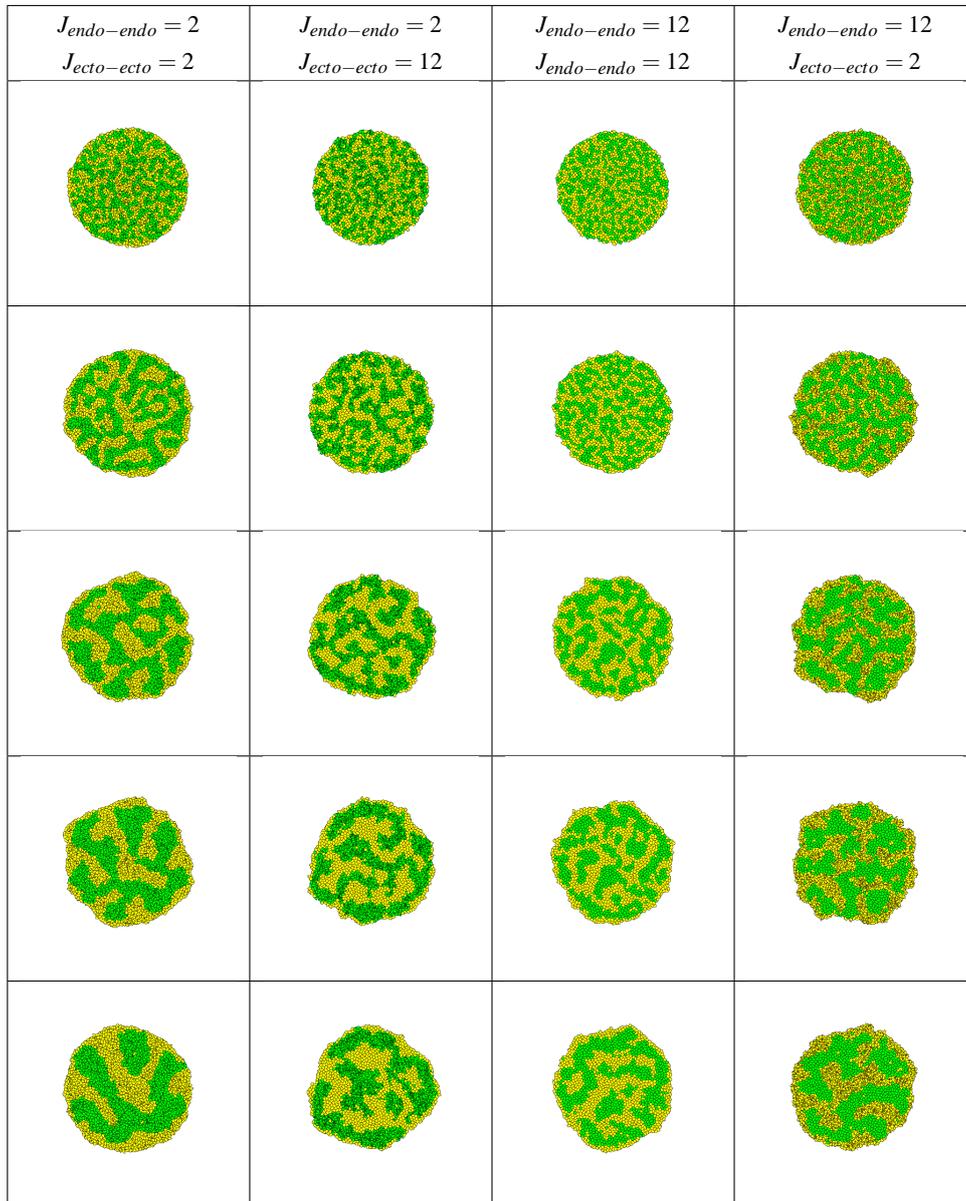


FIGURA 4.6.1. DINÂMICAS DE SEGREGAÇÃO CELULAR MANTENDO TENSÕES IGUAIS. Nas simulações acima, mantemos as tensões superficiais e a tensão interfacial (dadas pelas equações 4.3.6, 4.3.7 e 4.3.8) constantes enquanto variamos os valores de acoplamento entre as células ectodérmicas (amarelas) e as entre células endodérmicas (verdes). As interações heterotípicas e o acoplamento das células com o meio são determinados em consequência disto. Na figura estão representadas de cima para baixo, as configurações para as escolhas dos parâmetros indicados, de cinco tempos diferentes: 10^2 MCS, 10×10^2 MCS, 50×10^2 MCS, 100×10^2 MCS, 200×10^2 MCS. A temperatura usada é 6.

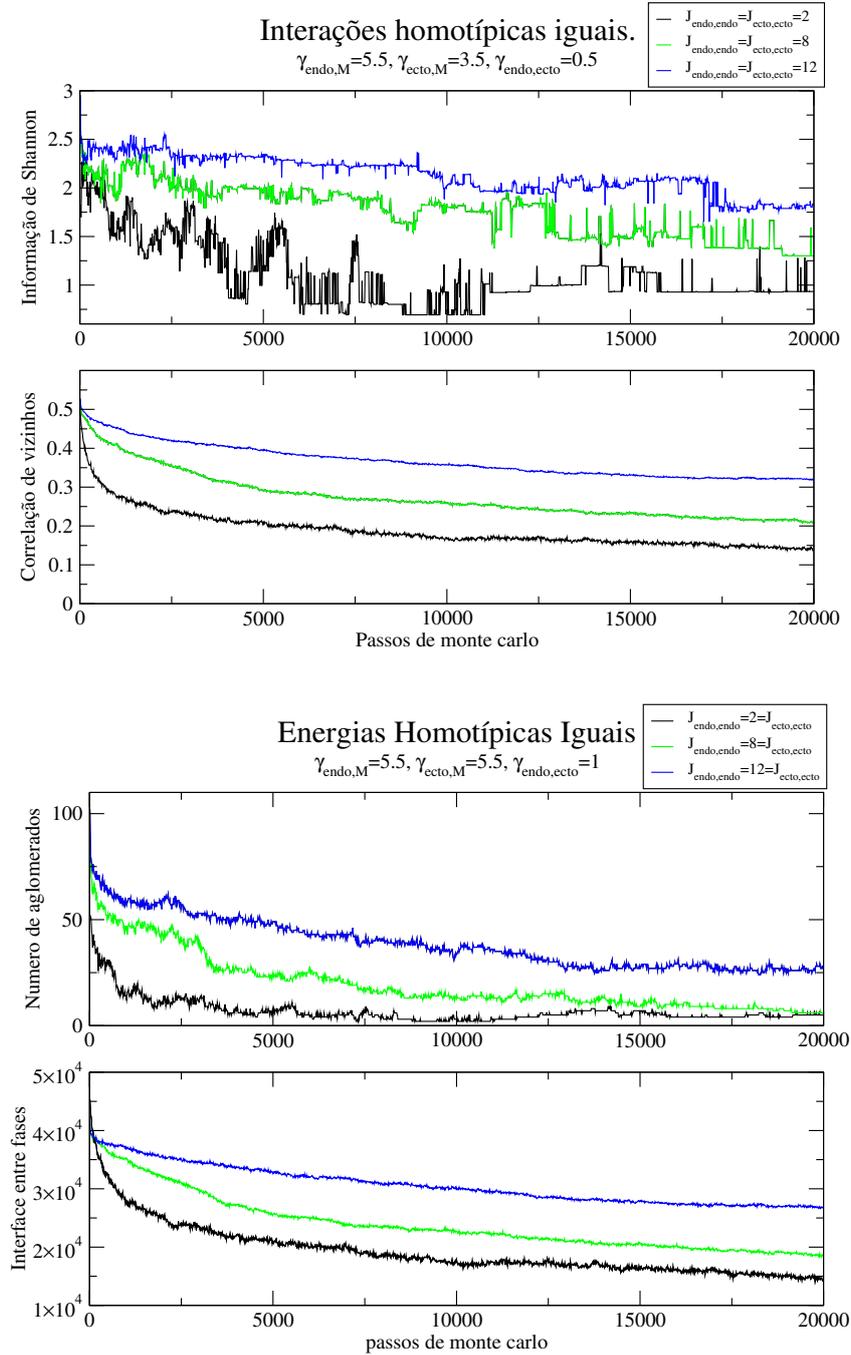


FIGURA 4.6.2. DINÂMICAS DE SEGREGAÇÃO CELULAR. Todos os gráficos se referem às mesmas três simulações, cujas tensões superficiais são as mesmas. Variamos os valores de acoplamento de modo a manter sempre energias homotípicas iguais (isto é, energias entre células endoteliais são iguais às energias entre células ectoteliais). O primeiro gráfico mostra a informação de Shannon variando com o tempo, seguido do gráfico da evolução da correlação entre primeiros vizinhos. Mais abaixo, o terceiro gráfico mostra o decaimento do número de aglomerados dentro do agregado e por final, a diminuição do contato interfacial entre os tecidos. O tempo está mostrado em passos de Monte Carlo.

a aumentar este valor. É muito interessante entender outras situações não tão bem definidas ao analisar como o número de aglomerados varia com o tempo.

Número de células por aglomerado

Não apenas é importante registrar o número total de aglomerados, como também a distribuição de células em cada aglomerado. Há dinâmicas que percolam iniciando-se com a formação de aglomerados pequenos, na qual células individuais se prendem em pequenos aglomerados de 3 – 4 células. Enquanto esta distribuição predomina durante o início do processo, existe um momento crítico no qual estes aglomerados maiores começam a se percolar. Por praticidade, representamos este valor por n_a .

Nesta dissertação não vamos mostrar histogramas destes valores, porém, estaremos utilizando estes valores (n_a) no cálculo da entropia.

Entropia / Informação de Shannon

O grau de ordem estabelecido nas estruturas pode ser estimado em termos da entropia de conformação, definido como

$$(4.6.3) \quad S = - \sum_i^A P_i \ln P_i.$$

Nesta equação A é o número total de aglomerados, de modo que estamos somando sobre o número de aglomerados, a probabilidade de um célula se encontrar no i -ésimo aglomerado é

$$(4.6.4) \quad P_i = \frac{n_a(i)}{n_{total}},$$

onde n_{total} corresponde ao número total de células e $n_a(i)$ corresponde ao número de células no i -ésimo aglomerado.

Na situação completamente ordenada, na qual existem apenas dois aglomerados, cada qual com, digamos, metade das células, este valor será $S = -\frac{1}{2}(\ln \frac{1}{2}) - \frac{1}{2}(\ln \frac{1}{2}) = \ln 2$.

Função de correlação de vizinhos

Para averiguar o grau de ordenamento, calculamos a função de correlação ξ_i de primeiros vizinhos. Como os outros observáveis descritos acima tendem a decrescer com o aumento de segregação celular, definimos esta correlação entre células vizinhas como a soma total de vizinhos de tipo *diferente*, dividido pelo número total de vizinhos que uma célula possui. Ou seja, a média por célula é

$$(4.6.5) \quad \xi_i = \frac{\text{\#células vizinhas de tipo diferente}}{\text{\#total de células vizinhas}},$$

onde o número de correlação de uma célula dentro do agregado geralmente varia de maneira que o total de vizinhos esteja entre 3-8. Quando a célula estiver dentro de uma massa de tecido homogêneo do seu tipo, ela vai apresentar $\xi = 0$. Interessamos saber a média destas correlações encima de todo o sistema, portanto, vamos calcular

$$(4.6.6) \quad \Xi_{ecto} = \frac{1}{N_{ecto}} \sum_{i=ecto} \xi_i,$$

$$(4.6.7) \quad \Xi_{endo} = \frac{1}{N_{endo}} \sum_{i=endo} \xi_i.$$

Em muitas das simulações, optamos apenas por mostrar os valores $\Xi_{total} = \Xi_{ecto} + \Xi_{endo}$.

Mesmo obtendo segregação perfeita com envoltura total (células ectodérmicas completamente envolvendo as endodérmicas), as células que constituem a interface dos tecidos não possuem ξ 's nulos, portanto os valores de Ξ_{ecto} e Ξ_{endo} vão tender a um valor pequeno, porém não nulo que corresponde ao ótimo de uma interface esférica. Observamos também, que devido a geometria do problema e dos tamanhos relativos entre os tipos de célula, os valores mínimos de Ξ_{ecto} e Ξ_{endo} não serão necessariamente iguais.

Para uma primeira interpretação de uma situação de reagrupamento celular através das definições acima, analisaremos um caso de segregação celular acompanhado por envoltura. Vamos analisar as configurações correspondentes às tensões superficiais da topologias vistas na figura 4.6.1 na página 89, analisando apenas os casos de valores de acoplamento $J_{ecto-ecto} = J_{endo-endo}$ para os valores $J_{endo-endo,ecto-ecto} = 2, 8, 12$. Na figura 4.6.2 na página 90 estão os gráficos que mostram a evolução para as diferentes escolhas de energias. A segregação pode ser observado pela correlação de vizinhos, cujas curvas decaem, representando que cada vez mais células se cercam com vizinhos iguais (segundo gráfico), de modo que o número de aglomerados dentro do agregado também decai com o tempo (terceiro gráfico). A informação de Shannon não é uma curva suave, pois faz grandes saltos cada vez que aglomerados coalescem. Observamos a tendência da entropia diminuir (primeiro gráfico). A interface entre os tecidos diminui de forma logarítmica. Estes são os comportamentos gerais e esperados. Mais interessante é perceber o quão mais lento se torna a segregação perante energias de acoplamento altas, na qual a exploração ergódica não parece ir tão livremente. No decaimento das interfaces, na correlação de vizinhos e na redução do número de aglomerados observa-se quase uma tendência de saturação acima da configuração de equilíbrio para o caso $J_{ecto-ecto} = J_{endo-endo} = 12$.

4.6.1.3. Outros exemplos de reagrupamento

Tensões interfaciais de tecido negativas

Além da situação na qual um tecido envolve totalmente outro, há relações de tensões que irão resultar em topologias bem distintas. Vamos reproduzir algumas destas configurações ao escolher as relações apropriadas de tensões.

Na figura 4.6.3 na próxima página temos um exemplo de topologia xadrez. Para simular estas situações, escolhemos casos em que a tensão interfacial entre os tipos de células é negativa:

$$\gamma_{endo} = 5.5; \gamma_{ecto} = 3.5; \gamma_{ecto,endo} = -1.$$

Para satisfazer os valores de γ dados acima, e mantendo a “convenção biológica” que a coesão de células endodérmicas é maior que para ectodérmicas, nos valores $J_{ecto,ecto} = 3$, $J_{endo,endo} = 5$, temos por consequência que $J_{endo,meio} = 8$, $J_{ecto,meio} = 5$. Mantemos os outros parâmetros nos valores $T = 6$ (temperatura) e $\lambda = 1$ (elasticidade). A fração entre tecidos é 1 : 1.

O que se observa é, logo nos primeiros passos de Monte Carlo, uma intercalação imediata das células de diversos tipos. Num processo um pouco mais lento, há o estabelecimento de uma camada predominantemente ectodérmica da borda do agregado. Ou seja, mesmo obtendo uma configuração do tipo envoltura completa, a topologia interna é uma de mistura. Isto é esperado, já que esta escolha de parâmetros (para as tensões superficiais), obedece a forma de envoltura total, dada pela equação 4.4.3 na página 75.

Apesar de continuamente as células se difundirem entre as outras, as distribuições não parecem se alterar visualmente. Não é possível mais ver diferenças na topologia das configurações resultantes após 100 passos Monte Carlo.

A dinâmica correspondente à topologia xadrez da figura 4.6.3 está representada nos gráficos da figura 4.6.4 na página 95. O comportamento indicado pelas curvas indica que ocorreu uma dinâmica muito diferente daquela que acabamos de tratar, a de segregação com envoltura. Aqui, o número de aglomerados ao invés de decair, aumenta levemente o número da situação aleatório inicial, refletindo a necessidade das células de aumentarem os contatos heterotípicas. Esta propriedade também fica evidente pela correlação de vizinhos, curva que indica que após aproximadamente 500 passos de Monte Carlo a configuração que visa maximizar vizinhos diferentes já foi alcançada, pois este se mantém constante. A interface entre fases (tecidos), novamente confirma esta mistura rápida, na qual um perímetro grande é mantido entre os tipos. Enquanto isto, a informação de Shannon se estabiliza com em torno de 2.

Uma característica talvez peculiar é que, apesar destas tensões estarem favorecendo a formação de vizinhos diferentes (de um tipo diferente que a própria célula), o valor para qual a correlação de vizinhos tende não é 1, é um valor menor que isto, ≈ 0.6 . Isto resulta é claro de contatos homotípicas

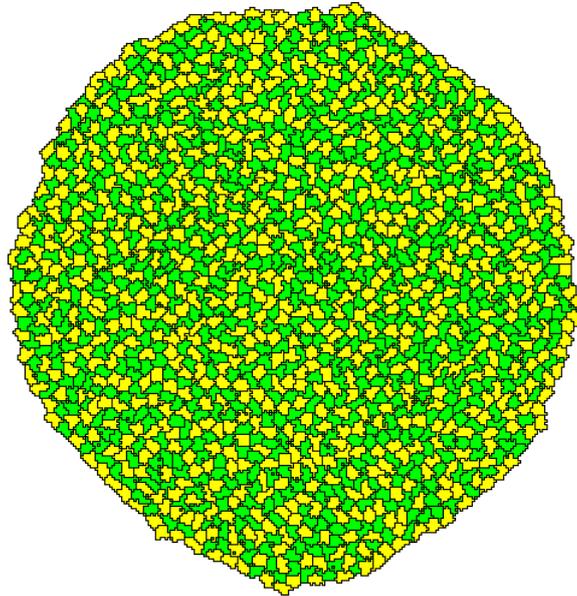


FIGURA 4.6.3. TOPOLOGIA XADREZ. Parâmetros decisivos para esta configuração é a da tensão negativa entre interfaces heterotípicas. Mesmo assim, a tendência das células ectodérmicas a ficarem na superfície do agregado se mantém. Esta é uma imagem de uma topologia resultante após 200 passos Monte Carlo. No entanto, já nos primeiros momentos, topologias assim são estabelecidas - é um processo muito rápido.

inevitáveis, imperfeições devido à temperatura e efeitos de borda, ou melhor, ao fato que células ectodérmicas que envolvem o agregado contribui para baixar a correlação de vizinhos da situação 'ideal'.

Motivados em saber como estes efeitos de "interface" (distribuições não homogêneas quando célula ectodérmicas se concentram no perímetro) realmente dependem destas distribuições, repetimos as simulações de topologias xadrez, para os mesmos valores, porém agora modificando as concentrações relativas de endo/ecto. Escolhemos três concentrações: a) 10% de células endoteliais b) 40 % de células endoteliais e c) 60% de células endoteliais. Como o efeito depende fortemente do 'tipo' (endo/ecto) de célula, expomos as correlações de vizinhos específicas para a população endodérmica e para a população ectodérmica (Ξ_{ecto} e Ξ_{endo}).

Como esperado, no caso onde as células endoteliais existem apenas na fração 0.1, elas atingem praticamente uma correlação de vizinho $\Xi_{endo} \approx 1$, enquanto as células ecto se encontram desfavorecidos a estabelecer vizinhos diferentes. Outra observação menos óbvia, é que as correlações de vizinhos endo e ecto não obedecem uma simetria: quando a fração de células endoteliais é 0.4, $\Xi_{endo} \approx 0.7$, já se esta fração for de células ectodérmicas, a correlação é de apenas $\Xi_{ecto} \approx 0.5$. Esta assimetria é conseqüência da envoltura total característica nestas configurações xadrez.

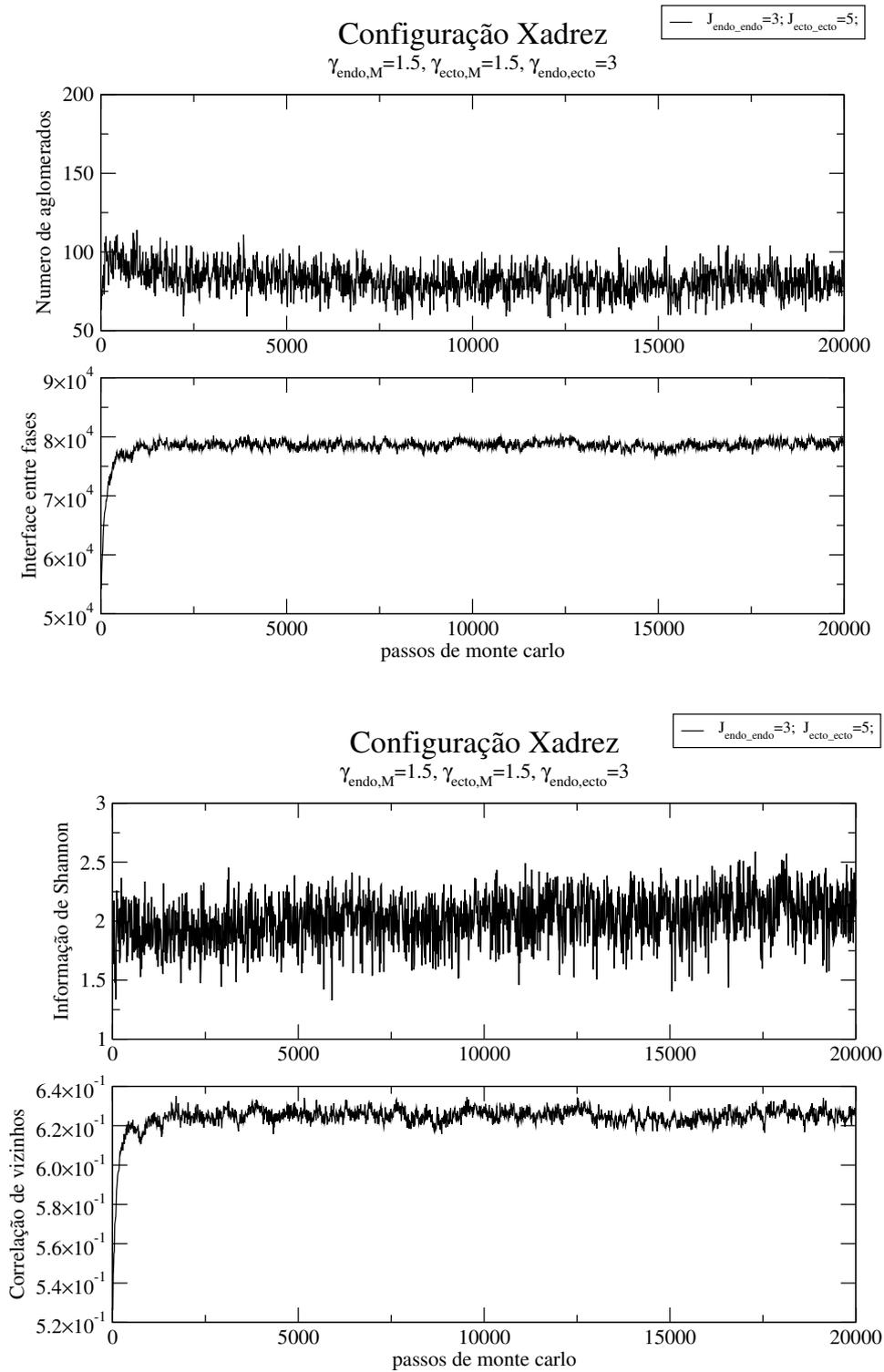


FIGURA 4.6.4. ANÁLISE DE UMA PROGRESSÃO XADREZ. Curvas que vão auxiliar em entender a dinâmica de organização de uma topologia xadrez na qual existe envoltura.

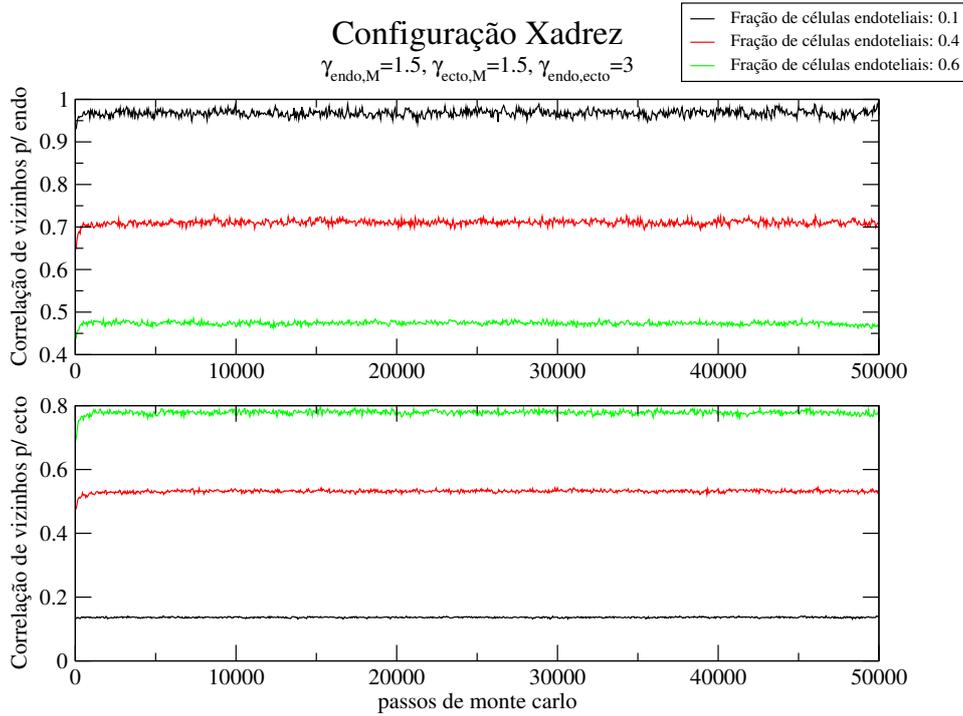


FIGURA 4.6.5. DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EPITÉLIOS.

Apesar que as análises que fizemos nesta seção são bastante elementares, existem outras situações mais delicadas, na qual tais métodos podem de fato ser muito elucidativos. Todo um estudo a respeito de dependências de tamanho celular, concentrações, energias e temperatura na dinâmica de reagrupamento celular pode ser feito.

Formação de agregados segregados

Uma tensão interfacial $\gamma_{endo,ecto}$ maior que as tensões superficiais, γ_{endo} e γ_{ecto} gera a separação dos tecidos. Na seguinte simulação mostramos um exemplo disto. Por causa das tensões superficiais positivas, as massas celulares tendem a formar aglomerados homogêneos, como também minimizar contatos com células de diferentes tipos. Escolhemos como parâmetros

$$\gamma_{endo} = 1.5, \gamma_{ecto} = 1.5, \gamma_{ecto,endo} = 3,$$

também definimos as energias de acoplamento coesivas sendo $J_{ecto,ecto} = 5$, $J_{endo,endo} = 3$. Isto vai resultar nas energias de superfície com o meio de $J_{ecto,meio} = 4$, $J_{endo,meio} = 3$ e na energia interfacial dos tecidos, $J_{endo,ecto} = 6.5$. Novamente, mantemos os outros parâmetros, $T = 6$ e $\lambda = 1$. A fração entre tecidos é de 1 : 1.

Na figura 4.6.6 mostramos a situação de separação de tecidos que ocorreu após 20000 MCS. Nos primeiros passos de simulação, a percolação interna dos tecidos começa a provocar a separação delas perto do perímetro

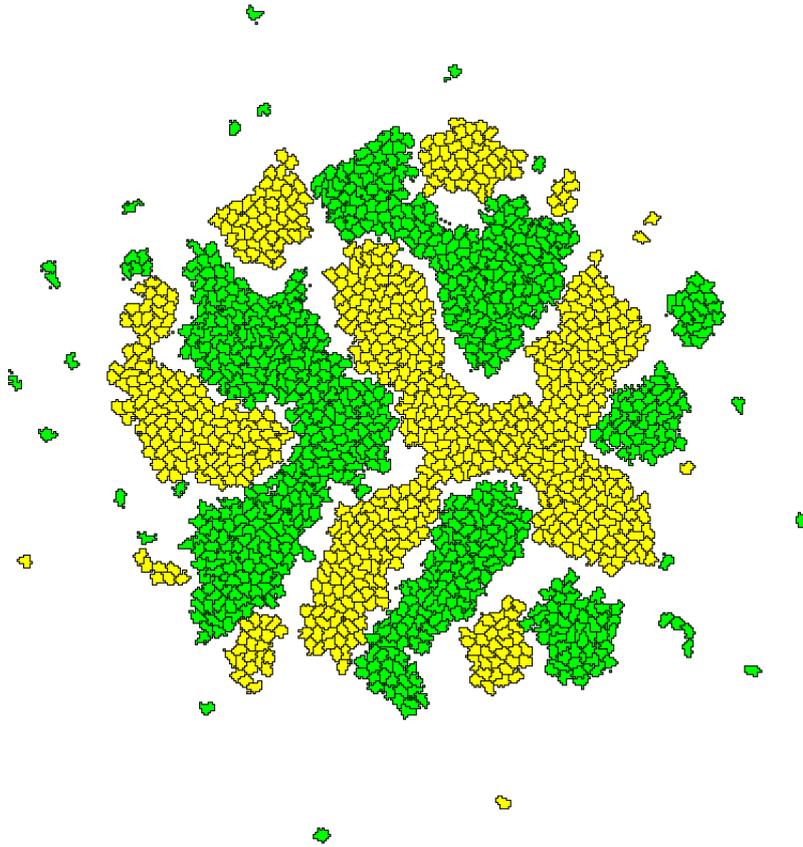


FIGURA 4.6.6. TECIDO EM AGLOMERADOS DISTINTOS. Há uma forte separação dos tecidos, que é estabelecido após suficiente grau de segregação interna das células.

(isto é, o meio começa a penetrar por dentro as interfaces heterotípicas). Estes aglomerados independentes também conseguem se juntar, formando domínios cada vez maiores.

Condição de Young em tecidos

Outra configuração final estável que pode ser gerada, é uma na qual os tecidos se segregam formando pontos trípticos com o meio. Estas configurações são alcançadas para tensões que obedecem, por exemplo, a forma

$$(4.6.8) \quad \gamma_{endo} < \gamma_{ecto} + \gamma_{ecto,endo},$$

mas na qual

$$(4.6.9) \quad \gamma_{endo} > \gamma_{ecto}, \quad \gamma_{endo} > \gamma_{ecto}.$$

Na verdade, isto significa que nenhuma das tensões pode ser maior que a soma das outras duas. Isto pode ser facilmente entendido se imaginarmos as tensões superficiais como vetores ao longo das interfaces cujas somas

vetoriais em equilíbrio igualem a zero. Esta imposição determina os ângulos de contato entre os dois tecidos e o meio, de modo que o ponto tríplice é o ponto onde ocorre a junção destas fases (tecido endotelial, ectotelial e meio). Caso uma das tensões é maior que a soma das outras duas, não existe mais ângulo que equilibre estes vetores, de modo que o desequilíbrio de forças gerado move as fronteiras até haver um efeito de envoltura (casos já analisados).

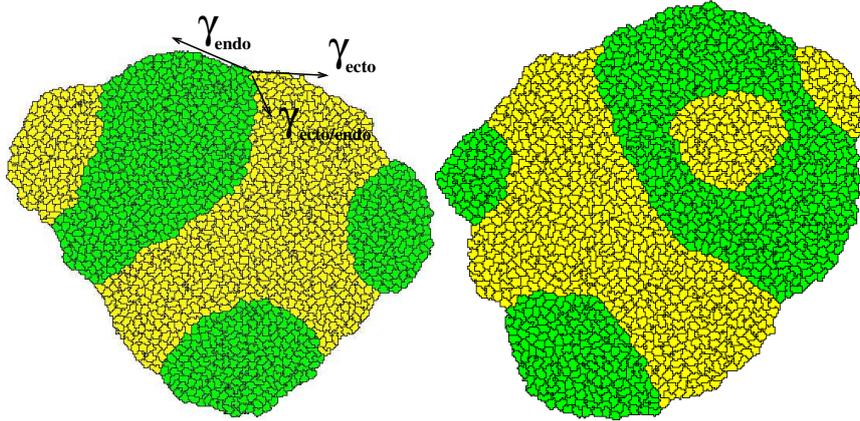


FIGURA 4.6.7. PONTOS TRÍPLICES. As figuras acima representam o estado obtido após 200000 MCS a partir de duas condições iniciais aleatórias diferentes. Em ambos os casos, as tensões de interfaciais foram: $\gamma_{ecto} = 4.5$, $\gamma_{endo} = 3.5$ e $\gamma_{ecto,endo} = 3$. As energias de acoplamento utilizadas foram, $J_{endo-endo} = 3$, $J_{ecto-ecto} = 3$.

A partir de configurações aleatórias de células endodérmicas e ectodérmicas misturadas, vemos que utilizando tensões superficiais que satisfazem as condições acima, dadas pelas equações 4.6.8 e 4.6.9, vamos obter configurações finais semelhantes porém de topologias diferentes. A semelhança reside na formação de capas esféricas de tecidos em contato com um ao outro e com o meio, sendo que os ângulos estabelecidos entre estas fases se mantêm relativamente constantes. As diferenças nas configurações finais são frutos da alta metaestabilidade existente na evolução, pois os agregados não dificilmente conseguem chegar a uma segregação total (duas massas homogêneas em contato).

Expomos um exemplo disto na figura 4.6.7. Nela mostramos a configuração final (após 200000 MCS) de duas simulações iguais inicializando as condições iniciais aleatórias de maneira diferente. Percebe-se nitidamente a formação das capas esféricas. As tensões superficiais e acoplamentos utilizadas foram:

$$\begin{array}{l} \text{tensões superficiais:} \\ \text{acoplamentos:} \end{array} \quad \begin{array}{l} \gamma_{ecto} = 4.5 \\ J_{endo-endo} = 3 \end{array} \quad \begin{array}{l} \gamma_{endo} = 3.5 \\ J_{ecto-ecto} = 3 \end{array} \quad \begin{array}{l} \gamma_{ecto,endo} = 3 \\ J_{ecto-endo} = 3 \end{array} .$$

Outros parâmetros foram, temperatura $T = 6$ e tamanho das células de 30 sítios.

No primeiro exemplo da figura 4.6.7 na página precedente indicamos um dos pontos tríplices ao representar através de vetores o valor das tensões superficiais. O ângulo de contato entre os tecidos/meio definem a direção destes vetores. Notamos que, apesar da situação nem sempre ser uma de equilíbrio total (soma nula), existe definitivamente a tendência de equilibrar estas forças.

Finalizamos com este exemplo algumas das possíveis configurações que tecidos compostos por diferentes tipos de células podem estabelecer. A seguir, vamos focalizar não mais no estabelecimento da organização, mas sim em propriedades elásticas das células individuais e, conseqüentemente, propriedades mecânicas do agregado de células de hidra.

4.6.2. Simulações de “burst”: sugestão para pesquisas futuras

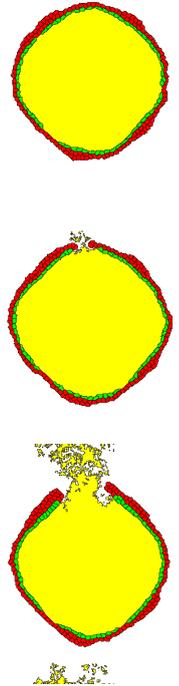
Nesta seção vamos explorar questões que serão abordados em investigações futuras, desenvolvendo já a metodologia que será utilizada. O modelo proposto e as perguntas levantadas complementam o estudo experimental em andamento.

Uma vez que há o estabelecimento completo dos tecidos segregados concêntricos na hidra, ocorre um bombeamento de líquido do meio para dentro do agregado tanto devido a diferenças osmóticas como por processos ativos. Uma cavidade se forma. Esta cavidade aumenta paulatinamente, exercendo uma pressão nas camadas das paredes do agregado. Finalmente, da massa inicial de células (que podemos controlar tanto em simulações quanto em experiências) uma dupla-camada de células se forma, isto é, dois epitélios de 1 célula de espessura, de modo que o aumento contínuo da cavidade altera o formato das células. Este processo continua até haver o rompimento do epitélio, sendo o líquido interno expelido. Eis o *burst*, que já descrevemos na seção 4.5.2 na página 84.

A cinética do processo de *burst* fornece informações muito úteis, especialmente sob o ponto de vista de simulações. Os tempos envolvidos até a ocorrência do *burst* irá refletir características sobre a elasticidade individual das células, e é o que definimos por *tempo de burst*. A intensidade de coesão entre as células será determinante, quanto também a coesão entre os tecidos. A simulação deste processo irá nos oferecer dados sobre o impacto do multiplicador de Lagrange λ relacionado ao vínculo de tamanho das células.

4.6.2.1. Resultados preliminares

A fim de entender como a razão entre as áreas das células ecto/endo influencia nestas dinâmicas, fixamos um grupo de valores referentes às energias de acoplamento, varrendo apenas as áreas alvo. É nosso intuito maior, ver como esta dependência das razões de áreas com o tempo de burst se



burst na simulação

modifica com diferentes escolhas de λ . Deste modo, foi implementado no programa três formas diferentes de calcular o Hamiltoniano.

4.6.2.2. Detalhes da simulação

A primeira forma de implementação do Modelo Celular de Potts considerada será simplesmente o método tradicional, na qual λ é uma constante. Outra maneira é escalar λ com a área alvo (*target* área) correspondente ao tipo da célula. Referimo-nos a este parâmetro modificado de λ_T . Quando as áreas alvos das células endo/ecto forem mantidas iguais, esta modificação se reduz novamente ao caso clássico. Finalmente definimos λ_V como a constante que depende do volume (área) real que a célula apresenta.

Nas diversas simulações, mantemos constante para todas as seguintes combinações de razões de área endo/ecto, o volume total de cada tecido. Como partiremos já de uma situação de total segregação, controlamos o número inicial de células de cada tipo pelo raio que define a cavidade (e início da camada de células endodérmicas), raio que marca a parede que limita o disco endodérmico com a camada ectodérmica, e finalmente, o raio total do agregado. Mantemos estes parâmetros iguais para todas as configurações iniciais, de modo que, ao se variar o tamanho das células, digamos diminuindo as, obteremos diferentes quantidades de células, no caso, mais células.

O aumento da cavidade é mantido como um processo lento durante a simulação para permitir que elas se ajustem a nova situação, num processo de quase equilíbrio.

Nas seguintes simulações utilizamos os valores de acoplamento:

$J_{w,c} = 0$; acoplamento entre o meio externo e o meio interno da cavidade; supomos por esta condição que eles são ‘iguais’.

$J_{w,endo} = 13$; interação do meio com as células internas.

$J_{w,ecto} = 7$; interação do meio com as células ectodérmicas, as externas.

$J_{c,endo} = 7$; interação do meio da cavidade com as células endodérmicas.

$J_{endo,endo} = 3$; coesão entre células endodérmicas.

$J_{ecto,ecto} = 5$; coesão entre células ectodérmicas.

$J_{endo,ecto} = 7$; coesão entre células ectodérmicas.

Alguns resultados preliminares estão representados na figura 4.6.8. Nela vemos que, não apenas a razão entre as áreas das células irá determinar o tempo de burst, quanto também a forma que utilizamos para calcular o Hamiltoniano 4.6.1 na página 87 devido os diferentes tipos de constantes de elasticidade (λ , λ_V , λ_T).

4.7. Sugestões para Pesquisas Futuras

Verificamos com a união de observações experimentais com simulações, apoiados também em dados da literatura, que o modelo de fluidos

			
1a) 20MCS	2a) 20MCS	3a)20MCS	4a) 20MCS
			
1b)100MCS	2b) 200MCS	3b) 100MCS	4b) 100MCS
			
1c)250MCS	2c) 250MCS	3c)250MCS	4c) 250MCS
			
1d) BURST: 272MCS	2d)400MCS	3d)300MCS	4d) 300MCS
			
	2e)500MCS	3e)BURST: 311MCS	4e) BURST: 322MCS
			
	2f)BURST: 539MCS		

FIGURA 4.6.8. BURSTS. Aqui mostramos algumas imagens da evolução de diferentes agregados. As primeiras duas colunas mostram a situação em que células foram simuladas com λ constante, na primeira coluna ambos tipos com área alvo de 20, e na segunda, $\lambda_{endo}:20$ $\lambda_{ecto}: 30$. Estas relações de área são repetidas nas duas seguintes colunas, desta vez porém, com λ_T .

explica de forma satisfatória as configurações de equilíbrio no processo de reagrupamento celular. Seguindo a discussão com espumas, surgem modificações enormes nas topologias devido às energias diferenciadas de adesão.

Há muitos pontos que ainda temos que explorar melhor. Por exemplo, reagrupamentos parciais ocorrem quando atingimos uma razão crítica nas proporções iniciais de células - mais do tipo ecto que de endo poderá resultar na formação de ilhas de ecto na massa maior endo (Sulsky *et al.*, 1984; Steinberg, 1975). Steinberg (1975) enfatiza a observação que se células não estiveram na proporção correta, o estado final dependerá significativamente da razão tamanho/volume e da configuração inicial. Isto aparentemente contradiz a suposição que as células exploram ergodicamente a paisagem energética. Estes aspectos podem ser explorados com o modelo de simulações aqui proposto.

CAPÍTULO 5

Topologia III: Câncer

Introduzindo um novo fator que influenciará as topologias: mitose.

5.1. Introdução

Temos por objetivo estudar os padrões e conformações resultantes da proliferação de células. Chegamos ao ponto em que podemos unir as considerações a respeito da geometria das células e de suas propriedades adesivas com um elemento de extrema importância que é sua proliferação. Visto que o crescimento, diferenciação, enfim, todo comportamento celular é orquestrado para manter a organização de um organismo maior, pluricelular, torna-se extremamente importante estudarmos casos anômalos da proliferação celular para verificar quais são os elementos que de fato estabelecem as configurações conhecidas do tecido. E é justamente em células cancerosas onde ocorre a perda desta organização, pois há falhas no mecanismo regulatório celular. Embora suas causas possam eventualmente ser sempre identificadas ao nível molecular, há efeitos e hipóteses a nível celular e de interações intercelulares que só podem ser verificadas por modelos matemáticos, devido à complexidade do problema (enorme número de parâmetros). Simulações devem ser vistas como uma ferramenta para o estudo do fenômeno de crescimento celular e, conseqüentemente, do câncer.

Estudos com células de câncer ajudam a revelar o funcionamento dos mecanismos que regulam o comportamento normal de células. Foi através das anormalidades apresentadas pela proliferação desenfreada de células de câncer que muitas das proteínas fundamentais nos processos de apoptose, sinalização celular e ciclo mitótico foram identificadas (Cooper, 2000).

Ou seja, o estudo da neoplasia é antes de mais nada o estudo de como funciona a célula normal, da mesma maneira como o estudo do comportamento de uma célula saudável esclarece as causas do câncer.

Começamos a abordagem destes problemas pelas propriedades biológicas apresentadas pelas células envolvidas com dinâmica populacional. Os mecanismos pelos quais as células modificam a sua geometria, as formas de interação entre elas e a sua dinâmica de divisão serão rapidamente esboçados nas próximas subseções, a fim de nos induzir às melhores críticas em relação às simulações futuras.

5.1.1. Adesões focais

Na discussão que prossegue, sobre o destino da célula ser mediada por sua geometria, defrontamo-nos com a questão de como é possível a célula manter uma topologia estruturada. A resposta se encontra quase por completo nos pontos de adesão, que são estruturas especializadas do citoesqueleto. Para formar estes contatos, a célula precisa de certas proteínas em seu meio ambiente, por isto a importância de haver uma matriz extracelular (ECM).

A matriz extracelular, além de preencher os espaços entre tecidos, é o substrato sobre qual as células irão se estender e mover. Ela consiste de proteínas secretadas e de polisacarídeos. Os tipos exatos de proteínas e a concentração destes componentes determinarão o tipo de ECM. Por exemplo, quando focalizamos nossa atenção (Ingber, 1997) nas linhagens epiteliais, estaremos descrevendo apenas o ECM que forma a lâmina basal, ou seja, a fina membrana basal na qual as camadas de células epiteliais crescem.

Basicamente, toda ECM possui proteínas fibrosas submersas numa substância em estado gel (composta por polisacarídeos), contendo também proteínas de adesão que interligam os diversos componentes da matriz, dando-lhe uma estrutura de rede, assim como fornecendo pontes de contato entre as estruturas da matriz à própria célula. Os GAGs¹ formam o gel, e em associação a proteínas proporcionam estrutura à ECM. No entanto, o principal componente que fornece suporte são os colágenos, dos quais conhecem-se 19 membros. O colágeno é formado por três correntes polipeptídicas em forma de hélice que são secretadas pela célula. No meio extracelular organizam-se em fibras, e estes podem ainda se associar através de pontes estabelecidas por proteínas de adesão, formando verdadeiras redes. Ou seja, já mencionamos a terceira classe compositora da ECM - que será o único que pretendemos modelar de forma indireta e portanto o cerne desta elocução - as proteínas de adesão. Elas não apenas juntam os componentes da matriz, como também possuem sítios de reconhecimento para a célula e para os proteoglicanos. Nesta categoria se encontra a fibronectina, e, em laminais basais mais especificamente, a laminina (Alberts *et al.*, 1983).

Existem na superfície da célula, receptores chamados de integrinas que reconhecem certas seqüências em colágenos, fibronectina e laminina. Integrinas são compostas por duas subunidades transmembrânicas, α e β . Além de aderir à matriz através destes sítios, elas formam nestas pontos ancoramentos na qual o citoesqueleto pode se fixar. Desta maneira há uma estabilização de junções célula-matriz. Estas conexões entre integrinas e o citoesqueleto podem ocorrer sob duas formas:

- adesões focais,
- hemi-desmosomos (integrina $\alpha_6\beta_4$).

Assim, movimento, forma e polaridade são variações sobre o mesmo tema: cooperação entre as proteínas da ECM, integrinas e proteínas constituintes

¹*glycoaminoglycans* - glicoaminoglicanos

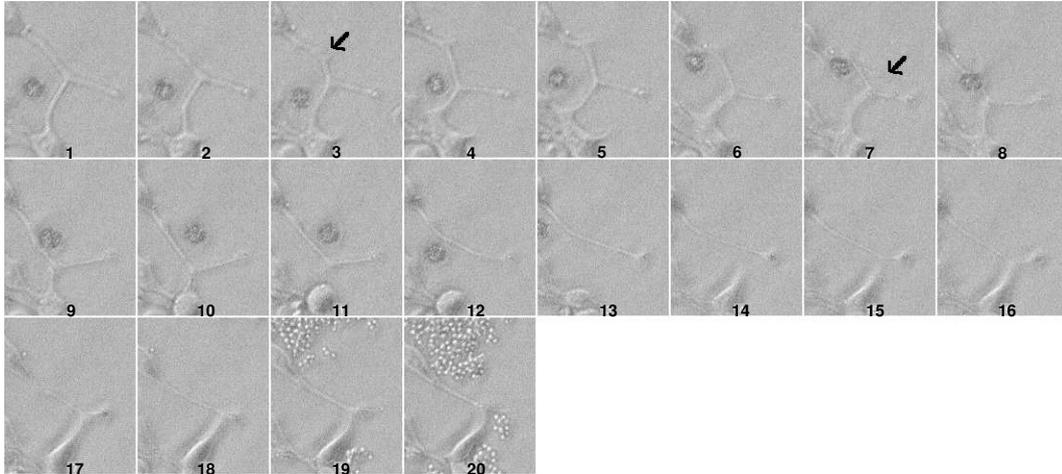


FIGURA 5.1.1. TNTS SEGURADOS EM PONTOS DISCRETOS. A figura mostra longas protrusões membrânicas de duas células se tocando. Tais extensões da membrana são chamadas de *tunneling nanotubes* (TNT). Percebe-se como estas extensões também se encontram fixas em alguns pontos discretos, que correspondem a adesões focais. Por exemplo, no quadro 3 é possível observar uma das estruturas tubulares formando um ângulo no ponto focal indicado com a seta. No quadro 7 temos o desaparecimento deste ponto, a partir do qual vemos como conseqüência a célula inferior, ao se preparar para citocinese, contrair-se e arrastar consigo o TNT da célula superior. Este é um belo exemplo de interações de longo alcance entre células, pois estas extensões de espessura nanométrica, podem alcançar comprimentos equivalentes a vários diâmetros celulares. A formação destas estruturas, e o efeito de interações de longo alcance, são relevantes a baixas densidades e desaparecem antes de chegar numa confluência total.

do citoesqueleto. Os pontos de adesão focal, um exemplo destas interações, representam a conexão entre dois mundos, uma junção mecânica direta entre o meio externo e o interior da célula. Por isto nossa ênfase nas integrinas, pois é nossa opinião que elas influenciam muitos níveis de comportamento da célula e, de modo crucial, a proliferação e formação de configurações, motivo de nosso estudo.

5.1.2. Ciclo celular: mitose e interfase

Vários dos modelos matemáticos que descrevem a proliferação celular se baseiam em princípios do ciclo celular, e por isto se torna necessário

entender as diversas fases da evolução apresentada pela célula para claramente entender quais são as aproximações e premissas que estão sendo utilizadas (Webb, 1986). Também, ao modelar a atividade da célula por meio de simulações de Modelo de Potts Celular, estaremos recorrendo a certas propriedades empíricas.

De modo geral, existem dois processos importantes macroscópicos: crescimento celular (aumento do volume) e a subsequente divisão (citoquinese). Em nível subcelular, estes processos são acompanhados pela replicação de DNA e a distribuição dos cromossomos duplicados para as células novas. Nosso estudo não visa modelar estes dois últimos estágios, apesar de que aqui daremos uma rápida descrição do procedimento geral. Uma das características extremamente importantes do ciclo celular é que a passagem entre as diversas fases é controlada por um processo regulatório complexo, que não se limita a guiar o ciclo interno da célula mas a coordena de acordo com sinais extracelulares essenciais no controle da proliferação.

A mitose é apenas uma das fases do ciclo, e é a que corresponde à separação dos cromossomos resultantes e por fim, da citoquinese. Já todos os preparativos para isto - aumento da célula e replicação do DNA - ocorrem na parte mais extensa do ciclo, a *interfase* (corresponde a $\approx 95\%$ da duração do ciclo). O crescimento da célula individual se dá de maneira constante durante a interfase, alcançando o dobro de tamanho entre uma mitose e outra. De maneira mais específica existe uma classificação em fases:

Fase *M*: É a mitose. Separação dos cromossomos e citoquinese.

Fase G_1 : Inicia-se com o período G_1 a interfase, que consiste no intervalo entre a mitose e a iniciação da réplica de DNA. Neste intervalo a célula cresce.

Fase *S*: Continua-se na Interfase. Há duplicação do DNA, e uma vez feita a sua síntese, segue-se a última etapa da interfase:

Fase G_2 : na qual a célula continua crescendo, ocorrendo paralelamente sínteses de proteínas importantes para a mitose.

Nas experiências feitas por nós em laboratório, na qual observamos a dinâmica celular por microscopia, vamos apenas conseguir distinguir quando células entram na fase *M* (vide subseção 5.5.1). Já os estágios da interfase - *G*, *S* e G_2 - só podem ser identificadas por processos bioquímicos, o mais importante sendo a incorporação de timidina que se dá na síntese (fase *S*).

Regulação do ciclo

A maneira pela qual a célula atravessa os estágios do ciclo celular, da interfase e mitose, é regulada por sinais extracelulares vindos do ambiente, e de sinais internos que vão assegurar a coordenação entre os processos. Isto se dá através de certos pontos de verificação. Neste contexto, um dos momentos mais críticos é a da decisão na fase G_1 antes da entrada na fase *S*. Este ponto de restrição é regulado por estímulos externos, como quantidade de fatores de crescimento e de tamanho celular, para determinar se as

condições são favoráveis para continuar ou não com o ciclo. Uma vez passado este ponto, a não ser por erros eventuais, a célula está comprometida a continuar com o ciclo celular mesmo com subsequente falta de fatores de crescimento.

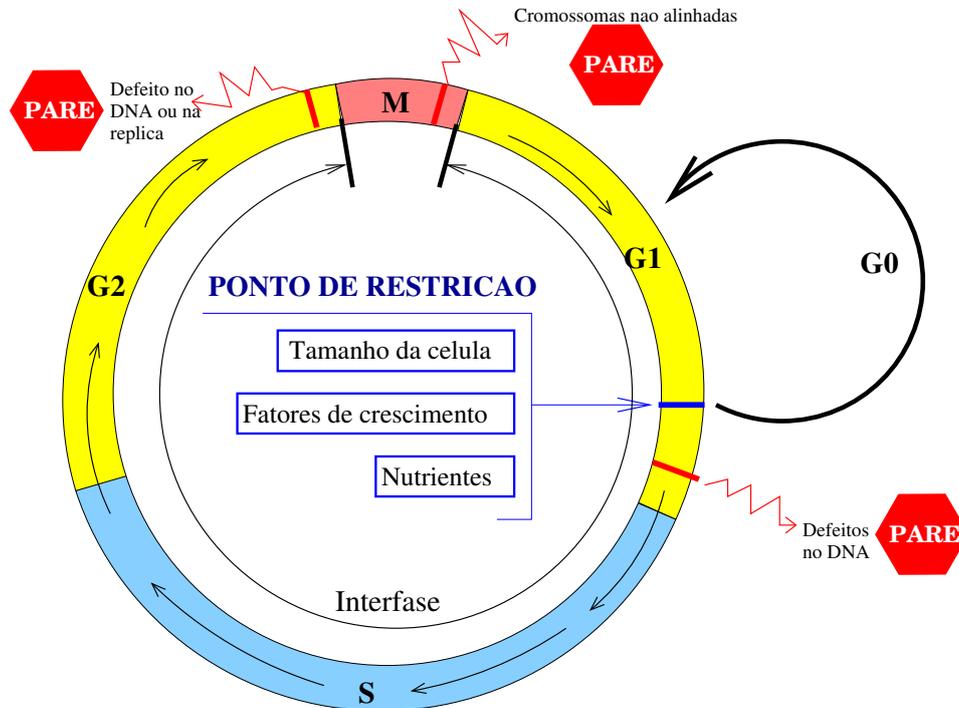


FIGURA 5.1.2. FASES E PONTOS DE REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR.

Já se os requerimentos para a passagem do ponto de restrição não forem satisfeitos, a célula sai do ciclo celular entrando num ciclo lateral (G_0) que pode alcançar grande duração. Neste período a célula não se divide, apresenta uma síntese baixa de proteínas, porém continua metabolicamente ativa, num estado, que pode ser chamada de quiescente.

Além do ponto de restrição, vale por consistência mencionar mais três momentos do ciclo que servem para fiscalizar o processo. São conhecidos como pontos de averiguação (Alberts *et al.*, 1983):

- Ponto em G_1 que faz com que célula repare eventuais defeitos no *DNA*. Isto é mediado pela proteína *p53*, (freqüentemente os genes que transcrevem esta proteína se encontram alterados em células cancerosas, refletindo a propriedade das mesmas em não controlar defeitos no *DNA*).
- Ponto em G_2 que assegura que a duplicação de *DNA* já finalizou antes de entrar na mitose. Também alterações no *DNA* são percebidas e corrigidas, para que elas não sejam transferidas para as células filhas.

- Ponto ao final da fase M , que garante o alinhamento correto dos cromossomos. Caso contrário, a citoquinese acarretaria em uma distribuição desigual dos cromossomos (característica bem conhecida em câncer).

Mais sobre mitose

O curto período compreendido pela fase mitose é onde os acontecimentos mais dramáticos ocorrem e são justamente os que observamos com facilidade. A mitose se subdivide em vários estágios, os principais sendo a prófase, metáfase, anáfase e telófase - onde ocorre desde a condensação dos cromossomos, a formação da estrutura de microtúbulos e das junções destes aos cromossomos, até a separação das cromátides e finalmente, a divisão. Para nossas finalidades esta última, conhecida com citoquinese, é a única que nos interessa em mais detalhes.

Nas figuras 5.1.4, 5.1.5 apresentamos por ilustração seqüências de imagens de alguns eventos relacionados à mitose. As células por nós estudadas, possuem certas propriedades de simetria resultantes da formação dos microtúbulos que geram um plano durante a metáfase na qual se alinham os cromossomos. Este plano geralmente coincide com a bissecção da célula (ver figuras 5.1.5 e 5.1.4), e é nela que se formará um anel contrátil de actina e miosina que estrangulará a célula em duas. As vezes estas simetrias são mais difíceis de observar apenas por microscopia, porém o resultado final da citoquinese sempre se aproxima a um corte de bissecção, como na figura 5.1.6.

Por ser a mitose um processo tão dinâmico, foi extremamente importante que nossos dados se baseassem em filmes na qual podemos monitorar a evolução dos formatos da célula antes de sofrer mitose. Percebemos também que já muito antes da citoquinese, (a célula já passou da fase S e provavelmente, G_2), há uma reconfiguração da geometria celular - esta se arredonda (ver figuras 5.1.35.1.4, 5.1.5, e 5.1.6) devido à perda temporária de algumas adesões focais. Esta é novamente um exemplo da forte interação entre citoesqueleto, pontos de adesão e regulação celular.

Para fins de modelamento, as observações *in vitro* foram importantes pois as observações apontadas nestas figuras foram usadas nas simulações.

5.2. Comportamento Celular como “Função” da Forma

É requerimento da grande maioria das células de se encontrarem ligadas umas às outras ou à matriz extracelular para apresentar o devido funcionamento, crescimento e até mesmo sobrevivência. Sem manter estes contatos células muitas vezes morrem através do processo de apoptose - uma morte celular programada. A não ser hemácias, células normais em suspensão não entram em mitose e acabam morrendo. Esta observação bem conhecida comprova uma correlação muito forte entre o crescimento celular (e

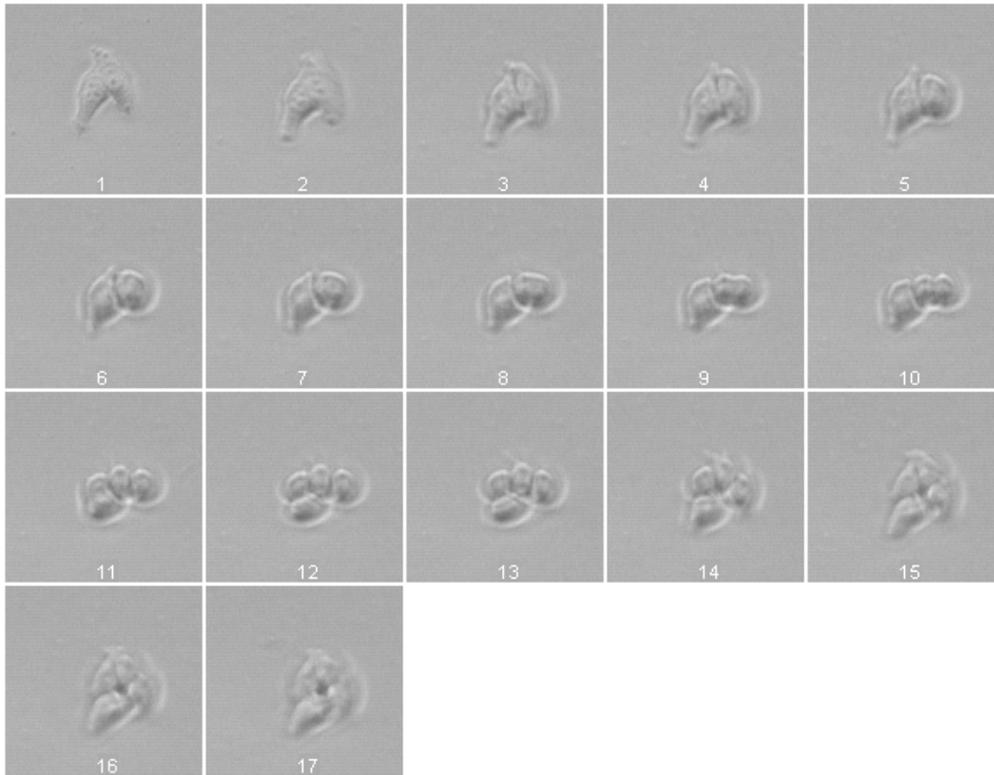


FIGURA 5.1.3. MITOSE SINCRONIZADA. Estas seqüências de imagens mostram um efeito que observamos bastante durante as experiências: existem muitos casos onde os ciclos mitóticos aparentam estar coordenados. Não sabemos porém se isto é devido a algum sinalamento entre as células, ou se consequência da possibilidade que ao selecionar células para sementeira, estamos selecionado aquelas que se encontram em um dado momento do ciclo.

até sua sobrevivência) e a relação substrato-célula, e é conhecida como a “dependência de ancoramento”. Este efeito é tão bem conhecido, que estas células desprovidas de contatos são conhecidas como “anoikis” (Frisch e Thoumine, 2002).

Vamos citar experiências e explorar os argumentos que sustentam a hipótese desta ‘dependência de ancoramento’. Começaremos com as observações mais básicas: se células de várias linhagens são levadas de uma conformação extremamente achatada a uma geometria mais esferoidal, verifica-se a diminuição de proliferação (menor incorporação de 3H -timidina).

Seguimos por uma perturbação da observação anterior feita com fibroblastos: se as células em suspensão puderem se ligar a pequenos bastões dispersos no meio, começará a haver proliferação desde que os bastões superem um comprimento de $20\mu m$.

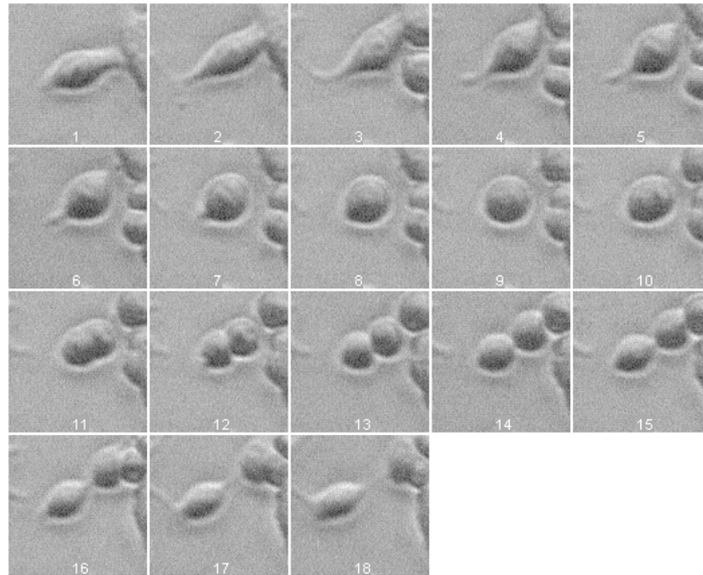


FIGURA 5.1.4. CITOQUINESE COM EIXOS BEM DEFINIDOS I. Exemplo clássico de mitose: a célula, possuindo certo alongamento, é vista se arredondar. Antes disto, ela já começou a entrar no processo de mitose: podemos até perceber a formação de uma linha fraca passando pelo menor eixo da célula (perpendicularmente ao eixo maior). Uma vez que a célula, já sem pontos de adesão, estiver completamente redonda, ocorre a divisão propriamente dita *exatamente no local do antigo eixo menor*, seguida pela formação de pontos adesivos de ambas as novas partes.

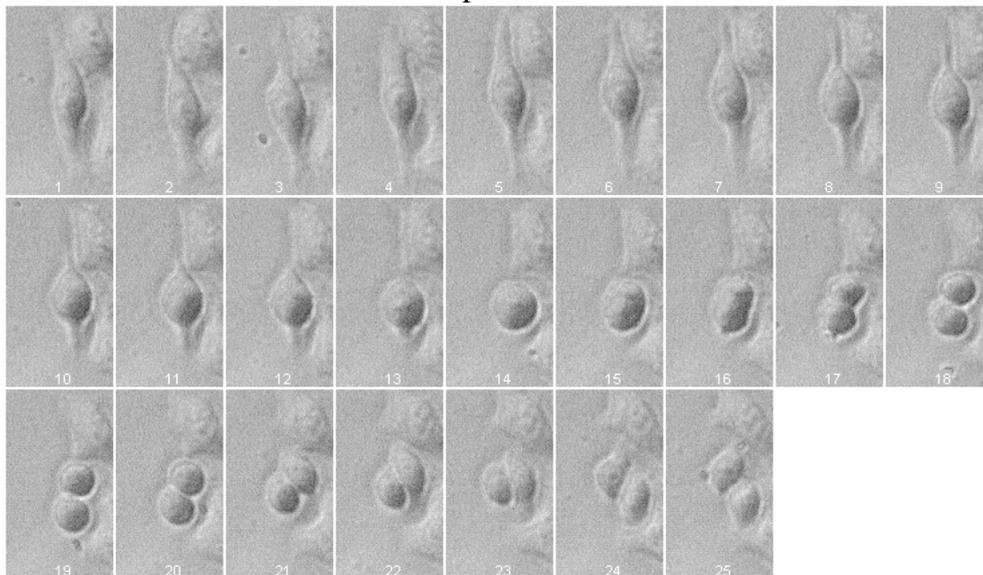


FIGURA 5.1.5. CITOQUINESE COM EIXOS BEM DEFINIDOS II. A célula se encontra no começo da seqüência na sua máxima extensão, pois logo em seguida começa a haver um retração. A simetria é mantida de maneira muito clara. Percebe-se que a partir do quadro 19, as células ‘trocam’ de posição.

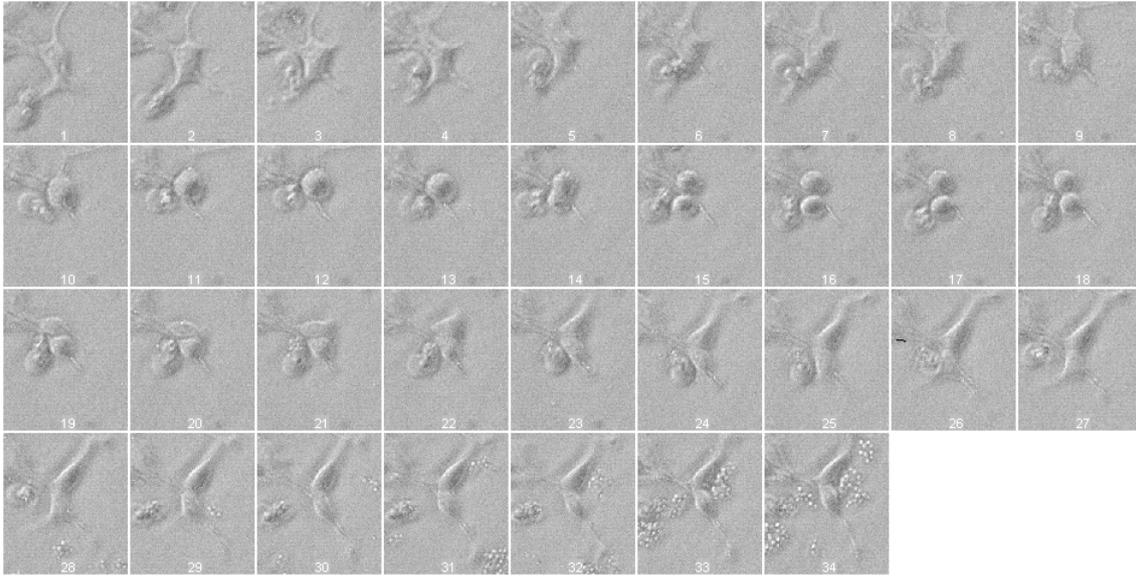


FIGURA 5.1.6. FORMAS INICIAIS NÃO TRIVIAIS. Neste caso, a célula se estendeu de tal forma que fica difícil aproximá-la por uma elipse. Este é portanto um exemplo de casos onde fica difícil prever em que direção a escolha será feita. De forma geral, porém, o eixo de divisão não parece contradizer a idéia de ser um dos eixos menores.

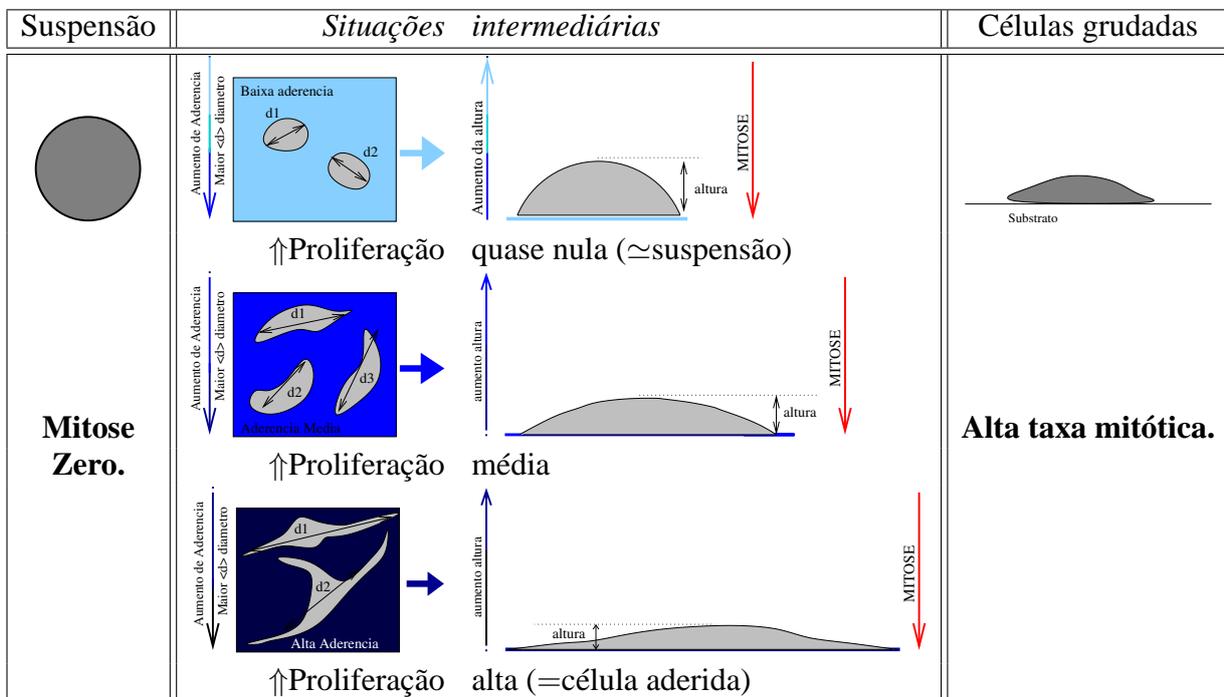


FIGURA 5.2.1. DEPENDÊNCIA DE ANCORAMENTO OU DE GEOMETRIA?

Também se sabe que, ao colocar células em contato com um substrato com que tenham pouca afinidade, as poucas células que são capazes de grudar a ele possuem uma conformação praticamente esférica apresentam uma proliferação extremamente baixa ou até mesmo nula. Ou seja, estas células são incapazes de passar para a fase *S*, analogamente a células em suspensão. Estes fatos foram primeiramente interpretadas por Folkman e Greenspan (1975) sob a ótica que em todos estes casos uma variável escondida pudesse ser a causa destes resultados, a variável do *formato da célula*. Esta sugestão reformulou as observações feitas até então sob um novo prisma, pois tanto a inibição de contato quanto a dependência de ancoramento apenas se baseiam nas sinalizações pelas integrinas. Seguem-se as principais relações causais conhecidas, no quadro abaixo:

Alteração		Resultado
disrupturas no ECM	→	apoptose
células em suspensão aderidas a bastões	→	pode diminuir apoptose e aumentar proliferação

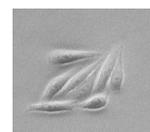
Isto é claro acontece devido à ativação das integrinas. Porém, numa segunda análise, percebe-se que a hipótese do formato celular pode ser mais relevante: quando há ruptura da ECM, a célula *continua aderida* aos fragmentos de matriz, apenas se torna mais arredondada. E quanto aos bastões: se eles não possuírem um tamanho mínimo, de forma a alterar significativamente o formato da célula, mesmo que esta se encontre aderida, ainda sofrerá taxas de apoptose equivalente a células totalmente em suspensão. É possível então acrescentar na relação causal um processo intermediário:

Alteração		conseqüência intermediária		Resultado
disrupturas no ECM	→	célula arredonda mantendo pontos de adesão	→	apoptose
células em suspensão aderidas a bastões	→	células mais estendidas	→	pode diminuir apoptose e aumentar proliferação

Ou seja, mesmo que existam aglomerados de integrinas, se estes não mantiverem a ‘extensão’ da célula, também não poderão promover a proliferação.

Folkman e Moscona (1978) realizaram as primeiras experiências para dar uma sustentação mais quantificada a esta hipótese. Descreveremos rapidamente no que segue os resultados e principais conclusões.

Experimentalmente, a forma da célula pode ser regulada controlando a adesividade da placa de cultura. Células crescidas sobre substratos menos aderentes tendem a uma configuração mais esferoidal, enquanto que aquelas em contato com substratos mais aderentes se apresentam mais estendidas com uma altura menor. Estas medidas são realizadas considerando-se



Células destorcidas

toda uma população de tal maneira que se pode obter uma geometria média específica como função do grau de aderência de cada substrato. Em diversas destas populações observou-se que as células mesmo não sofrendo de inibição de contato (pois são mantidas isoladas), apresentam diferentes taxas de crescimento conforme o formato que possuem. Mais especificamente, o grau de síntese de DNA é inversamente proporcional à altura (espessura) da célula. Assim, surge a pergunta se, em vez de existir uma relação causal direta entre inibição de contato e diminuição de mitose, a relação não reside na verdade na diminuição de mitose devido à mudança para um formato mais esferoidal, que ocorre também quando células começam a se pressionar devido ao contato (ver figura 5.2.2 para explicação esquematizada).

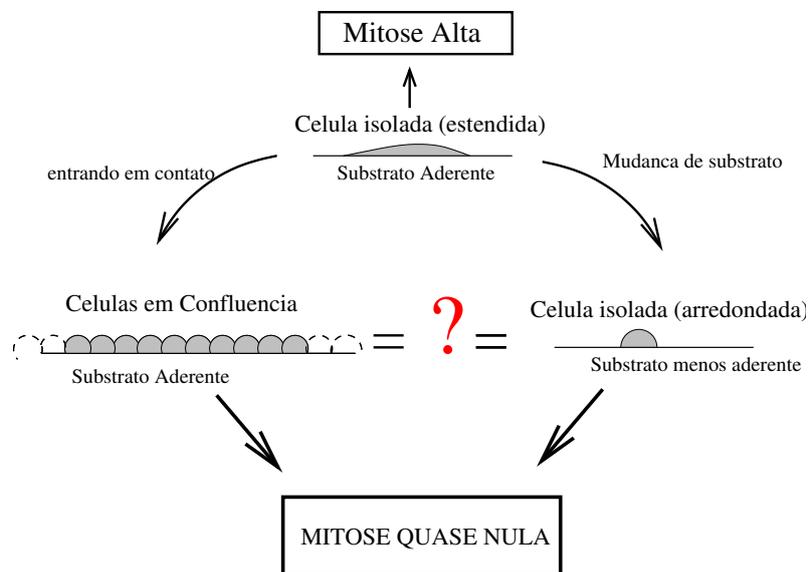


FIGURA 5.2.2. INIBIÇÃO DE CONTATO OU DEPENDÊNCIA DE GEOMETRIA? Escolhendo-se um substrato de aderência (menor) tal que a célula nela aderida mimetiza fenotipicamente a situação de confluência, observa-se aproximadamente a mesma taxa de proliferação, sugerindo novamente uma forte correlação entre geometria e comportamento celular.

Deste modo, células esparsas mantidas em conformações arredondadas semelhante a conformação apresentadas por células em confluência, também possuem os mesmos níveis de síntese de DNA que as em contato. Resultados de situações como estas, na qual se garante o isolamento da célula, mantendo-as em certas geometrias com artifícios externos sugerem que a hipótese de dependência geométrica pode ser correta.

Não é ainda possível discriminar a possibilidade de que a quantidade de pontos de adesão focal poderia estar diretamente relacionado com a resposta celular, uma vez que a mudança topológica da célula acarreta, pelo simples

fato de possuir mais ou menos área de contato, numa alteração do número de receptores de membrana (ligações de integrina, formação de adesões focais e maior acesso a fatores de crescimento).

No entanto, Chen *et al.* (1997) demonstraram que, ao modificar apenas o formato celular enquanto a quantidade de moléculas adesivas é mantida constante, existe um limiar de extensão abaixo do qual as células se tornam quiescentes e suscetíveis a apoptose. Isto foi possível ao passar de substratos de adesividade homogênea a pontos adesivos discretos. Desta maneira, é possível estender células mantendo constante a área de contato. A observação principal confirmada por trabalhos deste tipo (Chen *et al.*, 1999, 1997; Ingber *et al.*, 1995) é a de que células aderidas e espalhadas incorporam mais DNA (ou seja, se encontram na fase *S*) do que as menos estendidas, mesmo em situações onde se mantém o mesmo número de pontos de adesão (em ordem de grandeza). Estas observações estão esquematizadas e resumidas na figura 5.2.3.

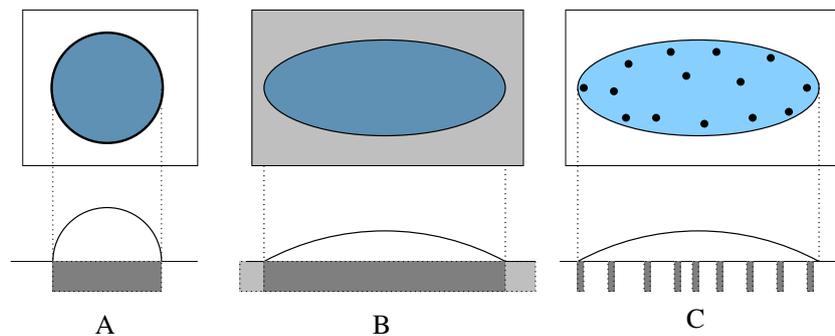


FIGURA 5.2.3. DEFORMAÇÕES DESACOPLADAS COM ÁREA DE CONTATO. Estas células assumem os limites impostos à matriz extracelular. A) célula preenche toda a pequena ilha adesiva a que tem acesso, simulando confluência: apresenta apoptose. B) célula livre se estendendo sob extensa área de matriz. C) por meio de pontos muito pequenos de fibronectina sobre uma superfície não adesiva, a célula, por meio de aderências focais é capaz de se estender. Apesar de possuir uma área mínima de contato, ao mimetizar a configuração da situação B), esta célula apresenta o mesmo comportamento: proliferação e sobrevivência. Foi portanto possível equalizar a área de contato, variando as deformações. Conclusão: comportamento celular depende diretamente da forma.

Resta entender o mecanismo pelo qual células traduzem as mudanças na sua conformação geométrica em respostas bioquímicas que determinarão seu comportamento. Adesões focais (subseção 5.1.1) formam intracelularmente uma ponte molecular que acopla a estrutura do citoesqueleto à ligação de integrina (em outras palavras, actina à Matriz Extracelular), e por isso estas adesões são conhecidas por mediar a transdução do sinais

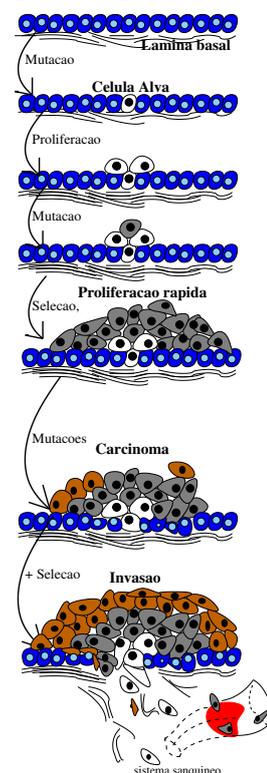
celulares (Wang *et al.*, 1993). A relação entre forma e comportamento pode então adquirir uma interpretação mecânica através das integrinas (por exemplo), que conferem conexões físicas entre citoesqueleto e ECM. Por isto, se supõem que elas também integrem os sinais mecânicos associados à geometria da célula com processos químicos estimulados diretamente nas ligações de integrinas (Boudreau e Jones, 1999; Giancotti e Ruoslahti, 1999). Enfim, as explicações são as mais diversas, e este campo é de extremo interesse. Nós apenas mencionamos aqui pelo tocante que estas especulações das propriedades de tensegridade e mecanotransdução possuem com toda a discussão da regulamentação celular por geometria.

E claro, para a física como ciência, é fascinante poder existir uma conexão tão íntima entre estímulos mecânicos por distorções do citoesqueleto que finalmente levam à expressão genética.

Conclusões e introdução dos objetivos

Foi discutido o impacto, e as diversas formas na qual a ECM controla o formato celular, e por sua vez, a geometria regula a morte e crescimento. Visamos entender melhor as consequências desta teia de causa e efeito em alguns modelos matemáticos (Gompertz), na interpretação de dados experimentais e através de simulações por modelo de Potts. Nosso objetivo é, motivados pela sugestão de que o formato celular seja um sinal ‘extracelular’ para o ciclo celular, explorar quais seriam as consequências da modificação desta regulação na proliferação de uma população.

Mais especificamente, faremos a ponte com estudo de células de câncer, pois uma das características de transformações malignas é justamente a da perda da regulação por formato. Isto acarreta crescimento celular em situações onde não haveria normalmente extensão na ECM suficiente, o que por sua vez causa a expansão incontrolável de massa - enfim, a desorganização da arquitetura histológica por neoplasia.



5.3. Mais Mitose

5.3.1. Crescimento populacional e de tumores

O crescimento tumoral é um processo que possui quatro fases distintas para fins de estudo:

- (1) A transformação maligna da célula alvo:
A partir desta única célula resultará todo o câncer.
- (2) Proliferação das células transformadas:
Constitui parte do nosso estudo.
- (3) Invasão local:
Quando a proliferação causa a propagação dentro do tecido de origem.

(4) Metástases:

A colônia das células transformadas adquirem certas propriedades que as possibilitam invadir outros tecidos, ambientes diferentes etc.

De forma redundante, isto se traduz à realidade de que, em 30 gerações forma-se uma massa tumoral clinicamente detectável, isto é de 1g. Adicionando mais 10 gerações a este mínimo detectável, estaremos lidando com uma massa tumoral de 1kg, o que vem a ser o tamanho máximo tolerado para a sustentação da vida do 'hospedeiro' (Ingber, 2002).

Estes números servem apenas para estipular ordens de grandeza relacionados à dinâmica tumoral pois existem outras variáveis que podem alterar consideravelmente estes parâmetros. No entanto a idéia principal infelizmente é válida para os casos clínicos: ao se detectar um tumor, este já completou a maior parte do seu ciclo vital. Isto constitui o mais fundamental obstáculo para um tratamento. Os estudos feitos em relação à dinâmica de crescimento de células tumorais têm se fundamentado em observações empíricas nas quais é extremamente difícil isolar as relações causais possíveis. Predomina na literatura enormes acervos de relatos de experiências, mas sempre com efeitos quantificados incertos. No entanto, algumas noções são fortemente sugeridas: em geral a velocidade de crescimento dos tumores é atribuída ao grau de diferenciação (grau de mutação) apresentado.

A correlação da semelhança entre as células tumorais e as células normais de origem tanto em nível morfológico como funcional, parece determinar o sucesso da invasão. Dos tipos de tumores classificados (aproximadamente 200), obteve-se um espectro de padrões de crescimento e diferenciação celular que vai desde células tumorais que proliferam pouco e mantêm a arquitetura do tecido de origem (incluindo neste grupo os tumores benignos de células mesenquimais que são praticamente indistinguíveis do tecido normal) até aquelas células, as carcinomas indiferenciadas, que apresentam alta invasividade e crescimento desordenado (Castro, 1999).

Ao analisar estes fatos no contexto do funcionamento do ciclo celular discutido na seção na página 105, é possível levantar várias hipóteses quanto à repentina mudança de comportamento proliferativo de uma certa população. Tanto os mecanismos que inibem a passagem da célula pelo ponto de restrição (para prosseguir no ciclo), quanto os de averiguação, podem ao alterar-se, fazer uma linhagem mais proliferativa que outra. Quando isto ocorre, estamos sendo levados a um regime que poderá se adaptar a um aumento da entrada de células na fase *S* e conseqüentemente na mitose propriamente dita.

Também a taxa de proliferação da população, que depende do tempo total necessário de cada célula a passar por todo o ciclo - interfase e mitose - poderá ser alterada substancialmente como conseqüência da diminuição deste ciclo, causando o crescimento desenfreado característico. Apesar desta hipótese ser coerente, é fato que para muitos tumores o ciclo celular não apenas é igual, quanto também pode ser maior quando comparado ao

das células normais correspondentes. Isto também está de acordo com o comportamento holístico de um tumor: quando apresentam tamanhos pequenos existe um crescimento exponencial - representando quase uma total incorporação das células no ciclo celular ativo. À medida que este tumor se aproxima do tamanho de saturação determinado pelo ambiente, a maioria das células neste momento já estarão quiescentes (G_0). Veremos que existem modelos matemáticos que se baseiam justamente nestas frações de células ativas e quiescentes.

A ponte entre a alta fração de células em crescimento e a discussão prévia sobre os efeitos morfológicos da células (ver subseção 5.2), reside na suposição que os mecanismos inibitórios do ciclo foram relaxados nas células tumorais quanto ao “feedback” fenotípico. Isto explicaria o aumento exagerado da fração de número de células que entram no ciclo celular.

5.4. A Fórmula de Gompertz e Outros Modelos

Colocamos ênfase na Lei de Gompertz de crescimento, que tem sido amplamente utilizada, e, apesar de (ou talvez, por isto...) extremamente simples, se mostrou, dentre todos os modelos, mais de acordo com resultados empíricos. Ressaltamos fraquezas apresentadas por este modelo, como também apresentamos algumas bases teóricas que já foram levantadas para justificá-la. De modo geral, têm ocorrido esforços para derivar o modelo de Gompertz como sendo um caso particular de modelos mais gerais, baseadas sob diversos princípios biológicos. Julgamos esta discussão muito importante, pois, além de favorecer com isto a nossa escolha de utilizar este modelo para descrever as experiências feitas por nós (Castro, Klamt, Grieneisen, Grivicich, e Moreira, 2003), ficará também explícito que está faltando um tratamento baseado em estruturas mesoscópicas.

Curvas de crescimento num contexto amplo

Modelos de crescimento devem satisfazer, de modo geral, a fase inicial acelerada acompanhada por um efeito de saturação, dado por uma grandeza representando a capacidade máxima. Turner *et al.* (1969) propuseram uma classe geral de equações diferenciais que são exemplos de modelos que obedecem a estes princípios. Sendo o número de células N , a taxa de crescimento intrínseco quando o número de células estiver baixa dado por γ (portanto possuindo unidade de $\frac{\text{células}}{\text{tempo}}$), capacidade máxima A (em unidade ‘célula’), e ainda definindo parâmetros adimensionais ϵ e n que determinam a forma da curva, obtém-se a expressão geral

$$(5.4.1) \quad \frac{dN}{dt} = \frac{\gamma N^{1-n\epsilon}}{A^n} (A^n - N^n)^{1+\epsilon}.$$

Esta equação resume na sua estrutura o comportamento bimodal, de crescimento inicial e saturação, pelo produto de dois termos: $(A^n - N^n)^{1+\epsilon}$

representa o comportamento de saturação, regulando a população no tamanho estável de capacidade máxima A ; e $N^{1-n\epsilon}$ termo responsável pelo crescimento acelerado do começo. A interpretação por conceitos de dinâmica populacional fica explícita na forma da equação 5.4.1, porém, será útil no futuro recorrer a ela escrita de forma diferente, por isto aproveitamos este momento para efetuar algumas simplificações algébricas triviais. Podemos reescrever a equação 5.4.1 como

$$\frac{dN}{dt} = \gamma \left\{ \left[1 - \left(\frac{N}{A} \right)^n \right] \left[\left(\frac{A}{N} \right)^n - 1 \right]^\epsilon \right\} N,$$

ou seja, a equação geral 5.4.1, pode ser reescrita como

$$(5.4.2) \quad \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = \frac{d \ln N}{dt} = \gamma \left[1 - \left(\frac{N}{A} \right)^n \right] \left[\left(\frac{A}{N} \right)^n - 1 \right]^\epsilon.$$

Aqui a equação está escrita de maneira adequada para tratar de aproximações feitas num modelo de Gompertz generalizado, tópico da subseção 5.4 na página 121.

Fórmula de Gompertz

Em 1825, com intuito de estudar a mortalidade humana, Gompertz, por observações puramente empíricas formulou uma lei de crescimento. Mais tarde constatou-se que esta mesma fórmula se aplica de forma excelente na descrição de crescimentos biológicos em geral (Bajzer, 1999).

Apesar de historicamente sua origem ter se dado de maneira observacional, vamos chegar a esta expressão por considerações de dinâmica populacional. Ou seja, vamos propor uma possível dinâmica de crescimento e morte de uma população através de uma equação diferencial ordinária, na qual cada termo possui um significado, e obter como solução desta a lei que Gompertz obteve por ajustes.

Ao se descrever o aumento populacional de células, dado pelo número de células $N(t)$, um possível crescimento pode ser dado por

$$(5.4.3) \quad \dot{N}(t) = \alpha \cdot N(t) - \beta \cdot N \ln N(t), \quad N(0) = 1,$$

onde o primeiro termo representa o aumento exponencial que irá prevalecer em tempos pequenos, e o segundo termo inibe o crescimento determinando a saturação. Os parâmetros α e β , que por definição são positivos, regem este comportamento mas, como já se percebe, não possuem (especialmente o β) uma correspondência observável direta. Reescrevendo a equação 5.4.3, obtemos uma forma mais compacta:

$$(5.4.4) \quad \dot{N} = N(\alpha - \beta \ln N) = \beta \left(\ln \frac{A}{N} \right) N,$$

com

$$(5.4.5) \quad \alpha = \beta \ln A.$$

Tomamos este momento para reparar, na equação 5.4.4, que β representa a taxa de crescimento, e A representa a população máxima possível do sistema.

A solução da equação diferencial 5.4.3,

$$(5.4.6) \quad N(t) = N_0 \exp\left[\frac{\alpha}{\beta}(1 - \exp(-\beta \cdot t))\right], \quad N(0) = N_0,$$

é a Lei de Gompertz. Às vezes refere-se à forma 5.4.4 como a *taxa de crescimento de Gompertz*.

A correspondente expressão para o aumento do volume experimental de um tumor é dado diretamente, pela introdução do volume em lugar do número populacional:

$$(5.4.7) \quad V = V_0 \exp\left\{\frac{\alpha}{\beta}(1 - \exp(-\beta t))\right\},$$

onde V representa o volume do tumor, V_0 o volume inicial do mesmo, α e β parâmetros a serem ajustados aos dados experimentais pelo método dos mínimos quadrados, e t , a variável de tempo. A fórmula é muito simples, podendo o crescimento ser descrito apenas pela caracterização de V_0 , α e β . No entanto ela é, como já mencionamos, puramente fenomenológica e não fornece nenhum mecanismo em nível celular que possa explicar o comportamento mostrado na figura 5.4.1.

Na figura 5.4.1 percebemos que a curva sigmóide gerada apresenta como aspectos mais marcantes o ponto de inflexão e a capacidade máxima, estando relacionados com α e β (diretamente). Como a função de Gompertz é a solução da equação 5.4.3, já estamos num regime onde os parâmetros α e β são positivos. Porém, esta conclusão pode ser obtida de imediato ao observar que, para existir uma capacidade máxima que seja finita e não nula, o termo exponencial $e^{-\beta t}$ da equação 5.4.6 precisa tender a zero. Segue que $\beta > 0$ e que, para se ter crescimento,

$$(5.4.8) \quad N(\infty) \equiv N_\infty = \exp\left(\frac{\alpha}{\beta}\right) > 1,$$

portanto voltamos a obter que $\alpha > 0$.

O ponto de inflexão é o requisito básico para qualquer modelo de descrição biológica, pois reflete a tendência do crescimento eventualmente desacelerar devido a fatores externos ou por mecanismos de controle interno. Isto ocorre após se alcançar uma taxa máxima de crescimento. Derivando a equação 5.4.3, obtemos

$$(5.4.9) \quad \dot{N} = \dot{N}(\alpha - \beta - \beta \ln N).$$

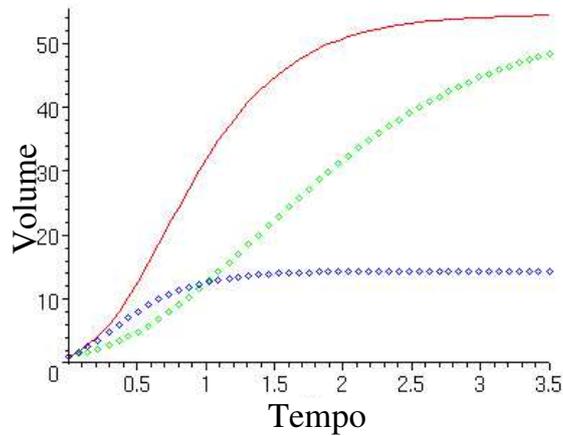


FIGURA 5.4.1. CURVAS DE DESCRIÇÕES EMPÍRICAS. O eixo vertical representa o volume do tumor, e o horizontal o tempo. Apresentamos a equação 5.4.7, com parâmetros distintos: para a curva vermelha: $\alpha = 8$, $\beta = 2$, linha pontilhada azul alteramos apenas $\beta = 3$, na linha pontilhada verde: $\alpha = 4$, $\beta = 1$. Todas curvas possuem o mesmo volume inicial para o tumor ($=1$). A linha pontilhada verde e a inteira vermelha possuem a mesma razão α/β , por isto possuem o mesmo valor de saturação.

Ao igualar esta expressão a zero, e lembrando que nos encontramos num regime de taxa de crescimento positiva, achamos o ponto de inflexão em $\alpha - \beta - \beta \ln N = 0$, ou seja:

$$(5.4.10) \quad \ln N^\circ = \frac{\alpha}{\beta} - 1.$$

Substituindo $N^\circ = e^{(\frac{\alpha}{\beta} - 1)}$ na expressão 5.4.6, obtemos que o tempo onde ocorre esta transição de crescimento é

$$(5.4.11) \quad t^\circ = \frac{1}{\beta} \ln\left(\frac{\alpha}{\beta}\right).$$

A capacidade máxima do tumor (N_∞), descrita pela equação 5.4.8, se relaciona com o número de células no ponto de inflexão (N°), dada pela equação 5.4.10, apenas por uma constante, o número de Euler: $N_\infty = eN^\circ$. Isto é uma observação interessante ao se analisar o crescimento populacional de células pois no momento em que o processo começa a desacelerar, podemos calcular o limite superior da capacidade máxima.

A figura 5.4.2 registra três estágios de comportamento característico do tumor. A fase I reflete o crescimento inicial, com a curva Gompertziana côncava até alcançar o ponto de inflexão, este relacionado com o número final saturado. Segue-se então uma curva convexa na qual a segunda fase

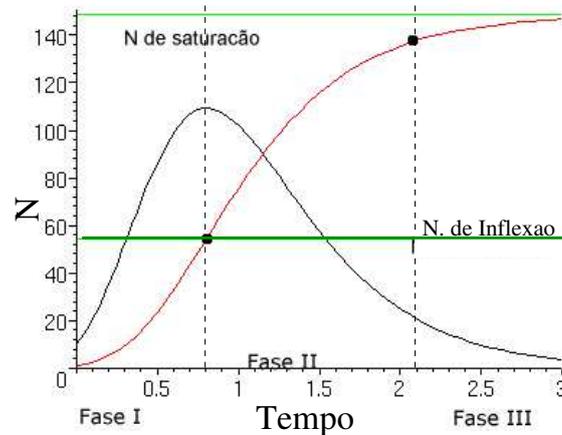


FIGURA 5.4.2. FASES DE CRESCIMENTO TUMOR. A curva vermelha representa o aumento de células com o tempo, enquanto a preta representa a sua primeira derivada, através da qual percebemos melhor o comportamento das taxas de crescimento, possibilitando a classificação da dinâmica tumoral em três fases. A linha superior representa o limiar de saturação da expressão 5.4.8, e o número de células do ponto de inflexão corresponde a $\sim 0.36N_{\infty}$.

representa a dinâmica tumoral até a morte do hospede. A terceira fase, saturada, é a extrapolação do crescimento caso o hospede continuasse com vida. Matematicamente, apenas podemos inferir a transição da Fase I para Fase II, a segunda transição se baseia em observações clínicas e se encontram tabeladas para inúmeras linhagens de células.

Valores iniciais, massa tumoral perto de zero

Uma das primeiras limitações que se percebe ao contemplar a equação 5.4.7 é quando, ao estudar o aumento do tamanho de um tumor, o volume inicial é infinitesimalmente pequeno. Ou seja, quando queremos descrever o crescimento a partir de uma ou poucas células. Biólogos e experimentais já constataram que esta é a principal falha da lei de Gompertz quando se deseja ajustar a curva próximo a $t = 0$ para valores iniciais muito pequenos. Outras curvas de crescimento, como a de von Bertalanffy (1966), não apresentam esta limitação².

Calderon e Kwembe (1991) mostraram que é possível modificar a Lei de Gompertz para um caso mais ‘geral’, de modo a englobar esta região. Iremos seguir sua lógica.

Primeiramente, partindo da taxa de crescimento de Gompertz, descrita pela expressão 5.4.4, identificamos a expressão $(\ln \frac{A}{N}) \cdot \beta$ com $\phi(N)$. O parâmetro A , que foi redefinido na expressão 5.4.5 e escrito de forma isolada,

²Pois estas leis de crescimento, quando colocados na forma da equação 5.4.12 satisfazem o requerimento da expressão 5.4.14.

representa $A = \exp(\frac{\alpha}{\beta})$ - que já reconhecemos como sendo a capacidade máxima (equação 5.4.8). Reescrevemos a forma da taxa de crescimento de Gompertz como,

$$(5.4.12) \quad \frac{dN}{dt} = \phi(N) \cdot N,$$

ou seja,

$$(5.4.13) \quad \frac{dN}{\phi(N)N} = dt.$$

Quando $N \rightarrow 0$, só obteremos uma solução não-trivial se a integral definida do lado esquerdo da expressão não divergir, isto é, se

$$(5.4.14) \quad \int_0^\varepsilon \frac{dN}{\phi(N)N} < \infty,$$

na qual a integração está sendo efetuada num domínio arbitrariamente pequeno ($[0, \varepsilon]$) perto de zero.

Infelizmente a expressão $\phi(N) = (\ln \frac{A}{N}) \cdot \beta$ vai mais lentamente ao infinito que N a 0, ou seja, a taxa de crescimento de Gompertz não satisfaz o requerimento para ter solução não trivial.

Calderon e Kwembe (1991) propuseram que fosse modificado a equação 5.4.4, mudando-se o expoente de $\phi(N)$ para satisfazer o requerimento 5.4.14. Ou seja,

$$(5.4.15) \quad \frac{dN}{dt} = \phi^{1+\varepsilon} \cdot N = \beta^{1+\varepsilon} (\ln \frac{A}{N})^{1+\varepsilon} \cdot N.$$

Para não desviar muito da interpretação dos parâmetros, mantenhamos β com o expoente 1,

$$(5.4.16) \quad \frac{dN}{dt} = \beta (\ln \frac{A}{N})^{1+\varepsilon} \cdot N \rightarrow \frac{d \ln N}{dt} = \beta (\ln \frac{A}{N})^{1+\varepsilon},$$

que, ao se resolver com a condição inicial $N(0) = 0$, fornecerá a solução

$$(5.4.17) \quad N(t) = A \exp\{-(\varepsilon \beta t)^{-\frac{1}{\varepsilon}}\},$$

que resulta numa curva sigmoideal para valores fixos de ε , aproximando-se a A para tempos grades e tendendo a zero para t pequeno, proposta por Calderon e Kwembe (1991) e denominada curva “hiper-Gompertziana”. Ela não é a única solução, já que $N = 0$ também satisfaz 5.4.16. Esta segunda situação é interpretada como não havendo mutação da célula alvo. Já o caso da existência de um tumor, cuja evolução segue o comportamento dado pela lei de Gompertz, equação 5.4.17 proposto por Calderon e Kwembe (1991) pode, por via de extrapolação, fornecer uma especulação sobre o momento na qual ocorreu a transformação maligna da célula alvo.

Voltamos por um momento à forma ‘simplificada’ da equação geral 5.4.1 que foi obtido na introdução desta seção, que corresponde a equação 5.4.2, $\frac{d \ln N}{dt} = \gamma [1 - (\frac{N}{A})]^n [(\frac{A}{M})^n - 1]^\epsilon$. Aplicamos sobre esta expressão certas aproximações: tomamos o limite dela quando n tende a zero, enquanto exigimos que $\gamma n^{1+\epsilon} \rightarrow \beta$.

Feito isto, obtemos a própria equação Gompertziana 5.4.16, demonstrando que ela é de fato um membro da classe de modelos descritos na introdução desta seção, subseção 5.4 na página 117.

5.5. Experimental

Toda teoria que almeja compreender os processos envolvidos nos crescimentos patológicos de células, visa descrever e interpretar as observações de crescimento de colônias de células malignas *in vivo*. Consideram-se estes modelos experimentais (na qual experiências são feitas *in vivo*, em ratinhos por exemplo) fortemente análogas à situação clínica, pois é fornecido para o tumor um suporte de células normais (estroma). Entretanto, se compararmos com experiência *in vitro*, a dificuldade de observar detalhes da dinâmica das células individuais é enorme, como também há uma perda do controle de variáveis fundamentais para quantificar o comportamento celular³.

Dentro do contexto de experiências *in vitro* existem dois modelos fundamentais para o estudo da cinética de tumores:

- topologias de células em monocamadas,
- topologias esferoidais de células.

Tanto a escolha quanto o controle das características destes modelos se deve a fatores tais como: substrato de cultura, microambiente fornecido as células, nutrientes, tipo de células etc.

5.5.1. Observações *in vitro*

Dentre várias maneiras de coletar informações sobre a dinâmica celular apresentada pelas células cancerosas, existem duas primeiras bifurcações nas metodologias possíveis. Uma classe de métodos consiste em medir os observáveis em amostras distintas a certos tempos fixos. Obtemos assim, espécies de “fotografias” da evolução *in vitro*, no entanto, não podemos tirar mais que uma fotografia por amostra.

Se quisermos estudar detalhes dos mecanismos que guiam a dinâmica celular, é importante não apenas medir a população de células em tempos distintos via método de amostragens, mas realmente seguir em tempo real sua evolução. Ou seja, desejamos ter um “filme” de uma amostragem específica. Isto possibilita verificar individualmente relações entre fenótipo celular, distribuição das células nos focos e proliferação, assim como outros detalhes da cinética da mitose.

³Comunicação pessoal de M. A. A. Castro.

Experiências deste último tipo foram realizadas, em colaboração com Mauro A. A. Castro, no Laboratório de Estruturas Celulares do IF-UFRGS. As amostras eram preparadas no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica-UFRGS.

Para acompanhar a dinâmica das células viáveis por técnicas de vídeo-microscopia desenvolvemos, durante o curso deste trabalho, um aparelho que permitisse o controle de temperatura das amostras enquanto estas se encontravam na mesa do microscópio. Desta forma, podemos observar uma mesma amostra por muitas horas sem que estas entrem em morte celular (apoptose⁴ e/ou necrose).

Seguem algumas das nossa observações que serão essenciais para discussão, interpretação de dados e modelamento.

Trypsinização

Utilizamos a técnica da trypsinização para desmanchar temporariamente adesões focais, e com isto verificar como estas mantinham a configuração da célula. Também é utilizada no preparo de amostras, para soltar as células de uma placa e semeá-las em outro ambiente. Ver figura 5.5.1 para exemplo explicativo. A tripsina é uma enzima que degrada as proteínas da matriz e as de adesão celular. Por isto, uma vez feita a trypsinização a célula precisa restabelecer as proteínas de adesão extracelulares. Normalmente após 1 hora ela se adere normalmente.

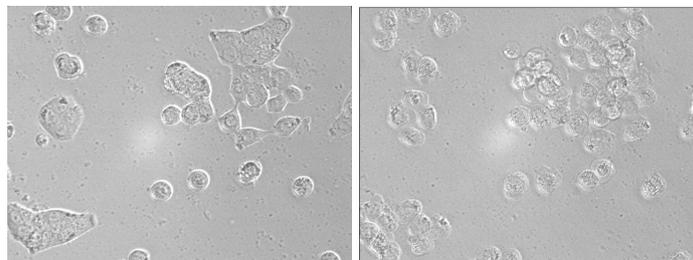


FIGURA 5.5.1. EFEITO DA TRIPSINA NAS INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA. Fazemos com que as células em cultura percam os seus contatos de adesão por trypsinização. Não apenas os aglomerados se desmancham, ficando bem claro o número exato de células que as compõem, quanto também as células perdem sua característica forma achatada ao tornarem-se, sem pontos de adesão, arredondadas. Acompanhamos nas figuras acima um exemplo destes efeitos, percebe-se inclusive que muitas células saem do foco por já estarem em suspensão.

⁴ver Apêndice

5.5.2. Padrões de crescimento correlacionado a organização fenotípica de carcinoma de cólon, glioma maligno e linhas celulares de carcinoma de células não-pequenas de pulmão

Seguem abaixo os resultados obtidos numa colaboração do Laboratório de Estrutura Celular (LabCel) do Instituto de Física da UFRGS, com o departamento de Bioquímica do Instituto de Biociências da UFRGS, mediado por Mauro A. A. Castro. Nosso trabalho visa comparar dinâmicas de crescimento populacional de células entre várias linhagens de câncer, e, dentro da mesma linhagem, observar efeitos das configurações nos comportamentos individuais de células.

Reproduzimos praticamente na íntegra o artigo de Castro, Klamt, Grieneisen, Grivicich, e Moreira (2003) resultante desta colaboração.

Inicia-se com uma descrição geral do estudo na qual resumimos o que pretendemos analisar e citamos quais as mudanças introduzidas ao modelo. Procuramos deixar certos detalhes biológicos mais claros para o leitor que não é advindo da área das ciências biológicas. Em seguida, resumimos as conclusões da discussão anterior (seção 5.2 na página 108) referente à importância das propriedades fenotípicas (grau de extensão de células) no processo da mitose. A intenção desta sinopse é deixar mais evidente a motivação que nos levou a fazer estas medidas e modificações ao modelo.

Prosseguimos citando rapidamente os métodos de cultura de células, obtenção das curvas de crescimento experimental e análise estatística. Nos resultados, analisamos as medidas e propomos uma explicação do modelo em termos destes dados (melhor parte!). Finalmente na discussão, retomamos parte da discussão feita anteriormente e indagamos quais são as implicações das correlações que encontramos.

Descrição geral do estudo

Neste estudo apresentamos o modelo de Gompertz para crescimento celular como função de certas propriedades fenotípicas das células, usando seis linhagens de tumores humanos. Quando referimos a carcinoma estamos tratando necessariamente de neoplasias de origem epitelial.

No pulmão existem dois grandes grupos de carcinoma broncogênico: carcinoma de pequenas células e carcinoma de não-pequenas células. Esta divisão se baseia na resposta a terapias disponíveis, tendo o grupo de pequenas células uma resposta inicial alta a quimioterapia enquanto a de não-pequenas células são menos responsivos. O tumor de pequenas células também se caracteriza por se espalhar mais nos tecidos (metástases), aparentemente sendo menos aderentes, enquanto os de não-pequenas células se

mantém em focos. O grupo de carcinoma de não-pequenas células corresponde a 75% das neoplasias malignas de pulmão. No estudo, utilizamos 3 linhagens de células não-pequenas de pulmão. São elas⁵:

A-549
NCI-H596
NCI-H520

A quarta linhagem estudada foi de glioma maligno. Gliomas derivam das células gliais, que são células que atuam no sistema de sustentação dos neurônios.

U-251

E finalmente, seguem as linhagens de carcinoma de cólon:

HT-29
SW-620

Dito quais são as linhagens estudadas, prosseguimos com uma descrição rápida da metodologia utilizada para obter as curvas de crescimento.

Foram feitas medidas de células em monocamadas apresentando crescimento exponencial em várias densidades, via coloração com *SRB*⁶ para obter as curvas de crescimento celular. *SRB* é um corante utilizado para marcar aminoácidos básicos. Existe uma correlação direta entre o grau de impregnação do corante e o conteúdo protéico da amostra de células. Assim, pode-se determinar a densidade celular. Observamos que este processo somente é confiável quando feito em células vivas pois, ao morrer, células rapidamente acidificam-se, alterando a impregnação e conseqüentemente, a relação impregnação-proteína-densidade celular.

A equação de Gompertz foi ajustada aos dados experimentais para obter de cada linhagem os três parâmetros empíricos de crescimento: densidade celular inicial, taxa de crescimento celular e capacidade máxima de carga. Isto é um procedimento empírico tradicional. A contribuição nova deste trabalho foi introduzir um parâmetro para o formato celular estabelecido, que chamamos de coeficiente de deformação *D*. Este parâmetro relaciona morfológicamente as células estendidas (quando células se encontram em baixa densidade sobre uma matriz aderente) com as em confluência (densidade alta). Ele foi relacionado por análise regressiva com o parâmetro de taxa de crescimento relativo β descrito pela equação de Gompertz 5.4.4. Concluímos que o coeficiente *D* é diretamente proporcional ao parâmetro de crescimento β . A curva ajustada se mostra significativamente de acordo com os dados empíricos ($P < 0.05$), com o coeficiente de correlação de 0.9152.

⁵Estes nomes são apenas códigos para descrever a linhagem. Aqui, por exemplo, NCI corresponde a *National Cancer Institute*.

⁶sulforrodamina- β

Em súmula, vamos demonstrar que uma função modificada de crescimento Gompertz foi obtida utilizando D . O grau de correlação entre o parâmetro de crescimento Gompertziano com o coeficiente D nos leva a uma nova interpretação do parâmetro de crescimento β com base em medidas morfológicas de um grupo de tipos de células tumorais, e corrobora a idéia de que a cinética de crescimento celular pode ser modulada pela organização fenotípica de células aderidas.

Introdução

Em estudos anteriores de três linhagens de células não-pequenas de pulmão, *Castro (1999)* abordou a questão se crescimentos em duas e três dimensões obedecem uma dinâmica geral. Ele mostrou que o uso de análises morfométricas na descrição de cada linhagem celular indicavam que existia uma modulação de crescimento por fenótipo como função de densidade celular. Aqui também estamos fornecendo uma interpretação fenotípica do modelo de Gompertz de acordo com as configurações de crescimento de seis linhagens celulares de tumor. Este modelo matemático pode expressar uma propriedade de crescimento celular como um processo auto-organizado modulado pela geometria individual da célula.

Como já foi tratado no trabalho de Castro, Schwartsmann, e Moreira (2001), dentre os vários modelos clássicos para descrever crescimento tumoral, o modelo de Gompertz fornece uma correspondência satisfatória ao fitar medidas experimentais.

O comportamento de crescimento, como já discutimos anteriormente, possui um primeiro estágio de crescimento exponencial, depois do qual satura, se aproximando a um plateau que corresponde ao aumento do tumor. A característica essencial desta descrição  algum mecanismo de inibição que aparece com números assintoticamente crescente de células (Norton *et al.*, 1976). Foi proposto que a compressão da forma celular em células confluentes poderia controlar este processo realimentativo inibitório (Wang e Zuidhof, 2004; Olive e Durand, 1994). Como já observamos, Chen *et al.* (1997) verificaram que,  medida que as células se arredondam, a síntese de DNA gradualmente pra. De modo inverso, a maioria das células necessitam da extensão num substrato para exercer suas funções de modo normal (Ruoslahti, 1997). Tais relações entre crescimento e forma discutidas na seção 5.2, são tratados aqui por análise regressiva de um parâmetro de deformação celular que descreve a amplitude das variações da forma celular, mostrando correlação positiva com os parâmetro cinéticos de crescimento como descrito pelo modelo de Gompertz. Por outro lado, vale mencionar que leucemia, proliferação de leucócitos transformados, que não se enquadram nos modelos de tumores sólidos, também foram observados a se caracterizarem por uma dinâmica Gompertziana (Afenya e Calderon, 2000).

Métodos e Materiais

Cultura de Células. As linhagens de carcinoma de pulmão de não-pequenas células, A-549, NCI-H596 e NCI-H520, as linhagens de células de carcinoma de colo de útero SW-620 e HT-29 e a linhagem de glioma maligno U-251 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA). Todas as linhagens de células cresceram como monocamada aderente em frascos de 25cm^2 a 25°C numa atmosfera umidificada de 5% de CO_2 e mantidas no meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 com 10% FCS. Tratamento por tripsina foi efetuada a 37°C por 2min com a mistura de 0.05% tripsina e 0.02% EDTA. Após tripsinização, células foram contadas numa câmara hemocitométrica⁷.

Curvas de Crescimento Celulares. Células foram separadas em suspensões viáveis em meio de cultura pela tripsinização e semeadas em placas de 96 poços de cultura na densidade de $7.5 \times 10^3 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2}$ (densidade inicial de células). A proliferação celular foi feita a 37°C numa atmosfera umidificada de 5% CO_2 por no mínimo 1 semana. O meio foi trocado a cada 48h após semeadura e o número de células foi determinada periodicamente por coloração de SRB.

As células aderentes foram fixadas *in situ* ao se adicionar $50\mu\text{l}$ de TCA⁸ 50% frio (concentração final - TCA 10%) por 60min a 4°C . Após retirarmos a solução de TCA, as placas foram lavadas cinco vezes com água deionizada e secadas. Cem micro litros de solução SRB (0.4% e 1% de ácido ascético w/v) foram adicionados a cada poço e as culturas então encubadas por 10min a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). O SRB não reagido foi removido por cinco lavagens com ácido acético 1%. Este é um passo crucial, pois queremos medir apenas o SRB ligado às proteínas celulares. Por isto é importante primeiramente fazer o tratamento com TCA, para esta lavagem ser possível sem a perda de células.

As placas foram secadas ao ar. O corante ligado foi solubilizado com Tris buffer, e a absorbância foi obtida por um leitor de placa espectrofotométrica automatizada no comprimento de onda 515nm. Observamos que a relação absorbância-densidade celular é estipulada anteriormente por parâmetros conhecidos de densidades. Esta calibração deve ser refeita para cada tipo (linhagem) de célula utilizada. O crescimento celular foi medido pelo procedimento de coloração SRB por determinação de proteínas de toda cultura, mostrando sensibilidade e reprodutibilidade. Por causa de seu grande alcance linear, o SRB é ideal para estudar não apenas culturas de baixa densidade, mas também monocamadas quase-confluentes e aglomerados de células em multicamadas contendo grandes quantidades de células (Keepers *et al.*, 1991; Pizao *et al.*, 1992).

⁷É uma placa sob a qual estão definidos regiões que vão facilitar a contagem 'manual' de células num volume de $100\mu\text{l}$.

⁸Precipita proteínas, fixando as células no substrato. Assim, as células podem ser coradas e lavadas sem alterar o número.

Curvas ajustadas e Análise de regressão não-linear. O crescimento tumoral foi caracterizado de acordo com o modelo de Gompertz ao ajustar a equação de Gompertz aos dados individuais de cada linhagem celular (Norton *et al.*, 1976). Vimos na subseção 5.4 na página 118, que este modelo se mostra extremamente adequado ao descrever vários processos de crescimentos biológicos. Esta equação pode ser reescrita como.

$$(5.5.1) \quad \frac{dN}{dt} = \beta \cdot N \cdot \ln\left(\frac{A}{N}\right),$$

sendo $n(t)$ o número de células no tempo t e A , a capacidade máxima do sistema.

A solução da equação 5.5.1,

$$(5.5.2) \quad N(t) = A \cdot \exp\left[-\ln\left(\frac{A}{N_0}\right) \cdot \exp(-\beta \cdot t)\right],$$

foi ajustada para cada linhagem tumoral usando o método de mínimos quadrados aos dados experimentais das densidades celulares como função de tempo. Iniciamos na densidade de $7500 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2}$. Os parâmetros de crescimento foram obtidos utilizando o pacote de regressão não-linear SPSS (Chicago, Illinois, USA) pelo método Marquardt.

Medidas de formato celular e análise estatística. A partir das fotomicrografias de contraste de fase de células fixadas a densidades de dispersão (células rarefeitas) e de confluência (monocamada de células, formando um ‘tapete’), medidas morfométricas foram obtidas pelo programa de análise NIH-image⁹. Pelo menos 30 células em três experimentos foram medidas para estimar os parâmetros de formato de cada linhagem. A correlação das variáveis contínuas foram analisadas pelo coeficiente de correlação Pearson. Expressamos os dados por suas médias acompanhadas pelo desvio padrão, com o nível de significância de grupo em $P < 0.05$.

Resultados

A polaridade do formato de células aderidas é descrita neste trabalho pela razão entre dois diâmetros ortogonais da célula, como ilustrada na figura 5.5.2 ao se comparar células morfologicamente distintas. A razão entre o diâmetro maior r_i com o diâmetro menor r_j resulta na polaridade da célula,

$$(5.5.3) \quad f = \frac{r_i}{r_j},$$

que é um parâmetro maior ou igual a 1, sendo que $f = 1$ representa células perfeitamente esféricas. A amplitude da variação desta polaridade é expressa pelo coeficiente $D \geq 0$,

⁹software de domínio público disponível no site <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>

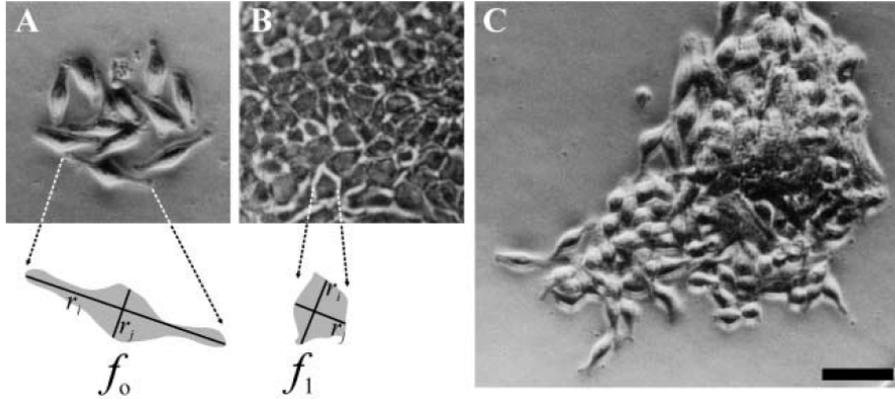


FIGURA 5.5.2. PARÂMETRO D . Fotomicrografias de contraste de fase. Situação (A) representa células a baixa densidade (situação de dispersão) na qual as células são capazes de se estender melhor sobre o substrato. A imagem (B) mostra a mesma linhagem numa situação de confluência; nestas condições elas se encontram menos estendidas. Usando o programa NIH-image medimos os diâmetros perpendiculares (r_i, r_j) de ambas as situações. Um foco de células contendo uma gama ampla de distorções está visível na imagem (C), e exemplifica a amplitude do coeficiente de distorção D , expressa como $D = f_o/f_1$. A barra é de $50\mu\text{m}$.

$$(5.5.4) \quad D = \frac{f_o}{f_1} - 1,$$

onde f_o corresponde a células de culturas esparsas e f_1 a polaridade de células em confluência. O parâmetro D pode ser interpretado como sendo um coeficiente de deformação morfológica das células aderidas. Medidas similares de células foram feitas para caracterizar a heterogeneidade de células aderidas (Thoumine *et al.*, 1995). Os parâmetros da forma obtidos estão apresentados na tabela 5.5.1 na próxima página, mas em forma de médias. Desta maneira, de agora adiante, redefinimos $f_o = \overline{f_o}$ e $f_1 = \overline{f_1}$ como sendo as médias das polaridades de uma dada linhagem, quando respectivamente estiverem dispersas e confluentes. O coeficiente $D = \overline{D}$ em função destas médias corresponde a deformação morfológica das células aderidas *típica de cada linhagem*.

Para poder comparar D com os parâmetros cinéticos de crescimento celular, as linhagens de células foram semeadas a $7500 \frac{\text{celulas}}{\text{cm}^2}$ e incubadas por pelo menos uma semana para produzir as curvas de crescimento apresentadas em 5.5.3. A cada linhagem de células ajustamos a solução da equação diferencial de Gompertz, equação 5.5.2. As melhores curvas de fato representam bem as medidas observadas no crescimento das células tumorais.

Linagem	Polaridade \bar{f}_0	Polaridade \bar{f}_1	Deformação \bar{D}	Const. de Crescimento $\bar{\beta}$
A-549	3.72±0.19	1.96±0.17	0.80±0.22	0.68±0.14
NCI-H596	3.10±0.34	2.02±0.21	0.53±0.16	0.47±0.08
NCI-H520	1.82±0.08	1.37±0.09	0.33±0.05	0.32±0.09
HT-29	2.33±0.61	1.40±0.23	0.67±0.12	0.76±0.18
SW-620	2.63±0.92	1.30±0.20	1.03±0.17	0.91±0.26
U-251	4.54±1.92	3.55±1.12	0.32±0.06	0.38±0.16

TABELA 5.5.1. PARÂMETROS DE FORMA E DE CRESCIMENTO. Os desvios foram dados. Para cada experiência utilizamos pelo menos 30 células para estimar os parâmetros morfológicos de cada grupo. As polaridades se referem a células em situações esparsas (\bar{f}_0) e em confluência (\bar{f}_1). O coeficiente de deformação \bar{D} vai de acordo com a equação 5.5.4. A constante de crescimento β foi obtida ao fitar a equação de Gompertz aos dados representados na figura 5.5.3. Onde $\bar{\beta}$ é a média das constantes de crescimento, juntamente com o desvio padrão da média, de três diferentes dados de crescimento de cada linha.

A constante β derivada de tais aproximações está representada na tabela 5.5.1 e é descrita como sendo o parâmetro de crescimento, de acordo com o modelo de Gompertz. Verificando a hipótese de que β é proporcional a D , quando β é plotado contra D no gráfico 5.5.4 para cada linhagem, a relação linear exhibe um coeficiente de correlação de 0.9152 ($P < 0.05$). Este grau de correlação entre β e D permite, para estas células tumorais, uma nova interpretação de β com base numa estimativa de D produzida pelas medidas morfométricas. A equação 5.5.2 em vista disto pode ser reescrita como

$$(5.5.5) \quad N(t) = A \cdot \exp\left[-\ln\left(\frac{A}{n_0}\right) \cdot \exp\left(- (D - m) \cdot \frac{t}{u}\right)\right],$$

uma equação de Gompertz com uma variável fenotípica D com constantes u e m derivadas da equação regressiva $D = u \cdot \beta + m$. Embora a tabela 5.5.1 com seis linhagens de células oferece apenas um conjunto limitado de pontos para se poder assumir uma linearidade universal aplicável a diferentes modelos de crescimento tumoral, como por exemplo em culturas celulares em suspensão (Olive e Durand, 1994), nossas observações são representativas para linhagens de células tumorais que estabelecem monocamadas. Deste modo, a premissa na qual está baseada a equação 5.5.5 é que o número de células medidas, que varia com o tempo, $N(t)$, como descrito pelo modelo de Gompertz 5.5.1, depende de uma taxa de crescimento fenotípica.

Apresentamos na seção 5.5.5 a simulação de crescimento celular utilizando a equação 5.5.5 em vez da equação 5.5.2. As melhores aproximações - que podem ser vistas na figura 5.5.3 - também estão representadas na figura 5.5.5. A taxa de crescimento foi a única diferença entre as equações

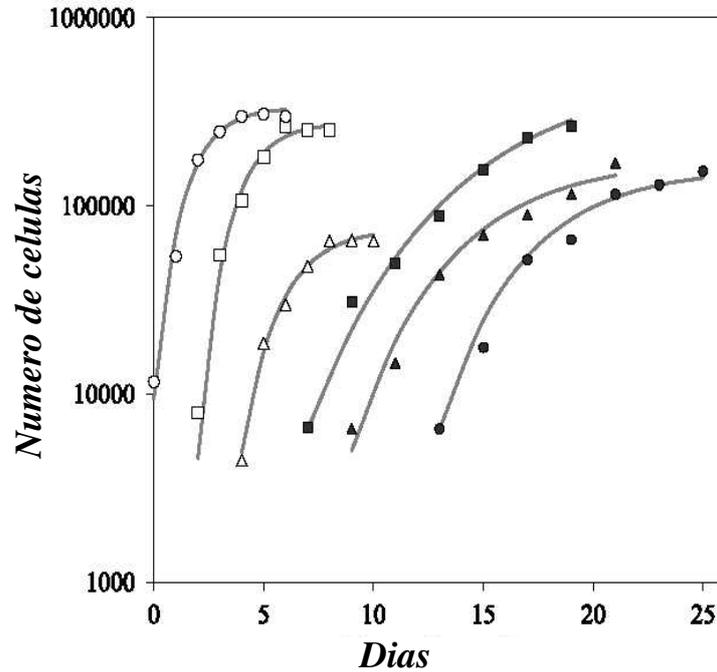


FIGURA 5.5.3. PROLIFERAÇÃO DE MONOCAMADAS. As linhas sólidas são as melhores aproximações da equação de Gompertz aos dados experimentais, que estão representados pelos pontos: SW-620 (\circ), HT-29 (\square), U-251(\triangle), NCI-H250 (\bullet), NCI-H296(\blacksquare), A-549(\blacktriangle). O eixo da densidade celular está em escala logarítmica. As constantes de crescimento (β) correspondentes a cada linhagem são obtidas das curvas de melhor ajuste e se encontram listadas na tabela 5.5.1 e representados na figura 5.5.4 juntamente com os coeficientes de deformação. Cada símbolo representa o valor médio de pelo menos três experimentos. Os desvios padrões tipicamente estão em torno de 10% do número médio de células.

5.5.2 e 5.5.5 para cada linhagem de célula, pois β foi substituído pelo coeficiente D (juntamente com $u + m$ constantes).

Finalmente, podemos chegar à mesma conclusão de que $\beta \propto D$ teoricamente, ao assumir algumas hipóteses (duas, mais especificamente). Consideramos a polaridade média apresentada por uma linhagem de células, f , como sendo uma função contínua dependente da densidade celular da população, ou seja, $f(\text{densidade})$. Como estando sempre trabalhando com superfícies de áreas constantes, podemos escrever esta dependência diretamente em função do número de células, $f(N)$, de maneira que a polaridade apresentada em confluência é aquela estabelecida quando a população atinge sua capacidade máxima, ou seja, $f(A) = f_1$. Estipulamos ainda um

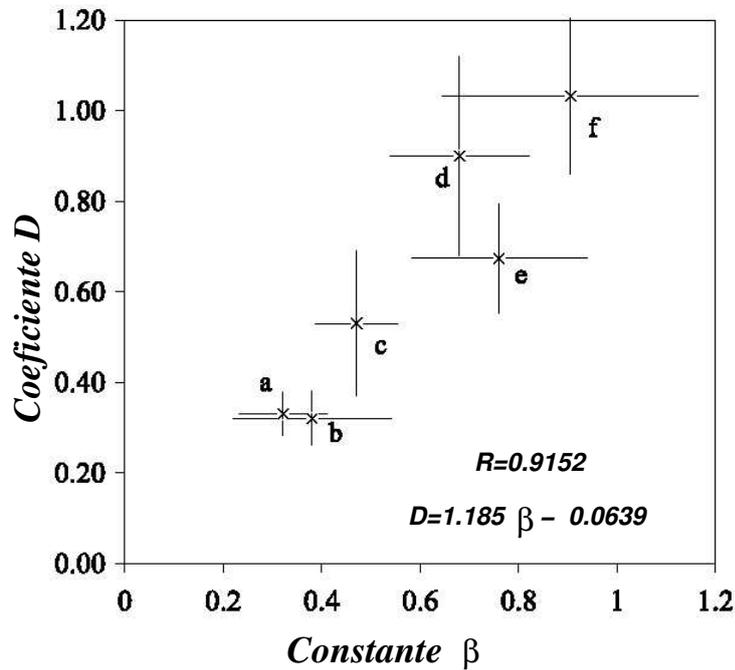


FIGURA 5.5.4. CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETRO DE CRESCIMENTO β E COEFICIENTE D . Cada ponto representa os pares (β, D) determinados pelas medidas morfométricas (pelas medidas dos diâmetros) indicadas na figura 5.5.2 e das curvas de melhor ajuste apresentados na figura 5.5.3 para as linhagens celulares U-251 (a), NCI-H520(b), NCI-H596 (c), HT-29 (d), A-549 (e) e SW-620 (f). O conjunto total de dados está contido na tabela 5.5.1, incluindo as barras de erro para cada parâmetro. O coeficiente de correlação de Pearson da equação regressiva $D = u \cdot \beta + m$ está incluído. Os valores de u e m foram determinados experimentalmente. A correlação é significativa com $P < 0.05$.

número de células N_0 como representando um valor qualquer na qual as células se encontram esparsas, de modo que podemos escrever $f(N_0) = f_0$.

Dito isto, imaginamos uma dependência entre a 'densidade' e a polaridade logarítmica. Nossa primeira hipótese fica pode ser escrita como

$$(5.5.6) \quad f(N) = f(A) + \left[\frac{(f(N_0) - f(A))}{f(A)} \right] \cdot \ln\left(\frac{A}{N_1}\right),$$

lembrando que $N_0 \ll A$ e que $f(N) = \frac{r_i(N)}{r_j(N)}$ representa agora não a distorção de apenas uma célula, mas a distorção média para a linhagem com uma determinada população. Definimos uma função α como função das polaridades e do número da população,

$$(5.5.7) \quad \alpha(N) \propto \left[\frac{(f(N) - f(A))}{f(A)} \right] \cdot \ln\left(\frac{A}{N_0}\right).$$

Assim, como o crescimento Gompertziano é dado por

$$(5.5.8) \quad \frac{dN}{dt} = \alpha(N) \cdot N,$$

temos que

$$(5.5.9) \quad \alpha(N) = \beta \cdot \ln \frac{A}{N};$$

ao substituir a equação 5.5.6 na equação 5.5.7 e comparando isto com a equação 5.5.9, encontramos que

$$(5.5.10) \quad \beta \propto \frac{f_0}{f_1} - 1 = D,$$

onde usamos novamente que $f_0 = f(N_0)$ e $f_1 = f(A)$. A premissa da expressão 5.5.6 diz que a polaridade mensurável da linhagem de célula $f(N)$ varia logaritmicamente com N . Mostramos na tabela 5.5.2 os dados experimentais adicionais de três linhagens em quatro densidades diferentes que corroboram com esta afirmação, onde calculamos e apresentamos as polaridades médias por

$$\langle f(N_{cel}) \rangle = \left[\left(\frac{\sum_{cel}^{N_{cel}} r_i(CEL)}{\sum_{cel} r_j(CEL)} \right) / N_{cel} \right] \pm SD.$$

Finalmente, ao substituir a expressão 5.5.6 na equação 5.5.7 e o resultado subsequente na equação 5.5.8, retornamos aproximadamente à equação de Gompertz na sua forma diferencial:

$$(5.5.11) \quad \frac{dN}{dt} = \left(\frac{f_0}{f_1} - 1 \right) \cdot N \cdot \ln \left(\frac{A}{N} \right),$$

que contém a afirmação de que $D \propto \beta$.

Discussão

Este estudo apresentou o modelo de Gompertz para crescimento celular como sendo dependente do fenótipo celular. Utilizando seis linhagens humanas (A-549, NCI-H596, NCI-H520, HT-29, SW-620 e U-251) nós caracterizamos um parâmetro de morfologia celular (chamado de coeficiente de deformação D) que descreve o aumento do número de células com tempo, estabelecendo uma interpretação morfológica de uma função empírica amplamente usada para fitar crescimento biológico (Bajzer, 1999).

A fim de estimar padrões de crescimento através de medidas morfológicas, podemos considerar que a forma celular representa uma manifestação

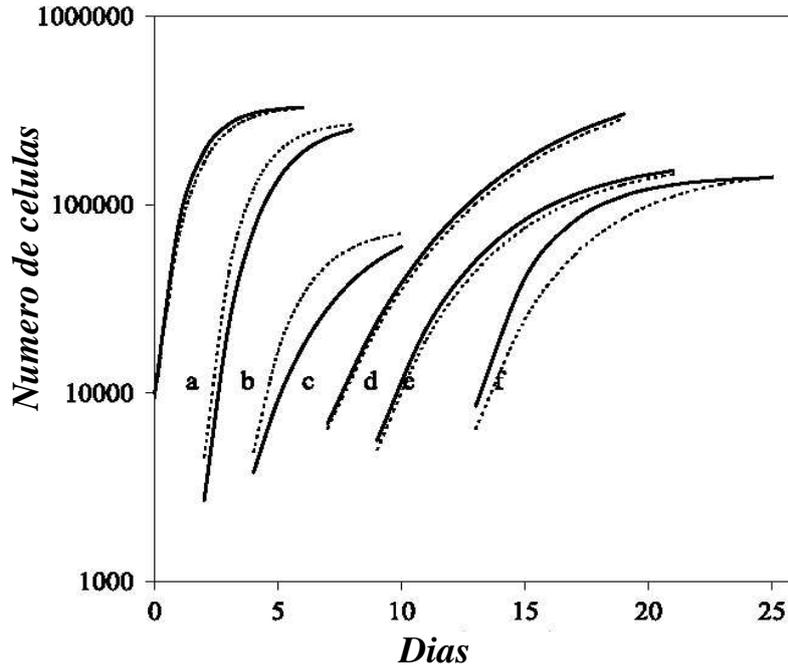


FIGURA 5.5.5. MODELO DE PREDIÇÃO PARA AS CURVAS DE CRESCIMENTO. A equação modificada de Gompertz 5.5.5 foi utilizada para simular o crescimento celular (linhas sólidas) das linhagens SW-620(a), HT-29 (b), U-251 (c), NCI-H520 (d), NCI-H596 (e) e A-549(f). As simulações foram efetuadas com o coeficiente de deformação D e de cada linhagem de célula como apresentado na tabela 5.5.1 e com os constante $u + m$ da equação 5.5.4, de acordo com a descrição da equação 5.5.5. As melhores aproximações aos dados experimentais (linhas pontilhadas) são as mesmas que apresentadas na figura 5.5.3.

A549		NCI-H596		NCI-H520	
Densidade	Polaridade	Densidade	Polaridade	Densidade	Polaridade
20	3.72 ± 0.19	16	3.10 ± 0.24	13	1.82 ± 0.08
40	2.97 ± 0.35	34	2.57 ± 0.55	49	1.72 ± 0.14
95	2.37 ± 0.15	98	2.17 ± 0.12	155	1.57 ± 0.12
140	1.96 ± 0.17	160	2.02 ± 0.21	330	1.37 ± 0.09

TABELA 5.5.2. POLARIDADE COMO FUNÇÃO DAS DENSIDADES CELULARES DE A549, NCI-H596 E NCI-H520. A densidade de células está dada em unidade $\frac{\text{células}}{\text{cm}^2}$. Os valores da polaridade f (expressos na tabela como $\langle f \rangle \pm SD$) foram obtidos ao se medir os diâmetros maiores (r_i) e os menores (r_j) de pelo menos 80 células para cada linhagem nas quatro densidades diferentes.

visual de um equilíbrio subjacente de forças e sinais químicos (Olive e Durand, 1994). De acordo com Ingber *et al.* (1995), a extensão celular por si só foi crítica para a proliferação e aumento de síntese de DNA, indicando que a morfologia celular é determinante na função celular - pelo menos quando na presença de fatores de crescimento ótimos e adesão ao ECM. Em muitas células, as mudanças na morfologia podem estimular proliferação celular através de sinais mediados por integrina, tais como MARKs, que estimula proliferação apenas quando células aderem e se estendem sob um substrato. Isto indica que a forma celular rege a maneira que as células individuais respondem a estímulos químicos (Boudreau e Jones, 1999).

De acordo com estas observações, propusemos a utilização da distorção celular e projeção para modelar a cinética de proliferação celular. A relação média entre diâmetros máximos e mínimos expressas através do coeficiente D fornece a amplitude de distorção celular para cada linhagem a uma dada densidade, que mostramos estar altamente correlacionado com o parâmetro de crescimento Gompertziano. Muitos autores têm tentado explicar o modelo de Gompertz dentro do contexto de crescimento celular: por cinética celular (Byrne, 1997), quiescência celular (Gyllenberg e Webb, 1989), entropia (Calderon e Kwembe, 1991), heterogeneidade tumoral (Kendal, 1993) e por interações celulares (Mombach *et al.*, 2002). De acordo com Vaidya e Alexandro (1982), uma das maiores falhas apresentada pelo modelo Gompertz é que a equação original não foi derivada a partir de uma base de fatos fisiológicos. Porém, apesar da bem-estabelecida verificação do modelo de Gompertz, a sua origem carece de uma interpretação biológica (Norton *et al.*, 1976; Marusic *et al.*, 1994). Por isto, os mecanismos que conectam a morfologia ao aumento populacional dos tumores celular são relevantes na tentativa de fornecer uma maneira alternativa para entender o modelo de Gompertz. De fato, também poderia ser esperado que qualquer uma da variedade de curvas de crescimento - logístico, Bertalanffy, Richards, etc. - pudessem dar lugar a correlação igualmente satisfatória com determinado fenótipo. Esta expectativa requer novas investigações, incluindo um estudo comparativo dos padrões fenotípicos descritos aqui com possíveis inter-relações que possam existir entre os modelos de crescimento biológicos, que estão além do escopo desta dissertação.

De maneira conclusiva, foi possível verificar a existência de uma correlação entre o fenótipo celular e o perfil das curvas de crescimento para cada linhagem. A variabilidade morfológica, que relaciona a polaridade de células cultivadas em baixa densidade com as de confluência está positivamente acoplada com a taxa de crescimento apresentado pelas células.

Nosso estudo sustenta a idéia de que a cinética de crescimento celular pode ser modulada pela organização fenotípica das células aderidas e também tenta entender o crescimento Gompertziano a partir da estrutura celular. A capacidade de estimar os padrões de crescimento de um tipo individual de célula tumoral com base das medidas morfométricas deveria ter aplicabilidade geral em estudos celulares.

5.5.3. Classificação por vídeo-microscopia

Comportamentos que ficaram evidentes ao acompanhar em tempo real a evolução da dinâmica tumoral são as probabilidades mitóticas das células de uma mesma linhagem. Mauro A. A. Castro observou que é possível obter correlações numa configuração de monocamadas entre as células individuais e a sua topografia celular. A distribuição de tamanho e forma dos aglomerados que dão origem a estas diferenças de categorizações de células individuais, também são uma consequência delas, gerando com isto um sistema complexo e interessante. Os dados preliminares sugeriram várias interpretações, e principalmente deram início a perguntas para futuras pesquisas. Estamos no momento ainda obtendo histogramas a partir dos resultados experimentais. Todavia, gostaríamos já de incorporar algumas destas idéias na forma de simulações, para depois comparar as hipóteses com os resultados observados.

5.6. Metadiscussão

Até este momento, para compreender a proliferação de células, olhamos por partes os diferentes níveis de atividade que determina a dinâmica de uma população: primeiramente estudamos o mecanismo regulatório individual de cada célula, em seguida traçamos uma relação entre o funcionamento interno e possíveis estímulos do ambiente. Baseados fortemente em diversas observações experimentais, tentamos isolar possíveis causas das consequências paralelas - o que procuramos fazer com muita cautela visto que sistemas biológicos muitas vezes não possuem uma relação causa-consequência óbvia (sendo inclusive até indistinguíveis). No entanto, ao comparar diversos resultados empíricos, e através de observações próprias, sugerimos que a distorção da célula é um elemento que poderá servir como um parâmetro no ponto de restrição do ciclo mitótico que ajuda a determinar o comportamento de uma célula.

Esta foi a nossa abordagem. Agora porém, gostaríamos de recolocar esta mesma discussão num outro contexto, abordando o problema de um ângulo totalmente diferente. No capítulo 3 vimos o quanto sistemas celulares originados por diferentes princípios compartilham muitas características. Especialmente ao fazermos análises topológicas sobre suas diversas funções de distribuição, suas dinâmicas de crescimento e de *coarsening*, fica evidente que alguns mecanismos fundamentais delineiam todas estas classes de sistemas. De maneira mais específica, quando tratamos de sistemas bidimensionais observamos que existe a tendência da topologia impor o número médio de lados a seis (Lei de von Neumann, 3.1.1 na página 33). Enquanto isto, considerações geométricas apontam para a otimização do perímetro perante a área apresentados pela célula, e finalmente, características mais específicas de cada sistema vão ainda acrescentar outras restrições a estas relações: a dinâmica dos sistemas celulares vai satisfazer funções de minimização que serão dadas pelas energias de fronteira, ou, como no caso

de uma tecido biológico, pela otimização da razão área/perímetro Mombach *et al.* (1993a).

Discutimos a lei de Aboav-Weaire (na página 36), na qual o número médio de lados dos vizinhos de uma célula de n lados obedece a equação 3.1.26, e demonstra a existência de uma forte correlação dos números de lados de células vizinhas *em praticamente todos os sistemas granulares*. Também a lei de Lewis, uma correlação entre lados e área, foi experimentalmente mostrada a descrever algumas células epiteliais. Nossa intenção é agora juntar esta visão topológica com a nossa discussão aqui apresentada sobre mitose, tratando-a, não como um resultado apenas de mecanismos regulatórios da célula, mas como uma terceira transformação topológica. Um dos fatos que promove esta linha de raciocínio é que a estrutura (forma e tamanho) da célula pode também ser tratada como o conflito gerado entre a manutenção da célula e o poder de absorção de nutrientes. Mombach *et al.* (1993b) sugeriram que o processo mitótico serve para garantir esta razão ótima de custo/benefício.

Conectando tais argumentos (Mombach *et al.*, 1993a,b) ao nosso trabalho, podemos considerar deformações críticas como uma reparametrização das constantes que descrevem as funções de distribuições entre número de lados e distribuição de vizinhos, e principalmente da lei de Lewis. Reolocando as conclusões obtidas da polaridade das linhagens de células sob esta ótica, ela se traduziria em dizer que a célula, para passar pela transformação topológica de uma mitose, precisa sair significativamente da sua razão ideal área/volume, sofrer divisão e restabelecer por uma dinâmica de relaxamento as distribuições típicas daquele tecido.

Sugerimos apenas estas possíveis conexões. Necessitaria porém um estudo mais quantificado para determinar a extensão destas analogias. O que deve ser feito é uma análise tanto dos resultados de simulações (Potts) quanto de medidas experimentais, ao tentar acoplar não apenas a dinâmica de proliferação dada pela equação de Gompertz com as propriedades fenotípicas, mas ver o quanto as energias configuracionais e as funções de correlação das situações de confluência das linhagens dependem destes parâmetros. Se uma dependência pode ser averiguada, podemos então perguntar quais são as propriedades mais gerais demonstradas por estes parâmetros.

5.7. Simulações

5.7.1. Implementação de mitose no Modelo de Potts

A citoquinese de uma célula no Modelo Celular de Potts foi implementada em todas as simulações ao se definir um eixo de divisão (em três dimensões isto corresponderia a um plano), seguida por uma nova definição de spin (índice celular) para uma das metades resultantes. Esta divisão será feita ao longo do diâmetro menor da célula. Ambas as células, a do spin novo e do spin anterior, serão denominadas de células filhas. Como neste

momento há uma redução drástica na área¹⁰ das novas células filhas (~ à metade), precisa haver uma renormalização da área alvo que corresponda ao novo tamanho. Do contrário, o termo da energia de área do Hamiltoniano da equação 4.6.1 na página 87 irá dominar de tal modo que estas células tão energeticamente desfavorecidas desapareceriam. Este rescalamento foi feita de diversas maneiras, todas dando resultados satisfatórios. Observamos na subseção 5.1.2 na página 105, que a área da célula dobra durante a interfase que separa as mitoses. Programamos isto no nosso código ao exigir que a célula alcance uma área mínima (menor mas geralmente próximo à área alvo), para se ‘candidatar’ à mitose.

O que podemos controlar neste período de relaxamento é o tempo entre a mitose e a possibilidade da célula novamente realizar mitose. A interfase existente é implementada nas simulações ao se postular um número determinado de passos Monte Carlo (MCS) em que células são impedidas a novamente se dividir. Ressaltamos que isto é um controle extremamente importante para se ter numa simulação, visto que muitos modelos matemáticos (Gyllenberg e Webb, 1989, 1990) se propõem a explicar o crescimento celular em termos de quiescência, e que estas defasagens temporais acarretam complicações ao se fazer predições analíticas.

O eixo de divisão foi definido como passando pelo centro de massa da célula. Após analisarmos muitíssimos exemplos *in vitro*, como foi discutido na subseção 5.5.1 na página 123, estamos convencidos que escolher o menor eixo de uma célula como a bissecção deste não é apenas a opção mais intuitiva, mas também a real.

5.7.1.1. Difusão de nutrientes

Antes de prosseguirmos com simulações em que implementamos as idéias exploradas previamente neste capítulo, iremos por fins ilustrativos mostrar os resultados de um crescimento tumoral na qual células dependem de nutrientes para poder realizar mitose. A saída gráfica vai mostrar para cada tempo duas imagens. A do lado esquerda mostra as células (vista de cima) em *2D*. Mudamos suas cores para representar se sofreram mitose ou não: células verdes são aquelas que nos últimos 500 passos de Monte Carlo estiveram quiescentes, enquanto as células vermelhas representam as que, num período menor que isto, sofreram mitose. A imagem da direita representa o campo de concentração do nutriente, mostrando sua difusão na região onde o agregado está localizado. A cor preta representa a total ausência de nutriente e o gradiente até o branco indica diferentes concentrações. Temos como controlar a taxa de difusão deste nutriente.

¹⁰Como todas as simulações vão ser realizados em *2D*, o tamanho da célula, que normalmente deve ser tratado por um volume, será aqui apenas chamado de área. Portanto, não confundir o termo área com quantidade de membrana, que neste caso se reduz apenas a um perímetro.

Iniciamos a simulação com apenas uma célula central que, através de sucessivas mitoses, e mitoses das células filhas sucessivamente acarreta o crescimento do tumor. Parâmetros essenciais para regular a dinâmica são constantes de acoplamento entre célula-célula e célula-meio ($J_{cel-cel}$, $J_{cel-meio}$), difusão D do nutriente, tamanho necessário para células iniciarem em mitose e a taxa de consumo de nutrientes. As outras constantes necessárias para a simulação celular de Potts são sempre mantidas fixas e, como nas demais simulações deste capítulo, $\lambda = 1$ e $T = 6$.

O campo de concentração de nutriente é implementado na simulação atribuindo a cada sítio da rede um valor real positivo e correspondente à concentração. A equação da difusão é resolvida na rede bidimensional, não pelo método convencional explícito de Euler, mas pelo procedimento implícito de direções alterantes (alternating-direction implicit method, ADI). Este método é utilizado para resolver equações parciais diferenciais em redes e consiste em usar em uma direção o método explícito, neste caso, na qual as taxas de nutrientes a serem redistribuídos dependem apenas dos valores naqueles tempos, enquanto o método implícito (dependência no tempo futuro) é utilizado na direção perpendicular. Para não provocar comportamentos anisotrópicos, alteramos a escolha das direções explícito/implícito no passo seguinte. Este método é computacionalmente muito mais eficiente que métodos puramente implícitos. É também melhor que os métodos puramente explícitos devido a ausência de instabilidade ao utilizar constantes de difusão altas.

Para ainda incorporar a interação das células com os nutrientes, a cada passo Monte Carlo diminuimos estes valores quando há células localizados no mesmo sítio (simulando o consumo do nutriente pela célula). Ao final, calculamos para cada célula a quantidade de nutrientes a que ela tem acesso. Mesmo que a concentração de nutrientes decresce num sítio a medida que uma célula a ocupa, continuamente nutrientes estão difundindo para dentro do tumor através das bordas. Assim, o alcance do nutriente dentro do tumor depende tanto da taxa de consumo das células quanto do coeficiente de difusão.

Todas células possuem a mesma área alvo padrão no começo da simulação e após cada mitose. Esta área alvo aumenta devido o consumo de nutrientes da célula. Implementamos isto através de uma probabilidade de aumento de área que é linear com a quantidade de nutrientes que a célula pode consumir. Quando a célula alcança o dobro do tamanho inicial¹¹ ocorre a mitose, divisão que é feita pelo menor eixo da célula. Neste momento, tanto a célula mãe quanto a filha vão aparecer vermelhas na saída gráfica, passando novamente a verde depois de 500 passos Monte Carlo.

Na figura 5.7.1 na próxima página podemos observar que devido ao acesso aos nutrientes pelo perímetro do tumor, células lá localizadas se encontram mais em mitose. Com o aumento do tumor isto resulta numa razão cada vez menor entre células em mitose e células quiescentes. Nesta figura

¹¹Este é o “ponto de restrição” implementado.

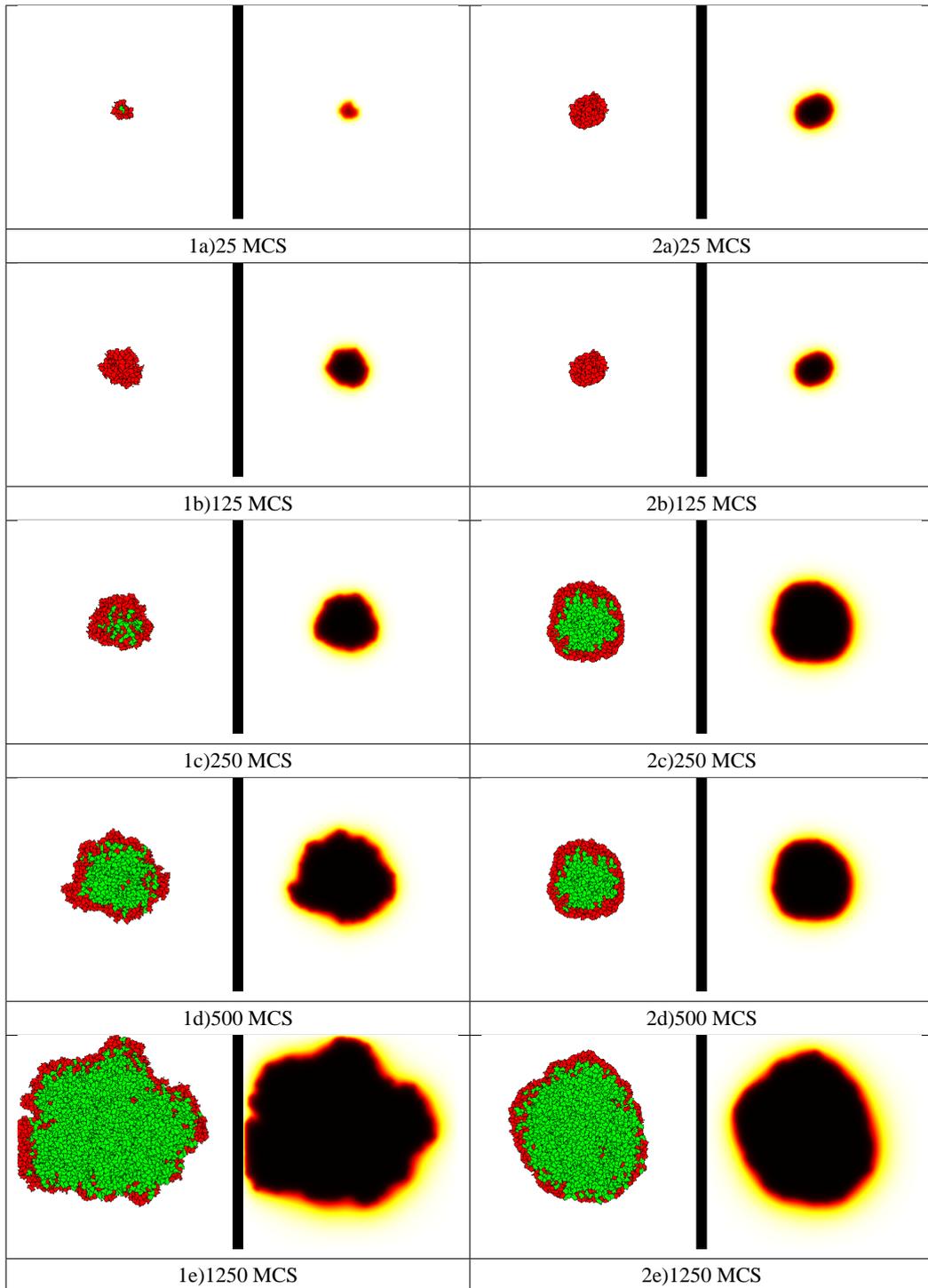


FIGURA 5.7.1. DIFUSÃO DE NUTRIENTES E CRESCIMENTO TUMORAL.

A primeira coluna representa a escolha de valores de acoplamento, $J_{cel-cel} = 1$ e $J_{cel-meio} = 1$ enquanto a segunda corresponde a $J_{cel-cel} = 1$ e $J_{cel-meio} = 2$. Aqui vemos claramente o efeito de saturação que caracteriza a dinâmica de crescimento da lei de Gompertz: nos tempos iniciais existe uma concentração maior de células vermelhas (as que realizaram mitose) que células verdes (mais que 500 passos de Monte Carlo sem realizar mitose), que em comparação com os tempos finais da simulação. Além disto, percebemos que uma maior afinidade com o meio resulta numa borda mais rugosa. Os tempos estão indicados embaixo das figuras em unidades de passo Monte Carlo.

está representado duas evoluções temporais. A primeira coluna mostra a dinâmica para os seguintes parâmetros: $J_{cel-cel} = J_{cel-meio} = 1$; temperatura $T = 4$.

A taxa de consumo e a constante de difusão é mantidas constantes para ambas as simulações. Na segunda coluna a única modificação nos parâmetros consiste em duplicar o valor de acoplamento entre célula e meio. Isto vai levar o tumor a uma configuração na qual ele tende a minimizar o perímetro com o meio, apresentando com isto uma borda mais ‘lisa’. Portanto, a simulação (1), cuja rugosidade na borda é maior, vai apresentar mais células expostas para nutrientes difusivos, e por isto apresenta uma massa tumoral maior. Todas simulações feitas reproduzem esta tendência: rugosidades maiores correspondem a tumores de crescimento mais rápido e saturação mais altas.

Se plotarmos o aumento populacional com o tempo, obteremos curvas que podem ser ajustadas pela equação de Gompertz. Mudando parâmetros da simulação, poderíamos ainda achar correspondências entre estes parâmetros biológicos e as constantes apresentadas pela equação de crescimento de Gompertz. Então diríamos que encontramos a interpretação biológica para o modelo de Gompertz que ajusta bem o comportamento de crescimento das curvas experimentais. Esta interpretação residiria principalmente no fato que existe difusão proveniente das bordas do tumor que causará a diminuição na taxa de crescimento. No entanto, não faremos isto. Apesar da aparente semelhança, entre a teoria e o observado, estaríamos atribuindo o comportamento a uma causa falsa. Nossas experiências *in vitro* foram feitas com monocamadas de células que estão submersas num meio rico em nutrientes. Todas as células têm acesso irrestrito a estes recursos (pelo menos durante o período que registramos). Apesar dos únicos modelos matemáticos do nosso conhecimento que tentaram dar interpretações biológicas a lei de Gompertz terem se baseado no mecanismo de difusão de alguma substância que positivamente estimulasse mitose (Xu, 1987), esta não é a explicação que podemos atribuir às nossas experiências *in vitro*.

5.7.2. Detalhes da mitose regulada por distorção

Finalmente chegamos ao ponto onde implementamos as idéias sobre a influência da distorção na regulação do processo de mitose. Para isto, nós introduzimos a probabilidade de ocorrência de mitose dependente da distorção da célula, como sendo função do sua distorção ϵ . Este parâmetro é definido através do eixo maior e eixo menor da célula. Este eixos são obtidos ao aproximar a célula por uma elipse. A distorção, como definida aqui varia de zero (esferas) até infinito (para o caso extremo de uma célula reduzida a uma linha). Ou seja, escolhemos definir a distorção como¹²

¹²Não confundir este parâmetro com a “deformação” D , definida pela equação 5.5.4 na página 130, pois aquele relacionava graus de distorção apresentadas por uma linhagem de célula em situações diferentes (densidades esparsa/ confluência), enquanto este, ϵ , mede

$$(5.7.1) \quad \varepsilon = \frac{\text{eixo maior}}{\text{eixo menor}} - 1.$$

A informação sobre o ciclo celular é implementada da seguinte maneira, a cada passo de Monte Carlo passamos por todas as células e calculamos a probabilidade P_m dela sofrer mitose. Esta probabilidade é zero caso o período entre a última mitose e aquele momento (Δt_σ) for menor que o tempo de interfase, parâmetro que determinamos previamente em cada simulação. Efetivamente, isto significa que ao passar por uma célula, verificamos primeiramente se ela já pode se candidatar à mitose devido ao tempo desde a sua criação.

Além deste período que separam possíveis mitoses, existem também as condições do ponto de restrição. Uma das nossas simulações incorpora a difusão de nutrientes, sendo que a quantidade de nutrientes absorvidos por uma célula é determinante para a decisão de entrada na mitose. Porém, em outras simulações não tratamos com esta condição, pois estamos considerando o regime onde todas as células têm acesso à mesma quantidade ilimitada de fatores de crescimento e nutrientes.

No entanto, em todos os casos, é imprescindível estabelecer uma área mínima necessária para a célula entrar em mitose. Em vista disto, introduzimos um parâmetro que determinará a área mínima que uma célula deverá apresentar para poder entrar em mitose, que denominamos A_{min} , e que corresponde ao caso biológico da verificação de tamanho que ocorre em células no ponto de restrição. Assim, resumimos estas características como

$$(5.7.2) \quad P_m = \begin{cases} 0 & \text{se } \Delta t_\sigma < T_{interfase} \text{ ou } a_\sigma < A_{min} \\ \propto p_m(\varepsilon_\sigma) & \text{se } a_\sigma \geq A_{min} \text{ e } \Delta t_\sigma \geq T_{interfase} \end{cases},$$

onde $p_m(\varepsilon_\sigma)$ dá a probabilidade de mitose dado que a distorção da célula é ε_σ .

A hipótese que levantamos para interpretar as observações a cerca de células cancerosas apresentarem um invasividade devido a perda da inibição por contato implica, de alguma maneira, que autoregulação devido ao fenótipo que controla o comportamento mitótico ficou significativamente reduzida. Ou seja, células cancerosas em confluência, que estarão necessariamente mais arredondadas, não ‘sentirão’ tão claramente os sinais comuns a este fenótipo e continuarão realizando mitose, resultando em metástases etc. Seguindo a terminologia introduzida ao explicar o ciclo regulatório celular (subseção 5.1.2), e inspirados na discussão do comportamento celular com função de forma, estamos supondo um requerimento ‘extra’ para a célula passar do ponto de restrição (da fase G_1 para S) - a de apresentar uma

a distorção aparente da célula. Também não confundir com o parâmetro f da equação 5.5.3 na página 129: neste caso, o que chamamos de distorção é $\varepsilon = f - 1$.

distorção mínima. Vamos introduzir este requerimento de maneira estocástica a estipular uma função de probabilidade ($p_m(\varepsilon)$) que depende de uma distorção crítica a partir da qual mitoses ficam significativas. Esta probabilidade é, portanto, dependente da distorção. Uma vez que a distorção pode variar significativamente por flutuações, achamos mais realístico olhar para o ‘alongamento integrada’ da célula, ε_σ , sendo esta a média da sua distorção nos últimos, digamos, 200 passos de Monte Carlo (valor que utilizaremos para todas as simulações feitas aqui).

Finalmente, escolhemos para definir $p_m(\varepsilon_\sigma)$ a função sigmoideal, dada por

$$(5.7.3) \quad p_m(\varepsilon_\sigma) = \frac{\varepsilon_\sigma^h \cdot H}{\varepsilon_\sigma^h + B^h},$$

onde chamamos h de coeficiente de inclinação, que vai definir o quão íngreme é nossa função; B é a mitose crítica e H estipula a probabilidade máxima de mitose por passo de Monte Carlo. Por motivos de ilustração, para h grandes a equação 5.7.3 tende a uma equação Heaviside da forma

$$(5.7.4) \quad p_m(x) \sim H \cdot \Phi(x - B).$$

As interpretações “biológicas” das constantes estão descritas abaixo.

h : coeficiente de inclinação - vai ditar quão rígido é a regulação via distorção. Para h pequeno isto significa que mesmo distorções menores que a distorção crítica vão acarretar numa razoável probabilidade de mitose. Ao aumentar este coeficiente estamos fortalecendo a regulação por distorção de maneira mais definida.

H : probabilidade máxima. Uma célula que se mostra extremamente distorcida, ou passando do ponto crítico para h alto, vai no máximo sofrer uma probabilidade H de mitose por cada passo de Monte Carlo. Vamos manter este parâmetro constante durante as simulações para melhor entendermos o efeito das outros.

B : distorção crítica. Esta é a distorção que vai definir o ponto de inflexão. A célula que alcança uma média de distorção no valor B vai sofrer mitose com uma probabilidade $\frac{1}{2}H$. Para h alto, distorções acima de B já correspondem a probabilidade máxima de mitose.

5.7.3. Resultados das simulações implementadas com a hipótese da mitose dependente de distorção celular

Nas próximas simulações, estamos interessados em estudar os efeitos que diversas combinações de valores de acoplamento célula-célula e célula-substrato podem exercer na resposta populacional do tumor. Mostramos para um mesmo tempo de Monte Carlo o resultado como duas imagens nas figuras 5.7.2, 5.7.3 e 5.7.4. A superior (ou a da direita) vai representar via cores o número de mitoses que cada célula sofreu.

A cor marrom corresponde a células que não sofreram nenhuma mitose, quando ocorreu uma mitose a cor passa para marrom esverdeado, sucessivamente ficando mais verde com número de mitose (verde claro = 6 mitoses) chegando a cores amarelas (amarelo puro = 9 mitoses, amarelo leve = 12 mitoses, areia = 14 mitoses). Quando o número de mitoses realizados exceder a 21, o gradiente de cores muda para tons de azul escuro.

Enquanto a imagem superior (ou da direita) representa o número de mitoses por célula, a inferior (ou a da esquerda) mostra em tons verdes a distorção de cada célula. As cores escuras representam pouca distorção enquanto as mais claras mostram a célula em vários graus de distorção. Observamos que logo após uma mitose, as células tomam um aspecto escuro, refletindo que momentaneamente elas se encontram mais arredondadas devido as conseqüências morfológicas de terem sido divididas a partir do eixo menor da célula-mãe.

5.7.3.1. Simulação de mitose regulada por distorção sem interações célula-substrato (ECM)

Nas seguintes simulações incorporamos a expressão de mitose da equação 5.7.3 no comportamento celular. Existe apenas um tipo de célula e o meio. Ou seja, definimos os parâmetros $J_{cel,cel}$ e $J_{cel,meio}$. Observamos que a interação com o meio vai influenciar na rugosidade da superfície do tumor, porém, não se percebe efeitos de borda. Isto é, o comportamento típico de um crescimento inicial alto seguido por uma diminuição da taxa de proliferação não foi observado nestas simulações. Para visualizar isto, mostramos na figura 5.7.2 na página seguinte exemplos da evolução tumoral para vários valores de acoplamentos.

Nas simulações expostas pela figura 5.7.2 mantemos os parâmetros que parametrizam o comportamento mitótico iguais. São eles: constante de inclinação $h = 4$, distorção crítica $B = 0.5$, taxa máxima de mitose $H = 0.01$, tempo de interfase $Tempo_{interfase} = 100$, área alvo $A_A = 60$, constante de elasticidade $\lambda = 1$ e temperatura $T = 6$.

Os resultados indicam que, mesmo variando todos os possíveis valores de adesividade versus. coesão intercelular, não obtemos a dinâmica prevista pela teoria, isto quer dizer, que células da borda conseguem se distorcer mais.

A interpretação destes resultados, reside no fato que a célula vai se distorcer tanto por contatos célula-célula quanto por contatos com o meio, não havendo assim uma regulação por fenótipo que possa depender da localização da célula no tumor. De maneira sucinta, não existe diferenças significativas fenotípicas entre células da borda e células centrais. Isto claramente vai contra observações *in vitro* e *in vivo*. Como a distorção é a mesma, a taxa de mitose é a mesma tanto para células da borda como células centrais, indicando que não há possibilidade de um crescimento Gompertziano. O motivo que estas experiência *in silico* não conseguem reproduzir o efeito de saturação tumoral não reside imediatamente em alguma falha da hipótese

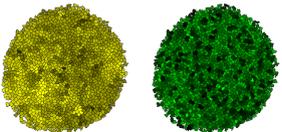
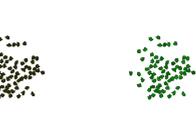
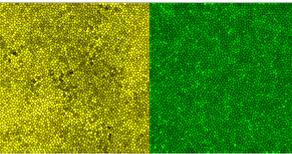
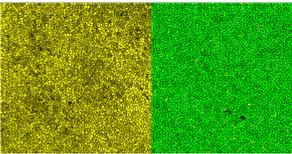
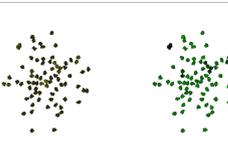
$J_{cel,meio} = 2J_{cel,cel} = 6,$	$J_{cel,meio} = 4, J_{cel,cel} = 2$	$J_{cel,meio} = 4, J_{cel,cel} = 10$	$J_{cel,meio} = 6, J_{cel,cel} = 6$
			
200 MCS	200 MCS	200 MCS	200 MCS
			
2000 MCS	2000 MCS	2000 MCS	3000 MCS
			
4000 MCS	4000 MCS	4000 MCS	4000 MCS
			
6000 MCS	6000 MCS	6000 MCS	6000 MCS
			
10000 MCS	10000 MCS	10000 MCS	10000 MCS

FIGURA 5.7.2. DINÂMICA NÃO-GOMPERTZIANA DE CRESCIMENTO TUMORAL SEM SUBSTRATO. Para três situações diferentes, referentes a valores de acoplamentos diferentes entre células e células e meio, vemos que, apesar das configurações mudarem, nenhum dos comportamentos favorece mitose na borda do tumor. Todos os demais parâmetros da simulação são mantidas iguais. O tempo está representado abaixo das figuras em unidades de passos de Monte Carlo.

da mitose dependente de distorção celular, mas na falta total da incorporação de uma interação essencial para a geração do formato celular: a matriz extracelular.

5.7.3.2. Simulação de mitose regulada por distorção e interações célula-substrato (ECM)

Nestas simulações, estamos interessados em estudar os efeitos que diversas combinações de valores de acoplamento célula-célula e célula-substrato podem exercer na resposta populacional do tumor. Para uma melhor visualização consideramos agora a simulação em um substrato unidimensional com a segunda dimensão espacial representando a direção perpendicular ao substrato: isto possibilita às células superporem-se.

Efeito da adesividade do substrato

Este é certamente o resultados mais importante desta simulação, pois corroboram com nossas suposições acerca da regulação de mitose por fenótipo. Ao aumentar a adesividade do substrato, as células da borda irão cada vez mais se deformar mais. Esta distorção acarreta uma alta probabilidade de mitose, de modo que a adesividade do substrato indiretamente estimula o crescimento do tumor. Observamos ainda que a maior contribuição para o crescimento do tumor provém das mitose sofridas pelas células da periferia, que, ao final de uma simulação de 20000 passos de Monte Carlo podem chegar a fazer 40 vezes mais mitoses que células centrais. A figura 5.7.3 na próxima página compara duas situações na qual alteramos as constantes de acoplamento entre células e substrato, representando na primeira coluna (1) a dinâmica de um tumor com constantes $J_{cel,ECM} = 3$, $J_{cel-cel} = 7$, $J_{cel-meio} = 7$ enquanto na segunda coluna (2) mudamos a energia de superfície para $J_{cel,ECM} = 6$, diminuindo assim a adesividade.

Os outros parâmetros desta simulação foram mantidas (para variações de $J_{cel,ECM}$) da seguinte maneira: $T_{interfase} = 100$ (tempo de interfase de 100 passos Monte Carlo), $\lambda = 1$ (constante de elasticidade), $H = 0.01$ (distorção máxima - parâmetro de saturação na equação sigmoideal), $B = 1.2$ (ponto de inflexão da curva sigmoideal), $A_{min} = 45$ (área necessária para mitose), $A_A = 60$ (área alvo), $T = 6$ (temperatura).

Efeito dos contatos intercelulares

Crucial no estabelecimento da morfologia do tumor são as interações entre as células. Estando elas mais aderidas, é conhecido que elas vão preferir estabelecer uma interface não rugosa com o meio. Diminuindo esta coesão, uma situação de expansão vai prevalecer, gerando por sua vez taxas mais elevadas de mitose. Repetimos várias simulações mantendo todos parâmetros iguais e apenas alterando estes valores de $J_{cel} - J_{cel}$.

Regulação da Mitose

Ao mudar os parâmetros que dão o formato da curva da probabilidade mitótica, podemos influenciar na sensibilidade da célula quanto a sua forma mitótica por forma. Deste modo podemos gerar “linhagens” de células que

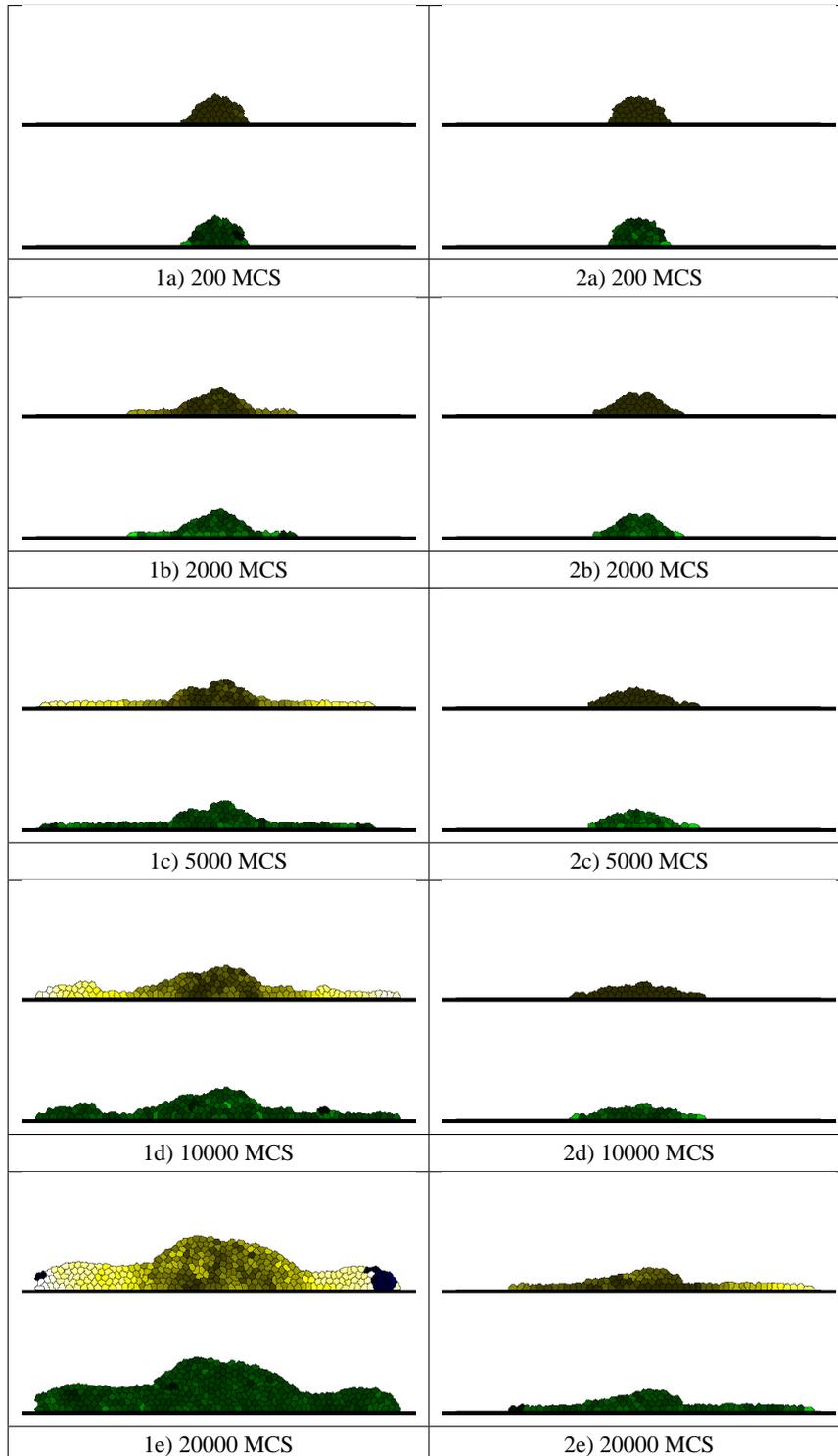


FIGURA 5.7.3. INTERAÇÕES CÉLULA-SUBSTRATO. A única alteração de parâmetros entre as colunas acima é a interação com o substrato. Cada figura é composta por duas partes: a superior mostra por cores o número de mitoses de cada célula (que ocorre muito mais nas células da borda), enquanto a figura inferior está demonstrando a distorção de cada célula (ver texto). Na primeira coluna a adesão das células com o substrato é maior, $J_{cel-ECM} = 3$, enquanto na segunda coluna este valor é $J_{cel-ECM} = 6$. As outras energias são iguais para ambos casos: $J_{cel-cel} = 7$, $J_{cel-meio} = 7$, $J_{meio-ECM} = 9$. Vemos nesta figura uma tendência que se mantém durante simulações com outros parâmetros: quanto mais adesivo o substrato, maior a invasividade do tumor.

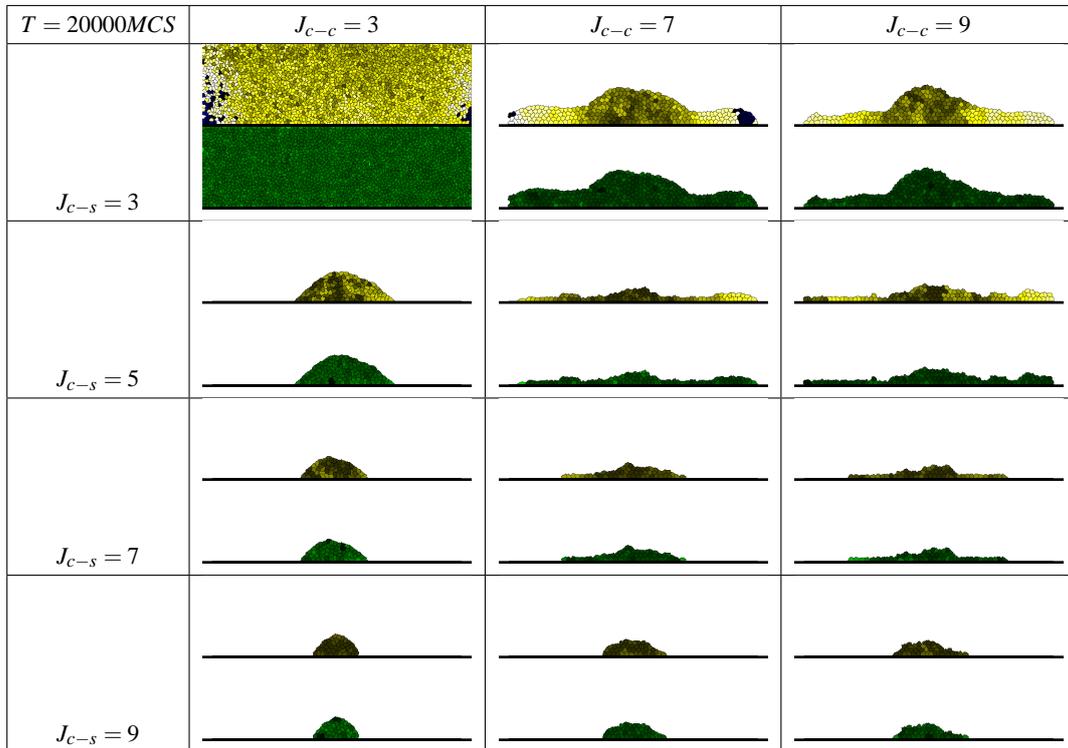


FIGURA 5.7.4. INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA. Está representado o efeito das coesões entre células para diferentes valores de adesão com o substrato. Todas as imagens correspondem à configuração resultante após 20000 passos Monte Carlo. Vemos que para as situações em que o acoplamento entre células e substrato é maior que $J_{c,s} = 3$, a diminuição da coesão implica numa maior invasividade do tumor.

apresentam um comportamento baseado na seu controle por mudanças fenotípicas diferentes. Estamos de certo modo tentando reproduzir os efeitos que observamos pelas medidas experimentais no estudo descrito na seção 5.5.2 na página 125.

5.7.4. Discussão

Demonstramos o impacto que adesividade intercelular e adesão com o substrato exercem sobre a invasividade de um tumor. Nas simulações onde as células se encontravam mais aderidas ao substrato houve duas tendências: a primeira, que células da periferia do aglomerado se estendem mais, resultando numa maior capacidade de se alastrar. Devido a estas deformações averiguamos que a hipótese de mitose dependente de distorção pode ser responsável pelo comportamento de crescimento inicial rápido seguido por uma fase de saturação, a segunda tendência observada nas simulações.

Interações adesivas intercelulares participam também na regulação da dinâmica e forma do aglomerado, podendo, por exemplo, frear o crescimento do tumor se elas forem suficientemente fortes. Isto é, células menos coesivas são mais invasivas. Dando sustentação a estas idéias está o fato que mutações que levam uma célula a ser invasiva são conhecidas em aumentar os receptores¹³ da superfície da célula causando um aumento de adesão com os ligantes encontrados na ECM (Huang e Ingber, 1999). Por outro lado, estas mesmas mutações diminuem a adesão célula-célula.

Vemos portanto que alterações nas diferentes tipos de adesão, deformações mecânicas da célula e comportamentos mitóticos, influenciam no fenótipo invasivo de um tumor, estando estas causas intimamente relacionadas.

¹³principalmente as integrinas

Parte 3

Discussão Final

CAPÍTULO 6

Discussão e Perspectivas Gerais

6.1. Limitações e Soluções

Pontos discretos de Junções Celulares

A respeito das junções discretas entre células, chegamos à conclusão na seção 4.3.2 que elas não precisariam ser implementadas ao se descrever a segregação celular nas Hidras. Porém, ao se estudar células de câncer, em especial sua proliferação, vimos como esta está intrinsecamente relacionada com a morfologia da célula. Ora, como o fenótipo de forma é uma consequência da maneira com a célula se estende sobre uma matriz, e isto se dá através de pontos focais - não basta mais a aproximação de interações homogêneas pela membrana celular. Os pontos de adesão, em particular a sua dinâmica - formação e destruição - é que irão originar o aparecimento de filopódios, extensões, deformações e até movimentação celular.

Mostramos com este trabalho que pontos discretos de grande adesão simulam bem a célula. Mas, para incorporar os outros fenômenos citados acima, é necessário no futuro implementar *interações entre moléculas de adesão*. Este passo seria apenas uma extensão ao nosso modelo, não exigindo grandes alterações na estrutura do algoritmo, porém, de rica análise para a biologia teórica. Segue uma descrição rápida da solução por nós proposta.

Numa simulação tridimensional, o Hamiltoniano de cada célula dependerá das interações (valores de acoplamentos) dado pela soma de seus pontos de contato. Este no entanto irão ser guiados por funções temporais, que também dependerão da entidade com a qual estarão interagindo. Assim, podemos definir uma classe de moléculas de adesão, e até iniciar com uma Matriz Extracelular não homogênea. A grande extensão ao algoritmo se deve porém, a *dinâmica* das moléculas de adesão, pois sabemos que estes se comunicam via sinalizações e podem ‘navegar’ pela membrana. Ou seja, paralelamente ao Modelo de Potts celular em três dimensões, que estará ditando as mudanças topológicas das células, teremos para cada célula uma matriz bidimensional, de tamanho variável onde se darão, por uma dinâmica distinta, as comunicações inter-moleculares.

6.2. Conclusões Finais

Ao longo deste trabalho foram estudados modelos do tipo Modelo de Potts e Celular de Potts, concomitantemente com a análise de formações

de configurações espaciais em diferentes sistemas, como espumas, hidras e câncer. Vimos espumas como sistemas paradigmáticos para topologias guiadas por energia de perímetro, hidras como representante de fenômenos em tecidos de restabelecimento de configurações *in vivo* - o assim chamado ‘re-agrupamento celular’ e câncer como toda a classe de anomalias a cerca de propriedades de crescimento da população de um sistema de células.

Das muitas idéias que surgem destas interações mútuas, escolhemos para discutir aqui o que para nós se tornou as conclusões “gerais” mais importantes.

Conclusão I: Modelo Celular de Potts, estruturas mesoscópicas e reorganização celular

Já citamos no primeiro capítulo a propriedade que torna o Modelo Celular de Potts tão distinguível na sua natureza que os demais modelos: seu potencial de controlar propriedades mesoscópicas do sistema através de vínculos. Ao observar a reorganização dos agregados de hidra, vimos que esta evolução possui certas propriedades marcantes:

- células mantêm contatos de adesão com outras, mas ainda são capazes de explorar sua vizinhança sem ter que se isolar. Continuamente há o estabelecimento de novas conexões, mudança de vizinhos entre as células que ocorre de maneira ‘suave’.
- aglomerados de células possuem mobilidade dentro de outros tecidos, sendo inclusive a percolação de ilhas de células um processo necessário e observável na dinâmica de reorganização.

Na verdade, o Modelo Celular de Potts consegue descrever bem a dinâmica de reorganização de tecidos devido a sua natureza multinível. O fato que a dinâmica da simulação ocorre simultaneamente como dois processos em níveis diferentes, isto é, nível subcelular que corresponde a criação de um sítio de spin nas interfaces, e o nível celular na qual propriedades da célula como unidade são mantidas, possibilita a emergência de comportamentos ao nível intercelular.

Não apenas tratamos com diversos níveis, mas fazemos isto de maneira ‘natural’, já que ambos comportamentos entram no Hamiltoniano. Isto difere consideravelmente de muitos modelos por equações parciais diferenciáveis.

Para tornar estes pontos mais claros, imaginamos a situação onde há um colapso dos vários níveis do sistema: cada pixel é uma célula. As possibilidades da dinâmica se reduzem à situação da célula-pixel se encontrar aderida de maneira energeticamente favorável a outra célula-pixel, ou dela se afastar (com temperaturas suficientemente altas). No momento que ela se encontra em ‘suspensão’, isto é cercada de outros spins a quem tem pouco afinidade, qualquer troca de sítio irá corresponder à mesma energia configuracional. Ou seja, as movimentações de uma célula-pixel num mar de outros spins possui características de um flutuar neutro. Já as formações de

agregados - muitos píxeis aderidos - vai congelar a configuração. Estas propriedades divergem consideravelmente das propriedades que caracterizam a segregação celular. Células certamente não estão restritas a situações discretas 'ligadas' e 'desligadas' - mas se deformam, se estendem, procuram novas vizinhanças por gradientes energéticos etc. Esta exploração mais realística da paisagem energética apenas é impedida por uma dinâmica bifásica de congelamento em estados aglomerados e movimentações sem diferenciações energéticas. É justamente o jogo entre a célula possuir uma certa extensão espacial, na qual ela pode integrar contribuições em escalas maiores, mas de maneira a ainda manter as propriedades de uma célula, que possibilitarão a emergência da dinâmica de reorganização.

Esta é a maior das conclusões.

Conclusão II: Espumas para descrever certos aspectos de topologias celulares

A organização interna de tecidos biológicos, por serem em grande parte guiada por mecanismos típicos de interfaces reflete topologias de espumas. Discutimos neste trabalho até que ponto tais analogias podem ser traçadas. Nos casos em que um paralelo se torna válido, é de se concluir que efeitos de área e número relativo entre os tipos celulares possam variar as configurações finais. Esta é uma conclusão que necessita futuros esforços para averiguação.

Conclusão III: Mitose pode resultar de efeitos fenotípicos

Concluimos, tanto por estudos experimentais, comparação de literatura e por simulações, que é razoável propor o formato das células não apenas como uma consequência do comportamento celular, mas sim, como um estado que reflete propriedades do ambiente (confluência, membrana adesiva etc). Como tal, o próprio formato da célula pode ditar a possível entrada da célula em mitose. Desvios desta regulação podem servir como uma explicação para diversos aspectos do crescimento tumoral.

Nesta linha de raciocínio, vemos novamente como várias formas de efeitos retroalimentadores podem resultar em efeitos num nível acima ao que está sendo controlado. Isto é, interações adesivas entre célula-tronco e célula-célula vão gerar deformações do formato celular, que vai, por controle direto, responder com possível mitose. A mitose é um processo que, ao alterar o número da população, vai influenciar localmente na densidade celular, que não apenas vai alterar a distribuição de vizinhanças e razão de células bordas/centro, mas também vai novamente alterar o balanço de deformações. Concluimos que estes processos interdependentes podem gerar efeitos como crescimento inicial exponencial, seguido por uma fase na qual a taxa de proliferação começa a diminuir até chegar a uma saturação total do sistema.

Conclusão IV

Esta dissertação se propôs a diferentes objetivos, em diferentes níveis.

Em particular, investigamos sistemas, como espumas, agregados celulares de hidras e células tumorais, focando em problemas específicos como, por exemplo, segregação celular ou taxa de crescimento tumoral. Neste nível, chegamos a alguns resultados que foram publicados (Castro, Klamt, Grieneisen, Grivicich, e Moreira, 2003), ou então sendo investigados em maior detalhe visando publicação.

Em segundo nível, esta dissertação tem um intuito de servir como um enquadramento e planejamento de futuros trabalhos tendo traçado linhas de pesquisa e fornecido modelo computacionais que podem vir a ser adequados a diferentes investigações.

Finalmente, esta exposição detalhada das bases, métodos e principais questões visa servir como um guia introdutório para estudantes do LabCel.

Apêndices

Abreviações

Biológicas

ATP: adenosina tri-fosfato

DM: (*dissociation medium*)-meio de dissociação

ECM: (*extracellular matrix*) matriz extracelular

EDTA: ácido diamino tetracético

FAK: (*focal adhesion kinase*) quinase de adesão focal

FCS: (*fetal calf serum*) soro bovino fetal

FGF: (*fibroblast growth factor*) fator de crescimento de fibroblastos

GAG: (*glycoaminoglycans*)

HM: (*hydra medium*) meio de hidra

ICAM: (*intercellular adhesion molecules*) moléculas intercelulares de adesão

MAP: (*mitogen-activated protein*)

MAP: (*microtubule associated protein*) proteína associada ao microtúbulo

PKC: proteína quinase C

SRB: sulforrodamina - β

TCA: ácido tricloroacético

Físicas

MCS: (*Monte Carlo Step*) passo de Monte Carlo

Condição de Young

Em 1805 Thomas Young propôs uma relação entre as tensões superficiais de três fases (no caso específico tendo sido formulado para a combinação dos estados líquido, sólido e vapor) e o ângulo diedral θ formado quando um líquido faz contato com uma superfície sólida. A equação é o que conhecemos como *condição de Young*,

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL},$$

onde γ_{LV} é a tensão superficial do líquido com o gás (vapor), γ_{SV} é a tensão interfacial entre a superfície sólida e o vapor, enquanto γ_{SL} é a tensão entre a fase líquida e o sólido. Esta equação foi interpretado por Young como sendo “o equilíbrio das três forças aplicadas nas partículas angulares (do líquido); uma na direção da superfície do fluido (γ_{LV}), a segunda na superfície comum do sólido com o fluido (γ_{SL}) e o terceiro na direção a face exposto do sólido (γ_{SV})”.

Roura e Fort (2004) demonstraram as falhas de tal dedução local num trabalho extremamente elucidativa na qual afirmam, “apesar que qualquer um que trabalha no campo de fenômenos de superfície muitas vezes vai lidar com ângulos de contato, as equações que governam seus valores em equilíbrio não são totalmente aceitas”. É portanto interessante ressaltar que medidas experimentais diretas da equação de Young não contribuem para a verificação das equações uma vez que é impossível medir a tensão γ_{LS} . Há grande busca desta averiguação por simulações baseados em interações microscópicas.

Observações Experimentais com Hidras

Linhagens A, B, C e D utilizadas

Durante a realização deste mestrado, trabalhamos com quatro linhagens de hidras. Duas ainda não foram identificadas. São elas:

- (1) espécie *A* - supostamente *Hydra vulgaris*; linhagem proveniente do Japão. Cor marrom.
- (2) linhagem *B* - coletado no campus da Unisinos, e doado para o Lab-cel. Ainda não se identificou a espécie. Verde.
- (3) espécie *C* - *Hydra salmacides* - espécie coletado no Brasil e identificado pelo prof. Fábio Lang da USP. Marrom.
- (4) linhagem *D* - linhagem proveniente dos E.U.A, ainda não identificado. Possui cor verde.

Manutenção das Hidras

O sucesso de qualquer técnica empregada para caracterizar aspectos citológicos, manipular a organização de tecidos ou qualquer outros procedimentos analíticos que se queira fazer com hidras, dependerá fundamentalmente das seguintes observações em relação a sua manutenção. Se as hidras não estiverem saudáveis, não podemos tirar nenhuma conclusão confiável ao comparar métodos pois estaremos com muitos parâmetros desconhecidos.

Basicamente a manutenção exige cuidados com os meios de cultura, a alimentação e limpeza. Infecções ocorrerem pela desregulação do Ph, da qualidade da alimentação (*nauplii* de *Artemia salina*), sendo por isto importante que se repita com uma periodicidade de alguns dias apenas.

Alguns dados importantes para a manutenção:

- A quantidade de *nauplii* de *Artemia salina* dada para as hidras diariamente vai regular o tamanho dos indivíduos. Assim, hidras que comem apenas 1 *naupli* por dia vão se manter pequenas e não farão brotamentos. Enquanto, no outro extremo, aquelas que estão numa dieta de 25 *nauplii* terão uma massa até 10 vezes maior com um constante número médio de 3 brotamentos. Estes números dependem, é claro, da espécie, mas a tendência se mantém.

- Hidras podem reagir negativamente a uma mudança repentina de alimentação. Quando aumentamos ou diminuimos muito a quantidade de camarão (bruscamente), a hidra passa por uma depressão.

Condições Ideais

Mostramos na figura 6.2.1 curvas de crescimentos obtidas num estudo para averiguar a capacidade ideal de brotamento dos 4 grupos (A, B, C, D) de hidras. Foi observado uma tendência forte de comportamentos diferentes entre os grupos.

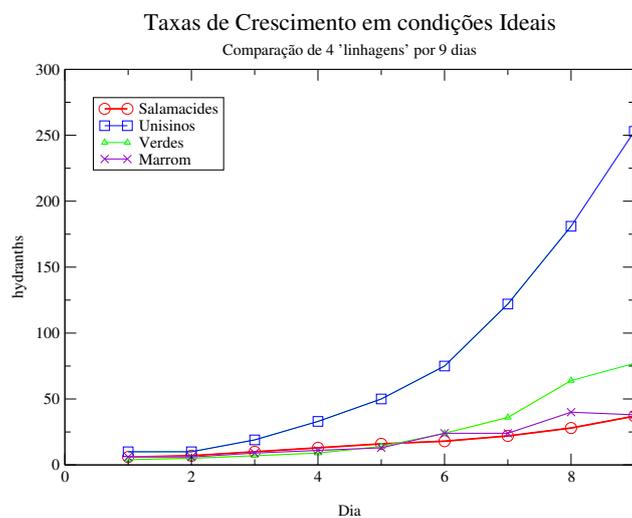


FIGURA 6.2.1. CRESCIMENTO POPULACIONAL EM CONDIÇÕES EXTREMAMENTE FAVORÁVEIS. O gráfico acima mostra o aumento da 'população de número de cabeças' (hidras independentes ou brotamentos são contados) pelos dias, na qual as quatro populações estão sendo mantidos em condições ideais de alimentação e limpeza. A espécie *Hydra salamacides* (C), representada pela linha vermelha, começou com uma população de três hidras das quais duas apresentando brotamento, portanto 5 cabeças. No final do nono dia, possuía 37. A linhagem (D) proveniente dos Estados Unidos é representada pela linha verde. Começou com 2 hidras com brotamentos, num total de 4 cabeças. Ao final do período alcançou 77 cabeças. A espécie (A) marrom, supostamente '*hydra vulgaris*' no dia 1 apresentava 3 hidras com brotamentos, num total de 6 cabeças, ao final do período obtendo 38. Iniciamos a observação da linhagem (B) de 'Unisinos' com 5 hidras com brotamentos, num total de 10 cabeças. Ao final do período alcançou 253 cabeças, como está indicado pelos pontos azuis.

Detalhes das experiências de dissociação

- (1) Utilizar hidras que estão em jejum por dois dias, sendo que foram limpas periodicamente (mesmo nos dias em que não foram alimentadas)
- (2) Cortar pés e cabeças; ir colocando os troncos num tubo de ensaio contendo HM¹.
- (3) Quando tiver a quantidade necessária de troncos, trocar ~ três vezes o HM.
- (4) Substituir HM por DM² e enxugar 3 vezes.
- (5) Colocar os troncos sobre uma superfície de vidro na qual começamos a picá-las. Os pedaços devem ser pequenos, porém não ao ponto de danificar o tecido; ou seja, não devem ficar indistinguíveis, mas com um aspecto granular.
- (6) Adicionar gotas de DM que foi retirado da geladeira (4°C), e colocar esta mistura num tubo de ensaio.
- (7) Pipetar o líquido para que as forças de cisalhamento ajudam a isolar as células. Procedimento de aproximadamente 15 minutos. Isto deve ser feito com força, mas sem produção de bolhas. A pipeta deve ter uma abertura pequena.
- (8) Deixar decantar (10 minutos).
- (9) Remover parte do líquido da superfície (fragmentos de células).
- (10) Completar com 4ml de DM o tubo onde deixamos o resto da mistura. E resuspende (pipetar).
- (11) Passar tubo pelo filtro.
- (12) Completar os tubos dos líquidos filtrados com D.M, até chegar a 8ml. Dependendo de quantas hidras utilizamos, podemos fazer vários tubos desta suspensão, tomando cuidado para manter a densidade celular iguais para todos.
- (13) Centrifugar a 1500 rpm por 10min.
- (14) Devemos ter como resultado um agregado por tubo-de-ensaio. Deixar descansar no gelo por 30 min.
- (15) É possível cortar os agregados em sub-agregados. Desaconselhamos isto, preferindo fazer mais tubos com concentrações de células menores.

¹*Hydra Medium* - meio de cultivo próprio para hidras

²*Dissociation Medium* - meio de dissociação

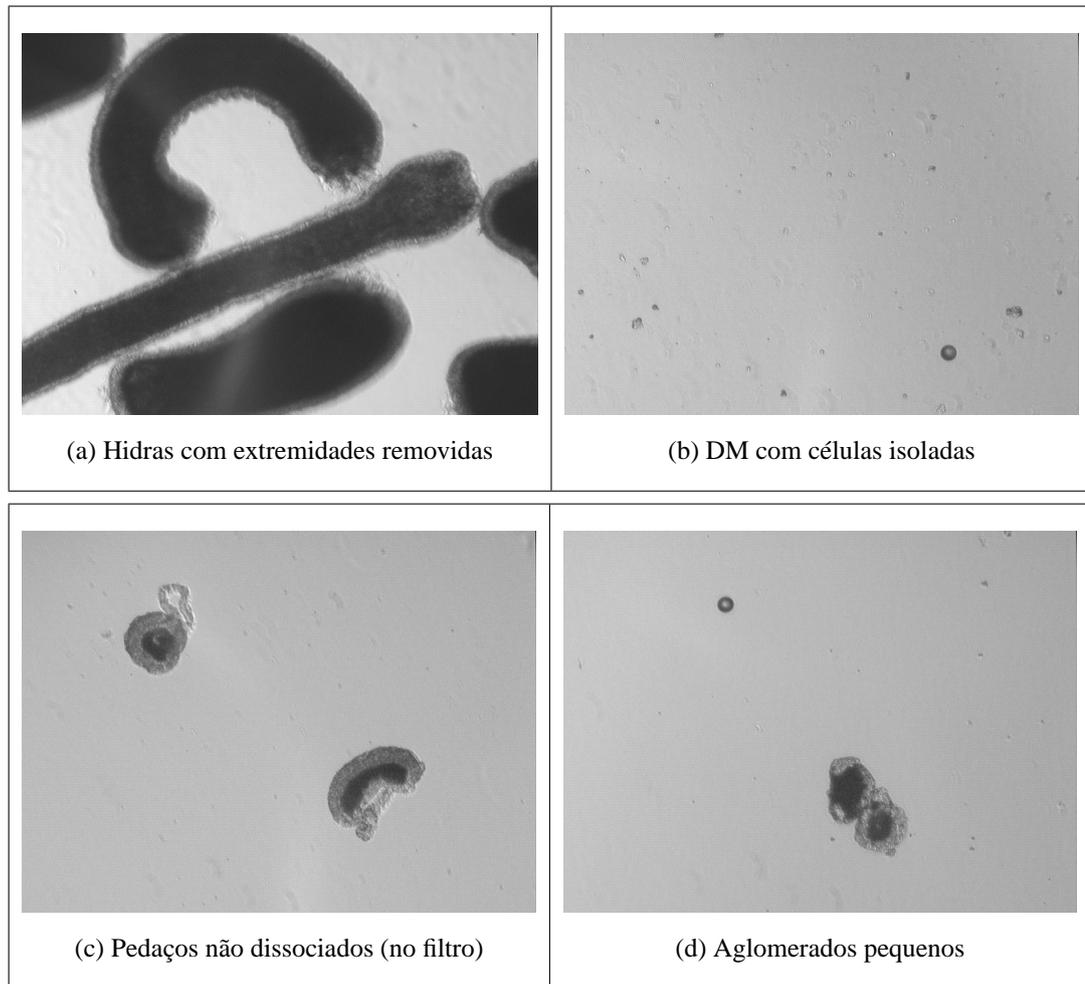


FIGURA 6.2.2. PASSOS DO PROTOCOLO.

Receitas para Experiências com Hidra

Meio de Cultura (HM)

HM se refere ao meio de cultivo das hidras feito a partir de soluções de preparo, (stock solutions). Na verdade, o termo ‘meio de cultura’ se refere melhor a microorganismos e cultura de células (como fizemos com as células tumorais), pois para a hidra, o meio de cultura não fornece nutrientes ou fatores de crescimento, apenas servindo como o ambiente na qual o animal vive e pode exercer suas funções vitais. Mesmo assim ela se torna importante pois muitos dos problemas que ocorrem nos cultivos de hidra se devem a contaminações provenientes da água, geralmente íons de cobre e outros metais pesados. Portanto, a primeira função do HM é proteger a hidra destes efeitos, sendo assim, um buffer.

A segunda função do HM é prover à hidra certos íons necessários. Para a sobrevivência, cátions como íons de cálcio e sódio são indispensáveis, enquanto que potássio e magnésio pode contribuir para a taxa de crescimento da população. Outro cuidado que temos é com pH do meio de cultura (HM), que mantemos a 7.0 – 7.5.

Abaixo segue-se a composição do HM utilizado pelo LabCel.

Stock solutions:

1M $CaCl_2$

50ml \Rightarrow 5.55g 200ml \Rightarrow 22.2g

0.5M $NaHCO_3$

50ml \Rightarrow 2.10g 200ml \Rightarrow 8.4g

0.1M $MgCl_2$

50ml \Rightarrow 1.02g 200ml \Rightarrow 4.07g

0.08M $MgSO_4$

50ml \Rightarrow 0.48g 200ml \Rightarrow 1.98g

0.03M KNO_3

50ml \Rightarrow 0.15g 200ml \Rightarrow 0.41g

Hydra Medium (HM)

para fazer 10l:

solução $CaCl_2$ 10ml

solução $NaHCO_3$ 30ml

solução $MgCl_2$ 10ml

solução $MgSO_4$ 10ml

solução KNO_3 10ml

Meio de Dissociação (DM)

Solução DM

$10^{-3}M$ $CaCl_2$

$10^{-3}M$ $NaHCO_3$

$10^{-4}M$ $MgCl_2$

$10^{-4}M$ KCl

$10^{-3}M$ Tris-buffer

pH 7.8, tudo em água destilada.

Apoptose

Existem duas maneiras de morte celular, a necrose e a apoptose. Esta segunda é feita de maneira ordenada e geralmente não é consequência de falta de nutrientes, como o primeiro. A necrose pode ser manipulada através da quantidade de nutrientes oferecido às células, enquanto a apoptose possui uma série de fatores extracelulares e intercelulares que a regulam. Nas nossas experiências, observamos casos de apoptose - depois de muito tempo, quando o nível de nutrientes cai significativamente, a morte é desorganizada.

Achamos importante mencionar estas observações, já que uma das questões muito abordado no modelamento da dinâmica de tumores é dado por dois componentes principais: a taxa de mitose e a taxa de necrose e apoptose (Byrne, 1997). Nas próximas figuras (figura na próxima página e figura 6.2.3) mostramos exemplos de morte celular observado em nossas experiências.

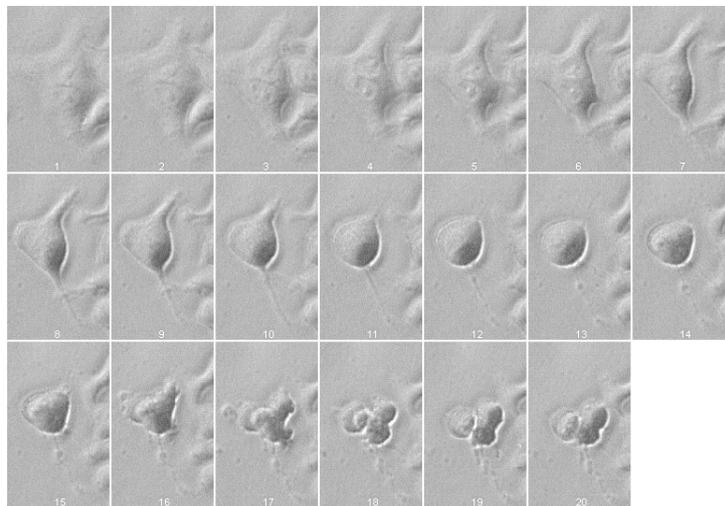


FIGURA 6.2.3. GEOMETRIA APOPTÓTICA.

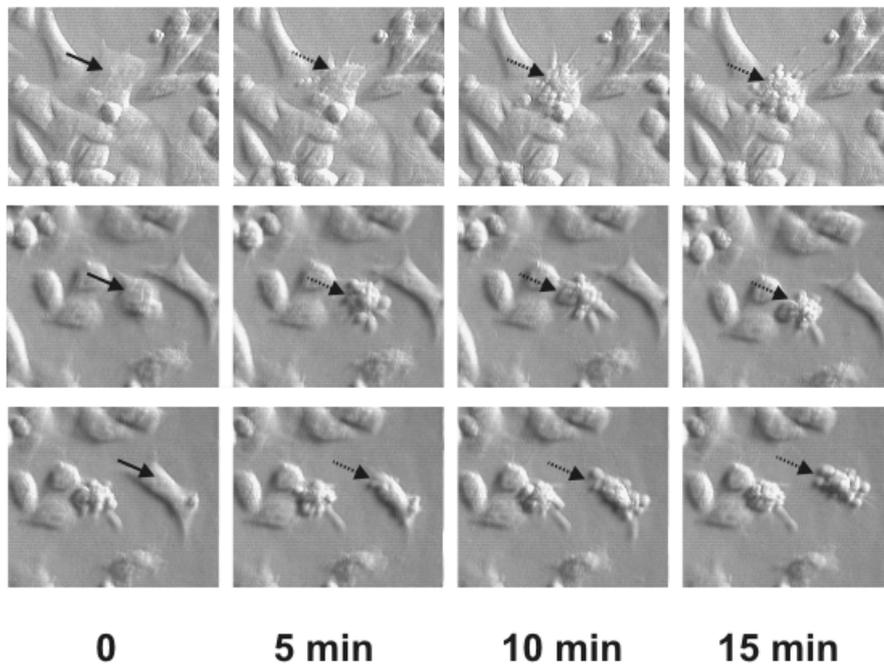


FIGURA 6.2.4. APOPTOSES.

Referências Bibliográficas

- AFENYA, E. K., CALDERON, C. P., Diverse ideas on the growth kinetics of disseminated cancer cells. *Bull. Math. Biol.*, New York, v. 62, nº 3, págs. 527–542, maio 2000.
- AGBAS, A., SARRAS, JR, M. P., Evidence for cell surface extracellular matrix binding proteins in *Hydra vulgaris*. *Cell Adhes. Commun.*, Yverdon, v. 2, nº 1, págs. 59–73, abr. 1994.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D., *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Publishing, 1983.
- ARMSTRONG, P. B., NIEDERMAN, R., Reversal of tissue position after cell sorting. *Dev. Biol.*, New York, v. 28, nº 3, págs. 518–527, jul. 1972.
- ARMSTRONG, P. B., PARENTI, D., Cell sorting in the presence of cytochalasin B. *J. Cell Biol.*, New York, v. 55, nº 3, págs. 542–553, dez. 1972.
- BAJZER, Z., Gompertzian growth as a self-similar and allometric process. *Growth Dev. Aging*, Bar Harbor, ME, v. 63, nº 1-2, págs. 3–11, primavera-verão 1999.
- BELL, G. I., Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, Washington, DC, v. 200, nº 4342, págs. 618–627, maio 1978.
- BERKING, S., *Hydra* as a model organism. *Nature*, London, v. 239, nº 5372, pág. 366, out. 1972.
- BERKING, S., A model for budding in *Hydra*: pattern formation in concentric rings. *J. theor. Biol.*, London, v. 222, nº 1, págs. 37–52, maio 2003.
- VON BERTALANFFY, L., On the von Bertalanffy growth curve. *Growth*, Philadelphia, PA, v. 30, nº 1, págs. 123–124, mar. 1966.
- BEYSENS, D. A., FORGACS, G., GLAZIER, J. A., Cell sorting is analogous to phase ordering in fluids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, DC, v. 97, nº 17, págs. 9467–9471, ago. 2000.
- BODE, H., MARTINEZ, D., SHENK, M. A., SMITH, K., STEELE, R., TECHNAN, U., Evolution of head development. *Biol. Bull.*, Lancaster, PA, v. 196, nº 3, págs. 408–410, jun. 1999.
- BODE, H. R., Head regeneration in *Hydra*. *Dev. Dyn.*, New York, v. 226, nº 2, págs. 225–236, fev. 2003.
- BOSCH, T. C., Ancient signals: peptides and the interpretation of positional information in ancestral metazoans. *Comp. Biochem. Physiol. B*, London, v. 136, nº 2, págs. 185–196, out. 2003.
- BOSCH, T. C., FUJISAWA, T., Polyps, peptides and patterning. *Bioessays*, Cambridge, v. 23, nº 5, págs. 420–427, maio 2001.

- BOUDREAU, N. J., JONES, P. L., Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem. J.*, London, v. 339, págs. 481–488, maio 1999.
- BYRNE, H. M., The effect of time delays on the dynamics of avascular tumor growth. *Math. Biosci.*, New York, v. 144, nº 2, págs. 83–117, set. 1997.
- CALDERON, C. P., KWEMBE, T. A., Modeling tumor growth. *Math. Biosci.*, New York, v. 103, nº 1, págs. 97–114, fev. 1991.
- CASTRO, M. A., KLAMT, F., GRIENEISEN, V. A., GRIVICICH, I., MOREIRA, J. C., Gompertzian growth pattern correlated with phenotypic organization of colon carcinoma, malignant glioma and non-small cell lung carcinoma cell lines. *Cell Prolif.*, Oxford, v. 36, nº 2, págs. 65–73, abr. 2003.
- CASTRO, M. A., SCHWARTSMANN, G., MOREIRA, J. C., Intercellular contact-dependent survival of human A549, NCI-H596 and NCI-H520 non-small cell lung carcinoma cell lines. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, S ao Paulo, v. 34, nº 8, págs. 1007–1013, ago. 2001.
- CASTRO, M. A. A., *Efeito do fenótipo celular sobre o crescimento e sobrevivência de linhagens tumorais de carcinoma de pulmão*. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- CHEN, C. S., BRANGWYNNE, C., INGBER, D. E., Pictures in cell biology: squaring up to the cell-shape debate. *Trends Cell Biol.*, Cambridge, v. 9, nº 7, pág. 283, jul. 1999.
- CHEN, C. S., MRKSICH, M., HUANG, S., WHITESIDES, G. M., INGBER, D. E., Geometric control of cell life and death. *Science*, Washington, DC, v. 276, nº 5317, págs. 1425–1428, maio 1997.
- COOPER, G. M., *The Cell: A Molecular Approach*. Washington, D. C.: ASM Press, 2^a ed., 2000.
- COX, S. J., VAZ, M. F., WEAIRE, D., Topological changes in a two-dimensional foam cluster. *Eur. Phys. J. E*, Paris, v. 11, nº 1, págs. 29–35, maio 2003.
- DUGUAY, D., FOTY, R. A., STEINBERG, M. S., Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev. Biol.*, New York, v. 253, nº 2, págs. 309–323, jan. 2003.
- EVANS, E., BERK, D., LEUNG, A., Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I. Forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys. J.*, New York, v. 59, nº 4, págs. 838–848, abr. 1991a.
- EVANS, E., BERK, D., LEUNG, A., MOHANDAS, N., Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. II. Mechanical energies to separate large contact areas. *Biophys. J.*, New York, v. 59, nº 4, págs. 849–860, abr. 1991b.
- FOLKMAN, J., GREENSPAN, H. P., Influence of geometry on control of cell growth. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 417, nº 3-4, págs. 211–236, dez. 1975.

- FOLKMAN, J., MOSCONA, A., Role of cell shape in growth control. *Nature*, London, v. 273, nº 5661, págs. 345–349, jun. 1978.
- FORGACS, G., FOTY, R. A., SHAFRIR, Y., STEINBERG, M. S., Viscoelastic properties of living embryonic tissues: a quantitative study. *Biophys. J.*, New York, v. 74, nº 5, págs. 2227–2234, maio 1998.
- FORTES, M. A., TEIXEIRA, P. I., VAZ, M. F., Distribution of film orientations in free and strained foams. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 89, nº 27, pág. 278302, dez. 2002.
- FORTES, M. A., VAZ, M. F., Unusual properties of foams at low pressures. *J. Colloid Interface Sci.*, New York, v. 266, nº 1, págs. 202–207, out. 2003.
- FOTY, R. A., FORGACS, G., PFLEGER, C. M., STEINBERG, M. S., Liquid properties of embryonic tissues: measurement of interfacial tensions. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 72, nº 14, págs. 2298–2301, abr. 1994.
- FOTY, R. A., PFLEGER, C. M., FORGACS, G., STEINBERG, M. S., Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development*, Cambridge, v. 122, nº 5, págs. 1611–1620, maio 1996.
- FRISCH, T., THOUMINE, O., Predicting the kinetics of cell spreading. *J. Biomech.*, New York, v. 35, nº 8, págs. 1137–1141, ago. 2002.
- FUJISAWA, T., *Hydra* regeneration and epitheliopeptides. *Dev. Dyn.*, New York, v. 226, nº 2, págs. 182–189, fev. 2003.
- GALLIOT, B., SCHMID, V., Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.*, Vizcaya, v. 46, nº 1, págs. 39–48, jan. 2002.
- GARROD, C., *Statistical Mechanics and Thermodynamics*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- GIANCOTTI, F. G., RUOSLAHTI, E., Integrin signaling. *Science*, Washington, DC, v. 285, nº 5430, págs. 1028–1032, ago. 1999.
- GIERER, A., BERKING, S., BODE, H., DAVID, C. N., FLICK, K., HANSMANN, G., SCHALLER, H., TRENKNER, E., Regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Nat. New. Biol.*, London, v. 239, nº 91, págs. 98–101, set. 1972.
- GLAZIER, J. A., *Dynamics of Cellular Patterns*. Tese de Doutorado, The University of Chicago, ago. 1989.
- GLAZIER, J. A., GRANER, F., Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys. Rev. E*, Lancaster, PA, v. 47, nº 3, págs. 2128–2154, mar. 1993.
- GOPAL, A. D., DURIAN, D. J., Relaxing in foam. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 91, nº 18, pág. 188303, out. 2003.
- GRANER, F., GLAZIER, J. A., Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 69, nº 13, págs. 2013–2016, set. 1992.

- GRANER, F., JIANG, Y., JANIAUD, E., FLAMENT, C., Equilibrium states and ground state of two-dimensional fluid foams. *Phys. Rev. E*, Lancaster, PA, v. 63, n^o 1, pág. 011402, jan. 2001.
- GRIENEISEN, V. A., BELMONTE, J. M., Mitose, célula em 3d e pontos de adesões, 2004, trabalho de Iniciação Científica.
- GYLLENBERG, M., WEBB, G. F., Quiescence as an explanation of Gompertzian tumor growth. *Growth Dev. Aging*, Bar Harbor, ME, v. 53, n^o 1-2, págs. 25–33, primavera-verão 1989.
- GYLLENBERG, M., WEBB, G. F., A nonlinear structured population model of tumor growth with quiescence. *J. Math. Biol.*, Berlin, v. 28, n^o 6, págs. 671–694, 1990.
- HARRIS, A. K., Is Cell sorting caused by differences in the work of intercellular adhesion? A critique of the Steinberg hypothesis. *J. theor. Biol.*, London, v. 61, n^o 2, págs. 267–285, set. 1976.
- HOBMAYER, B., SNYDER, P., ALT, D., HAPPEL, C. M., HOLSTEIN, T. W., Quantitative analysis of epithelial cell aggregation in the simple metazoan *Hydra* reveals a switch from homotypic to heterotypic cell interactions. *Cell Tissue Res.*, Berlin, v. 304, n^o 1, págs. 147–157, abr. 2001.
- HOLSTEIN, T. W., HOBMAYER, E., TECHNAU, U., Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev. Dyn.*, New York, v. 226, n^o 2, págs. 257–267, fev. 2003.
- HONDA, H., YAMANAKA, H., EGUCHI, G., Transformation of a polygonal cellular pattern during sexual maturation of the avian oviduct epithelium: computer simulation. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, Cambridge, v. 98, págs. 1–19, nov. 1986.
- HUANG, S., INGBER, D. E., The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat. Cell Biol.*, London, v. 1, n^o 5, págs. E131–E138, set. 1999.
- IGLESIAS, J. R., DE ALMEIDA, R. M., Statistical thermodynamics of a two-dimensional cellular system. *Phys. Rev. A*, Lancaster, PA, v. 43, n^o 6, págs. 2763–2770, mar. 1991.
- INGBER, D. E., Integrins, tensegrity, and mechanotransduction. *Gravit. Space Biol. Bull.*, New York, v. 10, n^o 2, págs. 49–55, jun. 1997.
- INGBER, D. E., Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation. *Differentiation*, Heidelberg, v. 70, n^o 9-10, págs. 547–560, dez. 2002.
- INGBER, D. E., PRUSTY, D., SUN, Z., BETENSKY, H., WANG, N., Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J. Biomech.*, New York, v. 28, n^o 12, págs. 1471–1484, dez. 1995.
- KASAHARA, S., BOSCH, T. C., Enhanced antibacterial activity in *Hydra* polyps lacking nerve cells. *Dev. Comp. Immunol.*, Elmsford, NY, v. 27, n^o 2, págs. 79–85, fev. 2003.
- KEEPERS, Y. P., PIZAO, P. E., PETERS, G. J., VAN ARK-OTTE, J., WINOGRAD, B., PINEDO, H. M., Comparison of the sulforhodamine B

- protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, Oxford, v. 27, nº 7, págs. 897–900, 1991.
- KENDAL, W. S., A perspective on tumour progression. *Can. J. Surg.*, Toronto, v. 36, nº 2, págs. 133–136, abr. 1993.
- LAMBERT, C. J., WEAIRE, D., Theory of the arrangement of cells in a network. *Metallography*, New York, v. 14, págs. 307–318, 1981.
- MARUSIC, M., BAJZER, Z., VUK-PAVLOVIC, S., FREYER, J. P., Tumor growth in vivo and as multicellular spheroids compared by mathematical models. *Bull. Math. Biol.*, New York, v. 56, nº 4, págs. 617–631, jul. 1994.
- MEINHARDT, H., The radial-symmetric *Hydra* and the evolution of the bilateral body plan: an old body became a young brain. *Bioessays*, Cambridge, v. 24, nº 2, págs. 185–191, fev. 2002.
- MOMBACH, J. C., DE ALMEIDA, R. M., IGLESIAS, J. R., Mitosis and growth in biological tissues. *Phys. Rev. E*, Lancaster, PA, v. 48, nº 1, págs. 598–602, jul. 1993a.
- MOMBACH, J. C., DE ALMEIDA, R. M., IGLESIAS, J. R., Two-cell correlations in biological tissues. *Phys. Rev. E*, Lancaster, PA, v. 47, nº 5, págs. 3712–3716, maio 1993b.
- MOMBACH, J. C., GLAZIER, J. A., Single cell motion in aggregates of embryonic cells. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 76, nº 16, págs. 3032–3035, abr. 1996.
- MOMBACH, J. C., GLAZIER, J. A., RAPHAEL, R. C., ZAJAC, M., Quantitative comparison between differential adhesion models and cell sorting in the presence and absence of fluctuations. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 75, nº 11, págs. 2244–2247, set. 1995.
- MOMBACH, J. C. M., LEMKE, N., BODMANN, B. E. J., IDIART, M. A. P., A mean-field theory of cellular growth. *Europhys. Lett.*, v. 59, nº 6, págs. 923–928, set. 2002.
- NIKOLAYEV, V. S., BEYSENS, D. A., Relaxation of nonspherical sessile drops towards equilibrium. *Phys. Rev. E*, Lancaster, PA, v. 65, nº 4, pág. 046135, abr. 2002.
- NORTON, L., SIMON, R., BRERETON, H. D., BOGDEN, A. E., Predicting the course of Gompertzian growth. *Nature*, London, v. 264, nº 5586, págs. 542–545, dez. 1976.
- OLIVE, P. L., DURAND, R. E., Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.*, Boston, MA, v. 13, nº 2, págs. 121–138, jun. 1994.
- PIZAO, P. E., LYARUU, D. M., PETERS, G. J., VAN ARK-OTTE, J., WINOGRAD, B., GIACCONE, G., PINEDO, H. M., Growth, morphology and chemosensitivity studies on postconfluent cells cultured in ‘V’-bottomed microtiter plates. *Br. J. Cancer*, London, v. 66, nº 4, págs. 660–665, out. 1992.

- RAVAINE, V., BIBETTE, J., HENRY, N., Wetting of liquid droplets on living cells. *J. Colloid Interface Sci.*, New York, v. 255, nº 2, págs. 270–273, nov. 2002.
- RIEU, J. P., UPADHYAYA, A., GLAZIER, J. A., OUCHI, N. B., SAWADA, Y., Diffusion and deformations of single *Hydra* cells in cellular aggregates. *Biophys. J.*, New York, v. 79, nº 4, págs. 1903–1914, out. 2000.
- ROURA, P., FORT, J., Local thermodynamic derivation of Young's equation. *J. Colloid Interface Sci.*, New York, v. 272, nº 2, págs. 420–429, abr. 2004.
- RUOSLAHTI, E., Stretching is good for a cell. *Science*, Washington, DC, v. 276, nº 5317, págs. 1345–1346, maio 1997.
- RUOSLAHTI, E., OBRINK, B., Common principles in cell adhesion. *Exp. Cell Res.*, New York, v. 227, nº 1, págs. 1–11, ago. 1996.
- SARRAS, JR, M. P., DEUTZMANN, R., *Hydra* and Niccolo Paganini (1782–1840) – two peas in a pod? The molecular basis of extracellular matrix structure in the invertebrate, *Hydra. Bioessays*, Cambridge, v. 23, nº 8, págs. 716–724, ago. 2001.
- SARRAS, JR, M. P., ZHANG, X., HUFF, J. K., ACCAVITTI, M. A., ST. JOHN, P. L., ABRAHAMSON, D. R., Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. III. Formation and function during morphogenesis of *Hydra* cell aggregates. *Dev. Biol.*, New York, v. 157, nº 2, págs. 383–398, jun. 1993.
- SATO-MAEDA, M., UCHIDA, M., GRANER, F., TASHIRO, H., Quantitative evaluation of tissue-specific cell adhesion at the level of a single cell pair. *Dev. Biol.*, New York, v. 162, nº 1, págs. 77–84, mar. 1994.
- SCHIFFMANN, Y., Polarity and form regulation in development and reconstitution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, Oxford, v. 75, nº 1-2, págs. 19–74, 2001.
- STEELE, R. E., Developmental signaling in *Hydra*: what does it take to build a “simple” animal? *Dev. Biol.*, New York, v. 248, nº 2, págs. 199–219, ago. 2002.
- STEINBERG, M. S., Adhesion-guided multicellular assembly: a commentary upon the postulates, real and imagined, of the differential adhesion hypothesis, with special attention to computer simulations of cell sorting. *J. theor. Biol.*, London, v. 55, nº 2, págs. 431–443, dez. 1975.
- STEINBERG, M. S., Cell-cell recognition in multicellular assembly: levels of specificity. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, Cambridge, v. 32, págs. 25–49, 1978.
- STEINBERG, M. S., Cell surfaces in the control of growth and morphogenesis. *Dev. Biol.*, New York, v. 3, págs. 1–13, 1986.
- STEINBERG, M. S., Adhesion in development: an historical overview. *Dev. Biol.*, New York, v. 180, nº 2, págs. 377–388, dez. 1996.
- STEINBERG, M. S., MCNUTT, P. M., Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, London, v. 11, nº 5, págs. 554–560, out. 1999.

- STEYER, A., GUENOUN, P., BEYSENS, D., Spontaneous jumps of a droplet. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 68, n^o 1, págs. 64–66, jan. 1992.
- SUGIYAMA, T., Spontaneous loss of interstitial stem cells from *Hydra* tissue. *Dev. Biol.*, New York, v. 163, n^o 2, págs. 302–308, jun. 1994.
- SULSKY, D., CHILDRESS, S., PERCUS, J. K., A model of cell sorting. *J. theor. Biol.*, London, v. 106, n^o 3, págs. 275–301, fev. 1984.
- SZETO, K. Y., FU, X., TAM, W. Y., Universal topological properties of two-dimensional trivalent cellular patterns. *Phys. Rev. Lett.*, Lancaster, PA, v. 88, n^o 13, pág. 138302, abr. 2002.
- TAKAKU, Y., HARIYAMA, T., TSUKAHARA, Y., Initial homotypic cell pair adhesion in regenerating *Hydra* facilitates subsequent adhesion of homotypic cells. *Naturwissenschaften.*, v. 87, n^o 4, págs. 177–179, abr. 2000.
- TAKAKU, Y., HARIYAMA, T., TSUKAHARA, Y., The process of cell adhesion among dissociated single cells of *Hydra*: morphological observations. *J. Exp. Biol.*, Cambridge, v. 204, n^o Pt, págs. 1697–1702, maio 2001.
- TECHNAU, U., HOLSTEIN, T. W., Cell sorting during the regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Dev. Biol.*, New York, v. 151, n^o 1, págs. 117–127, maio 1992.
- TECHNAU, U., MILLER, M. A., BRIDGE, D., STEELE, R. E., Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis. *Dev. Biol.*, New York, v. 260, n^o 1, págs. 191–206, ago. 2003.
- TEIXEIRA, P. I., GRANER, F., FORTES, M. A., Lower bounds for the surface energy of two-dimensional foams. *Eur. Phys. J. E*, Paris, v. 9, n^o 5, págs. 447–452, dez. 2002.
- THOMAS, W. A., THOMSON, J., MAGNANI, J. L., STEINBERG, M. S., Two distinct adhesion mechanisms in embryonic neural retina cells. III. Functional specificity. *Dev. Biol.*, New York, v. 81, n^o 2, págs. 379–385, jan. 1981.
- THOUMINE, O., ZIEGLER, T., GIRARD, P. R., NEREM, R. M., Elongation of confluent endothelial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure. *Exp. Cell Res.*, New York, v. 219, n^o 2, págs. 427–441, ago. 1995.
- TURNER, JR, M. E., BLUMENSTEIN, B. A., SEBAUGH, J. L., A generalization of the logistic law of growth. *Biometrics*, Washington, DC, v. 25, n^o 3, págs. 577–580, set. 1969.
- VAIDYA, V. G., ALEXANDRO, JR, F. J., Evaluation of some mathematical models for tumor growth. *Int. J. Biomed. Comput.*, Limerick, v. 13, n^o 1, págs. 19–36, jan. 1982.
- WANG, N., BUTLER, J. P., INGBER, D. E., Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, Washington, DC, v. 260, n^o 5111, págs. 1124–1127, maio 1993.
- WANG, Z., ZUIDHOF, M. J., Estimation of growth parameters using a nonlinear mixed Gompertz model. *Poult. Sci.*, Champaign, IL, v. 83, n^o 6, págs. 847–852, jun. 2004.

- WEAIRE, D., *The Kelvin Problem: Foam Structures of Minimal Surface Area*. London: Taylor and Francis, 1996.
- WEBB, G. F., A model of proliferating cell populations with inherited cycle length. *J. Math. Biol.*, Berlin, v. 23, nº 2, págs. 269–282, 1986.
- XU, X. L., The biological foundation of the Gompertz model. *Int. J. Biomed. Comput.*, Limerick, v. 20, nº 1-2, págs. 35–39, jan. 1987.
- YAMANAKA, H. I., HONDA, H., A checkerboard pattern manifested by the oviduct epithelium of the Japanese quail. *Int. J. Dev. Biol.*, Vizcaya, v. 34, nº 3, págs. 377–383, set. 1990.
- ZHANG, X., FEI, K., AGBAS, A., YAN, L., ZHANG, J., O'REILLY, B., DEUTZMANN, R., SARRAS, JR, M. P., Structure and function of an early divergent form of laminin in *Hydra*: a structurally conserved ECM component that is essential for epithelial morphogenesis. *Dev. Genes Evol.*, Berlin, v. 212, nº 4, págs. 159–172, maio 2002.
- ZHANG, X., HUDSON, B. G., SARRAS, JR, M. P., *Hydra* cell aggregate development is blocked by selective fragments of fibronectin and type IV collagen. *Dev. Biol.*, New York, v. 164, nº 1, págs. 10–23, jul. 1994.