

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
PROGRAMA INTERDISCIPLINAR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
COMPUTAÇÃO APLICADA - PIPCA

UM MODELO PARA INVESTIGAÇÃO
DO CRESCIMENTO E DA
MORFOLOGIA DE TUMORES

Marcos André Knewitz

SÃO LEOPOLDO, RS - BRASIL

2002

MARCOS ANDRÉ KNEWITZ

**UM MODELO PARA INVESTIGAÇÃO DO CRESCIMENTO E
DA MORFOLOGIA DE TUMORES**

SÃO LEOPOLDO, RS - BRASIL

2002

MARCOS ANDRÉ KNEWITZ

**UM MODELO PARA INVESTIGAÇÃO DO CRESCIMENTO E
DA MORFOLOGIA DE TUMORES**

Dissertação apresentada ao Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Computação Aplicada, da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Computação Aplicada.

Orientador: Dr. José Carlos Merino Mombach

SÃO LEOPOLDO, RS - BRASIL

2002

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS
PROGRAMA INTERDISCIPLINAR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
COMPUTAÇÃO APLICADA

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO

**UM MODELO PARA INVESTIGAÇÃO DO CRESCIMENTO
E DA MORFOLOGIA DE TUMORES**

ELABORADA POR
MARCOS ANDRÉ KNEWITZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
COMPUTAÇÃO APLICADA

Comissão examinadora:

Dr. José Carlos Merino Mombach - UNISINOS

Dr. Marcelo Walter - UNISINOS

Dr. Rita Maria Cunha de Almeida - UFRGS

São Leopoldo, 14 de junho de 2002

DEDICATÓRIA

À Magali, minha esposa,
por seu amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

a Deus pela existência e pela saúde física e mental;

à Magali, minha esposa, por seu apoio e compreensão;

a Carlos e Renéia, meus pais, pela educação formal e informal, sem as quais eu não chegaria até aqui;

ao professor José Carlos, meu orientador, pelos conhecimentos transmitidos e pela constante disposição em ajudar;

ao Müller, meu afidindo (afilhado e padrinho), pelo apoio moral em momentos difíceis;

aos meus irmãos, amigos e afilhados, pela compreensão;

ao Alceu e à Joecy, Diretor da DSI e Coordenadora do SISINF, pelo apoio para que eu conseguisse conciliar o mestrado com as atividades profissionais;

ao Altair, ao Lucimar, e aos demais colegas de serviço, pela tolerância à minha ausência física ou mental em alguns momentos importantes;

ao Ivan, à Fabiane e ao Leonel, também mestrandos, pelas dicas valiosas;

aos professores Bardo e Ney por suas contribuições;

e à Rejane, secretária do PIP-CA, pela atenção.

Agradeço, também, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram a realizar este trabalho.

RESUMO

UM MODELO PARA INVESTIGAÇÃO DO CRESCIMENTO E DA MORFOLOGIA DE TUMORES

Autor: Marcos André Knewitz

Orientador: Dr. José Carlos Merino Mombach

Alterações na adesão celular estão envolvidas nas fases iniciais do processo que conduz um tumor de benigno a maligno. Uma das características desse processo é a alteração da morfologia do tumor, principalmente de sua interface com o tecido sadio. A adesão celular se dá através de moléculas específicas denominadas Moléculas de Adesão Celular (CAM'S). Essas moléculas também atuam na organização das células de um tecido ou de um agregado celular através de um mecanismo denominado de Adesão Diferenciada. Este mecanismo foi proposto para explicar a reorganização das células através da minimização da energia livre de adesão do agregado celular. Essa energia tem sua origem nas diferenças de adesão entre tipos celulares. Diferenças de adesão entre tipos celulares, por sua vez, geram tensões superficiais que podem ser medidas experimentalmente. Como o crescimento tumoral também implica na reorganização espacial das células tumorais e das células normais adjacentes ao tumor, um modelo que inclua a Adesão Diferenciada contempla não só a adesão, mas também, a reorganização celular, dois importantes fenômenos envolvidos no crescimento tumoral. O Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada inclui este mecanismo e, embora seja muito utilizado para simular processos que envolvem reorganização celular, como, por exemplo morfogênese, ainda é pouco explorado para simular crescimento tumoral. Neste trabalho, desenvolveu-se um modelo, baseado no Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada, para simular o crescimento tumoral e investigar o papel da adesão celular na morfologia da interface entre o tumor e o tecido sadio. Na transição de benigno para maligno, a interface tumor/tecido sadio torna-se irregular. Neste trabalho, a irregularidade da

interface dos padrões gerados foi quantificada pela dimensão fractal da borda do tumor e pelo índice de irregularidade. Essas medidas foram relacionadas à tensão superficial entre células tumorais e normais, pois a tensão superficial está diretamente relacionada a adesões celulares e determina a configuração de menor energia livre do agregado. Com os resultados obtidos por este modelo, pôde-se concluir que a diminuição da adesão celular entre células tumorais pode gerar tensões superficiais que modificam o comportamento do tumor, afetando a interface com o tecido sadio tornando-a mais irregular. Pôde concluir, também, que somente com tensões superficiais negativas pode-se observar o desprendimento de células da massa tumoral, fenômeno necessário para que haja metastatização.

Palavras-chave: morfologia de tumores, Modelo de Potts, adesão celular.

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS
PROGRAMA INTERDISCIPLINAR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM COMPUTAÇÃO
APLICADA

Autor: Marcos André Knewitz

Orientador: Dr. José Carlos Merino Mombach

Título: Um Modelo para Investigação do Crescimento e da Morfologia de Tumores.

Dissertação de Mestrado em Computação Aplicada: Computação Científica.

São Leopoldo, 14 de junho de 2002.

ABSTRACT

A MODEL TO INVESTIGATE TUMOR GROWTH AND MORPHOLOGY

Author: Marcos André Knewitz

Supervisor: Dr. José Carlos Merino Mombach

Cell adhesion modifications are involved in the initial steps of the process that leads a tumor change from benign to malignant. One of the features of this process is the modification of the tumor morphology, mainly the interface between the normal and tumor tissue. Cell adhesion is performed by molecules known as Cell Adhesion Molecules (CAM's). These molecules are important in the organization of a cellular tissue or in an aggregate of cells through a mechanism called Differential Adhesion. This mechanism was proposed to explain this sorting through the minimization of the adhesion free energy cells aggregate, which arises from adhesion differences between cell types. Adhesion differences produce surface tensions, which can be experimentally measured. As tumor growth implies sorting of both, tumor cells and the surrounding normal cells, a model that includes Differential Adhesion contemplates both, adhesion and cell sorting. The Extended Potts Model with Differential Adhesion includes this mechanism and, although it has been largely used to simulate processes that involves cell sorting mainly in morphogenesis, it is still little explored to simulate tumor growth. In this work we propose a model for tumor growth based on the Extended Potts Model with Differential Adhesion to investigate tumor growth and the role of the cell adhesion in the morphology of the interface between healthy and tumor tissues. In the benign to malignant transition, the interface between tumor and normal tissue becomes irregular. The irregularity of this interface was measured by the tumor boundary fractal dimension and by the irregularity index. These quantities were related to the surface tension between tumor and normal cells. The surface tension is directly related to cell adhesion and determines the aggregate

configuration with minimum free energy. This work shows that the a change of adhesion can lead to surface tensions modifications that affect both, tumor behavior and the interface between tumor and normal tissue making it irregular. This work also shows that only with negative surface tensions it is possible to observe cells detaching from the tumor mass, which is a required phenomenon to the metastatising process.

Keywords: tumor morphology, Potts model, cell adhesion.

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS

APPLIED COMPUTATION INTERDISCIPLINAR GRADUATION PROGRAM

Author: Marcos André Knewitz

Supervisor: José Carlos Merino Mombach

Title: A Model to Investigate Tumor Growth and Morphology.

Master Dissertation in Applied Computing: Scientific Computing.

São Leopoldo, June 14, 2002.

1 SUMÁRIO

1	SUMÁRIO.....	X
2	LISTA DE FIGURAS.....	XII
3	LISTA DE TABELAS.....	XIV
4	LISTA DE GRÁFICOS.....	XV
5	INTRODUÇÃO	16
6	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
6.1	INTRODUÇÃO	21
6.2	CRESCIMENTO DE TUMORES	23
6.2.1	<i>Introdução</i>	23
6.2.2	<i>Progressão Tumoral.....</i>	24
6.2.3	<i>Morfologia dos Tumores</i>	26
6.2.4	<i>Metastatização</i>	29
6.2.5	<i>Adesão Celular.....</i>	31
6.2.6	<i>Metastatização e Adesão Celular.....</i>	33
6.2.6.1	<i>Adesão Célula-Célula.....</i>	34
6.2.6.2	<i>Adesão Célula-MEC.....</i>	35
6.2.7	<i>Conclusão.....</i>	36
6.3	ADESÃO DIFERENCIADA	38
6.3.1	<i>Introdução</i>	38
6.3.2	<i>Ordenamento Celular.....</i>	39
6.3.3	<i>A Hipótese da Adesão Diferenciada.....</i>	40
6.3.4	<i>Tensão Superficial em Agregados Celulares.....</i>	41
6.3.5	<i>Modelos Computacionais para Organização Celular.....</i>	44
6.3.6	<i>Conclusão.....</i>	46
6.4	MODELO DE POTTS ESTENDIDO COM ADESÃO DIFERENCIADA	48
6.4.1	<i>Introdução</i>	48
6.4.2	<i>Método Monte Carlo</i>	48
6.4.3	<i>Ensemble Microcanônico</i>	49
6.4.4	<i>Ensemble Canônico.....</i>	50
6.4.5	<i>Algoritmo de Metropolis</i>	52
6.4.6	<i>Modelo de Ising.....</i>	54

6.4.7	<i>Modelo de Potts</i>	55
6.4.8	<i>Modelo de Potts para Crescimento de Grãos</i>	56
6.4.9	<i>Extensões ao Modelo de Potts</i>	58
6.4.9.1	Acoplamento entre tipos de rótulos	58
6.4.9.2	Acoplamento a um campo externo	58
6.4.9.3	Vínculos	59
6.4.10	<i>Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada</i>	59
6.5	DIMENSÃO FRACTAL E ÍNDICE DE IRREGULARIDADE.....	63
6.6	MODELOS COMPUTACIONAIS DE CRESCIMENTO DE TUMORES	68
6.6.1	<i>Introdução</i>	68
6.6.2	<i>Modelo Clássico de Crescimento Cinético</i>	69
6.6.3	<i>Modelos de Crescimento Tumoral</i>	70
6.6.3.1	Modelo de Smolle e Stettner (1993)	71
6.6.3.2	Modelo de Ferreira et al.(1998).....	72
6.6.3.3	Modelo de Rashbass et al. (1996).....	73
6.6.3.4	Modelo de Reis et al. (2001)	74
6.6.3.5	Modelo de Stott et al. (1999).....	76
6.6.3.6	Modelo de Turner e Sherrat.....	77
7	DESENVOLVIMENTO DO MODELO E INVESTIGAÇÃO SIMULACIONAL	79
7.1	INTRODUÇÃO	79
7.2	O MODELO	81
7.3	SIMULAÇÕES.....	88
7.3.1	<i>Definição dos Valores dos Parâmetros das Simulações</i>	88
7.3.1.1	Área Alvo das células normais e tumorais - $A(n)$ e $A(t)$	89
7.3.1.2	Coefficiente de elasticidade das células - λ	90
7.3.1.3	Energias de Adesão Celular - e_m, e_n, e_{tt}	90
7.3.1.4	Temperatura - T	91
7.3.1.5	Mitose Crítica - MC	92
7.3.1.6	Tempo de Relaxação - TR	93
7.3.1.7	Energias de Adesão e Tensões Superficiais	93
7.3.1.8	Sumário dos Parâmetros	96
7.3.2	<i>Tecido Inicial</i>	97
7.3.3	<i>Execuções</i>	97
7.4	RESULTADOS	100
8	CONCLUSÕES E ESTUDOS FUTUROS.....	106
9	BIBLIOGRAFIA	109

2 LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estágios da progressão tumoral	25
FIGURA 2 - Diferenças entre tecido normal e tecido tumoral	26
FIGURA 3 - Diferenças macroscópicas entre tumores benignos e malignos	28
FIGURA 4 - Critérios da semiologia dermatológica	29
FIGURA 5 - Estrutura da pele	29
FIGURA 6 - Estruturas de Adesão e Moléculas de Adesão Celular	33
FIGURA 7 - Célula Tumoral despreendendo-se de um carcinoma <i>in situ</i>	36
FIGURA 8 - Estágios da reorganização celular em agregados celulares	39
FIGURA 9 - Similaridade entre a segregação celular e o comportamento de líquidos imiscíveis	40
FIGURA 10 - Efeito das tensões superficiais em agregados celulares	43
FIGURA 11 - Simulação do fenômeno de engolfamento	44
FIGURA 12 - Simulação do fenômeno de segregação celular completa	45
FIGURA 13 - Anisotropia em função da discretização da rede	57
FIGURA 14. - Distribuição dos 20 vizinhos mais próximos em uma rede quadrada bidimensional	57
FIGURA 15 - Exemplo de configuração de uma rede no Modelo de Potts Estendido com Adesão diferenciada	61
FIGURA 16 - Fractais de Mandelbrot	64
FIGURA 17 - Delimitação da borda de um tumor	66
FIGURA 18 - Padrões obtidos por Smolle & Stettner	71
FIGURA 19 - Padrões obtidos por Ferreira et al.	73
FIGURA 20 - Padrões obtidos por Rashbass et al.	74
FIGURA 21 - Padrões obtidos por Reis et al.	75
FIGURA 22 - Padrão obtido por Stott et al.	77
FIGURA 23 - Padrões obtidos por Turner & Sherrat	78
FIGURA 24 - Representação esquemática da alternativa de ocupação parcial da rede.....	84
FIGURA 25 - Efeitos da discretização da rede em cálculos	85

FIGURA 26 - Fluxograma principal do modelo	87
FIGURA 27 - Interações energéticas até os quarto primeiros vizinhos em uma rede quadrada	92
FIGURA 28 - Efeito da temperatura na forma da célula	92
FIGURA 29 - Ligações homotípicas entre células normais, entre células normal e tumoral e entre células tumorais	95
FIGURA 30 - Estágios da evolução de um tumor em uma simulação.....	98
FIGURA 31 - Detalhe da forma das células no modelo.....	99
FIGURA 32 - Padrões finais para a mesma tensão superficial	102
FIGURA 33 - Padrões finais para diferentes tensões superficiais.....	104

3 LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comparativo entre experimento de laboratório e simulação computacional	69
TABELA 2 - Caracterização resumida dos modelos estudados	70
TABELA 3 - Conjunto A de energias	96
TABELA 4 - Conjunto B de energias	96
TABELA 5 - Conjunto C de energias	96
TABELA 6 - Conjunto D de energias	96
TABELA 7 - Parâmetros utilizados nas simulações	97

4 LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Gráfico Log-Log para cálculo da dimensão fractal.....	65
GRÁFICO 2 - Índice de Irregularidade em função do tempo	100
GRÁFICO 3 - Dimensão Fractal da borda dos tumores em função da Tensão Superficial.....	101
GRÁFICO 4 - Índice de Irregularidade dos tumores em função da Tensão Superficial	105

5 INTRODUÇÃO

A reprodução celular em um organismo é controlada por fatores que a regulam de tal forma que sejam mantidos o tamanho e a arquitetura dos tecidos celulares. Eventualmente, uma célula, dentro de uma população normal de células, sofre uma mutação genética que incrementa sua propensão em proliferar, passando a se reproduzir de forma autônoma. Essa reprodução excessiva e descontrolada da célula mutada e de seus descendentes acaba por formar uma massa celular que recebe a designação de tumor (ANDRADE, 1984).

Os tumores podem ser divididos em duas classes, benigno ou maligno, dependendo de sua forma de crescimento. Tumores benignos crescem por expansão, comprimindo ou deslocando o tecido normal que o envolve, enquanto tumores malignos crescem por infiltração, destruindo o tecido que invadem (STOTT et al., 1999). Tumores malignos recebem a denominação de câncer, embora nem todo câncer apresente-se sob a forma de tumor, como é o caso, por exemplo da Leucemia (COTRAN et al., 1989).

As estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2001, elaboradas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Ministério da Saúde, previam o registro de 305.330 casos novos da doença, ocasionando 117.550 mortes. O câncer é a terceira maior causa de mortes no Brasil (11,4% do total dos óbitos), sendo superado pelas doenças cardiovasculares e por causas externas (acidentes de trânsito e outras causas de morte violenta) [INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2000]. Nos Estados Unidos, a American Cancer Society (ACS) estimava que, em 2001, aproximadamente 552.200 americanos morreriam de câncer, mais de 1.500 pessoas por dia. Nos Estados Unidos, o câncer é segunda causa de morte, sendo superada apenas por doenças do coração. Aproximadamente 5 milhões de pessoas morreram na última década nos EUA e 1.220.100 novos casos deveriam ser diagnosticados em 2001 [AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS), 2001].

O que torna o câncer tão letal é o seu crescimento invasivo, que pode comprometer órgãos vitais, e a sua capacidade de metastatização, isto é, a

formação de um novo tumor a distância do tumor original e sem continuidade com este (GOMES, 1997). Para metastatizar, células cancerosas têm que se desprender de sua localização original, invadir o tecido local adjacente, penetrar um vaso sanguíneo ou linfático, viajar pela circulação até um local distante e estabelecer uma nova colônia celular.

Estudos recentes têm investigado o papel de moléculas genericamente chamadas de Moléculas de Adesão Celular (*Cell Adhesion Molecules* – CAM's) no processo de invasão local. Moléculas de Adesão Celular são moléculas que regulam a adesão entre as células e entre estas e a Matriz Extracelular (MEC), que é uma malha de proteínas secretadas pelas próprias células e que serve como elemento estrutural nos tecidos celulares. A invasão maligna pode resultar do decréscimo da coesão das células cancerosas e/ou do acréscimo da adesão destas com a matriz extracelular ou outros componentes dos tecidos invadidos. Estudos demonstram que alterações na adesão das células cancerosas parecem exercer papel importante no processo de invasão local, tanto ao facilitar que as células cancerosas se desprendam do tumor, quanto ao induzir nestas uma maior mobilidade (STEINBERG & FOTY, 1997; FOTY et al., 1998 VLEMINCKZ et al., 1991; GRIMSTAD, 1987; HUANG & INGBER, 1999).

Alterações na adesão celular também parecem estar implicadas na morfologia dos tumores. Tumores benignos geralmente são esféricos ou ovalados e sua interface com o tecido normal é nítida e regular. Já, em tumores malignos, a interface com o tecido normal é irregular e pouco nítida. Ainda, em muitos casos, o tumor costuma apresentar-se como uma massa assimétrica com numerosos prolongamentos (GOMES, 1997).

De outro lado, sabe-se que processos biológicos que envolvem a reprodução celular, tais como cicatrização de feridas, morfogênese e o próprio desenvolvimento tumoral, implicam na reorganização espacial das células envolvidas, e que esta reorganização também é dependente das CAM's.

Um dos principais mecanismos de reorganização celular envolvendo as CAM's é o da Adesão Celular Diferenciada. Steinberg (1963) propôs a Hipótese da Adesão Diferenciada (*Differential Adhesion Hypothesis* – DAH). Para propor tal hipótese, Steinberg baseou-se em observações de que existe uma similaridade entre o comportamento de tecidos celulares e o de líquidos imiscíveis. A DAH trata-se de um modelo termodinâmico segundo o qual a interação entre as células envolve uma

energia livre de adesão que depende das moléculas de adesão nas membranas das células. A minimização da superfície total de contato, analogamente ao que ocorre com líquidos como, por exemplo, água e óleo, guia a evolução do sistema. Em agregados celulares, devido as CAM's, diferentes energias estão associadas às interfaces entre células de tipos iguais e diferentes. Isto gera tensões superficiais, que são de diferenças de energia por unidade de área numa interface, e que influenciam a organização espacial das células e determinam a configuração com o mínimo de energia global (GRANER, 1993).

Dos modelos propostos na literatura científica para simular a reorganização celular baseada na Hipótese da Adesão Diferenciada, o que melhor representa as propriedades físicas de células biológicas é o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada proposto por Glazier & Graner (1993). Neste modelo a dinâmica da reorganização celular se dá pela minimização da energia livre de adesão celular. Muitos modelos baseados no Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada têm obtido sucesso na simulação de sistemas em que a reorganização celular de um organismo completo se dá através da Adesão Celular Diferenciada, como é o caso de trabalhos sobre a morfogênese do *Dictyostelium discoideum* (HOGEWEG, 2000; MARÉE, 2000; YANG, 1998 SAVILL & HOGEWEG, 1997).

O processo de transição de um tumor de benigno para maligno é geralmente iniciado com a invasão local do tecido adjacente, que por sua vez é caracterizada pela formação de uma interface irregular e pouco nítida entre o tecido tumoral e o normal, onde se pode observar células desprendendo-se da massa tumoral. Modelos computacionais para simular crescimento de tumores, que representem apropriadamente as características físicas e biológicas de células reais podem fornecer subsídios para o melhor entendimento deste processo que leva um tumor à condição de maligno.

Existe uma grande variedade de modelos para simular o crescimento de tumores. Essa variedade ocorre em função do mecanismo físico ou biológico em estudo, da técnica computacional utilizada, ou de ambos (KANSAL et al., 2000; RASHBASS et al., 1996; FERREIRA et al., 1998; REIS et al., 2001). Entretanto, poucos modelos investigam a interface entre o tumor e o tecido normal e, dos que fazem isso, apenas o modelo de REIS et. al (2001) investiga a implicação de alterações da adesão celular na morfologia da interface.

A escassez de modelos que investigam tal questão e a aplicabilidade do Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada para sistemas que envolvem organização celular em função das CAM's, motivou o desenvolvimento de um modelo baseado no mesmo para investigar a influência da adesão celular na morfologia da interface entre o tumor e o tecido normal. Este é o objetivo central deste trabalho.

Uma das medidas mais utilizadas para quantificar interfaces é a dimensão fractal. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de associar a dimensão fractal da borda de tumores com seu grau de malignidade. Neste trabalho, para quantificar a interface entre tumor e o tecido normal, usa-se a dimensão fractal da borda dos tumores e, também, o índice de irregularidade, uma medida que relaciona o perímetro de uma imagem com a sua área. Essas medidas são tomadas em função da tensão superficial entre o tumor e o tecido normal, visto que são as tensões superficiais que determinam a configuração de equilíbrio em um agregado de células. Diferentes tensões superficiais são obtidas fazendo-se variar os valores de energia de adesão entre células tumorais e entre essas e as normais.

A apresentação deste trabalho é dividida em duas grandes partes: revisão bibliográfica e desenvolvimento do modelo e investigação simulacional.

A primeira parte consiste de uma revisão bibliográfica com intuito de prover um embasamento teórico para o desenvolvimento do modelo proposto. Versa-se sobre a biologia do câncer, sobre a Hipótese da Adesão Diferenciada, sobre a influência desta na transição de tumores de benigno para maligno, e sobre os modelos que implementam tal hipótese. Na seqüência o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada é introduzido e detalhado, e, faz-se uma explanação teórica sobre dimensão fractal e índice de irregularidade, as medidas quantitativas utilizadas para avaliar a interface dos tumores gerados pelas simulações. Por fim, dá-se uma visão geral sobre simulação de crescimento de tumores, destacando-se alguns modelos computacionais encontrados na literatura que estão relacionados com os interesses desse trabalho.

Na segunda parte, apresenta-se o modelo desenvolvido, dando-se ênfase às modificações implementadas sobre o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada necessárias para que o mesmo simule crescimento tumoral. Em seguida, explana-se a escolha dos parâmetros utilizados nas simulações e

apresentam-se os resultados obtidos através das simulações realizadas com o modelo desenvolvido.

Ao final, são apresentadas as conclusões a que este trabalho conduziu e considerações sobre os possíveis caminhos de continuação do mesmo.

Por ser um trabalho interdisciplinar, envolvendo as áreas da computação, física e biologia, o texto introduz muitos conceitos e definições básicas dessas áreas. Procurou-se, ao introduzir esses conceitos, apresentá-los com um nível tal de aprofundamento que não fosse prejudicado o prosseguimento da leitura para quem é leigo em determinada área, mas que também não comprometesse o significado dos mesmos.

6 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

6.1 Introdução

A primeira parte da revisão bibliográfica refere-se à biologia dos tumores, detendo-se apenas em questões relevantes ao escopo deste trabalho. Assim sendo, são abordados os tópicos da progressão tumoral, isto é, o processo de surgimento e evolução de um tumor; da morfologia dos tumores, caracterizando-se as diferenças entre tumores benignos e malignos e de suas respectivas interfaces com o tecido sadio; e do processo de metastatização, que é a formação de novos tumores a distância do tumor original e também a característica que lhes confere a elevada letalidade.

Conforme será exposto, vários fatores estão implicados na metastatização. Um deles, a alteração da adesão celular, parece estar envolvido na invasividade local, processo que antecede a metastatização e afeta a morfologia da interface entre tecido tumoral e o normal. Portanto, esta revisão bibliográfica, também inclui um tópico sobre a adesão celular e sobre trabalhos experimentais que investigam a adesão celular e sua correlação com a malignidade do tumor.

Processos cancerosos são caracterizados pela excessiva reprodução celular. À medida que as células crescem e se reproduzem, o tumor e o tecido adjacente precisam reorganizar-se. Um dos principais mecanismos de reorganização é o da Adesão Diferenciada. Esse mecanismo é dependente das CAM's. Por isso, aborda-se, na segunda parte desta revisão, assuntos relacionados à reorganização celular, explanando-se a Hipótese da Adesão Diferenciada e apresentando-se modelos computacionais que contemplam tal hipótese.

Na seqüência, apresenta-se o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada, com a intenção de fundamentar o desenvolvimento do modelo proposto, bem como, justificar a opção da utilização desse modelo como base para o que é desenvolvido neste trabalho.

A seção seguinte apresenta uma explanação teórica sobre dimensão fractal e índice de irregularidade, as duas medidas quantitativas utilizadas para mensurar a interface dos tumores gerados neste trabalho.

Por fim, são apresentados outros modelos computacionais que simulam crescimento de tumores e estão relacionados com este trabalho.

6.2 Crescimento de Tumores

6.2.1 Introdução

A reprodução celular em um organismo é controlada por fatores que a regulam de forma que sejam mantidos o tamanho e a arquitetura dos tecidos celulares. Em circunstâncias especiais, esse controle falha e as células passam a se reproduzir de forma autônoma. Células com esta característica são denominadas células neoplásicas (ANDRADE, 1984).

Esse crescer autônomo gera um acúmulo progressivo de células neoplásicas, formando uma massa volumosa que recebe a designação de neoplasia ou tumor.

O termo “tumor” foi aplicado originalmente à tumefação causada por inflamação. Como as neoplasias também podem induzir a tumefações, o significado não-neoplásico de tumor foi perdendo-se ao longo do tempo e atualmente esse termo equivale à neoplasia (COTRAN et al., 1989). É importante ressaltar que nem todas as neoplasias apresentam-se sob a forma de tumor.

Os tumores podem ser divididos em duas classes, benigno ou maligno, dependendo do seu método de crescimento. Tumores benignos crescem por expansão, comprimindo ou deslocando o tecido normal que o envolve, enquanto tumores malignos crescem por infiltração local, destruindo o tecido que invadem (GOMES, 1997). Entre os extremos de malignidade e benignidade, há muitas neoplasias com características intermediárias.

São muitas as diferenças entre as neoplasias benignas e malignas. Entretanto, a capacidade de metastatizar, isto é, de formar um novo tumor a distância do tumor original, é a característica mais marcante de uma neoplasia maligna (GOMES, 1997).

Câncer é a designação comum para todos os tumores malignos (COTRAN et al., 1989).

6.2.2 Progressão Tumoral

O termo câncer refere-se a mais de 100 formas de doenças. Quase todos os tecidos do corpo podem dar origem a cânceres e ainda, cada câncer tem suas próprias características. Apesar das variações, os cânceres parecem seguir algumas regras universais (WEINBERG, 1996).

O desenvolvimento do câncer segue um processo de múltiplos estágios caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas. Uma neoplasia incipiente, iniciada a partir de uma mutação em uma única célula normal, precisa adquirir, em sua progressão para graus mais acentuados de malignidade, as propriedades, aparentemente independentes, de proliferação extensa, invasão local e disseminação a distância. Cada uma dessas etapas se relaciona, por sua vez, a mais de uma anormalidade dentro da célula, como ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores¹. Verifica-se que o acúmulo final de uma série de alterações genéticas é o responsável pelas características biológicas do tumor, e não a seqüência cronológica com que as mesmas aparecem. Progressão tumoral é a seqüência de alterações que ocorrem num sistema neoplásico e que podem levá-lo do caráter benigno para o maligno e deste, para graus mais acentuados de malignidade, incluindo metastatização (GOMES, 1997).

Segundo Ruoslathi (1996) a progressão tumoral apresenta os seguintes estágios (FIGURA 1):

1 – Iniciação e Promoção. O desenvolvimento de um tumor começa quando alguma célula dentro de uma população normal, suporta uma mutação genética que incrementa sua propensão em proliferar quando não deveria.

2 – Hiperplasia. A célula alterada e seus descendentes continuam a parecerem normais, mas se reproduzem demasiadamente.

3 – Displasia. Em adição à proliferação excessiva, as novas gerações de células apresentam forma e orientação anormais.

¹ Duas classes de genes têm o maior papel no surgimento do câncer. Em suas configurações normais, eles atuam no ciclo de vida da célula – uma intrincada seqüência de eventos onde a célula aumenta de tamanho e divide. Proto-oncogenes estimulam tal crescimento, enquanto genes supressores de tumor inibem. Quando mutados, os proto-oncogenes podem tornar-se oncogenes que levam à multiplicação excessiva da célula mantendo o estímulo reprodutivo contínuo quando este deveria ser interrompido. Genes supressores de tumor, em contraste, contribuem para o câncer quando são inativados pelas mutações.

4 – Câncer *in situ* ou pré-invasivo. As células afetadas tornam-se mais anormais em forma e crescimento. Se o tumor ainda não rompeu os limites com os tecidos vizinhos, ele é chamado de câncer *in situ.*, podendo permanecer assim indefinidamente.

5 – Câncer ou Tumor Maligno. Se as mudanças genéticas dotarem o tumor da capacidade de invadir tecidos adjacentes e despejar células em vasos sanguíneos ou linfáticos, ele passa a ser considerado maligno. As células lançadas na corrente sanguínea podem estabelecer novos tumores (metástases) no organismo.

O limite máximo de possibilidade de nutrição por difusão de um aglomerado celular é de 1 a 2 mm de diâmetro. Um dos eventos biológicos que viabiliza a evolução do tumor é da capacidade deste de induzir angiogênese, a formação de vasos sanguíneos. Essa neovascularização do tumor segue uma cinética de crescimento menos acelerada que a das células tumorais, levando à formação de freqüentes áreas de necrose em função da baixa concentração de nutrientes obtidos por difusão (GOMES, 1997).

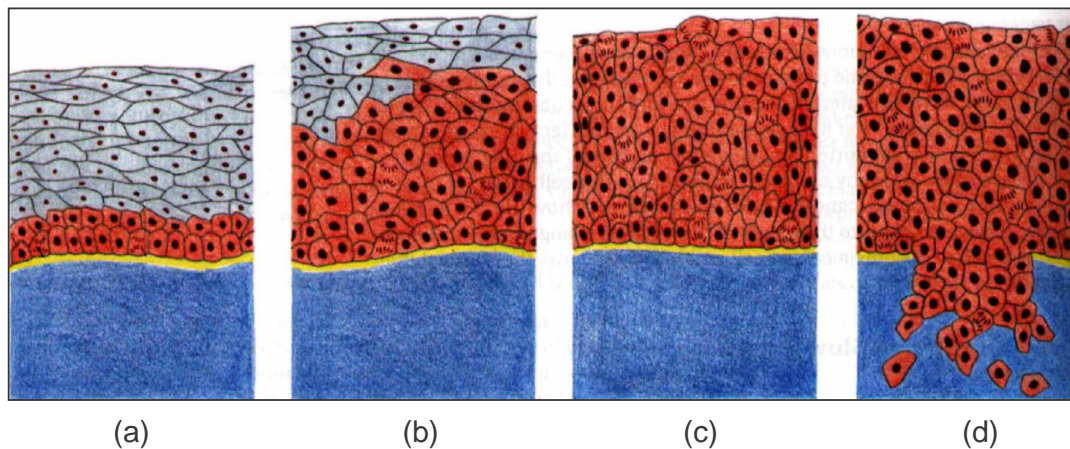


FIGURA 1- Estágios da progressão tumoral. Em (a), as células são normais, reproduzem-se normalmente e estão em harmonia com o tecido. Em (b), as células tumorais (escuras) são anormais em tamanho e forma, e reproduzem-se de forma acelerada. Em (c), o tumor, formado por células anormais, ainda não rompeu os limites com os tecidos vizinhos. Em (d), o tumor rompe os limites com os tecidos vizinhos, invadindo-os. Neste estágio o tumor é considerado maligno (adaptado de ALBERTS et al., 1994).

6.2.3 Morfologia dos Tumores

Em termos microscópicos, a característica mais marcante da progressão tumoral é o encontro de uma heterogeneidade cada vez mais acentuada, que se manifesta, ao exame histológico (FIGURA 2), pela diversidade morfológica do citoplasma e núcleo celulares (GOMES, 1997).

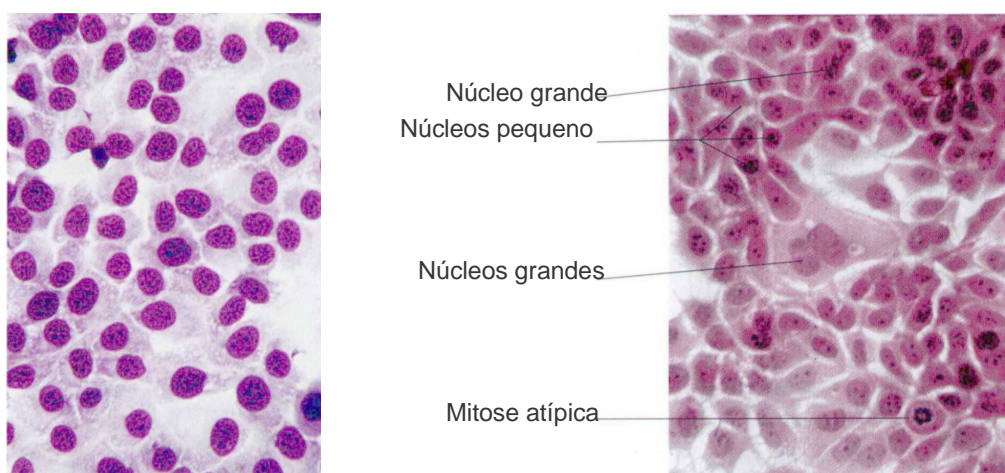


FIGURA 2 – Diferenças entre o tecido normal e o tecido tumoral. Cortes histológicos evidenciando as diferenças entre um tecido normal (à esquerda) e um tecido tumoral (à direita) (adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995)

Os tumores benignos são constituídos por células bem diferenciadas², semelhantes às células do tecido de origem, com núcleo relativamente pequeno, citoplasma abundante e raras mitoses, processo de reprodução celular durante o qual uma célula mãe se divide em duas. Seus limites com os tecidos adjacentes são precisos e freqüentemente é possível identificar uma pseudocápsula (capa fibrosa que envolve o tumor) (GOMES, 1997).

As células que compõem os tumores malignos são menos diferenciadas, e portanto, menos parecidas com as do tecido de origem. Estas células têm variações importantes de forma e de volume. Seus núcleos também são diferentes. Há núcleos

² O processo de especialização das células denomina-se diferenciação celular. Na diferenciação observa-se uma seqüência de modificações morfológicas, químicas e funcionais que transformam uma célula primitiva indiferenciada, capaz de executar as várias funções celulares com baixa eficiência, em uma célula diferenciada, capaz de executar as mesmas funções básicas, só que uma destas será realizada com grande eficiência.

volumosos e de limites imprecisos. São freqüentes as figuras de mitoses normais e anômalas. Os limites entre o tecido tumoral e o tecido normal são imprecisos; sendo possível observar a invasão do tecido normal pelas células do tumor (ANDRADE, 1984).

Do ponto de vista macroscópico, as características das neoplasias benignas são a forma geralmente esférica, a presença de cápsula fibrosa e a superfície de corte regular e homogênea. Nos processos neoplásicos malignos, a forma é geralmente irregular, não há desenvolvimento de uma cápsula fibrótica definida e a superfície de corte é geralmente irregular, heterogênea e com áreas de diferentes colorações (GOMES, 1997).

A morfologia dos tumores, conforme explicaremos abaixo, depende também da velocidade com que estes crescem.

As neoplasias benignas, por apresentarem um crescimento lento e do tipo expansivo, geralmente são, macroscopicamente, esféricas ou ovaladas, adquirindo na maioria das vezes, um padrão morfológico do tipo nodular, sendo bem delimitadas e quase sempre envolvidas por uma cápsula fibrótica, resultado da proliferação do tecido conjuntivo que as delimita externamente (GOMES, 1997). Quando os tumores crescem devagar existe a possibilidade de que os tecidos vizinhos se adaptem a este crescimento. Neste caso o tumor comprime os tecidos e os deforma, porém, mantêm-se nítidos os limites entre tecido tumoral e tecido normal (FIGURA 3(a)) (ANDRADE, 1984).

Quando as células neoplásicas proliferam rapidamente, e a medida que aumenta a velocidade de crescimento, o seu padrão também muda e, ao invés de comprimir os tecidos vizinhos, o tecido tumoral passa a infiltrá-los. Essa infiltração se faz pelos interstícios do tecido invadido, acompanhando vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. As neoplasias malignas, em função do crescimento infiltrativo, apresentam, do ponto de vista macroscópico, uma forma mais irregular, principalmente em sua superfície (FIGURA 3(b)). Assim, são freqüentes os pontos de infiltração dos tecidos, não permitindo o desenvolvimento da pseudocápsula definida. O tumor adquire uma forma que pode ser descrita como apresentando uma massa central com numerosos prolongamentos irregulares (FIGURA 3(c)). Por lembrar a figura de um caranguejo, surgiu o termo câncer para designá-las genericamente (*karkinos* – caranguejo em grego) (GOMES, 1997).

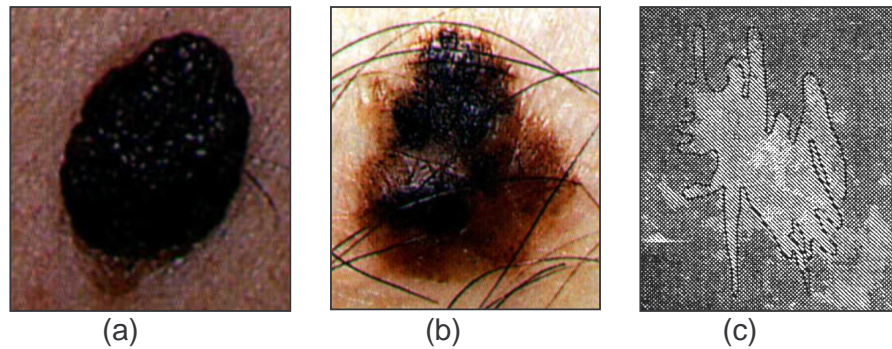


FIGURA 3 - Diferenças macroscópicas entre tumores benignos e malignos. (a) é um nevo (sinal de pele) benigno, com borda regular, limite com o tecido normal nítido e forma simétrica. (b) é um melanoma maligno com borda irregular, limites não nítidos (caracterizando infiltração) e forma assimétrica (adaptado de COX & LAWRENCE, 1999). (c) é um tumor de mama delimitado por um especialista, evidenciando a forma assimétrica com muitos prolongamentos partindo da massa tumoral (MENUT et al., 1997).

Neoplasias no sistema melanocítico (sistema de pigmentação da pele) favorecem a observação visual da interface entre um tumor e o tecido sadio. Na semiologia dermatológica, dois critérios estão relacionados à interface das afecções de pele com o tecido sadio: forma, classificada como regular ou irregular, e contorno, classificado como nítido ou borrado (FIGURA 4). Essas duas características compõem um conjunto de propriedades ou atipias utilizadas na identificação precoce por um especialista de um melanoma maligno cutâneo, uma neoplasia maligna de pele que possui elevado grau de malignidade. Esse conjunto, conhecido como a regra ABCDE, apresenta as seguintes propriedades:

- A – Assimetria;
- B – Contornos irregulares (franjeados ou policíclicos) ou borrados;
- C – Coloração desigual;
- D – Diâmetro superior a 6mm;
- E – Epitélio apresentando erosão ou alteração do relevo.

O melanoma maligno não é uma neoplasia de caráter uniforme, podendo distinguir-se vários tipos. A classificação baseia-se no tipo de crescimento, na evolução e na localização do tumor. O tipo de crescimento da neoplasia depende do grau de autonomia das células tumorais, podendo processar-se em sentido horizontal, dentro da epiderme (lentigo maligno, melanoma in situ); horizontalmente,

ao nível da epiderme e superfície da derme (melanoma de propagação superficial); ou em sentido vertical (melanoma nodular) (FIGURA 5). Entre outras características, os melanomas de crescimento horizontal, costumam apresentar forma irregular e contornos pouco nítidos (FIGURA 3(b)) (RASSNER & STEINERT, 1991).





Forma	1 	1 regular
	2 	2 irregular
Contornos	1 	1 nítidos
	2 	2 borrados

FIGURA 4 - Critérios da semiologia dermatológica. Critérios que dizem respeito à interface entre a afecção dermatológica e o tecido normal (adaptado de RASSNER & STEINERT, 1991).

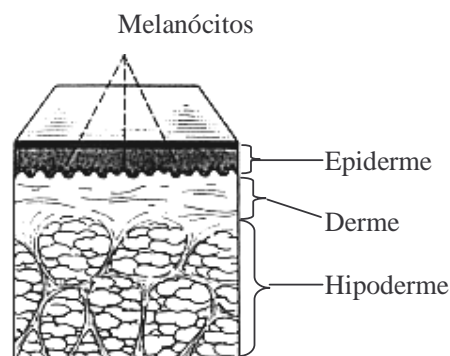


FIGURA 5 - Estrutura da pele. A camada superior é a Epiderme, a intermediária é Derme e a inferior, a Hipoderme. Na região basal da Epiderme estão os melanócitos que quando mutados podem dar origem ao melanoma maligno (adaptado de RASSNER & STEINERT, 1991).

6.2.4 Metastatização

A capacidade de metastatizar é a característica mais importante dos tumores malignos. Metástase significa colonização de um tumor maligno, a distância do foco primitivo original, sem continuidade com o mesmo (GOMES, 1997).

Para metastatizar, células cancerosas têm que se desprender de sua localização original, invadir o tecido local adjacente, penetrar em um vaso sanguíneo ou linfático, viajar pela circulação até um local distante e estabelecer uma nova colônia celular (RUOSLATHI, 1996).

Um passo importante na transição de benigno para maligno é invasão local do próprio tecido de origem do tumor. Apesar da invasividade local ser um fenômeno ligado diretamente à capacidade de metastatização, a primeira não implica

necessariamente na segunda. Certos tumores de pele, por exemplo, possuem alto poder de invasão e destruição locais, mas praticamente não geram metástases (GOMES, 1997).

Após a invasão local, o passo seguinte no processo de metastatização é a ruptura da lâmina basal³ subjacente. A capacidade de produzir enzimas proteolíticas torna a célula neoplásica capaz de destruir a lâmina basal (GOMES, 1997). Excetuando-se os glóbulos brancos, que penetram em outros tecidos para cumprir sua função de defesa do organismo, as demais células não o fazem. Entretanto, células cancerosas invadem outros tecidos e o fazem da mesma maneira que os glóbulos brancos, liberando enzimas que dissolvem a membrana basal (RUOSLATHI, 1996). Outras vezes, o que pode acontecer é a cessação da produção da lâmina basal ou mesmo a síntese, pelas células tumorais, de lâminas basais anômalas (GOMES, 1997). Apesar de serem capazes de provocar profundas modificações no microambiente que as cerca, as células tumorais raramente invadem tecidos mais resistentes, como paredes arteriais e cartilagens.

Para dar continuidade ao processo de metastatização, uma vez invadido o tecido circunvizinho, a célula deve chegar a uma via de metastatização. A invasão dos vasos sangüíneos ocorre pela penetração de capilares e vênulas. Vênulas são vasos sangüíneos de calibre intermediário entre capilares e veias. Tais vasos podem ser aqueles do tecido conjuntivo⁴ normal invadido pelo tumor ou aqueles neoformados, induzidos pela neoplasia. A invasão pode se dar também pelas cavidades naturais do organismo ou por vias linfáticas (GOMES, 1997).

Uma vez na corrente sangüínea, a célula cancerosa deve se aderir ao revestimento de um vaso sangüíneo, atravessá-lo, penetrar a membrana basal, invadir os tecidos adjacentes e começar a multiplicar-se em seu novo local (RUOSLATHI, 1996).

³ Os epitélios apresentam, na sua superfície de contato com o tecido conjuntivo, uma estrutura chamada lâmina basal. Essa estrutura, que tem a espessura de 20 a 100nm, é formada por substâncias sintetizadas pelas células epiteliais. Em continuação à lâmina basal, há uma estrutura caracterizada pelo acúmulo de complexos de fibras protéicas. À associação de lâmina basal e esta estrutura chama-se membrana basal.

⁴ O tecido conjuntivo caracteriza-se, morfológicamente, por apresentar diversos tipos de células separadas por abundante material extracelular produzido por elas. São exemplos de tecido conjuntivo, o tecido adiposo e o tecido conjuntivo propriamente dito, que pode ser frouxo ou denso. O tecido conjuntivo frouxo apoia e nutre as células epiteliais e contém elevada quantidade de substância fundamental amorfa, um fluido viscoso que preenche os espaços entre as células.

6.2.5 Adesão Celular

Esta seção, por tratar de um assunto bastante consolidado na área de biologia, foi obtida, em sua totalidade, de Alberts et al. (1994).

A maioria das células em organismos multicelulares está organizada em associações cooperativas chamadas tecidos, que por sua vez estão associados de várias maneiras para formar unidades funcionais maiores chamadas órgãos. As células em tecidos estão usualmente em contato com uma complexa rede de macromoléculas extracelulares secretadas denominada de matriz extracelular. Esta matriz ajuda a manter as células e tecidos unidos. Em muitos casos as células de um tecido também são mantidas em seus devidos lugares pela adesão direta de uma célula a outra (adesão intercelular). A adesão entre células ou entre uma célula e a matriz extracelular se dá através de estruturas especializadas denominadas junções celulares, ou se dá diretamente pela ligação de moléculas especializadas presentes nas membranas de células adjacentes.

Junções celulares ocorrem em todos os tecidos, mas são especialmente importantes no epitélio. Junções celulares podem ser classificadas em três grupos funcionais: junções de oclusão, que sela as membranas plasmáticas de células adjacentes impedindo a passagem de moléculas, mesmo que pequenas, de um lado para o outro do epitélio; junções de ancoragem que mecanicamente prendem células (e seus citoesqueletos⁵) às células vizinhas ou a matriz extracelular; junções comunicantes, que mediam a passagem de sinais químicos ou elétricos de uma célula para outra.

Tecidos maduros costumam apresentar estruturas de ancoragem bem desenvolvidas. Entretanto durante o desenvolvimento de um tecido, quando as células precisam de maior flexibilidade para rearranjarem-se, ou mesmo em alguns tecidos maduros, as células costumam unirem-se diretamente através de moléculas especializadas, sem apresentarem estruturas de junção. A este mecanismo se dá o nome de adesão intercelular. Quando moléculas de uma célula ligam-se a moléculas

⁵ Citoesqueleto é uma rede complexa constituída de proteínas estruturais que condicionam a forma das células e desempenham papel importante na movimentação celular.

do mesmo tipo em células adjacentes, diz-se que a ligação é homofílica. Quando moléculas em uma célula ligam-se a moléculas de tipos diferentes em células adjacentes, a ligação é dita heterofílica.

A arquitetura do tecido é ativamente mantida por adesões seletivas que as células fazem e progressivamente ajustam. As moléculas envolvidas neste mecanismo de adesão seletiva são denominadas de Moléculas de Adesão Celular (Cell Adhesion Molecules – CAM's). Existem duas classes distintas destas moléculas: as dependentes de Ca^{2+} e as independentes de Ca^{2+} .

As moléculas dependentes de Ca^{2+} responsáveis pela adesão intercelular em vertebrados são as caderinas. As primeiras caderinas foram nomeadas de acordo com o tipo de tecido onde eram encontradas: Caderina E presente em epitélios; Caderina N presente em nervos e músculos; e Caderina P presente na placenta e na epiderme. Novos tipos de caderinas são continuamente descobertos. A maioria das caderinas são glicoproteínas transmembranas. Elas atravessam a membrana citoplasmática mediando a ligação de filamentos de actina⁶ do citoesqueleto de células adjacentes. No seu domínio extracelular ligam-se de maneira homofílica. No interior da célula, conectam-se aos filamentos de actina através de uma proteína chamada catenina. Outras CAM's dependentes de Ca^{2+} são as integrinas, que mediam a ligação do citoesqueleto à membrana extracelular, e as selectinas (FIGURA 6).

As moléculas independentes de Ca^{2+} responsáveis pela adesão intercelular pertencem em sua maioria a grande família das imunoglobulinas (Ig). A mais estudada é a Molécula de Adesão de Células Neurais (Neural Cell Adhesion Molecule - N-CAM) que se liga de maneira homofílica e apresenta pelo menos 20 formas diferentes. Outros tipos de moléculas independentes de Ca^{2+} são as Moléculas de Adesão Intercelular (Intercellular Adhesion Molecules - I-CAM's). Estas se ligam de maneira heterofílica.

⁶ Filamento de actina (Microfilamento) – Proteína helicoidal formada pela polimerização de moléculas de actina globulares (Actina G). Maior constituinte do citoesqueleto de células eucarióticas. O microfilamento possui uma espessura ente 5 e 7nm.

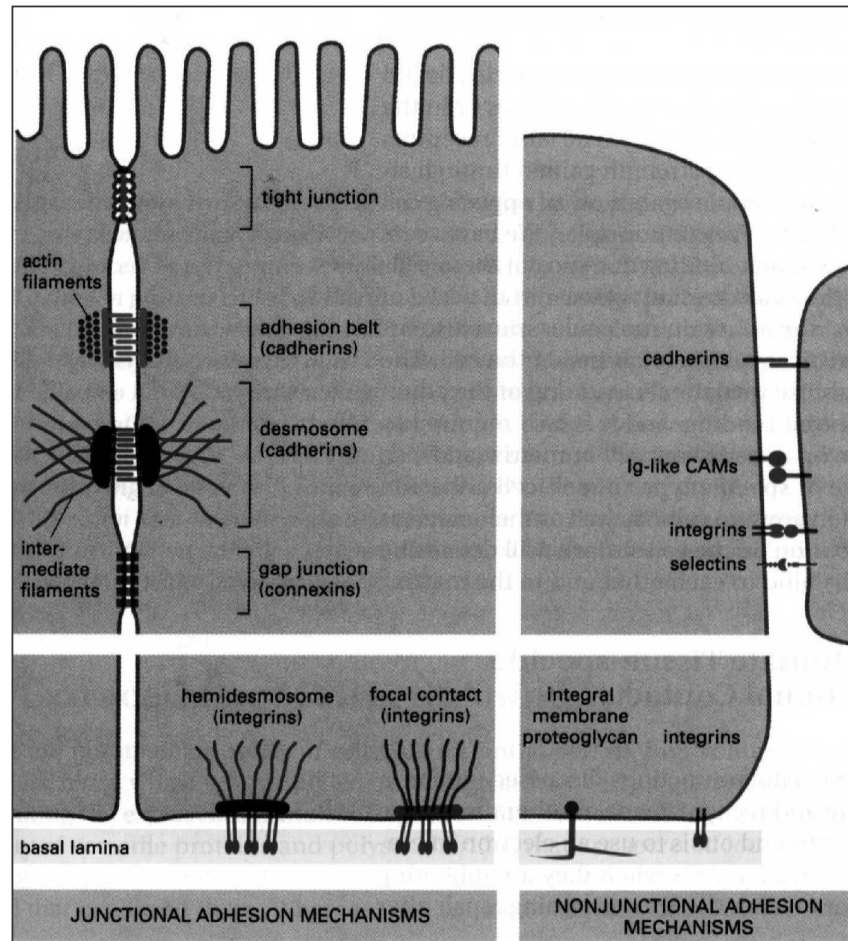


FIGURA 6 - Estruturas de Adesão e Moléculas de Adesão Celular (ALBERTS et al., 1994).

6.2.6 Metastatização e Adesão Celular

Durante a progressão tumoral, as células sofrem uma série de mutações, uma após a outra. Essas mutações afetam a adesividade das células, a habilidade em secretar enzimas que degradam a MEC e a capacidade de proliferação. A metastatização está relacionada às características que células neoplásicas passam a expressar em função dessas mutações. Tais características envolvem: o crescimento progressivo com invasão e destruição dos tecidos circunvizinhos, inclusive de paredes vasculares; a formação de vascularização própria; a diminuição da coesão das células tumorais e a aquisição de mobilidade própria.

Estas características estão inter-relacionadas e dependem, em grande parte, das interações das células neoplásicas entre si, com as células normais ou com os diversos componentes da matriz extracelular. Essas interações, por sua vez, são dependentes das Moléculas de Adesão Celular. Devido à identificação e caracterização recentes dessas moléculas, muitos estudos têm investigado seu papel no processo de invasão e metastatização (GOMES, 1997).

As CAM's regulam a adesão celular, isto é, a ancoragem de células às estruturas adjacentes. Em tecidos normais, as células aderem-se umas as outras e a MEC. Esses dois tipos de adesão executam papéis críticos diferentes durante a invasão local e a metastatização (RUOSLATHI, 1996). A malignidade está associada ao desprendimento de células que deixam seus tecidos originais e metastatizam. A invasão maligna pode resultar do decréscimo da coesão das células cancerosas e/ou do acréscimo da adesão destas com a matriz extracelular ou outros componentes dos tecidos invadidos (STEINBERG & FOTY, 1997; HUANG & INGBER, 1999).

6.2.6.1 Adesão Célula-Célula

As moléculas de adesão entre células ajudam a manter as mesmas no lugar e parecem estar comprometidas nas células cancerosas. Essa perda de adesão entre as células parece ser um passo inicial importante para a invasão (RUOSLATHI, 1996).

As células neoplásicas são pouco coesas entre si. Até a simples manipulação mecânica as separa com facilidade maior que as células normais. Essa baixa coesão se deve à diminuição da produção de moléculas de adesão (GOMES, 1997).

Células neoplásicas expressam menos moléculas de adesão que as células normais, especialmente N-CAM e Caderina E (NICHOLSON, 1988; MIYASAKA, 1995; STETLER-STEVENSON et al., 1993). Em alguns casos a expressão de moléculas de adesão é completamente ausente (KLEINERMAN et al., 1995).

Experimentos e estudos epidemiológicos têm demonstrado a conexão entre a atividade da molécula de adesão celular Caderina E e a invasividade de células de carcinomas, conduzindo à caracterização da Caderina E como um gene supressor de tumor. Experimentos em meio de cultura com células do carcinoma de pulmão de Lewis expressando baixa (células LLC) e alta quantidades de Caderina E (células

LLC-Ecad) demonstraram que, tanto a invasão quanto a expansão, foram marcadamente inferiores para a cultura com células LLC-Ecad (STEINBERG & FOTY, 1997).

Experimentos utilizando a droga sintética Dexametasona mostraram que ela é capaz de diminuir a invasividade das células HT-1080 do fibrossarcoma humano. Entre outros efeitos, o tratamento com Dexametasona aumentou a expressão de molécula de adesão celular Caderina E em mais de duas vezes e contribuiu para diminuição da invasividade das células HT-1080 inibindo as células de se desprenderem da massa tumoral (FOTY et al., 1998).

6.2.6.2 Adesão Célula-MEC

A adesão das células à matriz extracelular, permite às células sobreviver e proliferar. Células em cultura não conseguem reproduzir até que se prendam à uma superfície, fenômeno este denominado “dependência de ancoragem”. Apenas ligações envolvendo integrinas podem satisfazer os requerimentos da dependência de ancoragem. Muitos tipos de células, quando não conseguem ancorar, não somente param de proliferar como também cometem apoptose, o suicídio celular. A dependência de ancoragem é um mecanismo que garante a integridade do tecido, evitando que células se desprendam do tecido original e se fixem em outro tecido qualquer. Células cancerosas tornam-se independentes de ancoragem, ludibriando inclusive, o mecanismo de apoptose (RUOSLATHI, 1996).

A adesão celular à MEC também está envolvida na mobilidade celular. Células adultas estacionadas nos tecidos usam as interações integrina-fibronectina para ancoragem. Fibronectina é outra proteína envolvida no mecanismo de adesão celular. Células móveis, como as células embrionárias e células tumorais, utilizam-nas como apoio para a migração e possivelmente como estímulo à proliferação (GOMES, 1997). Experimentos envolvendo células com alta mobilidade proveram sólidas evidências de que a locomoção de células cancerosas é importante na invasão de tecidos biológicos. A alta mobilidade das células pode estar associada à haptotaxia, o movimento celular determinado por um gradiente de adesão no substrato. A habilidade de células tumorais em utilizar a membrana basal tanto como um fator de aderência, como um agente haptotático é provavelmente devido ao fato da adesão celular estar envolvida na haptotaxia (GRIMSTAD, 1987).

6.2.7 Conclusão

Viu-se que na transição de benigno para maligno, antecedendo à metastatização, o tumor passa a invadir o tecido circunvizinho. A diminuição da expressão das moléculas de adesão intercelular das células cancerosas e/ou do acréscimo da adesão destas com a matriz celular parecem exercer papel importante neste processo, tanto ao facilitar que as células cancerosas se desprendam do tumor (FIGURA 7), quanto ao induzir a estas, uma maior mobilidade e aderência à MEC, ludibriando, inclusive, o mecanismo de apoptose.

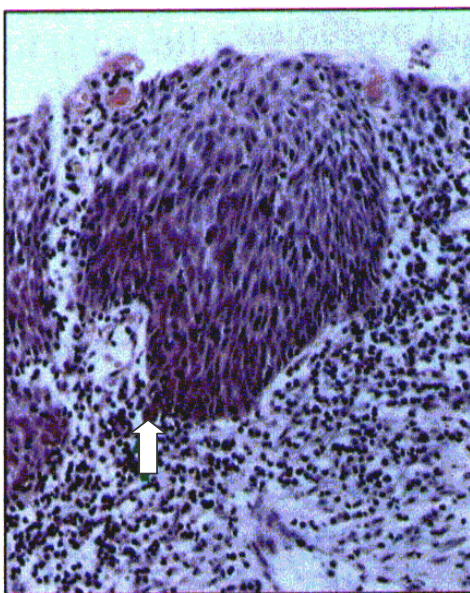


FIGURA 7 - Célula Tumoral (ver seta) desprendendo-se de um carcinoma *in situ*. (ALBERTS et al., 1994).

Viu-se, também, que tumores malignos apresentam morfologia bastante diferenciada dos benignos. Nos tumores malignos a interface com o tecido sadio é irregular e de limites pouco nítidos. Além disso, o corpo tumoral passa a apresentar-se, em muitos casos, como uma massa não compacta, com muitos prolongamentos e ausência de simetria. Alterações na adesão celular também parecem estar

implicadas na morfologia dos tumores, principalmente na morfologia da interface entre o tumor e o tecido sadio.

Embora ambos, o decréscimo da coesão das células cancerosas e o acréscimo da adesão destas com a matriz extracelular, estejam implicados nos processos de invasão local e na morfologia da interface entre tumor e o tecido normal, delimitou-se esse trabalho à investigação da influência da alteração da adesão celular das cancerosas.

À medida que um tumor cresce, as células tumorais e as do tecido adjacente precisam reorganizar-se. Na seção seguinte será visto que as moléculas de adesão celular também estão envolvidas nos processo de reorganização celular e que um modelo para simular reorganização celular que considera a ação dessas moléculas pode ser utilizado para realizar a investigação a que este trabalho se propõe.

6.3 Adesão Diferenciada

6.3.1 Introdução

Processos biológicos que envolvem reprodução celular implicam na reorganização espacial das células, seja em tecidos celulares vivos ou em agregados celulares *in vitro*. Células movem-se intensivamente no desenvolvimento embrionário. Em adultos, as células migram para o local de uma infecção ou ferimento. Células reorganizam-se na cicatrização de feridas e na reposição de células de tecidos epiteliais em função da descamação da epiderme e mucosas. Da mesma forma, em processos cancerosos, caracterizados pela excessiva reprodução celular, as células tumorais e as células normais do tecido circunvizinho necessitam se reorganizar espacialmente à medida que o tumor cresce.

Dentre os mecanismos que orientam a dinâmica da organização celular, conforme veremos adiante, destaca-se o da adesão diferenciada. O mecanismo de adesão diferenciada depende das moléculas de adesão presentes nas membranas das células. Sabemos que estas moléculas, possivelmente em função das mutações genéticas sofridas pelas células cancerosas, têm sua expressão afetada, ou seja, são produzidas em quantidade ou estrutura diferente da que é produzida por uma célula normal. Isto pode afetar a dinâmica da reorganização celular que se dá através da variação das forças de adesão entre células de tipos diferentes.

Embora a reorganização celular em função da adesão diferenciada seja mais evidente em tecidos onde a reprodução celular é alta, cabe ressaltar que este mecanismo continua atuando em tecidos estabilizados. Alberts et al. (1994) mencionam que tecidos embriônicos dissociados freqüentemente reorganizam-se de forma a remontar o tecido original, o que sugere que a estrutura do tecido não é simplesmente um produto de sua história; mas sim, que ele é ativamente mantido e estabilizado pelo sistema de afinidades que as células têm umas com as outras e com a matriz extracelular.

6.3.2 Ordenamento Celular

Townes & Holtfreter (1955) realizaram experimentos dissociando e reagregando células da gástrula⁷ de embriões de anfíbios. Nestes experimentos, verificaram que as células reagregadas se segregavam espacialmente, ocupando posições que refletiam a organização embriônica.

Quando células de dois ou mais tipos estão aleatoriamente misturadas e agregadas, elas são capazes de migrar longas distâncias, se comparadas ao seu diâmetro, para reestabelecer massas homogêneas de células e algumas vezes reconstruir tecidos (FIGURA 8).

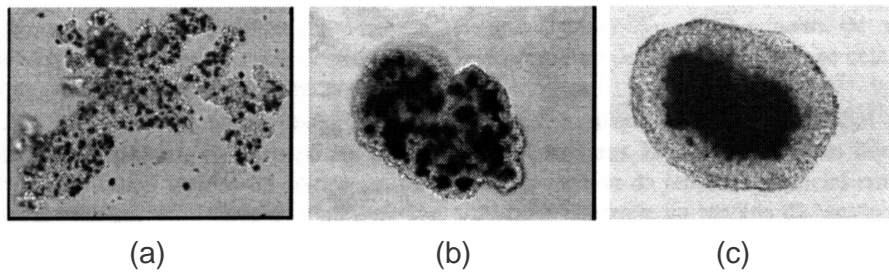


FIGURA 8 - Estágios da reorganização celular em agregados celulares. Experimentos com suspensões de células da retina neural e da retina pigmentada de embriões de pintos formando agregados onde as células estão arranjadas aleatoriamente. Após três dias, os dois tipos celulares segregaram completamente com as células da retina neural envolvendo as da retina pigmentada (MOMBACH et al., 1995).

O fato de células dissociadas conseguirem reagregar-se de forma ordenada deve-se a existência de mecanismos que orientam a migração celular. Estes mecanismos podem ser de duas classes: interações de curto alcance, onde células interagem por contato direto, e interações de longo alcance, onde as células interagem através do ambiente externo. As primeiras incluem a adesão diferenciada e a inibição por contato. As últimas incluem, entre outras, a quimiotaxia – locomoção em resposta ao gradiente da concentração de uma substância química em solução - , a haptotaxia – locomoção em função de conexões entre moléculas de adesão e a

⁷ Gástrula é um dos estágios iniciais no desenvolvimento embrionário.

membrana extracelular -, e a galvanotaxia – locomoção em resposta a presença de diferenças de potencial elétrico.

Embora os mecanismos acima possam explicar vários processos da morfogênese, o único que parece ser capaz de explicar o processo de segregação é o da adesão diferenciada (GILBERT, 1991).

6.3.3 A Hipótese da Adesão Diferenciada

Steinberg (1963) propôs uma teoria embasada na observação de que existe uma similaridade entre o comportamento de tecidos embriônicos e o de líquidos imiscíveis (FIGURA 9).

Por exemplo, se uma gota de óleo quando posta em contato com uma gota de água envolve esta última completamente. Se as duas gotas, em vez de serem postas em contato, forem misturadas, inicia-se um processo de segregação, onde as moléculas de água reagrupam-se e este agrupamento será envolvido por moléculas de óleo.

De forma similar, se agregados esféricos de dois tipos celulares são postos em contato, um envolverá o outro, obedecendo a mesma hierarquia em que os tecidos se encontram em um organismo vivo. Ainda, se as células dos dois tipos estiverem distribuídas aleatoriamente em um único agregado, e for dado tempo suficiente para as mesmas se reorganizarem, o mesmo padrão final será obtido.

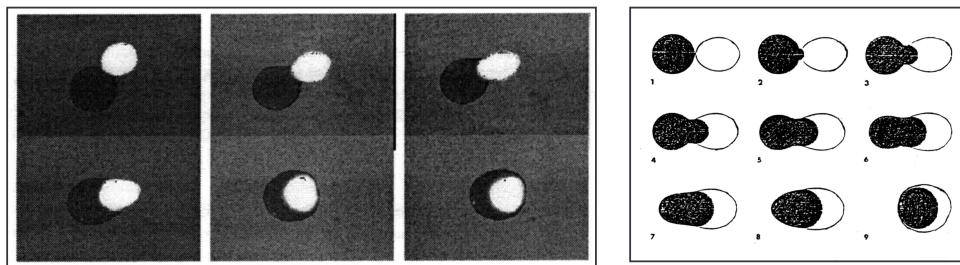


FIGURA 9 - Similaridade entre a segregação celular e o comportamento de líquidos imiscíveis. À esquerda, estágios do envolvimento de um agregado de células da endoderme (células claras) por um agregado de células da ectoderma (células escuras) de *Hidra*, um animal multicelular simples, de vida aquática e medindo de 10 a 30mm (UPADHYAYA & GLAZIER, não publicado). À direita, estágios do envolvimento de uma gota d'água com corante (gota escura) por uma gota de óleo (NEWMAN & COMPER, 1990).

Tais observações levaram Steinberg a propor um modelo termodinâmico para explicar o comportamento das células, a Hipótese da Adesão Diferenciada (*Differential Adhesion Hypothesis* – DAH). Steinberg sugeriu que a interação entre células envolve uma energia livre de adesão interfacial que depende dos tipos celulares devido às moléculas de adesão nas membranas. A Hipótese da Adesão Diferenciada estabelece que as células de um agregado exploram ergodicamente várias configurações para chegar a uma configuração de menor energia livre.

O comportamento de sistemas líquidos é dominado por sua energia livre de superfície, medidas como tensões superficiais. Essas tensões surgem de forças de atração entre suas subunidades moleculares. Por exemplo, uma gota de um líquido assume a forma esférica porque suas subunidades atraem-se ou aderem-se umas às outras até que seus contatos sejam maximizados e sua área superficial seja então minimizada. O mesmo é verdadeiro para o formato esférico de um agregado celular com células móveis e com a mesma força de adesão. De acordo com a DAH, em um agregado celular, ligações mais fortes entre células tenderão a desfazer as mais fracas. Este processo de maximização da adesão leva à reorganização celular.

6.3.4 Tensão Superficial em Agregados Celulares

Tensões superficiais representam diferenças de energia por unidade de área numa superfície ou interface. É a tensão superficial que determina a configuração com o mínimo de energia global (GRANER, 1993).

Em agregados celulares, devido as CAM's, diferentes energias estão associadas às interfaces entre células de tipos iguais e diferentes. Isto gera tensões superficiais que influenciam a organização espacial das células.

Graner (1993) definiu, matematicamente, as tensões superficiais de um agregado celular. Para uma mistura de dois tipos celulares, por exemplo, células brancas, l , e pretas d , as energias de superfície por unidade de área de contato associada com essas interfaces, tomam os valores e_{dd} , e_{dl} , e_{ll} , e_{dM} e e_{lM} e as tensões superficiais são definidas por:

$$\gamma_{dl} \equiv e_{dl} - \frac{e_{dd} + e_{ll}}{2}, \quad (1)$$

$$\gamma_{dM} \equiv e_{dM} - \frac{e_{dd}}{2}, \quad (2)$$

$$\gamma_{lM} \equiv e_{lM} - \frac{e_{ll}}{2}, \quad (3)$$

onde γ_{dl} é a tensão superficial associada à interface entre células d e l , γ_{dM} é a tensão superficial associada à interface entre células d e o meio M e γ_{lM} é a tensão superficial associada à interface entre células l e o meio M .

Para demonstrar o efeito das tensões superficiais, convencionou-se para a descrição seguinte que as células pretas são mais coesivas que as brancas, isto é, $e_{dd} < e_{ll}$.

Para um tipo celular em contato com um meio líquido, dois casos podem ocorrer: dispersão e coesão (FIGURA 10(a) e (b)). No caso onde γ_{dM} e γ_{lM} não são positivas, as células não agregam (FIGURA 10(c) e (d)). Quando γ_{dM} é negativa, células pretas e brancas mesclam formando um padrão similar a um tabuleiro de xadrez (FIGURA 10(e)), padrão que ocorre na maturação embrionária do oviduto⁸ de aves.

Em muitos agregados, o mínimo de energia está associado com a segregação de dois tipos celulares formando domínios separados (FIGURA 10(f)-(i)). Neste caso, as tensões superficiais γ_{dl} , γ_{dM} , γ_{lM} são positivas e na configuração de mínima energia os domínios estão em contato entre si e com o meio. No caso da condição de Young, (FIGURA 10(i)), as interfaces se encontram ao longo de uma linha de triplo contato. Um ponto nesta linha está submetido às forças (devido as tensões superficiais) mostradas na figura cuja soma se anula.

Se uma das tensões superficiais é maior que a soma das outras duas, a interseção dupla não é estável e a interface de maior custo energético desaparece (FIGURA 10(f)-(h)). Se $\gamma_{dM} > \gamma_{dl} + \gamma_{lM}$, as células pretas abandonam a superfície do agregado e ficam envolvidas por células brancas (FIGURA 10(f)). Contrariamente, se $\gamma_{lM} > \gamma_{dl} + \gamma_{dM}$, há uma reversão de posições, células brancas escapam da superfície

e ficam envoltas pelas células pretas mais coesivas (FIGURA 10(g)). Finalmente, se $\gamma_{dl} > \gamma_{dlM} + \gamma_{IM}$, o isolamento celular custa menos que o contato heterotípico (FIGURA 10(h)), fazendo aglomerados inicialmente separados não aderirem e inicialmente misturados dispersarem em muitos aglomerados pequenos de células brancas ou pretas.

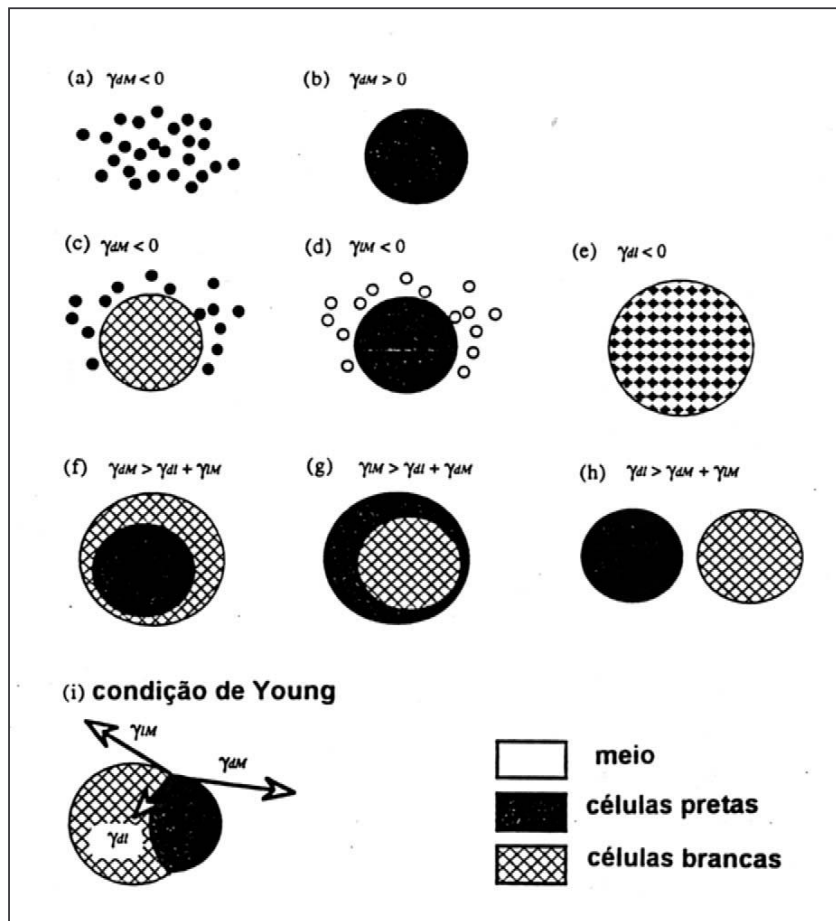


FIGURA 10 - Efeito das tensões superficiais em agregados celulares (GRANER, 1993).

Tensões superficiais de agregados celulares são as grandezas físicas de mais fácil acesso experimental e podem prover valores coerentes para serem utilizados em simulações.

⁸ Oviduto é um canal que leva o óvulo desde o ovário até outras partes do sistema reprodutor em animais.

6.3.5 Modelos Computacionais para Organização Celular

Graner & Sawada (1993) implementaram um modelo onde apenas o gradiente de adesão celular gera uma diversidade de padrões celulares. Este modelo, utilizando domínios de Dirichlet⁹ para representar células em 2D, reproduziu uma série de fenômenos de reorganização celular observados experimentalmente (FIGURA 11). Esse não contempla a flutuação das membranas.

Graner & Glazier (1992), usando um Modelo de Potts modificado em 2D, denominado Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada, mostraram que a adesão diferenciada associada a flutuações aleatórias das membranas celulares pode reproduzir, também, a larga variedade de fenômenos de reorganização celular (FIGURA 11). O Modelo de Potts é um modelo utilizado na física para simular fenômenos no qual partículas modificam seu comportamento através da interação com as partículas vizinhas, como por exemplo, sistemas ferromagnéticos (BINDER & HEERMANN, 1997).

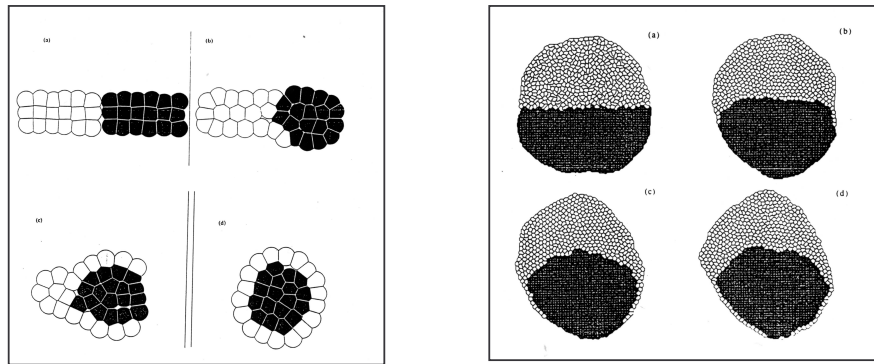


FIGURA 11 - Simulação do fenômeno de engolfamento. Simulação do fenômeno de reorganização celular denominado engolfamento. À esquerda, o modelo de Graner-Sawada (GRANER & SAWADA, 1993). À direita, o de Graner-Glazier (GRANER & GLAZIER, 1992). Compare com a FIGURA 9.

Na época que este modelo foi proposto, nenhuma evidência experimental apoiava a suposição sobre a necessidade de flutuações. Apenas recentemente,

⁹ Um domínio de Dirichlet é definido por um centro no espaço que contém a região mais próxima a ele do que todos os outros centros. Estes domínios são também conhecidos pelo nome de polígonos de Voronoi.

estudos mostraram concordância quantitativa entre os resultados da simulação do Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada e resultados experimentais a partir de células de embriões de pintos, apoiando a idéia de que as flutuações da membrana são aleatórias. Esses estudos, realizados por MOMBACH et al. (1995), mostraram que as flutuações da membrana têm um papel análogo ao da temperatura em sistemas físicos, aumentando a mobilidade das células e permitindo-as interagir com as células vizinhas. Em conseqüência, o sistema é capaz de pular sobre barreiras locais de energia, explorando ergodicamente a superfície de energia até alcançar o seu mínimo global.

De outro lado, estes mesmos estudos mostraram que células biológicas reais com membranas passivas não são capazes de segregar, o que sugere que o modelo de Graner e Sawada é incompleto

O Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada, que inclui apenas energias superficiais diferentes entre tipos celulares distintos e uma restrição de área para estabilizar o tamanho das células, reproduz uma série de fenômenos biológicos observados, incluindo segregação parcial e completa, tabuleiro de xadrez, reversão e dispersão (FIGURA 12).

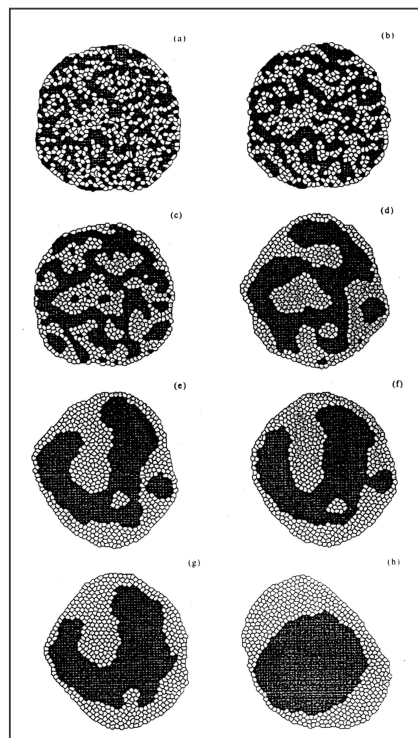


FIGURA 12 - Simulação do fenômeno de segregação celular completa. Compare com os estágios da segregação de agregados de células de embriões de pintos (FIGURA 8). (GRANER & GLAZIER, 1992).

Embora este modelo seja mais realístico que o de Graner & Sawada (1993), pois ele considera o aparato locomotor celular, ele também tem simplificações do ponto de vista físico. Todos os elementos que pertencem a uma célula são idênticos, a interface entre as células define a membrana celular que por sua vez não têm existência independente e também não há citoesqueleto. Assim, todas as propriedades da célula, com exceção da sua energia de superfície, estão representadas pelo termo que depende somente da área celular.

6.3.6 Conclusão

Processos biológicos que envolvem reprodução celular, entre eles o crescimento tumoral, implicam na reorganização espacial das células envolvidas diretamente no processo como também as dos tecidos adjacentes.

Viu-se que a reorganização celular pode se dar através de vários mecanismos, mas o único capaz de explicar o processo de segregação celular é o da Adesão Diferenciada

A Adesão Diferenciada procura explicar a reorganização celular como um processo de minimização da energia livre de adesão do aglomerado de células, de forma análoga ao que acontece com líquidos imiscíveis. A energia livre do agregado tem sua origem nas moléculas de adesão celular nas membranas das células. Como diferentes energias estão associadas às interfaces entre tipos iguais e diferentes, gera-se, no agregado, tensões superficiais entre tipos diferentes que determinam a configuração de menor energia global. Tensões superficiais podem ser medidas experimentalmente.

Viu-se, também, que dos modelos propostos para simular reorganização celular em função da DAH o mais realístico é o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada.

Embora este modelo seja mais realístico que os demais modelos de reorganização celular, pois considera o aparato locomotor das células, ele também tem simplificações do ponto de vista biológico. Todos os elementos que pertencem a uma célula são idênticos, a interface entre as células define a membrana celular que por sua vez não têm existência independente e também não há citoesqueleto.

Assim, todas as propriedades da célula, com exceção da sua energia de superfície, estão representadas pelo termo que depende somente da área celular.

Apesar dessas limitações, o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada é o que tem sido tomado como base para outros modelos que têm obtido sucesso na simulação de sistemas em que a reorganização celular se dá através da Adesão Celular Diferenciada. Como exemplo, podem-se citar os trabalhos sobre a morfogênese do organismo *Dictyostelium discoideum* (HOGEWEG, 2000; MARÉE, 2000; YANG, 1998; SAVIL & HOGEWEG, 1997).

Na seção seguinte detalharemos este modelo.

6.4 Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada

6.4.1 Introdução

O modelo desenvolvido nesta dissertação é baseado no Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada e será apresentado na segunda parte deste trabalho.

Contudo, faz-se necessário, neste momento, introduzir o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada a fim prover um embasamento para o melhor entendimento do modelo desenvolvido e melhor compreensão das razões que levaram à escolha deste, e não de outro modelo como base.

O Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada é resultante de uma evolução de modelos utilizados na física estatística, e sua definição envolve uma série de conceitos e técnicas importantes. Portanto, antes de se entrar em detalhes deste modelo, esses conceitos e técnicas são introduzidos.

Os conteúdos apresentados nessa seção, por serem assuntos bastante consolidados na área física, foram obtidos, quase que em sua totalidade, das obras de Binder & Heermann (1997), Newman & Barkena (1999) e Gould & Tobochnik (1996).

6.4.2 Método Monte Carlo

Métodos Monte Carlo formam a maior e mais importante classe de métodos numéricos para solução de problemas em física estatística.

A mecânica estatística está voltada ao cálculo de propriedades de sistemas de materiais condensados. A dificuldade crucial associada a estes sistemas é que eles são compostos por uma enorme quantidade de partes, tipicamente, átomos e moléculas. Essas partes são geralmente as mesmas ou de um pequeno número de tipos diferentes. Embora o comportamento destas partes frequentemente obedeça a

equações matemáticas simples, é praticamente impossível achar uma solução exata matematicamente. Por exemplo, o cálculo de um sistema de um litro de ar, que contém 4×10^{21} moléculas, é impraticável. Entretanto, este sistema apresenta propriedades macroscópicas bem preditíveis e que obedecem a leis simples, tais como temperatura e pressão. Estas medidas são a expressão média de propriedades do gás. A física estatística tenta, em vez de procurar soluções exatas, calcular as propriedades de um sistema de maneira estatística (BINDER & HEERMANN, 1997).

O objetivo usual de uma simulação Monte Carlo de um sistema térmico é o cálculo de um valor estimado, $\langle Q \rangle$, de uma quantidade observável, Q , tal como a energia interna em um modelo de um gás, ou a magnetização em um modelo magnético. Uma maneira de obter este valor é calculando a média deste sobre todos os estados, μ , do sistema. Mas isto só é possível para sistemas muito pequenos. Para sistemas maiores deve-se calcular a média da quantidade de interesse sobre um subconjunto de estados, embora isso introduza algum erro ao cálculo. Técnicas Monte Carlo fazem isso, escolhendo aleatoriamente um subconjunto de estados a partir de uma distribuição de probabilidade, p_μ , especificada. Escolhendo-se estados com igual probabilidade p_μ , o processo se torna muito custoso, mesmo para um computador potente. Entretanto, se souber quais os estados que mais contribuem para o cálculo da quantidade de interesse e, escolherem-se esses e ignorarem-se os demais, podem-se obter uma boa estimativa de $\langle Q \rangle$ mesmo com um pequeno número de termos. Esta é a essência da idéia por detrás dos métodos Monte Carlo para sistemas térmicos. A técnica de escolher os estados mais importantes dentre o grande número de possibilidades é chamada amostragem de importância (*importance sampling*). A vantagem deste método é que se precisa amostrar apenas uma pequena fração para obterem estimativas acuradas de quantidade físicas do sistema. A principal desvantagem é que, pelo fato de não se incluir todos os estados possíveis, haverá erros estatísticos.

6.4.3 *Ensemble* Microcanônico

O Método Monte Carlo pode ser aplicado na simulação das propriedades de equilíbrio de sistemas com muitos graus de liberdade. Em geral, um sistema

macroscópico isolado, para o qual o número de partículas N , o volume V , e a energia total E são fixas, e a influência dos parâmetros externos tais como gravidade e campos magnéticos podem ser ignorados, tende a um estado de equilíbrio independente do tempo com o máximo de aleatoriedade ou entropia. O macroestado do sistema é especificado pelos valores de E , V e N . Entretanto, microscopicamente existe um grande número de diferentes configurações do sistema nas quais o macroestado (E, V, N) pode ser obtido. Uma configuração particular ou microestado é acessível se suas propriedades são consistentes com o macroestado específico.

Geralmente, tudo o que se sabe sobre os microestados acessíveis é que suas propriedades são consistentes com as quantidades físicas conhecidas do sistema. Como não há razão para se preferir um ou outro, é razoável postular que o sistema é igualmente passível de estar em qualquer um dos microestados acessíveis. Em um sistema isolado com Ω estados acessíveis a probabilidade p_μ de achar o sistema em um microestado μ é $1/\Omega$ se μ é acessível e 0 caso contrário.

A média das quantidades físicas podem ser determinadas de duas maneiras. A primeira, pela medição, em experimentos de laboratório, das quantidades físicas em intervalos suficientemente longos que permitam o sistema experimentar um grande número de microestados acessíveis. A segunda, em vez de realizar medições em um único sistema, utilizar uma coleção ou *ensemble* de sistemas, que são réplicas virtuais idênticas caracterizadas pelo mesmo macroestado. O número de sistemas no *ensemble* é igual ao número de microestados possíveis. Um *ensemble* de sistemas especificados por E , V , N é chamado de ensemble Microcanônico. Supondo-se que a quantidade física Q tem o valor Q_μ quando o sistema está no estado μ , a média de Q no *ensemble* é dada por:

$$\langle Q \rangle = \sum_{\mu=1}^{\Omega} Q_\mu p_\mu, \quad (4)$$

6.4.4 Ensemble Canônico

Embora o *ensemble* Microcanônico seja conceitualmente simples, ele não representa a situação usualmente encontrada nos laboratórios. A maioria dos

sistemas de laboratórios não está isolada, mas sim, em contato térmico com ambiente. Este contato térmico permite a troca de energia, entre o sistema de laboratório e o ambiente, na forma de calor. O sistema de laboratório é usualmente menor em relação ao seu ambiente. O sistema maior, com muitos graus de liberdade, é denominado de reservatório térmico. Nesses casos, a energia total do sistema, E , composto pelo sistema de laboratório e seu ambiente, é restringida a ser constante, mas a energia do sistema de laboratório pode variar. Um grande número de cópias virtuais do sistema de laboratório e seu ambiente, considerados juntos, pode ser descrito pelo *ensemble* Microcanônico. Entretanto, como se está interessado nos valores de equilíbrio do sistema de laboratório, é preciso saber a probabilidade p_μ de achar o sistema de laboratório em um microestado μ com energia E_μ . O *ensemble* que descreve a probabilidade do sistema de laboratório em equilíbrio térmico com o reservatório térmico é conhecido como *ensemble* Canônico.

Imaginando-se um número infinitamente grande de cópias de um sistema com volume, V , e número de partículas, N , fixos em equilíbrio a uma temperatura, T , a probabilidade de que o sistema esteja no microestado μ com energia E_μ , é dada pela Distribuição de Boltzmann ou Canônica

$$p_\mu = \left(\frac{1}{Z} \right) e^{-\beta E_\mu}, \quad (5)$$

onde $\beta = 1/kT$ e Z é uma constante de normalização, tal que a soma sobre todos os estados seja 1. T é a temperatura absoluta e é medida em Kelvin (K). A constante de Boltzmann k é dada por $k = 1,38 \times 10^{-23} J/K$. Z é chamada de função de partição do sistema. Como $\sum p_\mu = 1$, Z é dado por

$$Z = \sum_{\mu=1}^{\Omega} e^{-E_\mu/kT}, \quad (6)$$

onde o somatório roda sobre todos os microestados acessíveis, Ω , do sistema.

Para obter a média de uma quantidade física de interesse no *ensemble* Canônica, pode-se usar (7). Por exemplo, a média da energia seria dada por

$$\langle E \rangle = \sum_{\mu=1}^{\Omega} E_{\mu} p_{\mu} = \frac{1}{Z} \sum_{\mu=1}^{\Omega} E_{\mu} e^{-\beta E_{\mu}}, \quad (7)$$

6.4.5 Algoritmo de Metropolis

Sistemas reais também não experimentam todos os estados com igual probabilidade, mas sim de acordo com a distribuição de probabilidades de Boltzmann. Por esta razão, tenta-se tomar uma amostra de estados do sistema em que a probabilidade de um estado particular aparecer é proporcional a sua probabilidade de Boltzmann. Esta é uma das formas mais comuns de amostragem de importância

A questão é como escolher os estados para que cada um apareça com a sua correta probabilidade de Boltzmann. Escolhendo-se estados aleatoriamente e aceitando-os ou rejeitando-os com probabilidade proporcional a $e^{-\beta E_{\mu}}$, acabar-se-ia por rejeitar virtualmente quase todos os estados, pois a probabilidade de aceitação é exponencialmente pequena. A solução padrão para a escolha de estados faz uso de um Processo Markoviano.

Um Processo Markoviano é um mecanismo que, dado um sistema em um estado μ , gera um novo estado ν . Isto é feito de maneira aleatória, isto é, não será gerado o mesmo estado cada vez que o sistema estiver em um estado inicial μ . A probabilidade para gerar o estado ν a partir de μ é chamada de probabilidade de transição $P(\mu \rightarrow \nu)$. Para um Processo Markoviano verdadeiro todas as transições devem satisfazer duas condições:

- a) as probabilidades de transição não podem variar no tempo;
- b) devem depender apenas das propriedades dos estados μ e ν e não de outros estados que o sistema já tenha passado.

Em adição as duas condições já mencionadas, duas outras condições são necessárias: ergodicidade e balanço detalhado (*detailed balance*). A condição de ergodicidade é a de que deve ser possível ao Processo Markoviano atingir qualquer

estado do sistema a partir de um outro estado qualquer, se o processo for executado por tempo suficiente. A condição de balanço detalhado é a que assegura que é a distribuição de Boltzmann que é gerada após o sistema atingir o equilíbrio, e não outra.

Construindo-se um algoritmo que produza um Processo Markoviano que, por sua vez, contemple as restrições acima e gere estados com exatamente as probabilidades de transição desejadas, será gerado um conjunto de estados com exatamente suas corretas probabilidades de Boltzmann. Entretanto, será despendido muito tempo gerando estados que não serão aceitos. Introduzindo o conceito de razão de aceitação este problema é minimizado.

O algoritmo de Metropolis, introduzido por Metropolis et al. (1953) é um dos algoritmos mais usados em simulações Monte Carlo no *ensemble* canônico. O algoritmo de Metropolis é um caso especial de amostragem de importância que gera estados com a probabilidade de Boltzmann. Este algoritmo trabalha gerando um novo estado ν , e então aceitando ou rejeitando-o de acordo com uma razão de aceitação. Se o novo estado é aceito, o sistema é alterado para este estado. Caso contrário, permanece inalterado. O algoritmo de Metropolis caracteriza-se por usar uma razão de aceitação (*acceptance ratio*), $A(\mu \rightarrow \nu)$, na seguinte forma

$$A(\mu \rightarrow \nu) = \begin{cases} e^{-\beta\Delta E} & , \text{ se } \Delta E > 0 \\ 1 & , \text{ caso contrário,} \end{cases} \quad (8)$$

O algoritmo de Metropolis pode ser descrito, no contexto de uma simulação de um sistema de partículas ou de uma rede de elementos, da seguinte forma:

1. Estabelecer um microestado inicial;
2. Repetir os passos de 3 a 9 para obter um número suficiente de microestados.
3. Fazer uma tentativa de mudança no microestado. Por exemplo, escolher um elemento aleatoriamente e mudar seu rótulo. Ou, escolher uma partícula aleatoriamente e deslocá-la uma distância aleatória;
4. Calcular ΔE , a diferença de energia do sistema devido à mudança no microestado;

5. Se ΔE é menor ou igual a zero, aceitar o novo microestado e ir para o passo 9;
6. Se ΔE é positivo, calcular um valor $w = e^{-\beta\Delta E}$;
7. Gerar um número aleatório r ;
8. Se $r \leq w$, aceitar o novo microestado; caso contrário, reter o microestado anterior;
9. Determinar o valor da quantidade física desejada;

6.4.6 Modelo de Ising

O Modelo de Ising é usado para simular fenômenos no qual partículas físicas modificam seu comportamento através da interação com as partículas vizinhas. Uma aplicação clássica deste modelo se dá no estudo do magnetismo. Neste modelo rótulos σ são associados aos elementos i de uma rede. Cada rótulo pode tomar um de dois valores: +1 ou -1, significando a orientação magnética dos elementos da rede. Se existem N elementos na rede, então o sistema pode estar em 2^N estados. Uma configuração particular ou microestado é especificado pelo conjunto dos rótulos de todos os elementos da rede $\{ \sigma_{(i1)}, \sigma_{(i2)}, \dots, \sigma_{(iN)} \}$.

A energia de um estado particular é dada pelo Hamiltoniano¹⁰ de Ising

$$H = -J \sum_{\vec{i}, \vec{j}}^N \sigma_{(\vec{i})} \sigma_{(\vec{j})} - B \sum_{i=1}^N \sigma_{(\vec{i})}, \quad (9)$$

onde J é a energia de interação entre os vizinhos mais próximos, e B é um campo magnético externo.

As propriedades macroscópicas do sistema são determinadas pela natureza dos microestados acessíveis. Usando-se o método Monte Carlo, é possível estimar os valores de quantidades do sistema, tais como magnetização $\langle M \rangle$ em uma dada temperatura.

¹⁰ Hamiltoniano é a representação analítica da configuração de energia de sistema e, para os fins desse trabalho, pode ser tomado como sinônimo de “energia do sistema”.

A partir de um estado μ poder-se-ia gerar uma grande quantidade de estados pela simples inversão dos rótulos de um subconjunto elementos da rede. A inversão de um subconjunto de rótulos ao mesmo tempo poderia gerar grandes flutuações de energia do sistema. Entretanto, como a flutuação de energia em sistemas em equilíbrio térmico é pequena se comparada à energia total do sistema, a maneira mais simples de aplicar esta condição ao Modelo de Ising é considerar apenas aqueles estados cuja diferença do atual seja a inversão de apenas um rótulo. Assim sendo, é possível gerar N novos estados ν a partir de um estado μ . Dos algoritmos que permutam um rótulo por vez diz-se terem dinâmica *single-spin-flip*.

Existem muitos algoritmos que podem ser usados para simular o Modelo de Ising, tais como o algoritmo de Wolf, o algoritmo de Swendsen-Wang, o algoritmo de Niedermayer e o algoritmo de Kawasaki, entre outros. Cada um destes algoritmos aplica-se a situações especiais e/ou variações do Modelo de Ising, mas o mais utilizado é o algoritmo de Metropolis.

6.4.7 Modelo de Potts

Modelos de Potts são uma classe de modelos similares ao Modelo de Ising exceto que os rótulos σ em cada elemento da rede podem tomar mais que dois diferentes valores discretos. Usualmente estes valores são representados por inteiros positivos iniciando em 1. Um Modelo de Potts de q estados é aquele em que cada rótulo pode ter valores inteiros de $\sigma = 1, \dots, q$.

Quaisquer dois elementos vizinhos contribuem com uma quantia $-J$ para o Hamiltoniano se eles tem o mesmo rótulo, ou com zero caso tenham rótulos distintos. O Hamiltoniano pode então ser escrito

$$H = -J \sum_{\vec{i}, \vec{j}} \delta_{\sigma_{(\vec{i})} \sigma_{(\vec{j})}}, \quad (10)$$

onde δ_{ab} é o delta de Kronecker, que vale 1 quando $a = b$ e zero caso contrário. Para o caso $q=2$, o Modelo de Potts é equivalente ao Modelo de Ising bastando adicionar algumas constantes ao Hamiltoniano.

Simulações Monte Carlo do Modelo de Potts de q estados tem usado tradicionalmente o algoritmo de Metropolis *single-spin-flip*. Primeiramente seleciona-se, aleatoriamente, um elemento i da rede. O elemento terá algum rótulo σ . Em seguida escolhe-se um novo rótulo $\sigma'_{(i)} \neq \sigma_{(i)}$ dentre as $q - 1$ possibilidades. Calcula-se a diferença de energia ΔH resultante da mudança de $\sigma_{(i)}$ por $\sigma'_{(i)}$, e então se aceita ou rejeita-se a mudança, com a razão de aceitação definida em (8).

6.4.8 Modelo de Potts para Crescimento de Grãos

O Modelo de Potts para Crescimento de Grãos é um Modelo de Potts de q estados para estudar padrões celulares. Srolovitz et al. (1984) usaram o Modelo de Potts para simular padrões de grãos metálicos em relaxamento a temperaturas baixas. Simulações com diferentes valores de q , mostraram que configurações com q pequeno consistem de grãos muito irregulares e assimétricos enquanto simulações com q grande consistem de grãos mais compactos e simétricos, estabelecendo que para a correta simulação de crescimento de grãos q deve ser grande.

A força básica que dirige a formação de grãos é a energia superficial. O Modelo de Potts coloca a energia superficial em uma rede através da definição da energia livre proporcional à área total dos contornos dos grãos. Matematicamente, cada elemento na rede tem um rótulo, sendo um rótulo diferente para cada grão. As interfaces entre rótulos diferentes definem os limites dos grãos. A energia de interação entre rótulos iguais é zero, e entre rótulos diferentes é 1. O Hamiltoniano é definido por:

$$H = \sum_{\vec{i}, \vec{j}} \left[1 - \delta_{\sigma(\vec{i}), \sigma(\vec{j})} \right], \quad (11)$$

onde i e j são elementos vizinhos da rede. O algoritmo utilizado costuma ser o de Metropolis.

O alcance da vizinhança afeta a natureza da interação. Simulações em redes podem gerar anisotropia devido a discretização do espaço. A anisotropia pode ser caracterizada pela razão entre a energia superficial mínima e a máxima por unidade

de comprimento dos contornos como função da orientação (FIGURA 13). Por exemplo, se usarmos interações simples entre primeiros vizinhos (FIGURA 14) em uma rede quadrada, os contornos tenderão a serem horizontais ou verticais.

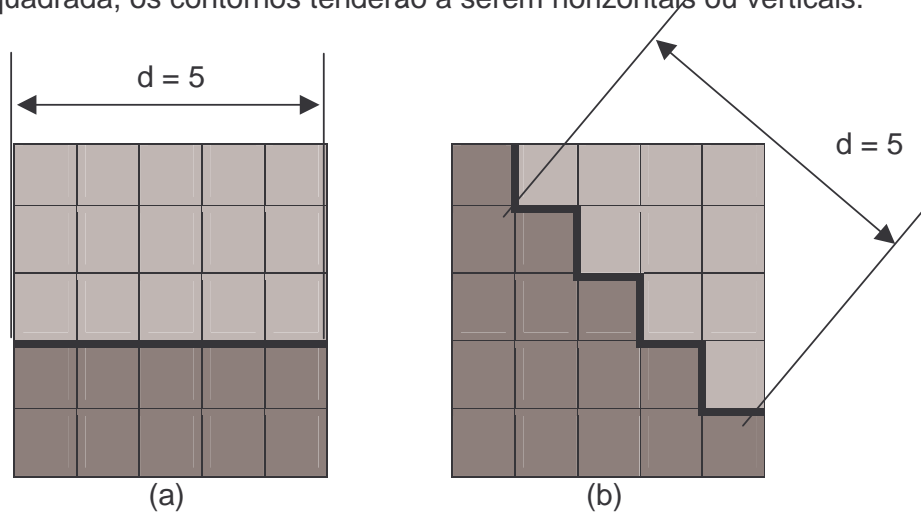


FIGURA 13. – Anisotropia em função da discretização da rede. Em (a), uma distância de 5 unidades separa uma interface de 5 elementos de rede. Em (b), a mesma distância separa, em função de sua orientação, 7 unidades de redes. Como a energia é proporcional à quantidade de elementos na interface, o sistema terá preferência pela interface (a) em função do menor custo energético.

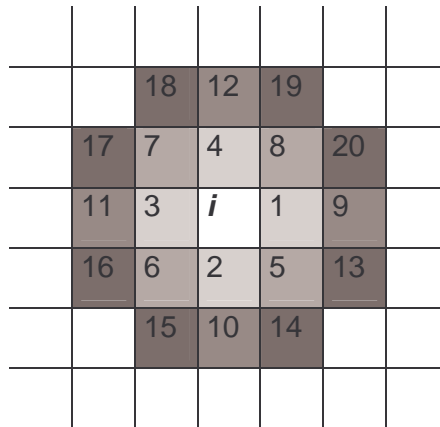


FIGURA 14 – Distribuição dos 20 vizinhos mais próximos em uma rede quadrada bidimensional. Os diferentes tons de cinza representam, do mais claro ao mais escuro, respectivamente, da primeira à quarta ordem de vizinhos de *i*.

As alternativas para tratar esse problema são trabalhar com temperaturas mais altas, onde a ativação térmica permite às interfaces dos grãos/células vencerem a anisotropia; aumentar o alcance das interações para um número maior de vizinhos ou utilizar uma rede triangular em vez de uma quadrada.

6.4.9 Extensões ao Modelo de Potts

Os modelos de Potts com q grande podem ser estendidos de diversas maneiras para incorporar as peculiaridades de diferentes materiais celulares, e não apenas grãos metálicos. As extensões podem ser de três categorias (YANG, 1998):

- acoplamento entre tipos de rótulos;
- acoplamento a um campo externo;
- vínculos.

O Modelo de Potts com q grande e suas extensões têm provado ser muito poderoso e flexível na modelagem de estruturas celulares onde a minimização da energia superficial é importante. Todavia, a suposição básica do modelo é que a cinética pode ser descrita pela termodinâmica de Boltzmann. Em algumas situações esta suposição pode não ser verdadeira (YANG, 1998).

6.4.9.1 Acoplamento entre tipos de rótulos

Quando mais de um tipo de célula está presente em um material celular, energias superficiais nos limites entre tipos iguais e tipos distintos diferem. Para incorporar estas diferenças nas energias superficiais, em vez de usar uma força de acoplamento constante para todos os pares de rótulos, introduz-se forças de acoplamento diferentes para diferentes tipos de rótulo.

6.4.9.2 Acoplamento a um campo externo

Quando um campo externo atua sobre as células, ou sobre algum subconjunto de tipos celulares, os rótulos precisam ser acoplados ao campo externo. São exemplos deste tipo de extensão a atuação de um campo magnético ou de um

campo gravitacional. A influência destes campos deve ser matematicamente modelada e adicionada ao Hamiltoniano do sistema.

6.4.9.3 Vínculos

No Modelo de Potts, o acoplamento entre tipos de rótulos da rede e o acoplamento de um campo magnético exercem forças locais que dependem somente das configurações locais dos rótulos. Forças não locais, que dependem de propriedade globais, podem ser tratadas como vínculos. De modo geral podemos adicionar o vínculo ao Hamiltoniano do sistema.

6.4.10 Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada

Graner & Glazier (1992), estenderam o Modelo de Potts com q grande para estudar a ordenação celular sob a DAH. Da mesma forma que no modelo original, o tecido celular é representado em uma rede quadrada. A cada elemento da rede é associado um rótulo, $\sigma \in \{1, \dots, N\}$, onde N é o número de células no modelo. Uma célula no modelo é definida pelo conjunto de todos elementos na rede que tenham o mesmo rótulo. A área de célula, $a(\sigma)$, é o somatório de elementos da rede com o mesmo rótulo e o perímetro, $p(\sigma)$, é o número de arestas entre elementos de diferentes rótulos.

O modelo proposto apresenta duas extensões.

A primeira é uma extensão de acoplamento entre tipos de rótulos, na qual um outro rótulo $\tau \in \{l, d, M\}$, associado à adesão diferenciada, identifica o tipo celular. São considerados três tipos celulares: células claras, células escuras e meio externo. A energia de configuração do sistema com esta extensão torna-se

$$H_1 = \sum_{\vec{i}, \vec{j}} e_{\tau(\sigma(\vec{i})), \tau(\sigma(\vec{j}))} (1 - \delta_{\sigma(\vec{i}), \sigma(\vec{j})}) \quad (12)$$

onde $\tau(\sigma)$ é o tipo associado à célula σ e $e_{\tau\tau'}$ é a energia superficial entre elementos da rede cujas células são do tipo τ e τ' . Energias de superfície menores correspondem a uma constante com menores valores de acoplamento.

A segunda extensão é um vínculo. Células biológicas geralmente têm limites fixos de tamanho. Elas não podem crescer infinitamente e nem desaparecer em um instante. Graner & Glazier (1992) incluíram um termo de energia elástica com uma constante elástica para estabilizar o tamanho das células

$$H_2 = \lambda \sum_{\sigma} [A(\tau(\sigma)) - a(\sigma)]^2, \quad (13)$$

onde λ é um multiplicador de Lagrange associado à elasticidade celular, $a(\sigma)$ é área da célula σ e $A(\tau(\sigma))$ é a área alvo das células tipo do τ , isto é, a área na qual a célula tende estabilizar.

A energia total de configuração do sistema é, então, definida por:

$$H = \sum_{\vec{i}, \vec{j}} e_{\tau(\sigma(\vec{i})), \tau(\sigma(\vec{j}))} (1 - \delta_{\sigma(\vec{i}), \sigma(\vec{j})}) + \lambda \sum_{\sigma} [A(\tau(\sigma)) - a(\sigma)]^2, \quad (14)$$

A FIGURA 15 apresenta uma representação esquematizada de um modelo baseado em uma rede quadrada de 11 x 11 elementos. Nesta rede temos a presença de 7 células distintas definidas pelo conjunto conexo de elementos da rede com mesmo rótulo σ . As células de rótulo 1, 2 e 6 são de um tipo τ e as demais de outro. A célula $\sigma=5$, por exemplo, possui área $A(\sigma)=16$ e perímetro $p(\sigma) = 20$, que é o número de elementos que compõem a célula e estão em contato com as demais.

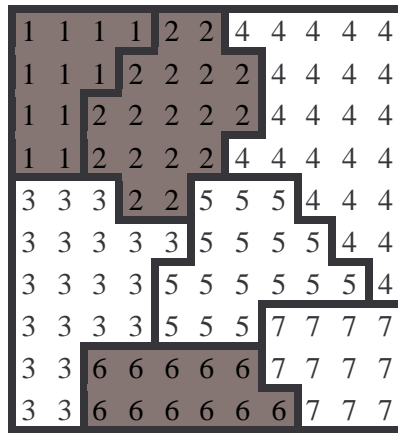


FIGURA 15 - Exemplo de configuração de uma rede no Modelo de Potts Estendido com Adesão diferenciada (adaptado de YANG, 1998).

Para diminuir a anisotropia energética do modelo, considerando que o mesmo é implementado em rede quadrada, Glazier e Graner utilizaram interações entre primeiros e segundos vizinhos.

O sistema evolui através de uma dinâmica de Monte Carlo com algoritmo de Metropolis à temperatura T constante.

A unidade de tempo na simulação é o passo Monte Carlo (*Monte Carlo Step* – MCS), definido como um número de sorteios igual ao número total de sítios da rede. Em cada passo da simulação, um elemento da rede, i , é selecionado aleatoriamente e o seu rótulo σ , é convertido ao rótulo σ' de um de seus oito primeiros e segundos vizinhos, j , também escolhido aleatoriamente, com uma razão de aceitação dada por:

$$P(\sigma(\vec{i}) \rightarrow \sigma(\vec{j})) = \begin{cases} e^{-\frac{\Delta H}{T}}, & \text{se } \Delta H > 0 \\ 1, & \text{se } \Delta H \leq 0, \end{cases} \quad (15)$$

onde ΔH é a variação de energia no padrão devido à mudança, sendo $\beta = 1/T$ e $k=1$.

O algoritmo Metropolis pressupõe que a movimentação dos contornos das células seja aleatória, descrita pela dinâmica de Boltzmann. Este pressuposto é verdadeiro para materiais metálicos. Na época que o modelo foi proposto, nenhuma evidência experimental suportava essa suposição. O modelo foi baseado em sua simplicidade e similaridade a materiais magnéticos. Entretanto, MOMBACH et al. (1995) mostraram através de experimentos com células de embrião de pintos que as membranas células biológicas também realizam flutuações aleatórias.

A temperatura da simulação não corresponde à temperatura real do experimento. Ela controla a amplitude das flutuações das membranas celulares. Tipicamente, em tecidos biológicos, as flutuações de membrana dirigidas pelo citoesqueleto são muito maior em amplitude que as verdadeiras flutuações térmicas.

As tensões superficiais podem ser definidas em termo de energias de interface. Estas tensões superficiais não são equivalentes à tensão interna de membranas biológicas, que aparece como parte da elasticidade da membrana, λ . Elas representam a diferença de energia entre interface heterotípicas (entre células de tipos diferentes) e homotípicas (entre células de mesmo tipo) por unidade de área da membrana. As tensões superficiais no modelo são calculadas a partir das equações (1), (2) e (3).

6.5 Dimensão Fractal e Índice de Irregularidade

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de associar a dimensão fractal da borda de tumores com seu grau de malignidade. Neste trabalho, para quantificar a interface entre tumor e o tecido normal, usa-se a dimensão fractal da borda dos tumores e, também, o índice de irregularidade, uma medida que relaciona o perímetro de uma imagem com a sua área.

A Geometria Euclidiana apresenta deficiências quando é aplicada a determinadas formas da natureza como, por exemplo, escarpas montanhosas, árvores, brônquios pulmonares (CROSS, 1997). Por exemplo, a FIGURA 16 mostra um objeto fractal matemático puro, o Conjunto de Mandelbrot, que tem um contorno complexo e o nível de complexidade permanece o mesmo a medida que se amplia o objeto. As deficiências da geometria Euclidiana em descrever o contorno desses objetos tornam-se aparentes quando se tenta, por exemplo, medir o perímetro do Conjunto de Mandelbrot. Se o perímetro do Conjunto de Mandelbrot for medido na ampliação (FIGURA 16(a)) então os detalhes vistos na figura (FIGURA 16(d)) não seriam contabilizados, o que afetaria a medição do perímetro. Há muitas similaridades entre estas imagens e os contornos de um tumor maligno, tal como um câncer de mama, quando visto através de um microscópio. Embora a borda de irregular de um tumor maligno não seja sempre fractal, a dimensão fractal da borda é muito útil para quantificar essa irregularidade.

A dimensão fractal difere da Euclidiana pelo fato de que ela pode ser não inteira, ou seja, fracionária. Ela é uma medida de como o objeto preenche o espaço, de forma que quanto mais próxima for a dimensão fractal da dimensão Euclidiana na qual o objeto está inserido, maior o grau de preenchimento do espaço pelo objeto. Assim, um objeto com dimensão 1,25 preenche o espaço mais que uma linha (por isso é maior que 1) mas não chega a preencher totalmente o plano no qual está inserido (por isso é menor que 2).

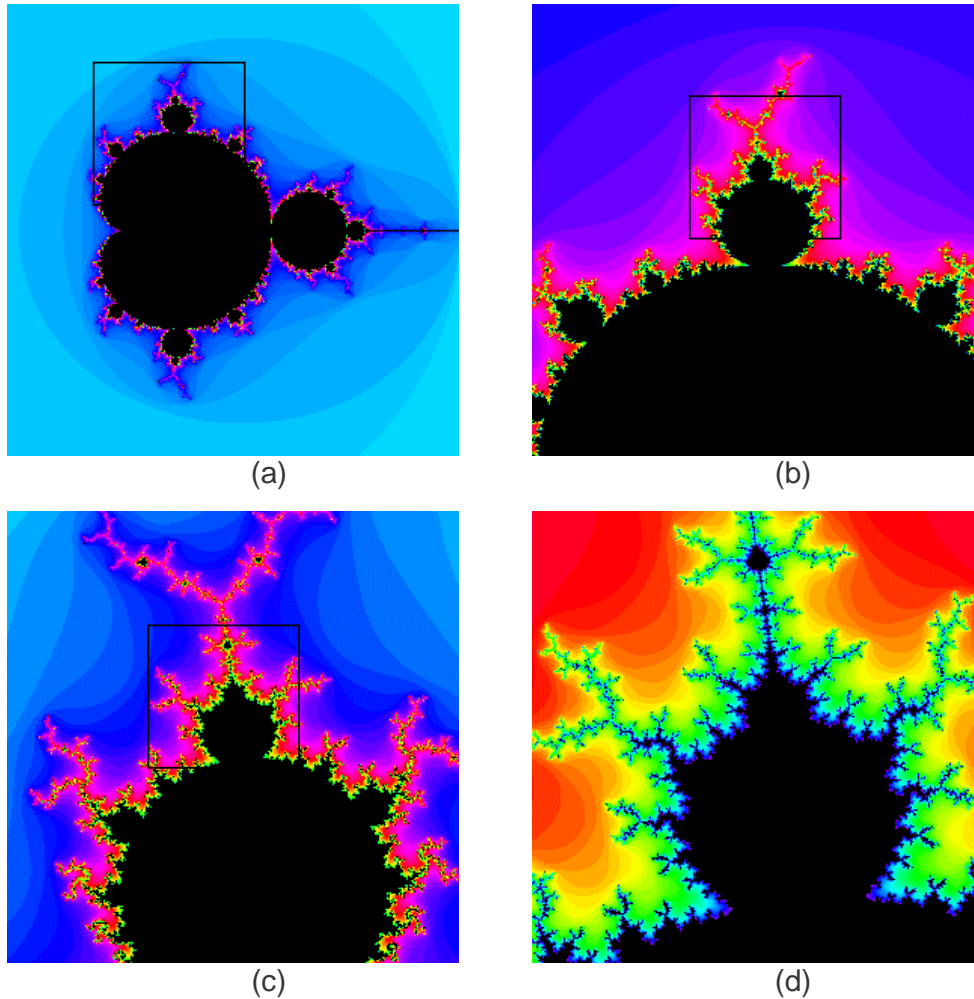


FIGURA 16 - Fractais de Mandelbrot. (b) é uma ampliação da região delimitada em (a). (c) é uma ampliação da região delimitada em (b). (d) é uma ampliação da região delimitada em (c).

Fractais são auto-similares, ou seja, são invariantes sob transformações de escala. Pode-se chamar um objeto auto-similar exato de fractal determinístico (BARABÁSI & STANLEY, 1995).

A dimensão fractal de objetos fractais determinísticos pode ser calculada algebricamente. Entretanto, na natureza não há fractais determinísticos, de modo que estes valores precisam ser obtidos através de métodos específicos. Um dos métodos mais utilizados é o de “Contagem de Caixas”.

Para medir a dimensão fractal da borda dos tumores gerados nas simulações implementamos este método de “Contagem de Caixas” conforme descrito em Cross (1997). Obtém-se o contorno da imagem de um tumor e, sobre este contorno, aplicam-se caixas de tamanhos variáveis (preferencialmente mais de vinte tamanhos

distintos) contando-se o número de caixas necessárias para cobrir totalmente o contorno. A dimensão fractal pelo método de Contagem de Caixas é dada por:

$$D_b = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\varepsilon)}{\log(1/\varepsilon)}, \quad (16)$$

onde D_b é a dimensão fractal da borda objeto, ε é o tamanho da caixa e $N(\varepsilon)$ é o menor número de caixas de lado ε necessários para cobrir completamente os contornos do objeto que está se medindo. Empiricamente D_b é obtida através de um gráfico $\log(N(\varepsilon))$ em função de $\log(1/\varepsilon)$, onde D_b é a inclinação da reta obtida.

O GRÁFICO 1 apresenta os valores de $\log(N(\varepsilon))$ em função de $\log(1/\varepsilon)$ obtidos pela aplicação do método de “Contagem de Caixas” sobre a imagem da FIGURA 17(b).

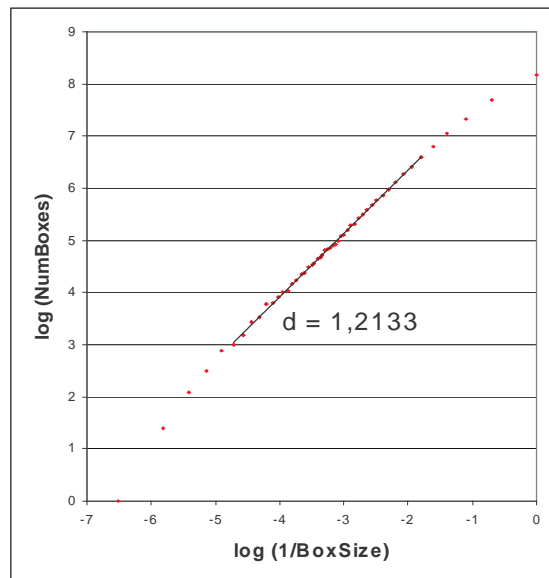


GRÁFICO 1 – Gráfico Log-Log para cálculo da dimensão fractal. Número de caixas $N(\varepsilon)$ em função do inverso do tamanho da caixa ($1/\varepsilon$). d é a inclinação da linha reta e representa a dimensão fractal do objeto. Os dados acima são referentes à simulação que gerou o tumor exibido em (FIGURA 17(a)).

A FIGURA 17 apresenta, a imagem de um tumor gerado pelo modelo desenvolvido neste trabalho e sua borda. Observar que não são consideradas no delineamento da borda do tumor as interfaces de células tumorais com células normais, se as últimas estiverem localizadas no interior do tumor.

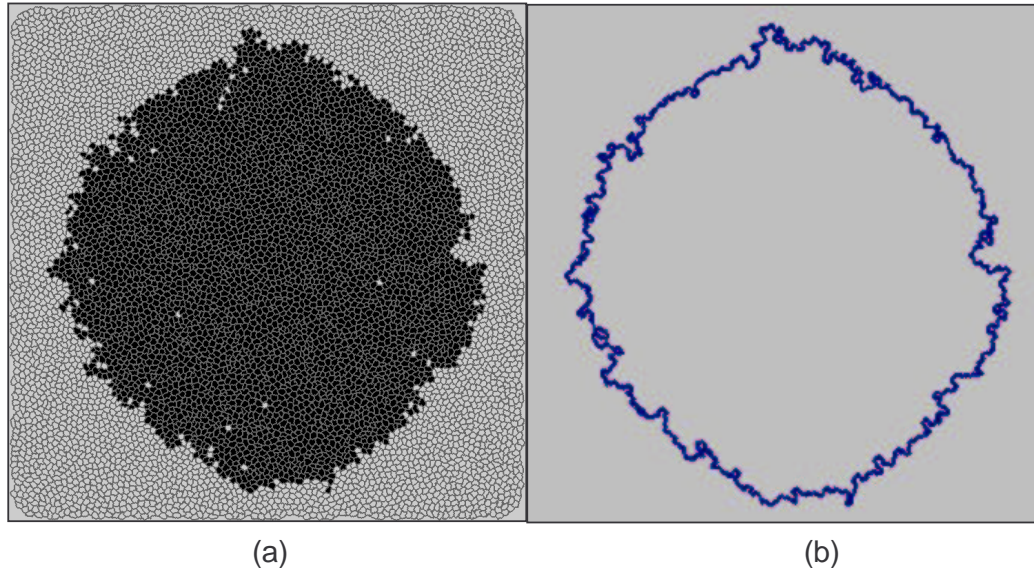


FIGURA 17 – Delimitação da borda de um tumor. Em (a) a imagem de um tumor gerado pelo modelo desenvolvido neste trabalho. Em (b) a borda delineada a partir de (a). Observar que não são consideradas no delineamento da borda do tumor as interfaces de células tumorais com células normais, se as últimas estiverem localizadas no interior do tumor.

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de associar a dimensão fractal da borda de tumores com seu grau de malignidade (CROSS, 1997; LANDINI & RIPPIN, 1996; BRÚ et al., 1998). Em alguns casos ela tem sido um bom indicador. Em outros, não. A dimensão fractal dá uma boa noção complexidade global do tumor. Entretanto, muitos tumores não apresentam uma borda irregular isotrópica. Algumas regiões são mais irregulares que outras, evidenciando graus distintos de malignidade. Para estes casos, a dimensão fractal do tumor não é um bom indicador e outras abordagens como, por exemplo, a análise de dimensões fractais locais são utilizadas (LANDINI & RIPPIN, 1996).

Uma segunda medida utilizada neste trabalho para quantificar a irregularidade da interface dos tumores com o tecido sadio foi o índice de irregularidade. Usualmente, esta medida, que relaciona o perímetro de uma imagem a sua área, é

aplicada para quantificar assimetria. Entretanto ela tem se demonstrado útil também para quantificar a irregularidade de uma interface.

O índice de irregularidade, I , definido por

$$I = 1 - \frac{p_c}{p_t}, \quad (17)$$

onde p_c é o perímetro do círculo com área igual a do tumor e p_t é o perímetro do tumor

6.6 Modelos Computacionais de Crescimento de Tumores

6.6.1 Introdução

Muitos problemas naturais não podem ser resolvidos através de métodos analíticos. Para explorar esses fenômenos o computador é uma ferramenta de grande utilidade. Entretanto, abordar essas questões com o uso de computadores pode exigir a introdução de algumas simplificações para tornar o problema factível computacionalmente.

Simulações de computador são algumas vezes referidas como experimentos de computador porque compartilham muito em comum com experimentos de laboratório. Algumas analogias podem ser vistas na TABELA 1. O ponto de início da simulação de computador é o desenvolvimento de um modelo do sistema que se deseja estudar. É necessário então especificar um procedimento ou algoritmo para implementar o modelo em um computador. O programa de computador simula o sistema, o que é definido como experimento de computador. Tal experimento de computador pode servir como uma ponte entre os experimentos de laboratório e a teoria. De um lado, a comparação dos resultados da simulação com cálculos teóricos pode servir como estímulo para o desenvolvimento de novos métodos de cálculo. Por outro lado, a simulação pode ser feita em um modelo realístico para prover uma comparação mais direta com experimentos de laboratório.

Simulações de computador, assim com experimentos de laboratório, são ferramentas que podem ser usadas para compreender fenômenos complexos. Usando-se resultados experimentais de várias medidas microscópicas envolvidas, torna-se possível construir modelos que revelam as relações entre parâmetros celulares e bioquímicos e fenômenos macroscópicos.

A seguir, apresentam-se alguns modelos computacionais que simulam crescimento de tumores com o intuito de demonstrar outras abordagens possíveis para realizar a investigação proposta neste trabalho e para ajudar a fundamentar a opção pelo Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada.

TABELA 1 - Comparativo entre experimento de laboratório e simulação computacional .

Experimento de Laboratório	Simulação de Computador
Amostragem	Modelo
Aparato físico	Programa de Computador
Calibragem	Teste do Programa
Medição	Computação
Análise de Dados	Análise de Dados

FONTE: GOULD & TOBOCHNIK, 1996.

6.6.2 Modelo Clássico de Crescimento Cinético

Espalhamento (*spreading*) é um processo no qual um objeto estende-se sobre uma área cada vez maior através da incorporação de regiões adjacentes a si. Uma grande variedade de processos naturais que apresentam esta capacidade pode ser descrita por modelos de crescimento cinético. Exemplos incluem crescimento de tumores, disseminação de epidemias e fluxo de fluídos em meios porosos (BARABÁSI & STANLEY, 1995).

Um modelo clássico de crescimento foi introduzido por Eden (1961) como um modelo para formação de colônias de células, tais como bactérias ou culturas de tecido. O modelo é baseado em uma rede onde se coloca um elemento semente no centro da mesma. Os elementos vizinhos mais próximos, não ocupados, são denominados de elementos do perímetro ou elementos de crescimento. Um elemento do perímetro é escolhido aleatoriamente e ocupado. O elemento recém ocupado é removido da lista de elementos de crescimento e seus vizinhos não ocupados são adicionados à lista elementos de crescimento. O processo de crescimento é repetido até que o aglomerado atinja um tamanho pré-definido. Quando iterado, o modelo de Eden gera um agrupamento de elementos com forma compacta e perímetro rugoso (BARABÁSI & STANLEY, 1995).

6.6.3 Modelos de Crescimento Tumoral

Existe uma grande variedade de modelos para a simulação de crescimento de tumores. Essa variedade se dá em função do mecanismo físico ou biológico em estudo, da técnica computacional utilizada, ou de ambos.

A maioria dos modelos para simular crescimento de tumores descritos na literatura é baseada no modelo de crescimento cinético, que é um autômato celular onde células são elementos unitários de uma rede e interagem através de regras locais. Entretanto, existem outras formas de representação de células. Uma célula pode ser representada por um conjunto conexo de elementos como, por exemplo, no Modelo de Potts, ou por ponto no espaço e uma região adjacente a este ponto. Esta região pode ser um círculo, um polígono regular, ou um polígono de Voronoi (vide seção Modelos Computacionais para Organização Celular) (TABELA 2).

TABELA 2 – Caracterização resumida dos modelos estudados.

Modelo	Representação da Célula	Técnica Computacional	Objetivo da Investigação
Smolle e Stettner (1993)	Um elemento de rede	Autômato Celular	Morfologia em função da concentração de fatores crescimento
Ferreira et al.(1998)	Um elemento de rede	Autômato Celular	Morfologia em função da concentração de fatores crescimentos
Rashbass et al. (1996)	Circulo	Autômato Celular	Morfologia em função taxa de crescimento e imortalidade de tipos celulares
Reis et al. (2001)	Polígono de Voronoi	Autômato Celular	Morfologia em função da adesão entre células tumorais
Stott el al. (1999)	Elementos de rede com mesmo rótulo	Monte Carlo	Formação do núcleo necrótico e crescimento do tumor
Turner e Sherrat	Elementos de rede com mesmo rótulo	Monte Carlo	Invasividade em função da diminuição da adesão entre células tumorais, do aumento da adesão dessas com MEC, da secreção de enzimas proteolíticas e da haptotaxia

6.6.3.1 Modelo de Smolle e Stettner (1993)

Smolle & Stettner (1993) desenvolveram um modelo onde o tecido é representado por uma rede 100 x 300 elementos. Neste modelo, uma linha de células colocadas no topo da rede (elementos ocupados) cresce ocupando elementos vazios. O conjunto de elementos não ocupados representa o tecido conjuntivo adjacente.

Uma célula escolhida aleatoriamente pode executar uma de três atividades, divisão, movimentação ou morte. A ação que será executada depende de probabilidades previamente determinadas e que são recalculadas para cada célula considerando fatores locais. Esses fatores locais representam as concentrações de substâncias autócrinas¹¹ e parácrinas que influenciam o metabolismo celular. Quando uma divisão celular ocorre, a célula filha é colocada em um dos oito primeiros vizinhos, que é escolhido aleatoriamente. Todas as células na direção do vizinho escolhido são movidas um elemento na mesma direção até que seja encontrado um elemento desocupado. Para a movimentação celular, uma das oito direções possíveis é escolhida e uma distância é aleatoriamente selecionada. Para morte celular, o elemento selecionado é excluído da rede e todos os elementos, de uma direção escolhida aleatoriamente, são movidos em direção ao que foi excluído até que seja encontrado um elemento vazio.

Um padrão obtido por este modelo pode ser visto na FIGURA 18.

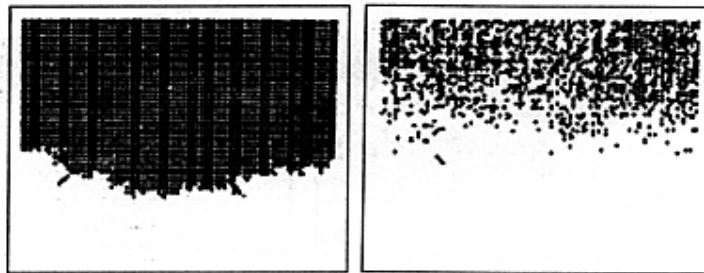


FIGURA 18 - Padrões obtidos por Smolle & Stettner (1993). No padrão à esquerda as células são imóveis (probabilidade de movimentação = 0). À direita probabilidade de movimentação = 0,63.

¹¹ Fatores de crescimento autócrinos e parácrinos influenciam o desenvolvimento tumoral. São proteínas estimuladoras, secretadas e liberadas por cada célula cancerosa. Usualmente essas proteínas atuam em células próximas (fatores parácrinos) mas elas podem ser utilizadas pelas próprias células que as secretaram (fatores autócrinos) (FERREIRA et al., 1998).

Simulações com este modelo mostraram que combinações variadas destes fatores locais conduzem a diferentes padrões morfológicos da interface entre o tumor e o tecido sadio, que são condizentes com a descrição de padrões histológicos de tumores reais.

Smolle & Stettner (1993) não utilizaram nenhuma medida para quantificar seus resultados.

6.6.3.2 Modelo de Ferreira et al.(1998)

Ferreira et al. (1998) desenvolveram um modelo similar ao Smolle & Stettner (1993), mas de crescimento radial. Neste modelo o crescimento tumoral é resultado da influência da difusão de fatores de crescimento autócrinos e parácrinos sobre as atividades das células tumorais. A proliferação, a mobilidade e a morte celular são reguladas localmente pela concentração desses fatores de crescimento.

O modelo é implementado em uma rede onde cada elemento representa uma célula, podendo esta ser normal $\sigma_{ij}=0$ ou cancerosa $\sigma_{ij}=1$. A cada iteração, uma célula cancerosa da periferia do tumor é escolhida aleatoriamente e pode realizar uma das seguintes ações: divisão celular, morte celular e movimentação. Cada ação tem uma determinada probabilidade de ser escolhida e a soma destas probabilidades é 1. Uma vez escolhida a ação, o modelo executará ou não esta ação, de acordo com uma probabilidade $p_o(act)$ que varia de acordo com a concentração de fatores de crescimento, calculada com base no microambiente circundante à célula selecionada.

As simulações deste modelo, que envolve um total 12 parâmetros independentes, levam à formação de padrões compactos e pouco invasivos ou à formação de padrões esparsos e mais invasivos de acordo com a parametrização escolhida. Exemplos de padrões obtidos por este modelo podem ser visto na FIGURA 19.

Ferreira et al. (1998) quantificaram a morfologia dos padrões utilizando o raio de giração e a rugosidade da superfície, definida como o desvio padrão do raio médio do tumor. Essas medidas escalam com o número de células do tumor, N , e seus expoentes tendem, com $N \rightarrow \infty$, a (0,5), o mesmo valor que o modelo de Eden.

Além das medidas citadas acima, Ferreira et al. (1998) quantificaram a dimensão fractal do tumor e o número de células na periferia do tumor, S . A

dimensão fractal do tumor tende assintoticamente a 2 com $N \rightarrow \infty$. Já o número de células periféricas em relação a N apresentou três regimes distintos. Com N até 4×10^3 células, S , cresce rapidamente, pois como o padrão é altamente disperso muitas células estão na periferia. Após atingir um máximo, S diminui, demonstrando que o tumor está se tornando compacto. A partir de 8×10^4 , a relação de S/N , volta a crescer exibindo comportamento similar ao modelo de Eden.

Em outra versão, este modelo foi estendido adicionando-se o uso de duas regras distintas para a probabilidade de divisão celular. Neste caso o crescimento dos tumores seguiu a curva de crescimento de Gompertz (FERREIRA et. al, 1999).

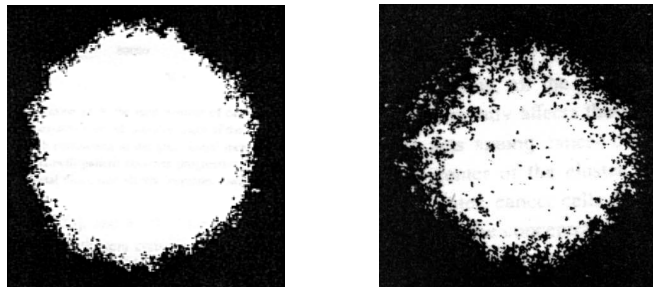


FIGURA 19 - Padrões obtidos por Ferreira et al. (1998). À esquerda, um padrão obtido com células de alta motilidade mas sem influência de fatores de crescimento. À direita, um resultado obtido com a mesma motilidade mas sob influência de fatores de crescimento. Os padrões possuem cerca de 10^5 células.

6.6.3.3 Modelo de Rashbass et al. (1996)

Rashbass et al. (1996) introduziram um modelo matemático implementado computacionalmente para simular o desenvolvimento de patologias epiteliais.

O modelo define a existência de uma membrana basal e de cinco tipos celulares: célula tronco, célula basal, célula intermediária, célula madura e célula morta. As células podem exercer seis atividades distintas: divisão, movimentação, diferenciação, envelhecimento, morte e descamação. Estas atividades são controladas por fatores químicos, físicos e por lapso de tempo. Introduzindo-se mutações que se mantêm para toda a progênie da célula mutante e afetam a taxa de mitose das células ou tornam as células imortais. Foram obtidos resultados comparáveis a uma variedade de patologias epiteliais com características benignas e malignas.

A FIGURA 20 exibe a evolução uma colônia de células derivadas de uma célula mutada.

Rashbass et al (1996) não quantificaram seus resultados em termo de morfologia.

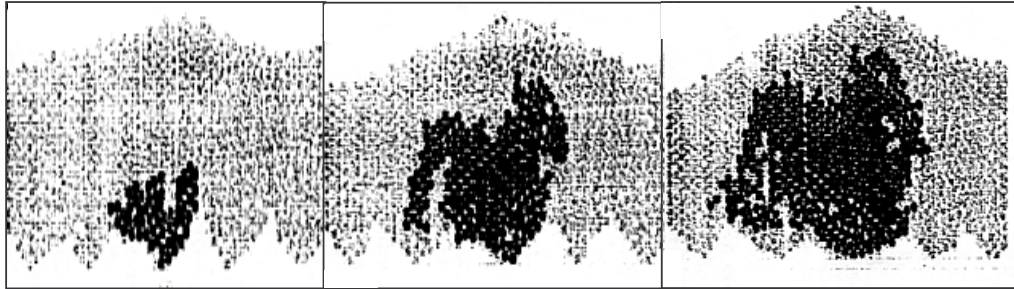


FIGURA 20 - Padrões obtidos por Rashbass et al. (1996). Da esquerda para a direita, a evolução de uma colônia de células derivadas de uma célula mutada.

6.6.3.4 Modelo de Reis et al. (2001)

O modelo de Reis et al. (2001) simula o crescimento de tumores em duas dimensões e é baseado no modelo MCLONE de Walter & Fournier (1998). No modelo MCLONE, cada célula é vista como uma partícula confinada em um espaço bidimensional e a interação entre as células se dá através de forças de repulsão moduladas por uma função associada à adesão. Reis et al. (2001) estenderam o modelo MCLONE, para conter dois tipos celulares, células normais e cancerosas. O modelo contempla as seguintes características:

a) A afinidade ou adesão celular é modelada através de um decréscimo de repulsão que depende dos tipos celulares envolvidos;

b) O movimento celular resulta do equilíbrio das forças de interações com outras células;

c) A visualização do tecido celular é gerada computando-se os polígonos de Voronoi associados a cada partícula da simulação;

d) A simulação inicia a partir de uma célula cancerosa inicial em um tecido de células normais;

e) A célula cancerosa inicial e seus descendentes têm uma taxa maior de divisão que as células normais e forças de adesão aleatórias;

f) A morte celular não é considerada.

Simulações de crescimentos tumorais partindo do mesmo estado inicial mostraram que, nos casos em que as forças de adesão celular não são alteradas e a única anormalidade é a alta taxa de mitose, são gerados tumores com características de benigno, ao passo que quando, além da alta taxa de mitose, as forças de adesão das células tumorais são geradas pela distribuição de Gauss-Heaviside, obtém-se um tumor com características de maligno, apresentando células desprendendo-se do mesmo. A representação visual da simulação mostrou o crescimento de forma compacta dos tumores benignos. Tumores malignos formaram um tecido com aspecto irregular, com células se desprendendo do aglomerado original e com a interface de contato entre os tipos normal e canceroso bastante irregular. A FIGURA 21 apresenta alguns padrões obtidos.

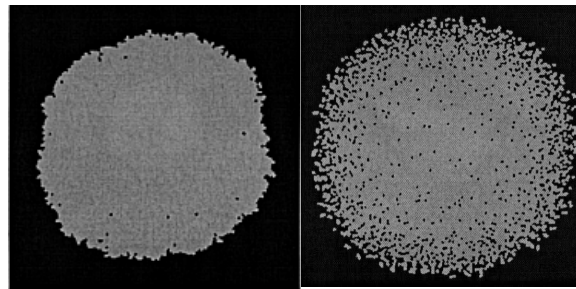


FIGURA 21 - Padrões obtidos por Reis et al. (2001). À esquerda, a única anormalidade das células tumorais é maior taxa de mitose. À direita, além da taxa de mitose mais elevada, as células tumorais apresentam menor força de adesão.

Reis et al. (2001) quantificaram a irregularidade da interface do tumor com o tecido normal usando como medidas a dimensão fractal da borda do tumor e a rugosidade, conforme descrito em anteriormente. A dimensão fractal da borda dos tumores aumentou com a diminuição da força de adesão entre células tumorais, iniciando em $\sim 1,1$ e saturando em torno de $\sim 1,6$. O expoente de crescimento, que é a declividade da linha obtida em um gráfico do logaritmo da rugosidade em função do logaritmo do tempo, também aumentou com a diminuição da força de adesão entre células tumorais, iniciando em $\sim 0,4$ e saturando em torno de $\sim 1,2$.

As simulações mostraram que o decréscimo da adesão celular é suficiente para explicar a rugosidade e o desprendimento de células do tumor. Isto suporta a

hipótese proposta por Steinberg & Foty (1997) de que o desprendimento de células de um tumor pode ser explicado pelo decréscimo nas forças de adesão de células mutantes e sugere que este processo é importante na transição de benigno para maligno.

6.6.3.5 Modelo de Stott et al. (1999)

Stott et al. (1999) simularam o crescimento de um tumor benigno avascular, isto é, um tumor que não iniciou a neovascularização, utilizando uma extensão do Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada.

O modelo inclui três tipos celulares: células proliferativas que crescem e se dividem, células do núcleo necrótico que encolhem e morrem, e células quiescentes que mantêm um volume relativamente constante. Adicionalmente são atribuídas, a cada tipo celular, taxas distintas de crescimento, bem como restrições de volume. A energia de adesão entre células normais é inferior à energia de adesão entre células tumorais, o que implica, às primeiras, maior força de adesão. Células proliferativas crescem em resposta ao incremento de volume sofrendo mitose sempre que a razão entre área superficial e volume cair abaixo de um certo patamar. As células mudam de tipo em resposta ao gradiente de nutrientes dentro do tumor. O modelo assume que o tecido normal é uma fonte homogênea de nutrientes.

As extensões ao Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada referem-se ao fato de que os tipos celulares e a elasticidade celular são tomados como função da concentração de gradientes e o volume celular como função do tempo. Em simulações realizadas com este modelo, os tumores crescem inicialmente de forma exponencial, formando três camadas distintas: a mais externa de células proliferativas, a mais interna contendo o núcleo necrótico e a intermediária com células quiescentes. A taxa de crescimento reduz e, eventualmente, o tumor atinge um estado de estabilidade. Estes resultados são consistentes com observações experimentais.

A FIGURA 22 apresenta o padrão gerado por Stott et al. (1999).

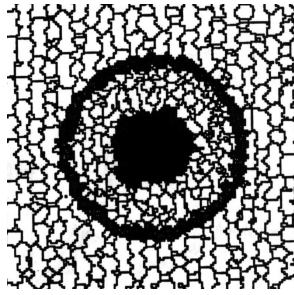


FIGURA 22 - Padrão obtido por Stott et al. (1999). Em evidência, as camadas de células proliferativas, a de células quiescentes e o núcleo necrótico.

6.6.3.6 Modelo de Turner e Sherratt

Turner & Sherratt desenvolveram um modelo baseado no Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada para investigar a invasividade do tumor em função da diminuição da adesão celular entre células tumorais, do aumento da adesão dessas com MEC, da secreção de enzimas proteolíticas e do gradiente de haptotaxia.

A haptotaxia no modelo está relacionada à secreção de enzimas proteolíticas. Ele se dá pela associação a cada elemento da rede de um valor, f_{ij} , que corresponde à concentração local de proteínas na MEC. Assim, além do termo de energia de adesão e do termo de área alvo, o Hamiltoniano do modelo apresenta um terceiro termo referente ao custo energético de adesão a MEC. Esta abordagem foi utilizada em estudos da morfogênese do *Dictyostelium discoideum* (SAVILL & HOGEWEG, 1997). Para simular a secreção de enzimas proteolíticas gerando um gradiente de concentração que implique na movimentação celular, o valor de f_{ij} é uma função do tempo e da posição dos elementos em relação ao tumor, sendo maior nos adjacentes a borda do tumor, o que é consoante com resultados experimentais.

Para implementar a reprodução celular, a célula é dividida por uma linha que passa pelo seu centro de massa. Essa linha tem uma de três direções: horizontal, diagonal, ou vertical, sendo escolhida a de menor comprimento. A seleção das células para divisão ocorre segundo uma probabilidade que é função do tempo de vida da célula e de seus valores de adesão, visto que esses estão implicados na reprodução de células reais.

Uma simulação inicia com uma camada com a espessura de aproximadamente 10 células cancerosas na borda superior da rede. O restante da rede é tratado com MEC. Não há células normais neste modelo. A interface do tumor avança sobre a MEC formando protuberâncias e apresentando células ou massas se desprendendo do tumor. Segundo os autores, isto é consistente com resultados experimentais.

Turner & Sherrat não avaliam a morfologia da interface, mas sim, a profundidade máxima da invasão, d_{max} , em função dos parâmetros utilizados. d_{max} é um critério utilizado em exames histológicos. Suas conclusões foram de que o aumento da adesão das células tumorais à MEC exerce maior influência na invasividade do que a diminuição da adesão entre células tumorais

A FIGURA 23 exhibe padrões obtidos por Turner & Sherrat.

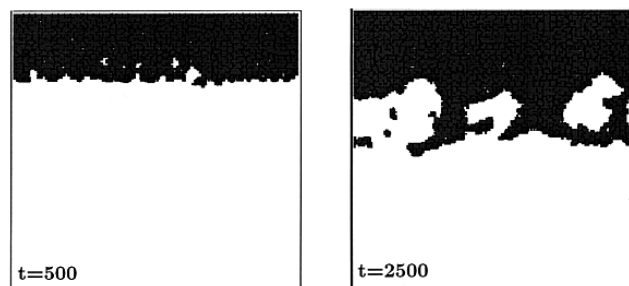


FIGURA 23 - Padrões obtidos por Turner & Sherrat. A região escura representa as células tumorais, a clara a MEC. À esquerda, um estágio inicial do tumor. À direita, um estágio mais avançado, onde se pode perceber a formação de infiltrações e a presença de células se desprendendo da massa tumoral.

7 DESENVOLVIMENTO DO MODELO E INVESTIGAÇÃO SIMULACIONAL

7.1 Introdução

O objetivo deste trabalho é propor um modelo de crescimento de tumores para investigar a influência da adesão celular na morfologia da interface entre tumor e tecido sadio.

Conforme foi visto em seção anterior, existe uma diversidade de modelos utilizados na simulação de crescimento de tumores. Muitos deles geram interfaces rugosas, seja pela simples cinética de crescimento, seja pela introdução de outros elementos no modelo, tais como difusão de nutrientes e fatores autócrinos e parácrinos.

Entretanto, o único modelo que investiga a implicação da adesão celular diminuída na morfologia da interface dos tumores é o modelo de Reis et al. (2001). Contudo, neste modelo as células não têm estrutura física e ele é de difícil extensão para 3D.

Considerando o fato de que a adesão celular é um mecanismo de grande importância nos processos de organização celular, a utilização de um modelo que contemple tal mecanismo é essencial para corretamente simular o crescimento e a morfologia de um tumor.

Modelos baseados em autômatos celulares podem, com facilidade, fornecer informações globais, tais como padrões morfológicos, sobre a sua coleção de células. Tais modelos, quando usados para simular interações entre células biológicas, geralmente empregam um autômato por célula e cada célula interage com as células vizinhas mais próximas utilizando regras locais. Entretanto sua utilização torna-se mais complicada para modelar sistemas nos quais a forma e/ou tamanho das células, a movimentação das membranas celulares, ou o crescimento celular estejam envolvidos. O uso de autômatos celulares para tais sistemas apresenta algumas desvantagens:

- as células possuem tamanho fixo;

- as células não possuem forma;
- todas as células interagem com um número fixo de vizinhos.

Por outro lado, sabe-se que o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada, além de trabalhar com energias de adesão interfaciais, apresenta como característica intrínseca a representação de células com forma e área/volume próprias. Isto possibilita a simulação da reorganização de células biológicas através da movimentação de suas membranas e da adesão celular diferenciada. Além disso, este modelo pode ser facilmente estendido para incluir outras características de células biológicas em nível microscópico, tais como divisão e crescimento celular, e também permite a modelagem de atividades celulares que ocorrem escalas de tempo diferente como, por exemplo, mitose e flutuação da membrana celular.

Até o momento, apenas dois trabalhos foram desenvolvidos utilizando o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada para simular crescimento tumoral: o modelo de Stott et al. (1999) e o modelo de Turner & Sherrat. Entretanto, ambos diferem entre si e do modelo desenvolvido neste trabalho, pelo enfoque da investigação, pelas modificações aplicadas ao modelo original e por algumas características de implementação.

A escassez de modelos que investigam a implicação da adesão celular na morfologia da interface de tumores, e a aplicabilidade do Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada para sistemas que envolvem organização celular em função das CAM's, motivaram a aplicação deste modelo para investigar tal questão que pode ser relevante para o entendimento da transição de tumores de benigno para maligno.

O modelo desenvolvido neste trabalho é apresentado a seguir. Na seqüência explica-se a escolha dos valores dos parâmetros utilizados nas simulações, demonstram-se as simulações realizadas e, por fim, os apresentam-se os resultados obtidos.

7.2 O Modelo

O modelo desenvolvido para simular o crescimento tumoral e investigar a interface do tumor com o tecido normal é baseado no Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada. Ele foi implementado em uma rede quadrada bidimensional. São considerados três tipos celulares, $\tau \in \{n, t, M\}$: célula normal, célula tumoral e célula meio, tratada como uma célula normal e cuja função é explicada posteriormente.

Da mesma forma que no modelo original de Potts Estendido com Adesão Diferenciada a adesão entre tipos celulares é definida através de constantes de acoplamento representando a energia livre por unidade de área de interface. Quanto maior o valor da constante de energia interfacial, menor a força de adesão celular.

O Hamiltoniano do sistema é o definido em (14) com uma pequena alteração que é apresentada a seguir.

O modelo evolui de acordo com o Algoritmo de Metropolis num processo Monte Carlo. A cada passo, um elemento da rede, i , é escolhido aleatoriamente. Em seguida, também de forma aleatória, um outro elemento, j , dentre os oito vizinhos mais próximos de i (FIGURA 14), é escolhido. Escolhe-se dentre os oito primeiros vizinhos para que não haja flutuações de mais de um elemento de rede, evitando a desconexão de elementos de uma célula. Se i e j pertencem à mesma célula, isto é, possuem o mesmo rótulo σ , os sorteios de i e j são repetidos. Entretanto, se os elementos sorteados pertencem a células distintas, uma tentativa de alterar a configuração do sistema, atribuindo $\sigma(i)$ a $\sigma(j)$, é realizada. A nova configuração é aceita com a razão de aceitação definida em (15). A unidade de tempo utilizada é o MCS (vide seção .6.4.10).

De acordo com o que foi mencionado em capítulo anterior, simulações em redes podem gerar anisotropia devido a discretização do espaço. Uma maneira de tratar este problema é trabalhar com temperaturas mais altas onde a ativação térmica permite às interfaces das células vencerem a anisotropia. Entretanto, como a temperatura no modelo está diretamente relacionada à flutuação das membranas

celulares, esta solução torna-as muito irregulares, o que aumenta o perímetro celular e afeta a relação $a(\sigma)/p(\sigma)$ utilizada para determinar se a célula deve ou não dividir. Além disso a morfologia celular pode ficar descaracterizada (FIGURA 28). Outra alternativa para reduzir a anisotropia é aumentar o alcance das interações ou utilizar uma rede triangular em vez de uma quadrada. De acordo com Yang (1998) usando-se interações com até os quartos vizinhos mais próximos, obtém-se uma anisotropia de 1,037 (muito próxima do ideal, anisotropia =1) e sem muitos custos computacionais.

Em função do exposto acima, o cálculo da energia neste modelo considera até os quarto vizinhos mais próximos (FIGURA 14).

Enquanto o Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada procura reorganizar espacialmente um número fixo de células de tipos diferentes através da minimização da energia livre de adesão das interfaces celulares, um modelo que se proponha a simular crescimento tumoral precisa, além de reorganizar as células espacialmente, incorporar a reprodução e, conseqüentemente, o crescimento de células tumorais, uma vez que após a reprodução as células diminuem sua área.

Para que as células tumorais possam se reproduzir, implementou-se, no modelo, a mitose celular. Células biológicas, ao ficarem muito grandes, perdem sua eficiência, pois a superfície da célula torna-se insuficiente para atender a demanda de nutrientes necessários a mesma. Isto se deve ao fato de que a troca de nutrientes da célula com o meio se dá pela membrana celular e esta cresce proporcionalmente ao quadrado de seu raio médio enquanto o volume celular cresce proporcionalmente ao cubo de seu raio médio. Para dividir as células implementou-se o procedimento descrito por Mombach (1996). Segundo este procedimento, quando a razão área/perímetro da célula atinge um certo valor crítico, denominado Mitose Crítica, a célula é dividida por uma reta que, passando pelo seu centro de massa, corresponde ao menor diâmetro. Uma das duas novas células mantém o rótulo antigo, enquanto a outra recebe um novo rótulo.

O modelo executa o procedimento de mitose após um intervalo de tempo em MCS. O objetivo disso é compatibilizar escalas de tempo bastante distintas. Na realidade, a escala de tempo em que as flutuações da membrana celular ocorrem é muito menor do que a escala de tempo das mitoses. A esse intervalo, que neste modelo é parametrizável, dá-se o nome de tempo de Relaxação.

Uma vez divididas, as células ficam com aproximadamente metade da área de sua célula mãe e crescem. O crescimento de uma célula ocorre pela incorporação de elementos vizinhos da rede pertencentes a outras células, sejam essas normais ou tumorais.

Cada tipo celular possui uma área alvo, $A(\tau)$, fixa. Esta área pode ser diferente para cada tipo celular. Em função do termo de energia de área alvo no Hamiltoniano do modelo, quanto maior for a diferença da área de uma célula de sua área alvo, maior a contribuição de energia livre para o sistema. Como o modelo busca minimizar a energia livre global, ele tenta diminuir essa diferença, viabilizando, assim, o crescimento celular.

Células recém divididas ficam com áreas muito distantes de suas áreas alvo, o que introduz energia no sistema. Este valor de energia pode ser alto se for considerado o elevado número de divisões celulares em um tumor. Para evitar que o sistema fique muito fora de equilíbrio, acrescentou-se uma pequena modificação à dinâmica do modelo. Embora cada tipo celular possua uma área alvo, $A(\tau)$, cada célula passa também a possuir sua própria área alvo, $A(\sigma)$. Após a divisão celular, a área alvo das duas células envolvidas toma o valor da metade da área alvo de seu tipo celular. A cada iteração do modelo, a área alvo das células é incrementada de 1 até que se iguale ao valor da área alvo do tipo celular em questão, $A(\sigma) = A(\tau(\sigma))$. Desta forma, faz-se o sistema evoluir mais próximo do equilíbrio, sem grandes flutuações de energia.

Isto implica em uma pequena alteração no termo de energia elástica do Hamiltoniano do Modelo de Potts, apresentado em seção anterior, que assume a forma:

$$H = \sum_{\vec{i}, \vec{j}} e_{\tau(\sigma(\vec{i})), \tau(\sigma(\vec{j}))} (1 - \delta_{\sigma(\vec{i}), \sigma(\vec{j})}) + \lambda \sum_{\sigma} [A(\sigma) - a(\sigma)]^2, \quad (18)$$

onde $a(\sigma)$ é área da célula e $A(\sigma)$, que substitui $A(\tau(\sigma))$, é a área alvo de cada célula.

Como as células tumorais possuem uma taxa de reprodução bem mais elevada que a das células normais e a rara reprodução das últimas possivelmente

afeta fracamente a dinâmica de crescimento e reorganização de um tumor real, na simulação apenas as células tumorais são selecionadas para o processo de divisão celular. Não se dividindo, as células normais permanecem com áreas relativamente estáveis se comparadas as das células tumorais. Para prover tais características ao modelo, associa-se à área alvo das células normais, $A(n)$, um valor equivalente à área que as células normais teriam na interfase (período não reprodutivo do ciclo de vida de uma célula) e à área alvo das células tumorais, $A(t)$, um valor equivalente à área que estas teriam durante a mitose, quando aumentam de tamanho para se reproduzir. A Mitose Crítica deve ser definida de tal forma que a razão (área da célula)/(perímetro da célula), $a(\sigma)/p(\sigma)$, seja atingida somente por células tumorais.

Para que o modelo suporte a reprodução e o crescimento das células tumorais é necessário implementar uma estratégia para que o mesmo comporte um número cada vez maior de células. Três abordagens foram consideradas.

A primeira seria iniciar a simulação com o tecido normal ocupando apenas parte da rede. À medida que as células tumorais se reproduzissem e crescessem, tomando área do tecido normal, este, por sua vez, tomaria área do meio extracelular. A simulação seria concluída quando o tecido sadio tocasse a borda da rede (FIGURA 24). Esta abordagem apresenta as desvantagens de subutilizar a área da rede e não representar adequadamente um tecido *in vivo*, onde o tecido normal, em geral, não está embebido em meio líquido.

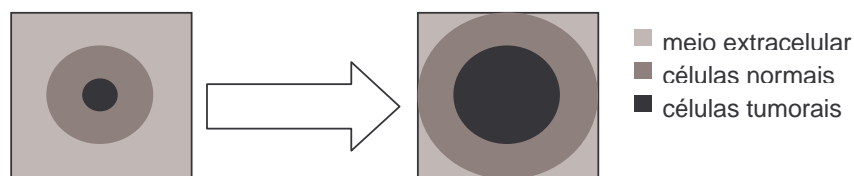


FIGURA 24 - Representação esquemática da alternativa de ocupação parcial da rede. Alternativa de implementação do modelo onde a simulação seria iniciada com o tecido normal preenchendo parte da rede e terminada quando este tocasse a borda da rede.

Uma segunda alternativa seria transformar a “área alvo” como função do número de células. Para permitir que o número de células no sistema aumente devido a reprodução das células tumorais, as áreas alvo dos diversos tipos celulares poderiam ser reduzidas, repercutindo em uma alteração proporcional nos valores de

mitose crítica. Com células cada vez menores, o modelo comportaria um número sempre crescente de células, até que um limite fosse atingido. A desvantagem desta alternativa é que computações realizadas com células de áreas reduzidas em um espaço discretizado podem gerar resultados indesejáveis. Por exemplo, a discretização da rede torna possível obter a mesma relação área/perímetro mesmo com áreas bastante distintas. Como a relação área/perímetro é utilizada para determinar se a célula deve ou não dividir, isto poderia alterar o comportamento do modelo. A FIGURA 25 exemplifica o exposto.

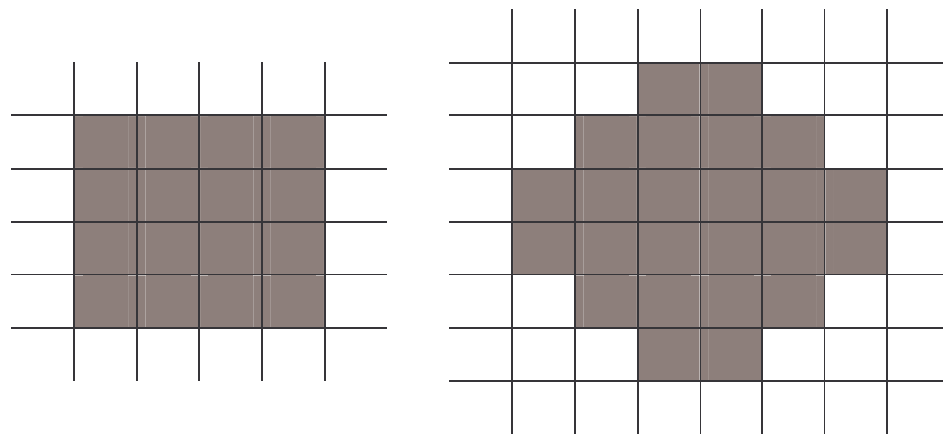


FIGURA 25 – Efeitos da discretização da rede em cálculos. À esquerda, uma célula com $a = 16$, $p = 16$ e $a/p = 1$. À direita, uma célula com $a = 24$, $p = 24$ e $a/p = 1$. Se o modelo trabalhasse reduzindo o tamanho das células, ambas poderiam ser selecionadas para mitose, mesmo com áreas bastante distintas.

A terceira abordagem seria gerar espaço para as novas células tumorais excluindo-se do modelo células normais. Desta forma a simulação poderia iniciar com o tecido sadio ocupando a totalidade da rede. A implementação da exclusão de células poderia se dar de várias maneiras:

- a) exclusão de células normais que tivessem sua área reduzida a um valor abaixo de um certo patamar, o que simularia a destruição do tecido sadio pelo tecido tumoral;
- b) exclusão de células normais cuja tempo de existência fosse superior a um certo número de gerações ou número de MCS, simulando morte por envelhecimento;
- c) exclusão de células normais que tocassem a borda da matriz.

As opções a) e b), embora factíveis, implicam no estudo e na introdução no modelo de mais um parâmetro. Desta forma, para suportar a reprodução das células tumorais, optou-se, por simplicidade, pela opção c).

Quando uma célula é excluída, os elementos da rede que a compunham são transferidos para a Célula Meio. Em todo o modelo existe uma única Célula Meio, que pode ser considerada como uma célula normal com uma pequena mudança funcional. A Célula Meio possui os mesmos valores de energia de adesão de uma célula normal, isto é $e_{MM}=e_{nn}$, $e_{Mn}=e_{nn}$ e $e_{Mt}=e_{nt}$, bem como o mesmo valor de área alvo das células normais, ou seja, $A(M)=A(n)$. A diferença está em seu comportamento. Assim como as células normais, a Célula Meio está livre para ceder elementos da rede para as células que se reorganizam ou crescem e livre para receber elementos de células que se reorganizam ou morrem. Entretanto, ao fazer isso seu valor de área não é modificado. A área da Célula Meio é, portanto, fixa e pode não corresponder a real quantidade de elementos da rede associados a ela. O objetivo disso é que a Célula Meio sirva como um repositório de elementos da rede, mas que localmente interaja com as demais células do modelo como se fosse uma célula normal. Como as células selecionadas para exclusão são as que estão em contato com a borda da rede, a Célula Meio assume a forma de uma linha que acompanha a borda da rede e acaba por envolver todo o tecido normal.

O modelo é executado sobre uma rede quadrada que implementa condições de contorno periódicas em todos os lados. As simulações iniciam-se com a rede repleta de células normais e uma única célula tumoral situada ao centro da rede (FIGURA 30(a)). O tumor cresce radialmente. O crescimento e a reorganização celular são dependentes da competição dos termos de energia de interface e de energia de área alvo. Isto afeta a velocidade de crescimento do tumor, que pode variar muito em função da parametrização de cada simulação. Para comparar medidas quantitativas de avaliação da interface entre tumores distintos é importante que estes apresentem áreas compatíveis e tenham atingido um estado de equilíbrio.. Esta área é determinada de tal maneira que a interface do tumor com o tecido normal ainda esteja distante das bordas. Caso contrário, isto o que afetaria o valor das medidas quantitativas em estudo.

A FIGURA 26 exhibe o fluxograma principal de execução do modelo, que foi implementado na linguagem de programação C.

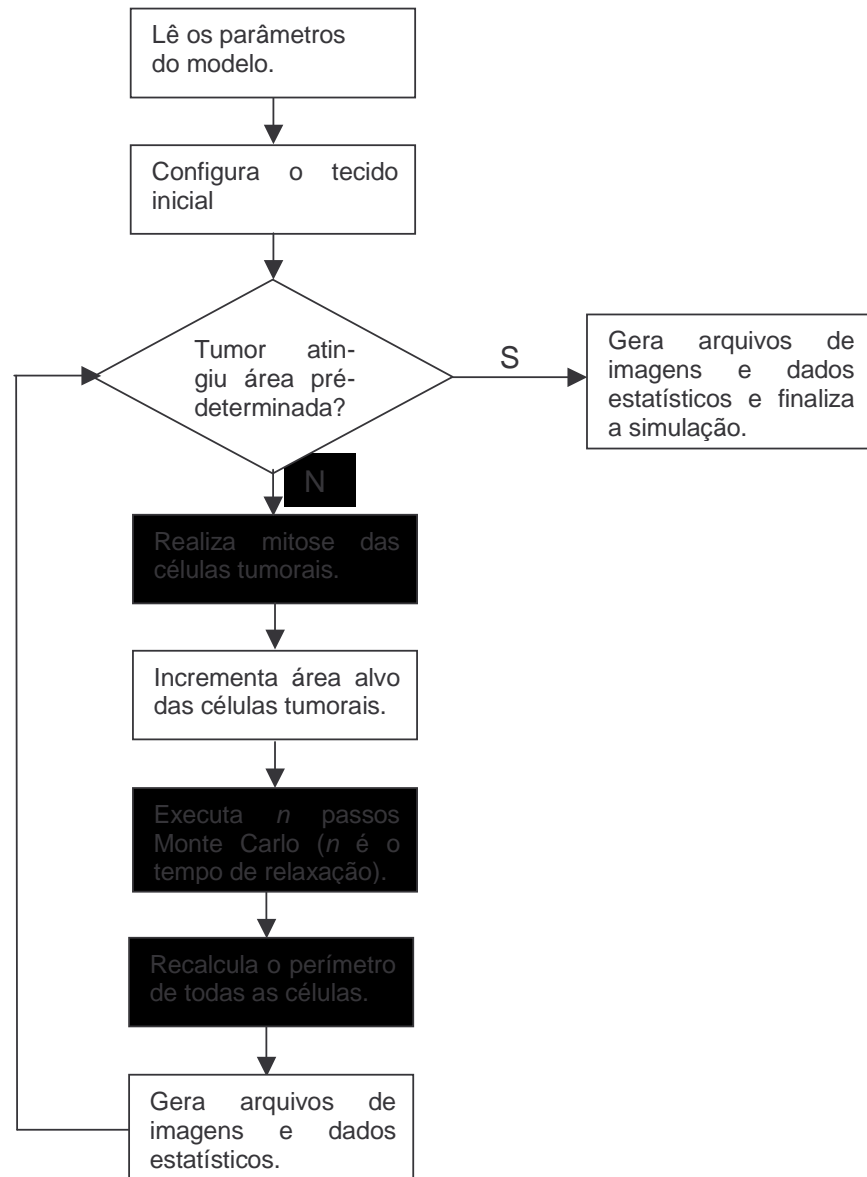


FIGURA 26 – Fluxograma principal do modelo.

7.3 Simulações

Por simplicidade, não se incluiu no modelo a adesão entre células e MEC, o que pode ser introduzido em trabalhos futuros. Assim, de acordo com mencionado na seção 6.2.7., as simulações realizadas investigaram apenas o papel da adesão entre células.

Nesta seção é detalhada a escolha dos valores de cada um dos 9 parâmetros do modelo, e demonstradas as execuções realizadas e o método de criação do tecido sadio inicial sobre o qual o tumor se desenvolve.

7.3.1 Definição dos Valores dos Parâmetros das Simulações

O modelo tem os seguintes parâmetros:

1. Área Alvo das células normais - $A(n)$;
2. Área Alvo das células tumorais- $A(t)$;
3. Coeficiente de elasticidade das células - λ ;
4. Energia de adesão (por unidade de interface) entre células normais – e_{nn} ;
5. Energia de adesão entre células normal e tumoral – e_{nt} ;
6. Energia de adesão entre células tumorais – e_{tt} ;
7. Temperatura - T ;
8. Mitose Crítica - MC ;
9. Tempo de Relaxação - TR .

Como o objetivo deste trabalho é investigar a influência da variação da adesão celular na interface entre o tecido tumoral e o normal, entre uma simulação e outra, os únicos parâmetros investigados são os referentes às energias interfaciais. Os demais são definidos uma única vez e permanecem inalterados em todas as simulações.

Nas subseções abaixo se explana a escolha dos valores desses parâmetros.

7.3.1.1 Área Alvo das células normais e tumorais - $A(n)$ e $A(t)$

Para definir a área alvo das células, duas restrições foram consideradas.

A primeira, é a de haver coerência entre a proporção da amplitude das flutuações das membranas das células biológicas e as do modelo. Trabalhos realizados por Mombach et al. (1995) demonstraram que células impedidas de criar protuberâncias temporárias da sua membrana (pseudópodos) são incapazes de segregar. Essas oscilações da membrana têm uma amplitude de aproximadamente 10% do diâmetro celular. No modelo, as flutuações ocorrem entre elementos vizinhos, ou seja, a amplitude de flutuação de um elemento da rede pertencente a interface de célula é de uma unidade. Assumiu-se, para efeito de cálculos, que as células do modelo sejam circulares. Desta forma, para que uma unidade da rede corresponda a 10% do diâmetro celular, faz-se necessário que o diâmetro seja de ~ 10 unidades da rede. Isto conduz a células com raio = 5 e área = 78 elementos de rede.

Uma segunda restrição com relação à área das células é que, usando-se interações com muitos vizinhos, os tamanhos limites tornam-se significantes. Por exemplo, em uma matriz quadrada bidimensional com interação entre os quartos vizinhos mais próximos, para qualquer célula com área $a \leq 21$, todos os elementos estarão na superfície. Segundo Yang (1998), para simulações em uma rede quadrada bidimensional, as áreas das células devem ser maiores que $Z^2/4\pi$, onde Z é o número de vizinhos. Como o modelo desenvolvido trabalha com interação até os quartos vizinhos mais próximos, ou seja, $Z=20$, a área de uma célula deve ser maior que $Z^2/4\pi \sim 32$. Deve-se, portanto, observar para que a área de uma célula recém dividida não seja inferior a 32, ou em outras palavras, a célula mãe deve ter uma área superior ou igual a 64 elementos.

Assumindo-se 78 para o valor de área alvo das células normais ($A(n)=78$), está-se respeitando também esta segunda restrição, mesmo porque apenas as células tumorais são selecionadas para divisão e estas, conforme discutido anteriormente, possuem área alvo superior a das normais.

Para definir o valor de área alvo das células tumorais, admitiu-se que 78 é a área média de uma célula normal que atinge um tamanho máximo antes de se dividir, a_i , e um tamanho mínimo após a divisão, a_f . Tem-se, então, que $\langle a \rangle = (a_i + a_f)/2$ e que $a_f = a_i/2$. Por consequência, $a_f=104$ e $a_f=52$. Desta forma definiu-se o valor de área alvo das células tumorais para ser $A(t)=104$.

A rede utilizada é de 750x750 elementos, o que permite comportar aproximadamente 7000 células com $\langle a \rangle \sim 78$.

7.3.1.2 Coeficiente de elasticidade das células - λ

Considerando a literatura, Mombach (1996) e Yang (1998), definiu-se, arbitrariamente, o coeficiente de elasticidade das células $\lambda = 1$.

7.3.1.3 Energias de Adesão Celular – e_{nn} , e_{nt} , e_{tt}

Nesse modelo o crescimento e a reorganização celular é dependente da competição dos termos de energia de adesão e de energia de área alvo.

Se for conferido ao termo de energia de área alvo valores proporcionalmente muito superiores ao termo de energia de interface, o sistema privilegia apenas a manutenção da área das células, dando pouca ênfase à reorganização. As células podem, neste caso, ficar com um perímetro muito grande em função da dispersão de seus elementos, impedindo que seja atingido o valor de mitose crítica. Por consequência as células não se dividem e o tumor não cresce.

Por outro lado, se do termo de energia de interface se obtém valores proporcionalmente muito superiores aos obtidos pelo termo de energia de área alvo, o sistema privilegia a reorganização celular, dando pouca ênfase ao crescimento das células. Sem crescer, as células não atingem área suficiente para se reproduzirem e, conseqüentemente, o tumor não cresce. Portanto, é conveniente que estes dois termos contribuam com valores de energia de mesma ordem.

Para determinar a magnitude das energias de adesão, de forma a tornar ambos os termos de energia compatíveis, investigou-se a variação de energia obtida pelo termo de área alvo.

Tomando-se os valores de área alvo das células e o coeficiente de elasticidade definidos acima, potencialmente a variação de energia referente ao termo de área alvo poderia ser de até -104 , isto no caso extremo de uma célula com área $a(\sigma)=104$ ganhar um elemento de uma célula com área $a(\sigma')=53$ e ainda, se ambas estivessem com área alvos iguais a 104, $A(\sigma)=A(\sigma')=104$. Entretanto, como a $A(\sigma)$ é incrementada a cada MCS e é dado tempo para o sistema relaxar, as áreas das células acabam não se afastando muito de suas respectivas áreas alvo e a

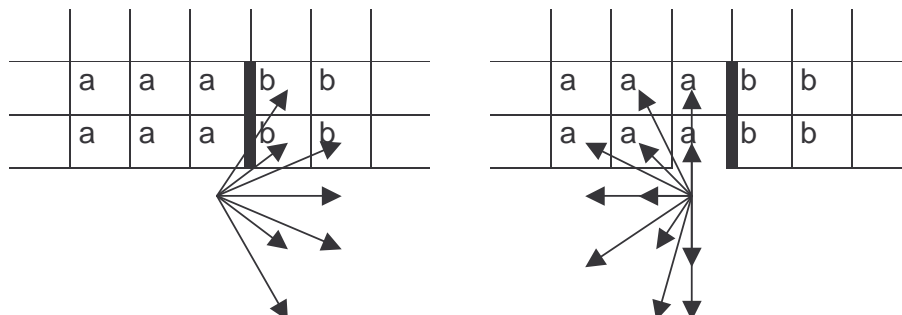
variação de energia referente ao termo de área alvo fica, na grande maioria dos casos, dentro de uma faixa que vai de -10 a $+4$. Esta faixa foi observada investigando-se esses valores através de simulações. Assim sendo, é importante que os valores das energias de adesão não sejam muito elevados, de forma que a variação de energia referente ao termo de energias de adesão seja comparável com a variação de energia referente ao termo de área alvo.

Usando uma faixa de valores de 1 a 5 unidades arbitrárias de energia/área, não há predominância de um termo sobre o outro.

7.3.1.4 Temperatura - T

O modelo tem duas temperaturas críticas, T_{c1} e T_{c2} . A energia requerida para romper uma interface reta entre células determina T_{c1} . Como ilustrado na FIGURA 27, em uma rede quadrada com interações até os quartos vizinhos, a diferença de energia da configuração anterior e posterior à mudança de um rótulo é $\Delta H = 12e_{ab} - 8e_{ab} = 4e_{ab}$. Então, $T_{c1} \sim 4e_{ab}$, para que esta mudança tenha uma probabilidade, $e^{(-\Delta H/T_{c1})}$, razoável de ocorrer. Abaixo de T_{c1} , as células ficam com interfaces rígidas demais e não ocorre reorganização. A segunda temperatura crítica, T_{c2} , é aquela na qual células individuais dissociam. Quando um elemento pertencente a uma célula e que está cercado somente por elementos de células diferentes tem uma longa expectativa de tempo de vida, ele pode livremente desprender-se e apartar-se da célula. Então T_{c2} é Ne_{ab} , onde N é o número de vizinhos do elemento (YANG, 1998).

Estas temperaturas críticas diferem para diferentes tipos celulares se esses possuírem diferentes energias de adesão. A temperatura deve ser alta o suficiente para que mesmo a membrana de célula mais rígida (de menor energia de adesão e_{ij}) possa flutuar, mas ainda pequena o suficiente para que a membrana celular mais fraca (de maior energia de adesão e_{ij}) não se rompa. Em outras palavras, é conveniente que a temperatura do modelo esteja entre a maior T_{c1} e a menor T_{c2} .



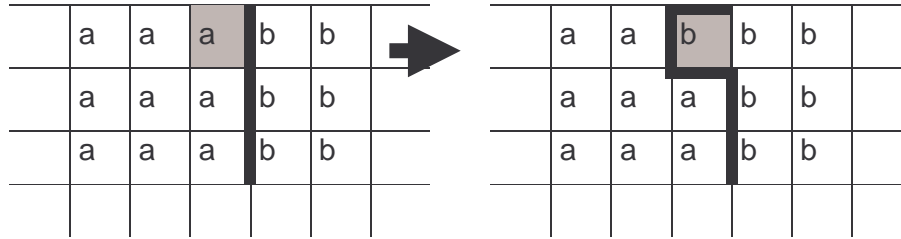


FIGURA 27 - Interações energéticas até os quarto primeiros vizinhos em uma rede quadrada (adaptado de YANG, 1998).

A definição da temperatura é, portanto, dependente do intervalo dos valores de energia de adesão. Este intervalo, conforme visto anteriormente, foi definido para ficar entre 1 e 5. Assim, a temperatura, T , a ser escolhida deve estar entre $T_{c1} \sim 4e_{ab} \sim 4$ e $T_{c2} \sim Ne_{ab} \sim 100$. Para as simulações foi adotado $T=8$, pois com temperaturas mais elevadas, as membranas das células tornam-se muito rugosas (FIGURA 28), aumentando o perímetro celular e afetando a relação $a(\sigma)/p(\sigma)$, o que impede a mitose.

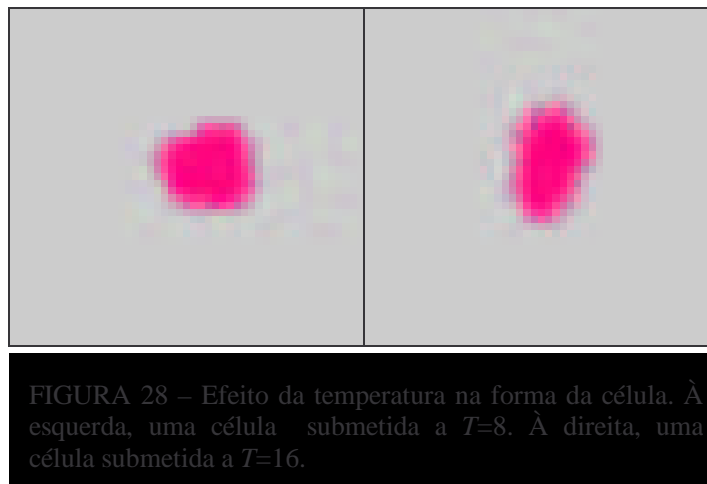


FIGURA 28 – Efeito da temperatura na forma da célula. À esquerda, uma célula submetida a $T=8$. À direita, uma célula submetida a $T=16$.

7.3.1.5 Mitose Crítica - MC

Para uma célula circular com $a=104$, o perímetro é 36,15, o que conduz a $a/p=2,87$. Entretanto, em função da discretização do espaço e das flutuações das membranas celulares e, considerando que as células do modelo não são circulares, esta relação nunca é alcançada e por conseqüência as células não se reproduzem. Assim sendo, o parâmetro de Mitose Crítica foi definido empiricamente através de

simulações para ser $MC=1,9$. Este valor é baixo o suficiente para ser atingido por células com área alvo 104, submetidas a uma temperatura $T=8$ e valores de energia interfaciais entre 1 e 5, e alto o suficiente para evitar que células ainda distantes de sua área alvo se dividam gerando descendentes com áreas inferiores a 32, que é o valor mínimo de área para uma célula

7.3.1.6 Tempo de Relaxação - TR

O tempo de relaxação, intervalo de tempo em MCS para que seja executado o procedimento de mitose, foi definido, empiricamente, para ser 32 MCS. À medida que o tumor cresce, o número de células recém divididas aumenta muito. Nesses casos, tempos de relaxação muito inferiores a 32 parecem não ser suficiente para gerar um processo próximo ao equilíbrio. Em desvantagem, o aumento deste valor implica diretamente em maior tempo de execução das simulações.

7.3.1.7 Energias de Adesão e Tensões Superficiais

A diminuição de coesão entre células tumorais é mapeada no modelo como um aumento na energia de adesão entre as mesmas.

A alteração dos valores de energia de adesão entre tipos celulares pode modificar a tensão superficial entre eles, pois tensões superficiais representam diferenças de energia por unidade de área em uma interface.

Tensões superficiais negativas maximizam as interfaces de contato, conduzindo à dispersão celular. De modo contrário, tensões positivas conduzem à segregação celular. Como o sinal de γ influencia o comportamento de um agregado celular, utilizou-se, nas simulações, valores de energia de adesão que conduzissem a um intervalo de tensões superficiais que fosse de valores negativos a positivos. O intervalo escolhido foi de $\gamma=-1$ a $\gamma=1$, pois é na transição de negativa para positiva que se espera observar mudança de comportamento do agregado de células tumorais. Esta mudança de comportamento pode estar relacionada à transição de um tumor de benigno para maligno.

O valor de e_{nn} utilizado em todas as simulações foi sempre o mesmo, entendendo-se que células normais não têm sua energia de adesão modificada em um processo tumoral. Definiu-se, arbitrariamente, a energia de adesão entre células

normais $e_{nn}=2$, considerando que este valor pertence ao intervalo definido de energias de adesão, 1 a 5, no qual se gera contribuições de energia de adesão proporcionais às contribuições de energia derivadas do termo de área alvo.

Já, os valores de e_{tt} e e_{nt} variam, pois estes são afetados em processos tumorais. Para ser consistente com o fato de que células tumorais são menos coesas que as normais e portanto possuem maior energia de adesão que as células normais, definiu-se que $e_{tt} \geq e_{nn}$, com e_{tt} assumindo valores que vão de 2 a 4⁽¹²⁾ Quando $e_{tt} = e_{nn}$, pode-se entender que a única anormalidade das células tumorais é a sua maior capacidade reprodutiva, uma vez que possuem adesão celular igual a das células normais.

No entanto, não há na literatura informações sobre os valores de adesão entre células normais e tumorais, e_{nt} .

Stott et al. (1999) em suas simulações de formação do núcleo necrótico, utilizaram para a adesão heterotípica, e_{nt} , a média geométrica das adesões homotípicas, e_{tt} e e_{nn} . Segundo eles, considerando que células tumorais expressam menos moléculas de adesão do que as células normais, especialmente N-CAM's e Caderinas E e que, em células cancerosas totalmente transformadas, a expressão de moléculas de adesão é freqüentemente ausente, um valor intermediário para adesão entre célula normal e célula tumoral é consistente com o fato de que células normais e tumorais eram originalmente do mesmo tipo, e portanto expressam as mesmas moléculas de adesão, apenas em quantidades diferentes.

Por outro lado, sabe-se que as moléculas de caderinas, no seu domínio extracelular, ligam-se de maneira homofílica, isto é, uma molécula de caderina de uma célula liga-se diretamente a uma molécula de caderina de outra célula. Desta forma, o número de ligações entre células tumorais e normais estaria limitada ao número de moléculas ligantes das células tumorais e o valor de adesão seria, então, determinado pelo número de moléculas expressas pela célula tumoral e não pela média geométrica entre ambas (FIGURA 29).

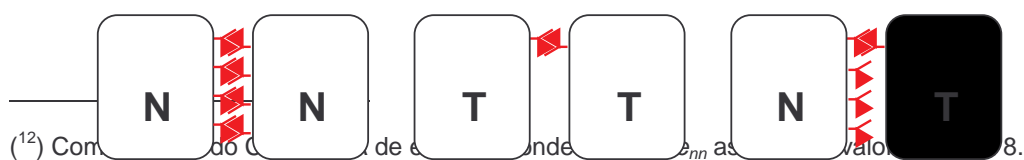


FIGURA 29 - Ligações homotípicas entre células normais (esquerda), entre células normal e tumoral (centro) e entre células tumorais (direita).

Visto que as mutações afetam de maneira imprevisível a adesão das células e , na ausência de informações mais consistentes sobre o valor da energia de adesão entre células normais e tumorais, optou-se por explorar diversas possibilidades.

Assim, definiu-se, para executar as simulações, quatro conjuntos de energias e suas respectivas tensões superficiais: A, B, C e D. O Conjunto A de energias (TABELA 3) reflete o trabalho de Stott et al. (1999): e_{nn} é fixo, e_{tt} é crescente e $e_{nt} = (e_{nn} e_{tt})^{1/2}$. No Conjunto B (TABELA 4), e_{nn} e e_{nt} são fixos e e_{tt} é crescente e recebe valores de modo que se obtenham as mesmas tensões superficiais obtidas em A. No Conjunto C (TABELA 5), e_{nn} e e_{tt} são fixos, sendo $e_{tt} > e_{nn}$. e_{nt} recebe valores de modo que se obtenham as mesmas tensões superficiais obtidas em A. O Conjunto D (TABELA 6) apresenta a mesma estrutura de C, porém com um valor fixo de e_{tt} maior que o valor de e_{tt} usado em C. Os conjuntos C e D apresentam combinações de valores que permitem obter tensões superficiais com valores positivos, mesmo com $e_{tt} > e_{nn}$, o que não é possível obter em A e B.

Abaixo, são apresentados os quatro conjuntos de parâmetros de energia de adesão utilizados nas simulações, bem como a respectiva tensão superficial heterotípica gerada. ID é um identificador de cada configuração e será utilizado para referenciar as mesmas.

TABELA 3 – Conjunto A de energias.

ID	e_{nn}	e_{nt}	e_{tt}	γ_{nt}
A1	2,00	2,00	2,00	0,00
A2	2,00	2,45	3,00	-0,05
A3	2,00	2,83	4,00	-0,17
A4	2,00	3,16	5,00	-0,34
A5	2,00	3,46	6,00	-0,54

TABELA 4 –Conjunto B de energias.

ID	e_{nn}	e_{nt}	e_{tt}	γ_{nt}
B1	2,00	2,00	2,00	0,00
B2	2,00	2,00	2,10	-0,05
B3	2,00	2,00	2,33	-0,17
B4	2,00	2,00	2,68	-0,34
B5	2,00	2,00	3,08	-0,54

A6	2,00	3,74	7,00	-0,76
A7	2,00	4,00	8,00	-1,00

B6	2,00	2,00	3,52	-0,76
B7	2,00	2,00	4,00	-1,00

TABELA 5 – Conjunto C de energias.

ID	e_{nn}	e_{nt}	e_{tt}	γ_{nt}
C1	2,00	2,50	3,00	0,00
C2	2,00	2,45	3,00	-0,05
C3	2,00	2,33	3,00	-0,17
C4	2,00	2,16	3,00	-0,34
C5	2,00	1,96	3,00	-0,54
C6	2,00	1,74	3,00	-0,76
C7	2,00	1,50	3,00	-1,00
C8	2,00	2,55	3,00	0,05
C9	2,00	2,67	3,00	0,17
C10	2,00	2,84	3,00	0,34
C11	2,00	3,04	3,00	0,54
C12	2,00	3,26	3,00	0,76
C13	2,00	3,50	3,00	1,00

TABELA 6 – Conjunto D de energias.

ID	e_{nn}	e_{nt}	e_{tt}	γ_{nt}
D1	2,00	3,00	4,00	0,00
D2	2,00	3,05	4,00	-0,05
D3	2,00	3,17	4,00	-0,17
D4	2,00	3,34	4,00	-0,34
D5	2,00	3,54	4,00	-0,54
D6	2,00	3,76	4,00	-0,76
D7	2,00	4,00	4,00	-1,00
D8	2,00	2,95	4,00	0,05
D9	2,00	2,83	4,00	0,17
D10	2,00	2,66	4,00	0,34
D11	2,00	2,46	4,00	0,54
D12	2,00	2,24	4,00	0,76
D13	2,00	2,00	4,00	1,00

7.3.1.8 Sumário dos Parâmetros

As tabelas 3, 4, 5 e 6 contêm os valores de energia de adesão investigados,. Na TABELA 7 é apresentada a lista completa dos valores dos parâmetros utilizados.

TABELA 7 – Parâmetros utilizados nas simulações.

Parâmetro	Valor
Área Alvo das células normais - $A(n)$;	78
Área Alvo das células tumorais - $A(t)$;	104
Coefficiente de elasticidade das células - λ ;	1
Energia de adesão entre células normais - e_{nn} ;	2
Energia de adesão entre células normal e tumoral - e_{nt} ;	Cfe. TABELAS 3, 4, 5 e 6

Energia de adesão entre células tumorais - e_{ti} ;	Cfe. TABELAS 3, 4, 5 e 6
Temperatura - T ;	8
Mitose Crítica – MC ;	1,9
Tempo de Relaxação – TR	32

7.3.2 Tecido Inicial

Para gerar o tecido inicial utilizado em todas as simulações, usou-se o mesmo modelo com uma pequena mudança de implementação. Esta mudança refere-se ao fato de não haver células tumorais. A partir de uma única célula normal inicial, situada ao centro da rede e capaz de reproduzir-se, obtém-se uma rede completamente preenchida por células normais. Para que as células normais pudessem se reproduzir, sua área alvo foi elevada para 104. Após o preenchimento total da rede, a área alvo foi baixada para 78 e foi dado tempo suficiente para o sistema estabilizar. Assim, gerou-se um tecido inicial energeticamente estabilizado e repleto de células normais com áreas muito próximas

7.3.3 Execuções

Cada configuração foi executada três vezes variando-se apenas as sementes aleatórias.

Como os parâmetros influenciam a velocidade de crescimento do tumor, o tempo em MCS para os tumores atingirem a área pré-determinada para encerrar a execução, oscilou de 14720 MCS a 20256 MCS. Em conseqüência, o tempo real de execução variou de 4h a 5h30min. As simulações foram executadas em máquinas com processador Pentium[®] 4 de 1,5 GHz.

A FIGURA 30 apresenta os diferentes estágios de evolução de um tumor em uma simulação usando a configuração A1 do Conjunto A de energias.

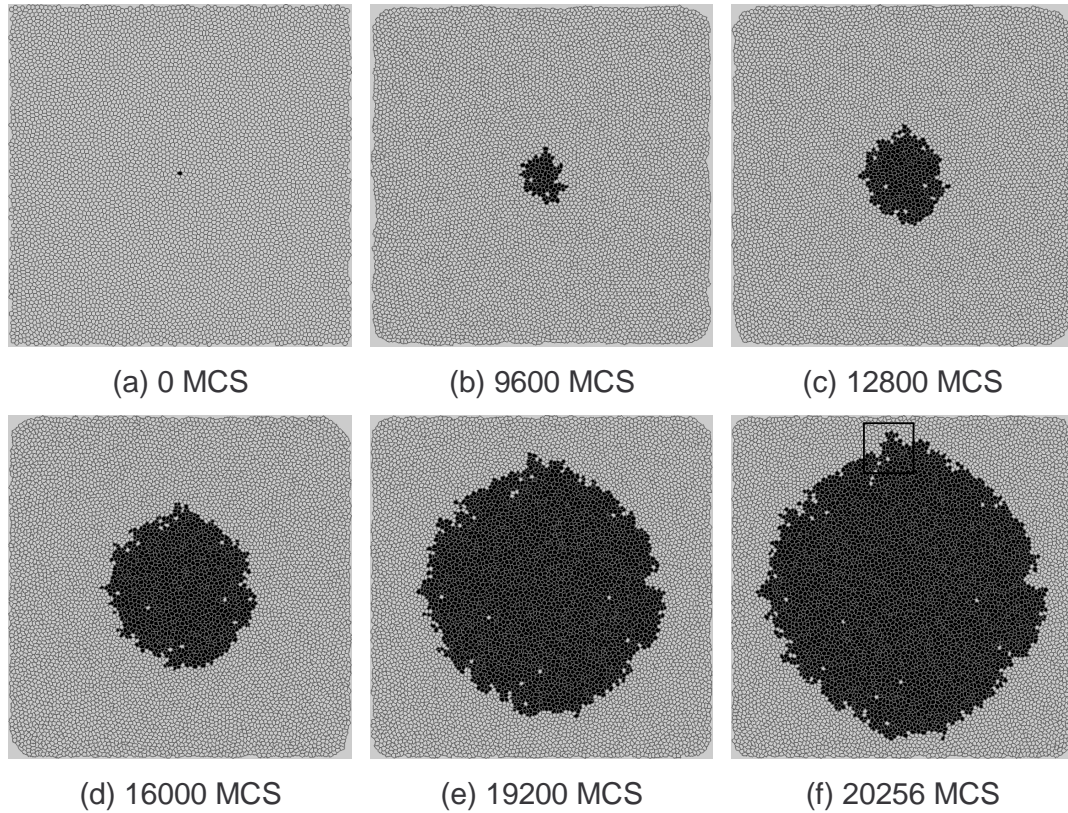


FIGURA 30 - Estágios da evolução de um tumor em uma simulação. Estágios da evolução de um tumor durante a execução de uma simulação, neste caso com a configuração A1. (a) é o passo inicial, contendo uma única célula tumoral (célula escura) e 6991 células normais (células claras). (f) é o padrão final contendo, 4041 células tumorais e 3612 células normais.

A FIGURA 31 é uma ampliação da região delimitada na FIGURA 30(f), evidenciando a forma das células.

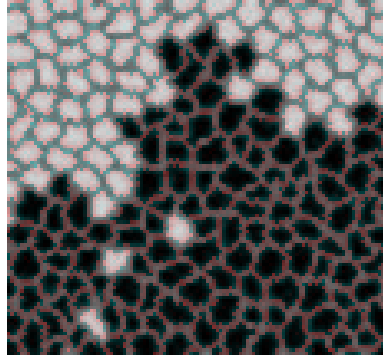


FIGURA 31 – Detalhe da forma das células no modelo. A imagem é uma ampliação da região delimitada na FIGURA 30(f).

7.4 Resultados

As medidas quantitativas foram avaliadas sobre a média dos valores finais e em equilíbrio obtidos nas três execuções de cada configuração. O GRÁFICO 2 demonstra que os valores do índice de irregularidade encontravam-se estabilizados ao final das execuções. O mesmo é esperado para os valores de dimensão fractal da borda., embora esta análise não tenha sido realizada.

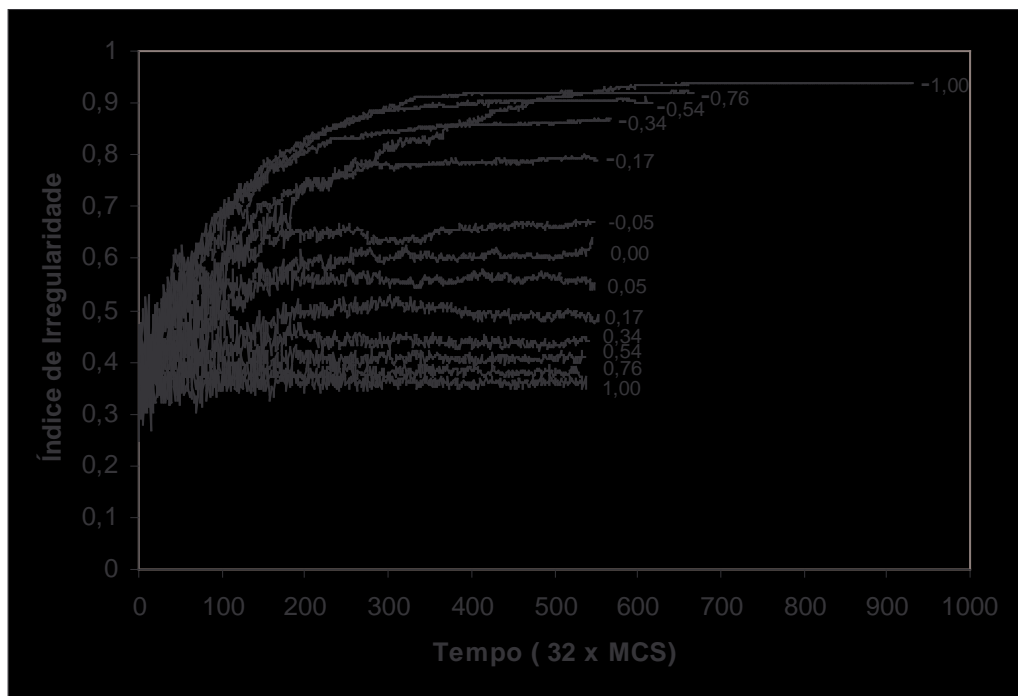


GRÁFICO 2 – Índice de Irregularidade em função do tempo. O dados deste gráfico são referentes à média dos valores das três execuções de cada configuração do Conjunto C. Notar os valores estabilizando ao longo do tempo.

O GRÁFICO 3 apresenta as dimensões fractais das bordas dos tumores obtidos nas simulações com conjuntos de parâmetros A, B, C e D em função da tensão superficial.

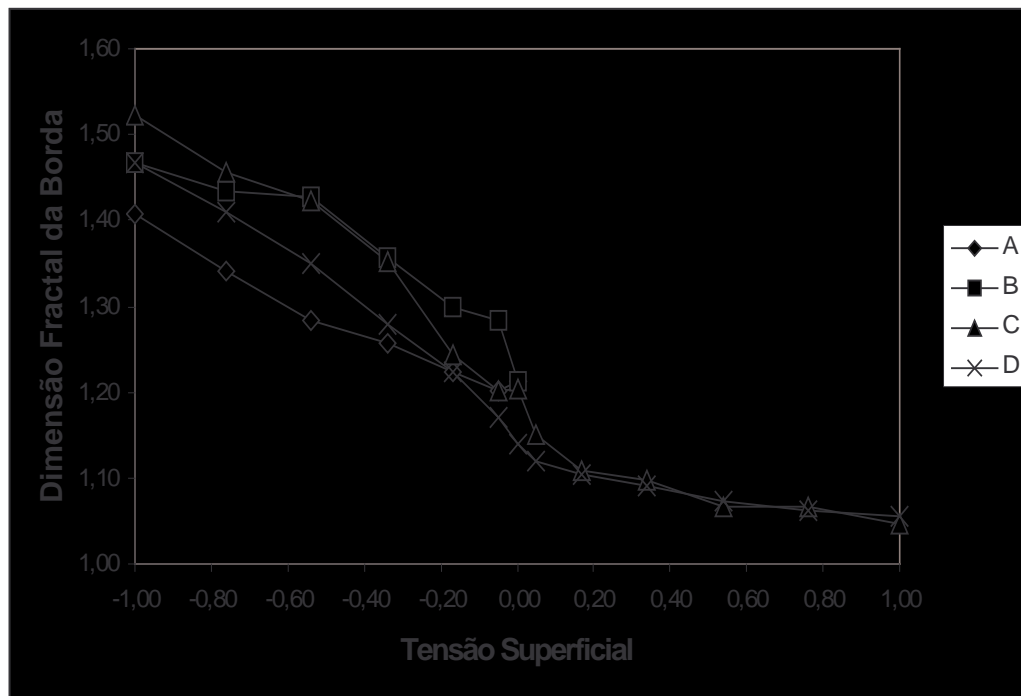


GRÁFICO 3 - Dimensão Fractal da borda dos tumores em função da Tensão Superficial.

Pode-se observar no GRÁFICO 3 que, de maneira geral, a dimensão fractal da borda dos tumores aumenta à medida que a tensão superficial diminui, corroborando uma correlação entre a diminuição da tensão superficial e a irregularidade da borda.

As configurações A1 e B1 (seção 6.3.7) são iguais e representam o caso em que a única anormalidade das células tumorais é a sua maior capacidade reprodutiva, uma vez que possuem adesão celular igual a das células normais, $e_{tt}=e_{nn}=e_{nt}=2$. A tensão superficial neste caso é $\gamma=0$ e a irregularidade marcada por $D_b = 1,21$ parece ser oriunda exclusivamente da dinâmica de crescimento, da mesma forma que, por exemplo, a irregularidade gerada pelo modelo de Eden. Toma-se, assim, a configuração A1 como referência. Configurações com $\gamma < 0$ geram padrões com $D_b > 1,21$, ao passo que configurações com $\gamma > 0$ geram

padrões com $D_b < 1,21$, donde conclui-se que o sinal de γ determina se a irregularidade da borda, será maior ou menor que a irregularidade obtida apenas pela mitose celular.

Outro resultado evidente é o aparecimento de diferentes D_b para valores iguais de tensão superficial. Das configurações C1 e D1 também se obtém $\gamma=0$. Entretanto, os valores de D_b observados para tais configurações são ligeiramente diferentes dos valores de A1 e B1. O mesmo pode ser observado para as demais configurações, onde não se obtém valores de D_b iguais para uma mesma tensão superficial, mas que foi obtida por diferentes combinações de energias de adesão.

Portanto, existem diferentes morfologias para mesmos valores de tensão superficial. Assim, como comentado na seção 6.3.7, as tensões superficiais determinam o mínimo global de energia livre, no entanto, aqui se vê que as características morfológicas específicas dependem dos valores das energias de adesão entre as células (FIGURA 32). Isto mostra que a tensão superficial não é suficiente para determinar o valor da dimensão fractal da borda de um tumor, mas que, neste modelo, esta é também dependente da dinâmica de crescimento do tumor resultante da competição entre os valores de energia de adesão e o termo de área alvo das células.

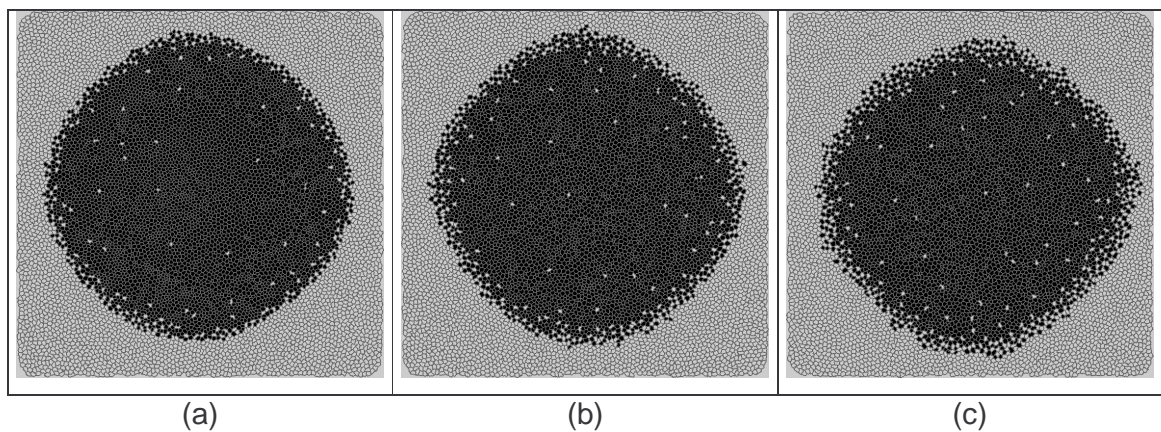


FIGURA 32 – Padrões finais para uma mesma tensão superficial. (a), (b) e (c) foram obtidos com $\gamma = -0,54$ utilizando-se as configurações A5, D5 e B5 e resultando, respectivamente, em $D_b = 1,28$, $D_b = 1,35$ e $D_b = 1,43$, caracterizando diferenças nos padrões finais. Compare, também, as FIGURAS 30(f) e 33(c). Ambas foram obtidas com $\gamma = 0$ usando configurações de energias diferentes.

É possível observar que para $\gamma > 0$ os valores de D_b tendem a serem menos dispersos. Para estes casos a tensão superficial por si só parece ser suficiente para determinar D_b , independentemente dos valores específicos de energia de adesão.

A ausência de informações consistentes sobre a adesão entre células normais e tumorais, permite, pelo menos matematicamente, que sejam obtidas tensões superficiais positivas mesmo com $e_{tt} > e_{nn}$. Este é o caso das configurações C_n e D_n com $n > 8$. Com estas configurações obtém-se padrões com bordas pouco irregulares onde $1,06 \leq D_b \leq 1,15$. Isto significa dizer que, neste modelo, nem sempre um decréscimo de adesão entre células tumorais conduz a um aumento da irregularidade da borda dos tumores.

Além dessas conclusões, cabe ressaltar que os valores de dimensão fractal obtidos, 1,47 para os mais irregulares a 1,06 para os menos irregulares, são compatíveis com os resultados experimentais e de simulação citados a seguir.

Cross (1997) apresenta medidas de dimensão fractal de melanomas e adenomas do colo retal obtidas em trabalhos anteriores. As dimensões fractais das bordas dos melanomas ficaram na faixa entre 1,05 e 1,3, e os de adenomas do colo retal na faixa de 1,69 a 1,78. Landini & Rippin (1996) mediram a dimensão fractal de lesões displásicas e malignas no epitélio da cavidade oral e obtiveram dimensão fractal 1,00 para epitélio sadio e 1,61 para carcinoma invasivo. BRÚ et al. (1998) obtiveram dimensão fractal 1,21 na análise de tumores de cérebro.

Reis et al. (2001), utilizando o modelo descrito neste trabalho, obtiveram valores variando de 1,1 para tumores considerados benignos (sem decréscimo de adesão) a 1,65 para tumores com maior decréscimo de adesão.

Por fim, a análise das imagens dos tumores gerados permite algumas observações. A FIGURA 33 apresenta uma amostra dos padrões obtidos para diversas tensões superficiais.

Utilizando-se $\gamma < 0$ e ~ -1 obtém-se uma distribuição de células na borda do tumor similar a um tabuleiro de xadrez (FIGURA 33(f)), o que é esperado, pois para tensões superficiais negativas este é o padrão de menor energia livre. Nesses casos, a borda do tumor fica pouco nítida, o que pode estar relacionado com a mesma característica encontrada em tumores malignos reais como é o caso do melanoma (vide seção 6.2.3) (RASSNER & STEINERT, 1991).

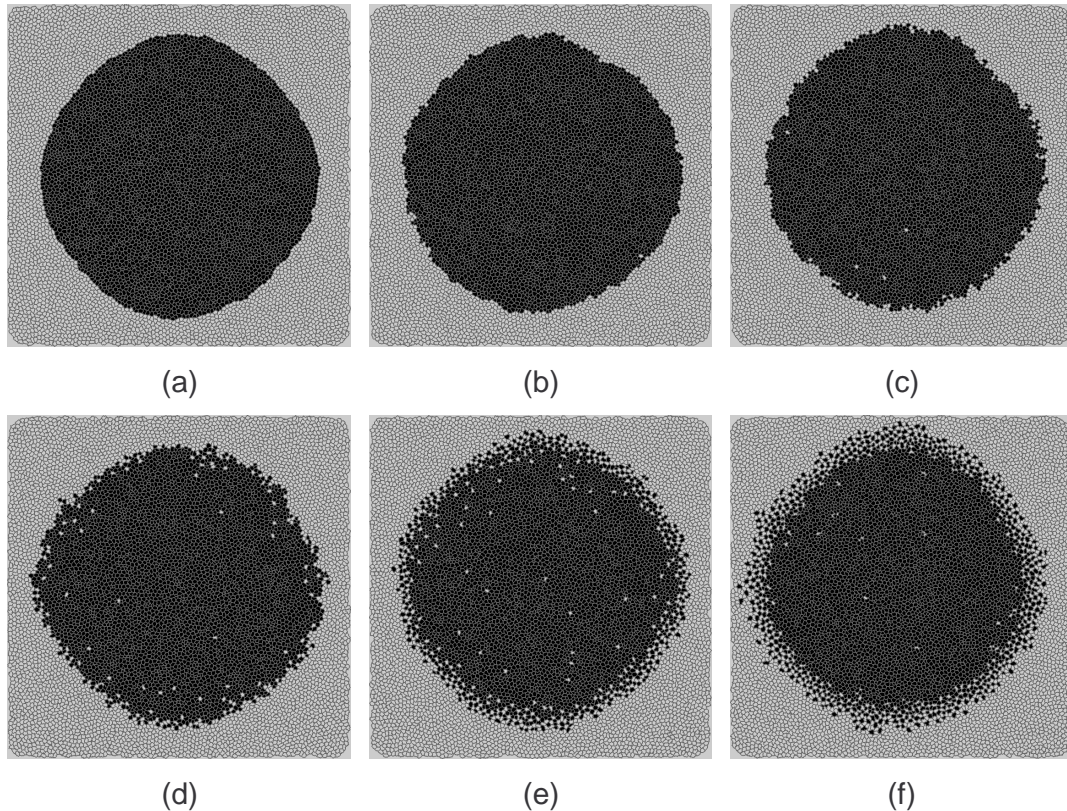


FIGURA 33 – Padrões finais para diferentes tensões superficiais. Os padrões acima foram obtidos nas simulações utilizando o Conjunto C. (a), (b), (c), (d), (e) e (f) são padrões finais obtidos, respectivamente, com os valores $\gamma=1$, $\gamma=0,17$, $\gamma=0$, $\gamma=-0,17$, $\gamma=-0,54$ e $\gamma=-1$. Observar a irregularidade crescente à medida que γ decresce e a formação, na borda do tumor, um padrão similar a de um tabuleiro de xadrez.

Outra característica comum em tumores malignos é a formação de infiltrações ou prolongamentos da massa tumoral. Isto, contudo, não foi observado em nenhum padrão. Possivelmente esta característica macroscópica esteja ligada a outros fatores não abordados neste trabalho, tais como, adesão à matriz extracelular ou secreção de fatores parácrinos ou autócrinos pelas células tumorais

Uma última observação refere-se ao fato de que, embora se obtenha bordas irregulares mesmo com $\gamma > 0$, só é possível observar desprendimento de células da massa tumoral (FIGURA 30(d)-(f)) quando $\gamma < 0$, o que implica que, segundo este modelo, somente nestas condições o tumor pode produzir de metástases.

O índice de irregularidade teve comportamento similar ao da dimensão fractal da borda do tumor (GRÁFICO 4).

Pode-se observar no GRÁFICO 4 que índice de irregularidade, assim como a dimensão fractal da borda aumenta à medida que a tensão superficial diminui, corroborando, também, uma correlação entre a diminuição da tensão superficial e a irregularidade de borda.

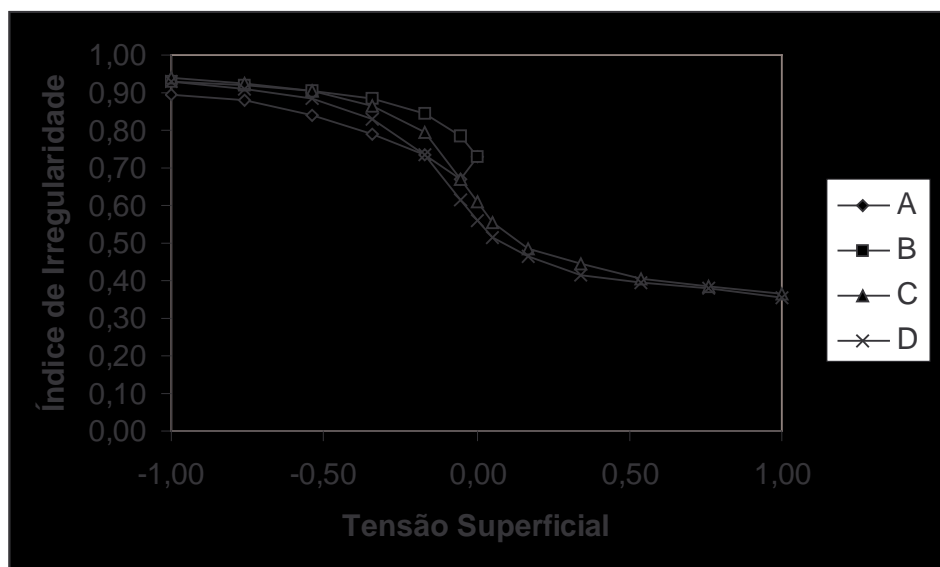


GRÁFICO 4 – Índice de Irregularidade dos tumores em função da Tensão Superficial.

Os valores do Índice de Irregularidade tendem para $I \sim 0,35$ com γ tendendo a 1, e tendem para $I \sim 0,95$, para γ tendendo a -1. Nas proximidades de zero, pode-se observar uma declividade mais acentuada da curva, evidenciando a rápida troca de comportamento do tumor quando a tensão superficial passa de positiva para negativa.

8 CONCLUSÕES E ESTUDOS FUTUROS

O objetivo central deste trabalho foi propor um modelo para crescimento de tumores para investigar, através de simulações de computador, a influência da adesão celular na morfologia da interface entre tumor e tecido sadio.

A importância de se ampliar o entendimento sobre a transição de tumores de benigno para maligno, notadamente marcada por modificações em sua interface, aliada a escassez de modelos que investigam a implicação da adesão celular na morfologia da interface de tumores motivaram este estudo.

Na transição de benigno para maligno, antecedendo a metastatização, o tumor passa a invadir o tecido adjacente. A baixa coesão das células tumorais, em função da diminuição da expressão das moléculas de adesão intercelular, parece implicar neste processo, facilitando que as células tumorais se desprendam do tumor.

Alterações na adesão celular também parecem estar implicadas na morfologia dos tumores, principalmente na morfologia da interface entre o tumor e o tecido sadio. Tumores malignos apresentam morfologia bastante diferenciada dos benignos. Nos tumores malignos a interface com o tecido sadio é irregular e de limites pouco nítidos, ao passo que nos tumores benignos a interface é regular e nítida. Além disso, os tumores malignos, freqüentemente, apresentam-se como uma massa não compacta, assimétrica e com muitos prolongamentos.

As moléculas de adesão celular, através do mecanismo de Adesão Diferenciada, também estão envolvidas nos processo de reorganização celular, entre eles o processo de crescimento tumoral, pois à medida que um tumor cresce, as células tumorais e as do tecido adjacente precisam se reorganizar.

A adesão diferenciada procura explicar a reorganização celular como um processo de minimização da energia livre de adesão do aglomerado de células, de forma análoga ao que acontece com líquidos imiscíveis.

O Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada, que simula reorganização celular contemplando a Adesão Diferenciada, é o modelo mais

preciso em simulações de reorganização celular e portanto, foi o modelo tomado como base para realizar a investigação a que este trabalho se propôs.

Portanto, para realizar a investigação, desenvolveu-se um modelo baseado no Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada estendendo-o com algumas características para simular crescimento tumoral, dentre elas, a reprodução das células tumorais.

Como diferentes energias estão associadas às interfaces entre tipos iguais e diferentes, geram-se, no agregado, tensões superficiais entre tipos diferentes. No equilíbrio as tensões superficiais determinam a configuração de menor energia global. Considerando isso e, também, que as tensões superficiais podem ser medidas experimentalmente, quantificou-se os resultados através das medições da dimensão fractal da borda do tumor e do índice de irregularidade do tumor em função da tensão superficial entre o mesmo e o tecido sadio. Os valores de dimensão fractal obtidos nas simulações foram compatíveis com os resultados experimentais e de simulação citados na literatura.

A análise dessas medições e das imagens geradas permitiu concluir, a partir deste modelo, que:

- de maneira geral, a dimensão fractal da borda dos tumores e o índice de irregularidade de um tumor aumentam à medida que a tensão superficial diminui, corroborando uma correlação entre a diminuição da tensão superficial e a irregularidade da borda;

- que a tensão superficial determina se a irregularidade da borda, será maior ou menor que a irregularidade obtida apenas pela mitose celular, caso em que a tensão superficial é zero;

- que podem existir diferentes morfologias para mesmos valores de tensão superficial e que elas dependem dos valores das energias de adesão entre os tipos celulares

- que a tensão superficial não é suficiente para determinar o valor da dimensão fractal da borda de um tumor, mas que esta é, também, dependente da dinâmica de crescimento do tumor resultante da competição entre os valores de energia de adesão e o termo de área alvo das células;

- que para $\gamma > 0$ os valores de D_b tendem a serem menos dispersos e nestes casos a tensão superficial parece ser suficiente para determinar a morfologia da interface, sem grande dependência dos valores específicos de energia de adesão;

- que nem sempre um decréscimo de adesão entre células tumorais conduz a um aumento da irregularidade da borda dos tumores, pois é possível (vide Conjuntos C e D de energias de adesão) que sejam obtidas tensões superficiais positivas mesmo com células tumorais sendo menos coesas que as normais;

- que com $\gamma < 0$ e ~ 1 obtém-se uma distribuição de células na borda do tumor similar a um tabuleiro de xadrez, tornando a borda do tumor pouco nítida e que isto pode estar relacionada à mesma característica encontrada em alguns tumores malignos reais;

- que embora se obtenha bordas irregulares com $\gamma > 0$, só é possível observar desprendimento de células da massa tumoral quando $\gamma < 0$, o que implica que somente nestas condições o tumor pode gerar metástase;

Além dessas conclusões, pode-se observar que não houve, em nenhum padrão, a formação de infiltrações ou prolongamentos a partir da massa tumoral, o que é outra característica comum em tumores malignos. Possivelmente estas características estejam ligadas a outros fatores que não foram abordados neste trabalho, tais como, adesão à matriz extracelular ou a secreção de fatores parácrinos ou autócrinos pelas células tumorais. Isto sugere novas aplicações e possibilidades de continuação para este trabalho no sentido de se obter tais infiltrações.

Outras possibilidades de continuação para este trabalho seriam a implementação do modelo em 3D e a introdução de novas medidas de irregularidade de interfaces como, por exemplo, a rugosidade.

Por fim, podem-se tirar conclusões do ponto de vista computacional. O Modelo de Potts Estendido com Adesão apresenta-se como uma boa alternativa para simular desenvolvimento de tumores, considerando-se suas características intrínsecas já discutidas; sua grande capacidade de ser estendido; e a compatibilidade dos resultados obtidos nas simulações com resultados experimentais e de outros modelos. Apesar dessas características, uma desvantagem do Modelo de Potts Estendido com Adesão Diferenciada é o seu custo computacional. Mesmo tendo sido implementado em C, simulações, com redes de 750 x 750 elementos e aproximadamente 7000 células, levaram cerca de 5h executando em máquinas de 1,5 GHz. Novos trabalhos podem introduzir algoritmos ou técnicas computacionais mais eficientes a esta implementação, como, por exemplo, o uso de tabelas de exponenciais ou, até mesmo, a possibilidade de rodá-lo distribuído em uma rede.

9 BIBLIOGRAFIA

1. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. et al.. *Molecular Biology of the Cell*. 3 ed. New York: Garland, 1994. 1294p.
2. AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Statistics*. 2000. [\(01/mai/2001\)](http://www.cancer.org)
3. ANDRADE, Zilton A.. *Patologia: Processos Gerais*. 2 ed. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 1984. 188p.
4. BARABÁSI, A. L.; STANLEY, H. E.. *Fractal Concepts in Surface Growth*. Cambridge : Cambridge University, 1995. 366 p.
5. BINDER, K.; HEERMANN, D. W.. *Monte Carlo Simulation in Statistical Physics: An Introduction*. 3 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 150p.
6. BRÚ, A.; PASTOR, J. M.; FERNAUD, I. et al.. Super-Rough dynamics on Tumour Growth. *Physical Review Letters*. v.81, n.18, p.4008-4011, nov., 1998.
7. COTRAN, R. S.; KUMMAR, V.; ROBBINS S. L.. *Patologia Estrutural e Funcional*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 1231p.
8. COX, N. H.; LAWRENCE, C. M.. *Diagnostic Problems in Dermatology*. London: Mosby-Wolfe, 1999. 180p.
9. CROSS, S. S.. Fractals in Pathology. *Journal of Pathology*. v.182, p.1-8, 1997.
10. EDEN, M. in J. Neyman (Ed.). *Proceedings of 4th Berkeley Symp. On Mathematical Statistics and Probability*. vol. IV: Biology and Problems of Health. University of California Press. Berkeley, 1961, p. 223.
11. FERREIRA Jr., S. C.; MARTINS, M. L.; VILELA M.J.. A Growth Model for Primary Cancer. *Physica A*. 261, p.569-580, 1998.
12. FERREIRA Jr., S. C.; MARTINS, M. L.; VILELA M.J.. A Growth Model for Primary Cancer (II): New Rules, Progress Curves and Morphology Transitions. *Physica A*. 272, p.245-256, 1999.
13. FOTY, R. A.; CORBETT, S. A.; SCHWARZBAUER, J. E. et al.. Dexamethasone Up-Regulates Cadherin Expression and Cohesion of HT-1080 Human Fibrosarcoma Cells. *Cancer Research*. 58, p.3586-3589, ago., 1998.
14. GILBERT, Scott F.. *Developmental Biology*. 3 ed. Sunderland: Sinauer, 1991. 891p.

15. GLAZIER, J. A.; GRANER, F.. Simulation of the Differential Adhesion Driven Rearrangement of Biological Cells. *Physical Review E.*, 47, 2128-2154, 1993.
16. GOMES, R.. *Oncologia Básica*. Rio de Janeiro: Revinter, 1997. 404 p.
17. GOULD, H.; TOBOCHNIK, J.. An Introduction to Computer Simulation Methods: Applications to Physical Systems. 2 ed. New York: Addison-Wesley, 1996. 721p.
18. GRANER, F.. Can Surface Adhesion Drive Cell-rearrangement? Part I: Biological Cell-sorting. *Journal of Theoretical Biology*. 164, p.455-476, 1993.
19. GRANER, F.; GLAZIER, J. A.; Simulation of Biological Cell Sorting Using a Two-dimensional Extended Potts Model. *Physical Review Letters.*, 69, 2013-2016, 1992.
20. GRANER, F.; SAWADA, J.. Can Surface Adhesion Drive Cell Rearrangement? Part II: A Geometrical Model. *Journal of Theoretical Biology*. 164, 477, 1993.
21. GRIMSTAD, I. A.. Direct Evidence That Cancer Cell Locomotion Contributes Importantly to Invasion. *Experimental Cell Research*. 173, p.515-523, 1987.
22. HOGEWEG, P. Evolving Mechanisms of Morphogenesis: On the Interplay between Differential Adhesion and Cell Differentiation. *Journal of Theoretical Biology*. 203, p.317-333, 2000.
23. HUANG, S. & INGBER D. E.. The Structural and Mechanical Complexity of Cell-Growth Control. *Nature Cell Biology*, 1:E131-E138. 1999.
24. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil para 2001. 2000. [\(01/mai/2001\)](http://www.inca.org.br)
25. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J.. *Histologia Básica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 433p.
26. KANSAL, A. R.; TORQUATO, S.; HARSH, G. R. et al.. Simulated Brain Tumour Growth Dynamics Using a Three-dimensional Cellular Automaton. *Journal of Theoretical Biology*. 203, p.367-382, 2000.
27. KLEINERMAN, D. I., TRONSCO, P., LIN, S. H. et al.. Consistent Expression of an Epithelial Cell Adhesion Molecule (C-CAM) During Human Prostate Cancer Development and Loss of Expression in Prostate Cancer: Implication as a Tumour Suppressor. *Cancer Research* 55, 1215-1220. 1995.
28. LANDINI, G.; RIPPIN, J. W.. How Important is Tumour Shape? Quantifications of the Epithelial-connective Tissue Interface in Oral Lesions Using Local Connected Fractal Dimension Analysis. *Journal of Pathology*. v.179, p.210-217, 1996.

29. MARÉE, A. F. M.. From Pattern Formation to Morphogenesis. Multicellular Coordination in *Dictyostelium discoideum*. Utrecht, 2000. 152 p. Tese de Doutorado, Department of Theoretical Biology and Bioinformatics, Utrecht University, 2000.
30. MENUT, O.; RANGAYYAN, R. M.; DESAUTELS, J. E. L.; Parabolic Modeling and Classification of Breast Tumors. *International Journal of Shape Modeling*. v.3, p.155-166, 1997.
31. METROPOLIS, N. A.; ROSENBLUTH, A. W.; ROSENBLUTH, M. N.; TELLER, A. H. Equation of state calculation by fast computing machines, *Journal of Chemical Physics*. 21(6). p.1087-1092. 1953.
32. MIYASAKA, M.. Cancer Metastasis and Adhesion Molecules. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 312, p.10-18. 1995.
33. MOMBACH, J. C. M.; GLAZIER, J. A.; RAPHAEL, R. C. et al.. Quantitative Comparison between Differential Adhesion Models and Cell Sorting in the Presence and Absence of Fluctuations. *Physical Review Letters*. v.75, n.11, p.2244-2247, set., 1995.
34. MOMBACH, J. C.. Um Estudo da Formação de Padrões Celulares Biológicos. Porto Alegre, 1997. 115p. Tese de Doutorado, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.
35. NEWMAN, M. E. J.; BARKEMA G. T.. Monte Carlo Simulation in Statistical Physics. New York: Oxford, 1999. 475p.
36. NEWMAN, S. A.; COMPER, W. D. 'Generic' Physical Mechanisms of Morphogenesis and Pattern Formation. *Development*, v.110, p.1-20, 1990.
37. NICHOLSON, G. L.. Cancer Metastasis: Tumor Cell And Host Organ Properties Important In Metastasis To Specific Secondary Sites. *Biochimica et Biophysica Acta* 948, p.175-224. 1988.
38. RASHBASS, J.; STEKELL D.; WILLIAMS, D.. The Use of a Computer Model to Simulate Epithelial Pathologies. *Journal of Pathology*. v.179, p.333-339, 1996.
39. RASSNER, G.; STEINERT U.. *Dermatologia: Tratado e Atlas*. 3 ed. São Paulo: Santos, 1991. 294p.
40. REIS, A. N.; MOMBACH, J. C. M.; WALTER, M.. Role of Decreased Cell Adhesion in Tumor Morphology: A Simulation Study. *Proceedings of 4th International EUROSIM Congress.*, Delft, Holanda, 2001.
41. RUOSLATHI, E.. How Cancer Spreads. *Scientific American*. v.275, n.3, p.42-47, set., 1996.

42. SAVILL, N. J. & HOGEWEG, P. Modelling morphogenesis: from single cells to crawling slugs. *Journal of Theoretical Biology*. 184, p.229-235, 1997.
43. SMOLLE, j., STETTNER, H.. Computer Simulation of Tumour Cell Invasion by a Stochastic Growth Model. *Journal of Theoretical Biology*. 160, p.63-72, 1993.
44. SROLOVITZ, D. J., ANDERSON, M. P., SAHNI, P. S. et al.. Computer Simulation of Grain Growth – II. Grain Size Distribution, Topology, and Local Dynamics. *Acta Metall*. 32(5), p.793-802, 1984.
45. STEINBERG, M. S. Reconstruction of Tissues by Dissociate Cells. *Science*, v.141, n.3579, p.401-408, 1963.
46. STEINBERG, M. S.; FOTY, R. A.. Intercellular Adhesions as Determinants of Tissues Assembly and Malignant Invasion. *Journal of Cellular Physiology*. 173, p.135-139, 1997.
47. STETLER-STEVENSON, W. G., AZNAVOORIAN, S., LIOTTA, L. A.. Tumor Cell Interactions with Extracellular Matrix During Invasion and Metastasis. *Annual Review of Cell Biology*. 9, p.541-573. 1993.
48. STOTT, E. L.; BRITTON, N. F; GLAZIER, J. A.; ZAJAC M.. Stochastic Simulation of Benign Avascular Tumour Growth Using Potts Model. *Mathematical and Computer Modeling*. 30, p.183-198, 1999.
49. TOWNES, P. L.; HOLTFRETER, *Journal of Experimental Zoology*., v.128, p.53-120, 1955.
50. TURNER, S., SHERRATT, J.. Intercellular Adhesion and Cancer Invasion: a Discret Simulation Using the Extended Potts Model. (aceito para publicação no *Journal of Theoretical Biology*).
51. VLEMINCKZ, K., VAKAET, K., MAREEL, M. et al. Genetic manipulation of E cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion supressor role. *Cell*. 66, p 107-110. 1991.
52. WALTER, M.; FOURNIER, A.; REIMERS, M.. Clonal Mosaic Model for the Synthesis of Mammalian Coat Patterns. *Proceedings of Graphics Interface'98*. Vancouver, p.82-91, 1998.
53. WEINBERG, R. A.. How Cancer Arises. *Scientific American*. v.275, n.3, p.32-40, set., 1996.
54. YANG, Y.. Cellular Pattern Formation. Notre Dame, 1998. 275 p. Tese de Doutorado, Departament of Physics, University of Notre Dame, 1998.