

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

ANA PAULA ALVES

**ANÁLISE ESTATÍSTICA DE AGREGADOS CELULARES
NA FORMAÇÃO DE REDES VASCULARES**

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS – BRASIL
AGOSTO 2018

ANA PAULA ALVES

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE AGREGADOS CELULARES
NA FORMAÇÃO DE REDES VASCULARES

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Física.

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A474a Alves, Ana Paula.

Análise estatística de agregados celulares na formação de redes vasculares / Ana Paula Alves. – 2018.

115f., enc. : il.

Orientador: Ubirajara Agero Batista.

Coorientador: Oscar Nassif de Mesquita.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física.

Bibliografia: f. 89-96.

1. Física estatística. 2. Microscopia ótica. 3. Física, teses.
I. Título. II. Batista, Ubirajara Agero. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física.

CDU – 53:311 (043)



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Física
Caixa Postal 702
30.123-970 Belo Horizonte - MG - Brasil

Telefone (xx) (31) 3409 5637
(xx) (31) 3409 5633
Fax (xx) (31) 3409 5688
(xx) (31) 3409 5600
e-mail pgfisica@fisica.ufmg.br

ATA DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO DA 346ª TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA, DEFENDIDA POR Ana Paula Alves orientada pelo professor Ubirajara Agero Batista e coorientada pelo professor Oscar Nassif de Mesquita para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração Física**. Às 09:00 horas de dezessete de agosto de dois mil e dezoito, na sala 4123A do Departamento de Física da UFMG, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores **Ubirajara Agero Batista** (Orientador - Departamento de Física/UFMG), **Ana Maria de Paula** (Departamento de Física/UFMG), **Luiz Orlando Ladeira** (Departamento de Física/UFMG), **Allbens Atman Picardi Faria** (Departamento de Física/CEFET-MG) e **Marcelo Lobato Martins** (Departamento de Física/UFV) para dar cumprimento ao Artigo 37 do Regimento Geral da UFMG, submetendo a Mestre **Ana Paula Alves** à arguição de seu trabalho de Tese de Doutorado, que recebeu o título de "**Análise estatística de agregados celulares na formação de redes vasculares**". Às 14:00 horas do mesmo dia a candidata fez uma exposição oral de seu trabalho durante aproximadamente 50 minutos. Após esta, os membros da comissão prosseguiram com a sua arguição e apresentaram seus pareceres individuais sobre o trabalho, concluindo pela aprovação do candidato.

Belo Horizonte, 17 de agosto de 2018.

Prof. Ubirajara Agero Batista
Orientador da estudante
Departamento de Física/UFMG

Profa. Ana Maria de Paula
Departamento de Física/UFMG

Prof. Luiz Orlando Ladeira
Departamento de Física/UFMG

Prof. Allbens Atman Picardi Faria
Departamento de Física/CEFET- MG

Prof. Marcelo Lobato Martins
Departamento de Física/UFV

Candidata

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu orientador professor Ubirajara Agero pelo trabalho conjunto desenvolvido ao longo do doutorado, pela grande motivação e por toda a sintonia desenvolvida ao longo desse período. Ao Professor Oscar Nassif, pela oportunidade em conhecer o trabalho do grupo, ao lecionar um tópico especial em *Física de Sistemas Biológicos* para a graduação, e por me ensinar sempre a ter cuidado ao fazer determinadas afirmações no universo científico. Ao Jesus Gómes Gardeñes pela colaboração e por sugerir diversas bibliografias no universo de *network science*. Aos colegas do laboratório de *Física de Sistemas Biológicos* da UFMG em especial à Patricia, Ulisses, Livia, Paula, Flávio, Jéssica e André. Aos colegas e colaboradores do *Instituto de Ciências Biológicas* da UFMG, em especial à Bárbara Hissa, Gleisy Gonçalves, Sérgio Scalzo e Natalia Couto. Aos professores do Departamento de Física que muito contribuíram na minha formação. Aos professores que participaram da minha banca qualificação e contribuíram bastante com sugestões que melhoraram este trabalho. Aos funcionários do Departamento de Física, em especial ao pessoal da biblioteca por toda a atenção e cuidado ao me atender. À minha família pelo apoio, especialmente aos meus pais, Maria Alves e Manoel Alves, e aos meus irmãos, Marta Alves e Paulo Roberto, por dividirem todos os momentos de ansiedade. Aos colegas do Departamento de Física que me motivaram durante esse período muito obrigada, em especial aos que forneceram café. Aos amigos meu muito obrigada pelo grande apoio em todas as horas em especial à Lígia, Mangos, Felipe, Jean, Regiane, Glaucio, Mychel, Edmilson, e em especial ao André Tanus e Patricia Sales por sempre me motivarem e corrigirem várias vezes meus textos. À *família astro* minha imensa gratidão por dividirem vários momentos desse processo, em especial à Alana, Júlia, Tati, Henrique e Bonnie. E às agências financiadoras FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo financiamento desse projeto e pelo período de bolsa.

LISTA DE ARTIGOS

- Nesta tese serão apresentados os resultados obtidos durante o doutorado da candidata Ana Paula Alves. Estes resultados foram publicados no artigo *Graph analysis of cell clusters forming vascular networks*, em 14 de março de 2018, na revista **Royal Society Open Science**. Alves, AP and Mesquita, ON and Gómez-Gardeñes, J and Agero, U. (2018), [1].

Além disso, durante este período a candidata desenvolveu outros trabalhos em colaboração com pesquisadores do *Instituto de ciências biológicas* da UFMG, a seguir estão listados outros dois trabalhos publicados neste período.

- *Neonatal cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin-1 is blocked by estradiol acting on GPER*. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**. Goncalves, Gleisy Kelly and Scalzo, Sergio and Alves, Ana Paula and Agero, Ubirajara and Guatimosim, Silvia and Reis, Adelina M. (2017), [2].
- *Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes*. **PloS One**. Hissa, Barbara and Pontes, Bruno and Roma, Paula Magda S and Alves, Ana Paula and Rocha, Carolina D and Valverde, Thalita M and Aguiar, Pedro Henrique N and Almeida, Fernando P and Guimarães, Allan J and Guatimosim, Cristina and others.(2013), [3].

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 Introdução	1
2 A formação da rede vascular	4
2.1 Vasculogênese	4
2.1.1 Vasculogênese e o desenvolvimento embrionário	5
2.1.2 Auto-organização celular em uma rede vascular.	6
2.2 Modelagem da vasculogênese	7
3 A física estatística aplicada em processos dinâmicos	17
3.1 Dimensão fractal	17
3.2 Teoria de grafos e redes	20
3.2.1 Caracterização e a estatística de grafos	22
3.3 Transição de fase para modelos de percolação	29
3.4 A percolação e a formação da rede vascular.	33
3.5 A densidade média de vasos	37
4 Métodos experimentais	41
4.1 Montagem experimental	41
4.2 Processamento de imagens	45
4.2.1 Padrões binários	46
4.2.2 Topologia da rede vascular	48
4.3 Matriz de adjacência	51

5	Resultados e Discussão	54
5.1	Análise Estatística dos Padrões Binários.	55
5.2	Métricas de Rede.	60
5.3	Métricas Estruturais.	68
6	Conclusões	75
	Referências	77
A		85
B		89

Lista de Figuras

2.1	Estágios embrionários definidos por Hambuguer e Hamilton	6
2.2	Auto-organização celular em uma rede vascular.	7
2.3	A física biológica conecta as abordagens teórica e experimental de um dado fenômeno biológico.	9
2.4	Padrões obtidos usando diferentes modelos matemáticos	11
2.5	Modelos de interação celular.	12
2.6	Modelo para a vasculogênese proposto por Kohn-Luque e Walter de Back.	15
2.7	Incubação e extração de embriões.	16
3.1	Representação de objetos fractais.	19
3.2	Análise fractal usada como diagnóstico de doenças por meio da topologia vascular da retina.	20
3.3	Padrões vasculares do córtex cerebral humano ao longo do desenvolvimento fetal.	21
3.4	Mapa das interações proteína-proteína em um organismo unicelular.	22
3.5	Topologias de rede.	23
3.6	Matriz de adjacência de grafos direcionados e não direcionados	24
3.7	Distribuição de graus em grafos.	26
3.8	Coefficiente de agrupamento local C_i	28
3.9	Topologias de rede.	29
3.10	Evolução de uma rede aleatória.	31
3.11	Percolação em tumorigênese.	32
3.12	Percolação em cultura celular resultado experimental e numérico.	35
3.13	Conectividade em redes celulares.	36
3.14	Dinâmica de formação da rede vascular ilustrada por meio de resultados numéricos.	38
3.15	Densidade de vasos em função do tempo prescrito pelo modelo.	40

4.1	Processo de incubação e extração de embriões.	42
4.2	Imagem do embrião	44
4.3	Montagem experimental	45
4.4	Processo de obtenção dos padrões binários.	47
4.5	Validação da detecção dos padrões binários.	48
4.6	Processo de obtenção da topologia das redes.	49
4.7	Topologia das redes vasculares.	50
4.8	Calculo da dimensão fractal, D_f	51
4.9	Processo de obtenção da matriz de adjacência.	53
5.1	Densidade de vasos em função do tempo.	56
5.2	Número de aglomerados celulares em função do tempo.	58
5.3	Densidade do maior aglomerado conectado em função do tempo.	59
5.4	A distribuição de graus para os grupos controle e tratado	61
5.5	Grau médio dos vértices.	63
5.6	Coefficiente de correlação dos graus em função do tempo.	64
5.7	Coefficiente de associatividade e o número de aglomerados em função do tempo.	65
5.8	Coefficiente de agrupamento médio em função do tempo.	66
5.9	Menor caminho médio em função do tempo.	67
5.10	Fração de vértices no maior aglomerado em função do tempo.	68
5.11	Comprimento médio entre as bifurcações.	70
5.12	Dimensão fractal em função do tempo.	71
5.13	<i>Treeness</i> em função do tempo.	73
5.14	Índice γ em função do tempo.	74

RESUMO

ALVES, Ana Paula, Universidade Federal de Minas Gerais, Junho de 2018.

Análise estatística de agregados celulares na formação de redes vasculares.

Orientador: Ubirajara Agero Co-Orientadores: Oscar Nassif de Mesquita

Este trabalho é um estudo experimental da vasculogênese em embriões de galinha sob uma perspectiva física. Utilizamos conceitos de física estatística associados à ciência de redes para caracterizar a auto-organização dos aglomerados celulares em uma rede única de capilares. Para isso, acompanhamos por meio da microscopia ótica de campo claro a formação da rede vascular durante 15 horas do desenvolvimento embrionário. Avaliamos a auto-organização dos aglomerados de células endoteliais em embriões controles, sem tratamento, e em embriões tratados com bevacizumabe (Avastin[®]), um anticorpo que inibe a sinalização do fator de crescimento de célula endotelial [do inglês *vascular endothelial growth factor* (VEGF)]. Neste trabalho estudamos a vasculogênese no embrião controle, ou seja sem restrição de VEGF, e caracterizamos a formação da rede vascular discutindo os princípios físicos que conduzem o comportamento coletivo dos aglomerados celulares na formação da rede vascular. Além disso, caracterizamos as topologias das redes vasculares diminuindo a concentração de VEGF livre. Para isso, desenvolvemos uma metodologia para extrair a partir de imagens capturadas ao longo da formação da rede vascular: os padrões binários, as topologias de rede e as matrizes de adjacência. A caracterização dos padrões binários é realizada medindo-se a densidade de vasos, o número de aglomerados celulares e a densidade do maior aglomerado conectado. A partir das topologias de rede extraímos as matrizes de adjacência e caracterizamos a formação da rede vascular por meio das métricas usuais de rede, tais como: distribuição de graus, coeficiente de agrupamento médio, menor caminho médio e coeficiente de correlação dos graus entre outros. Essas análises permitiram monitorar a emergência do maior aglomerado conectado fornecendo evidências quantitativas dos efeitos disruptivos que o Avastin exerce sobre as topologias do tipo árvore exibidas nas redes vasculares dos embriões controles.

ABSTRACT

ALVES, Ana Paula., Universidade Federal de Minas Gerais, June, 2011.

Statistical analysis of cell clusters forming vascular networks. Advisor:
Ubirajara Agero Co-Advisors: Oscar Nassif de Mesquita

In this work we present an experimental study of vasculogenesis in chicken embryos from a physics point of view. We use statistical physics and the network science to characterize the self-organization of cell clusters forming a single vascular network. The vascular network formation was observed by means bright-field microscopy during 15 hours of embryonic development. We quantify the self-organization of endothelial cell clusters forming a single vascular network in control embryos and in embryos treated with bevacizumab (Avastin[®]) an antibody that inhibits the signalization of the *vascular endothelial growth factor*, VEGF. In this work our aim is twofold: first we propose to study vasculogenesis on control embryos, it means without VEGF restriction, in order to characterize the vascular network formation and discuss physical principles that maybe driven the collective behavior in the system. Second, we characterize the vascular network formation applying a drug that binds to VEGF decreasing the free VEGF in extracellular matrix. In order to get quantitative parameters from the original images sequence we developed a methodology to extract binary patterns, network topologies and the adjacency matrices. This methodology allows us to make an accurate characterization of the endothelial cell clusters forming a single vascular network in control embryos and in Avastin-treated embryos. This characterization accounts for statistical parameters such as vessels density, cord length, number of cell clusters, fractal dimension and the largest cluster density. Also we characterized the system by means of the usual network metrics such as: the degree distribution, average clustering coefficient, average short path length, and assortativity among others. From these studies we were able to monitor the growth of the largest connected cluster in the system and provide quantitative evidences of the disruptive effects that Avastin has on the tree structure of vascular networks.

Capítulo 1

Introdução

A física biológica é um ramo da física que estuda sistemas biológicos, seja por meio de dados experimentais ou por intermédio de modelos matemáticos e computacionais. A microscopia ótica de campo claro, por exemplo, é uma técnica experimental que desempenha um papel importante na obtenção e quantificação de dados experimentais usados para caracterizar um sistema ou um fenômeno biológico. Os dados experimentais fornecem parâmetros que viabilizam a formulação de hipóteses de um dado sistema biológico e constituem um ponto chave no desenvolvimento de modelos teóricos. Associando a formulação de hipóteses de um dado fenômeno ou sistema biológico a uma teoria física é possível compreender os princípios físicos que o conduzem e desenvolver modelos que o reproduza. A modelagem matemática dos fenômenos biológicos é uma ferramenta importante pois ela é capaz de prever diferentes etapas do processo e possibilita também testar diferentes hipóteses no modelo, otimizando assim a reprodução de novos experimentos.

Neste trabalho medimos parâmetros quantitativos que caracterizam o processo da vasculogênese no embrião de galinha, *Gallus gallus*. Para isso, usamos a microscopia ótica de campo claro para acompanhar o surgimento da rede vascular ao longo de 15 horas do desenvolvimento embrionário. As imagens capturadas monitoram a auto-organização espaço-temporal de aglomerados celulares em uma rede única de capilares. No intuito de entender os mecanismos que promovem a auto-organização dos aglomerados celulares extraímos parâmetros quantitativos para um grupo de embriões controle e para um grupo de embriões tratados com um fármaco antiangiogênico, bevacizumabe (Avastin[®]). Este fármaco se liga ao *vascular endothelial growth factor* (VEGF), um polipeptídeo responsável pela sinalização química das células endoteliais durante o processo da vasculogênese. No Capítulo 2 está apresentado o processo de formação

da rede vascular ao longo do desenvolvimento embrionário. Ainda no Capítulo 2 são mostrados alguns modelos da literatura os quais discutem mecanismos diferentes da auto-organização espaço-temporal dos aglomerados celulares. Os aglomerados celulares inicialmente desconectados coalescem formando o maior aglomerado conectado que se alastra pelo sistema dando origem a rede vascular. A vasculogênese trata-se de um processo dinâmico e para descrever os princípios físicos que conduzem este fenômeno apresentaremos no Capítulo 3 alguns conceitos de física estatística usados para descrever processos dinâmicos. No Capítulo 3, faremos também uma breve revisão sobre teoria de grafos, destacando métricas usuais em ciência de redes usadas para caracterizar a formação das topologias de rede, detectar a emergência do maior aglomerado conectado no sistema e para distinguir as topologias entre os dois grupos estudados. Ainda no Capítulo 3, apresentaremos alguns resultados numéricos obtidos por meio de modelos teóricos propostos para a formação da rede vascular. A preparação das amostras, assim como a montagem experimental são apresentadas no Capítulo 4. Ainda no Capítulo 4, apresentaremos detalhadamente a metodologia desenvolvida para extrair os padrões dos aglomerados celulares, as topologias de rede, assim como também os procedimentos realizados para codificar as matrizes de adjacência. A partir dos dados experimentais coletados obtivemos parâmetros quantitativos que descrevem a formação da rede vascular que são apresentados e discutidos no Capítulo 5. Por meio da teoria de grafos foi possível estudar a vasculogênese em uma perspectiva diferente da apresentada na literatura, pois a partir das topologias de redes vasculares medimos alguns parâmetros de rede que foram fundamentais para caracterizar a emergência do maior aglomerado conectado no sistema a partir de 5h de experimento. Além disso, alguns destes parâmetros detectaram uma diferença entre as topologias de rede dos grupos controle e tratado a partir de 7.8h. As conclusões deste trabalho são apresentadas no Capítulo 6. O artigo publicado com os resultados principais obtidos neste trabalho está apresentado em *Graph analysis of cell clusters forming vascular networks* [1], no Apêndice B.

Além dos resultados principais da tese, desenvolvemos outros trabalhos em colaboração com pesquisadores do *Instituto de Ciências Biológicas* da UFMG. Por meio da microscopia ótica de campo claro acompanhamos as contrações em cultura de cardiomiócitos neonatais e avaliamos a diferença entre a fração da área celular contraída do grupo controle e de grupos submetidos a um determinado tipo de tratamento, os resultados estão apresentadas em *Neonatal cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin-1 is blocked by estradiol acting on GPER*, [2]. Estudamos também a rigidez

da membrana celular induzida pela secreção de lisossomos e os resultados obtidos estão apresentados em *Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes*, [3]. Por meio da microscopia de desfocalização [4, 5] avaliamos as propriedades mecânicas de membranas celulares em um grupo controle e em um grupo em que foi induzido a secreção das balsas de lisossomos.

Capítulo 2

A formação da rede vascular

Neste capítulo apresentaremos a vasculogênese sob a perspectiva biológica e mostraremos alguns modelos propostos para descrevê-la. Apresentaremos o processo de formação da rede vascular no embrião, assim como, os modelos matemáticos e computacionais desenvolvidos com o objetivo de modelá-lo quantitativamente. Embora cada modelo avalie um mecanismo de interação diferente entre os aglomerados celulares, todos resultados obtidos reproduzem a auto-organização dos aglomerados em uma única rede de capilares. A maioria dos modelos apresentados foram desenvolvidos de acordo com dados experimentais extraídos de células endoteliais em cultura *in vitro*.

2.1 Vasculogênese

A vasculogênese refere-se a formação de novos vasos sanguíneos em regiões não vascularizadas que ocorre tanto na fase embrionária como na fase adulta dos seres vivos. A formação da primeira rede vascular é um processo dinâmico que envolve migração, diferenciação e agregação das células endoteliais. O sistema vascular nos vertebrados contém três tipos de vasos sanguíneos: as artérias que levam o sangue para fora do coração, as veias que transportam o sangue de volta para coração e os capilares [6]. Os capilares são os menores vasos do corpo e são os únicos capazes de atuarem nas mudanças de sangue entre os tecidos [6]. Sendo assim, tanto as veias quanto as artérias exibem uma topologia do tipo árvore enquanto os capilares possuem topologias de redes mais homogêneas.

Para o entendimento dos fenômenos envolvidos na vasculogênese muitas pesquisas têm sido realizadas em diversas áreas da ciência [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. Especialmente nas ciências exatas, um grande esforço tem sido feito para modelar os

mecanismos que promovem a agregação das células endoteliais e sua subsequente organização em uma única rede vascular [14, 15, 16, 17, 18, 19].

2.1.1 Vasculogênese e o desenvolvimento embrionário

A primeira rede vascular aparece nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. A rede vascular é estabelecida antes do início do fluxo sanguíneo e desempenha um papel fundamental, pois é a responsável pela oxigenação e nutrição dos tecidos em formação [7].

Neste trabalho para obter parâmetros quantitativos que descrevam a vasculogênese acompanhamos o surgimento da primeira rede vascular no embrião durante 15 horas do desenvolvimento embrionário. Hamburger e Hamilton, (HH), desenvolveram um trabalho pioneiro classificando os estágios do desenvolvimento embrionário que receberam a nomenclatura (HH 1-46). A classificação dos estágios embrionários correlaciona a idade cronológica e estrutural dos embriões em formação, pois embora os ovos sejam incubados ao mesmo tempo é necessário considerar a variabilidade genética de cada embrião [12]. Na Fig.2.1 ilustramos alguns estágios embrionários, no intervalo que compreende o primeiro estágio HH1 até o estágio HH19. Acompanhamos o desenvolvimento da rede vascular em formação no embrião de galinha a partir do estágio HH11 até o estágio HH16.

O desenvolvimento do embrião começa ainda na galinha, o óvulo fecundado sofre um processo de sucessivas divisões formando o blastoderme, uma massa discoide, ou folheto embrionário, que dará origem ao corpo do embrião. Após o ovo eclodir-se e ser incubado, o embrião, que era um disco bidimensional, como ilustra o estágio HH1 na Fig.2.1, sofre um processo chamado de gastrulação. A gastrulação é caracterizada pela formação da linha primitiva, ilustrada na Fig.2.1 entre os estágios HH(2 – 4). Posteriormente, entre os estágios HH(5 – 8), começa uma nova fase da gastrulação pois inicia-se a regressão da linha primitiva. A regressão da linha primitiva é caracterizada pela diferenciação celular dando origem às estruturas básicas que formarão o embrião. Entre os estágios HH(8 – 11), o folheto cefálico é definido e os pares de somitos que ocupam a região central do embrião aumentam. Os somitos são blocos compactados de células que ocupam a região central do embrião definindo os lados direito e esquerdo. No estágio HH11 a região cefálica e caudal estão definidas e o coração ocupa o lado direito do embrião. Neste estágio, o embrião contém as estruturas básicas para o desenvolvimento da primeira rede vascular, e a partir deste instante acompanharemos

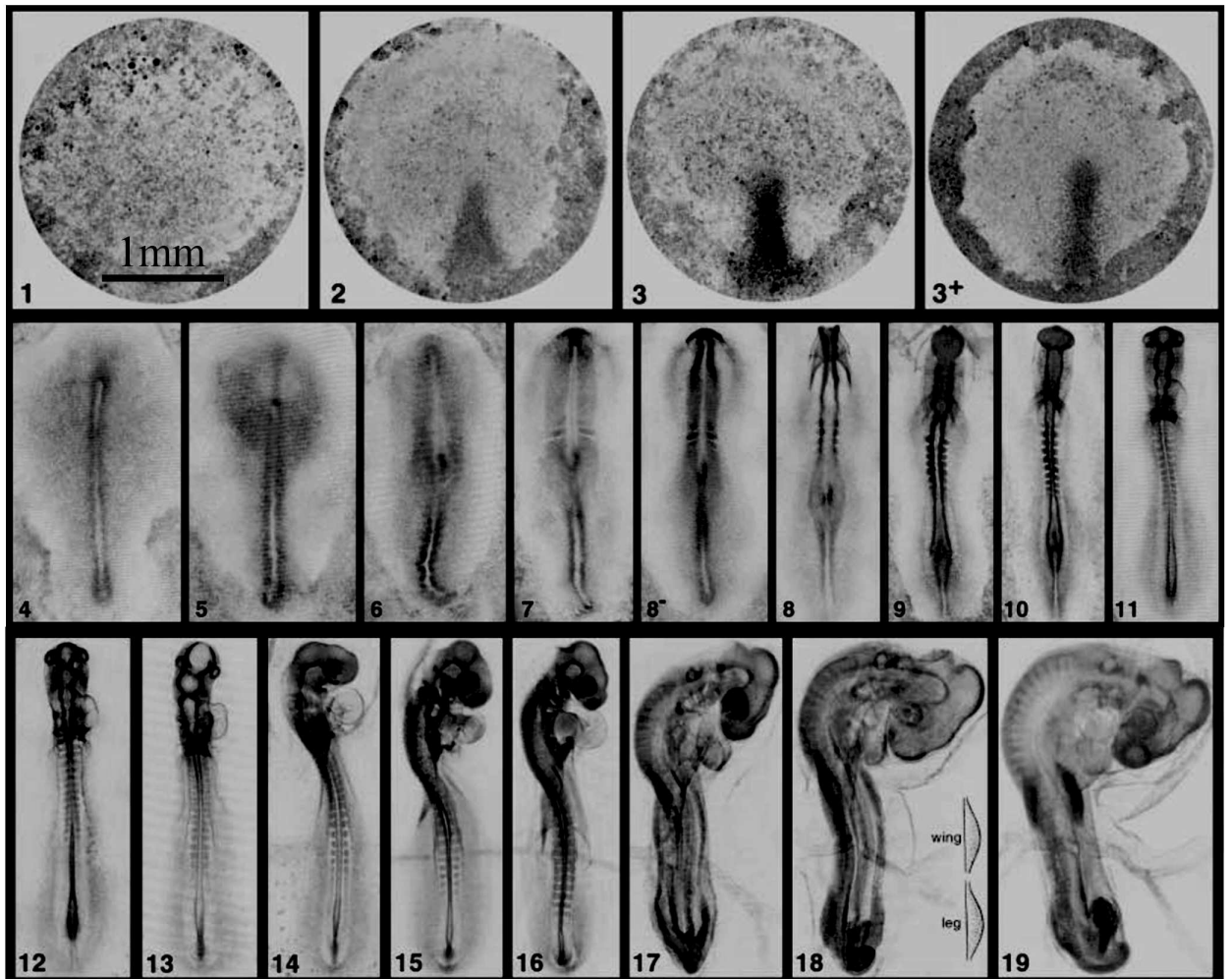


Figura 2.1: Estágios embrionários, estágio HH1 até o estágio HH19, classificados por Hamburger e Hamilton. Adaptada de [12].

o desenvolvimento da rede vascular no embrião até o estágio HH16.

2.1.2 Auto-organização celular em uma rede vascular.

As células do folheto embrionário se replicam, migram, diferenciam e se agregam formando ilhas celulares que coalescem em agregados maiores formando os primeiros capilares [7]. A sequência de interações entre as células que promovem a formação dos capilares e a subsequente organização destes capilares em uma rede primitiva está ilustrada na Fig.2.2. Inicialmente as células mesodérmicas migram diferenciando-se em células precursoras dos hemangioblastos Fig.2.2 (a). Os hemangioblastos coalescem originando ilhas celulares formadas por células externas que se diferenciam em angio-

blastos e revestem as células internas, células hematopoéticas, precursoras das células sanguíneas, como ilustrado na Fig.2.2 (b). Em seguida, ocorre a fusão das ilhas celulares, ilustrado na Fig.2.2 (c), simultaneamente, ocorre a diferenciação dos angioblastos em células endoteliais que revestem a parede dos capilares. Posteriormente, ocorre a formação e maturação dos capilares formando a rede vascular primária, ilustrada na Fig.2.2 (d) [7, 12, 20].

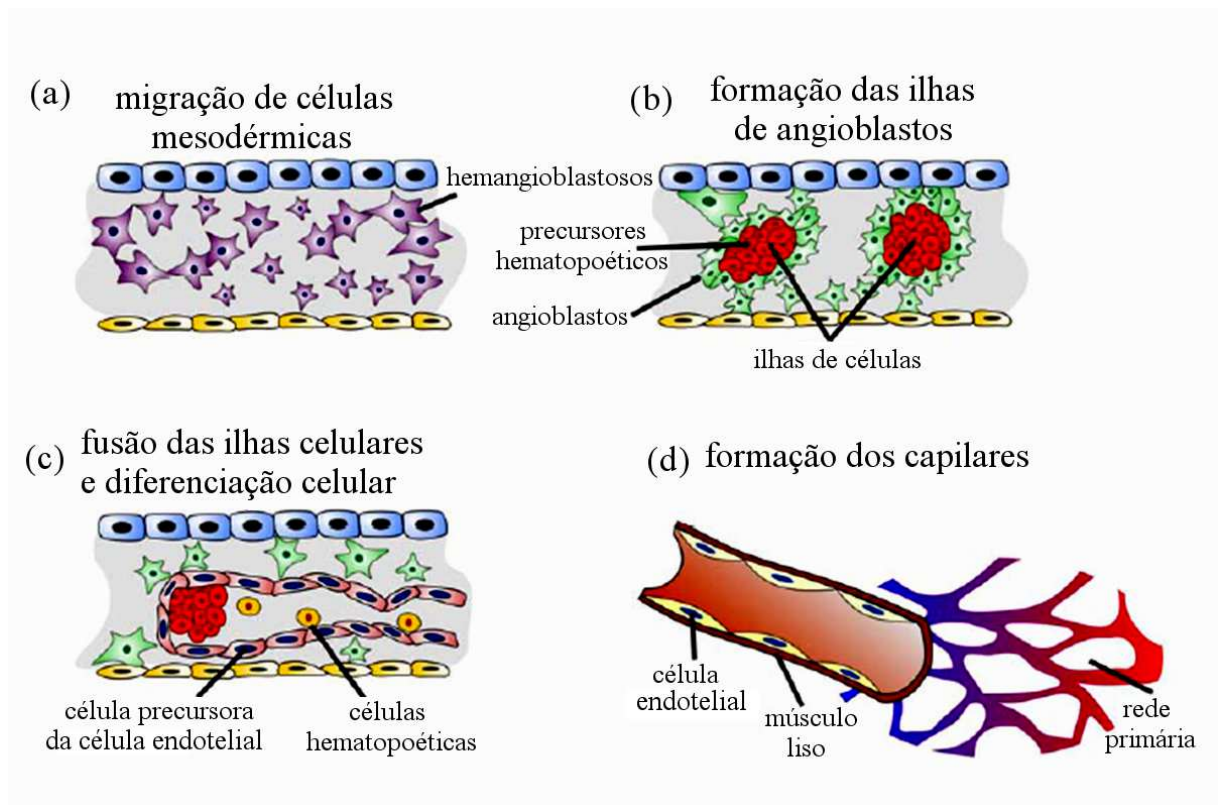


Figura 2.2: (a) Células mesodérmicas migram e se diferenciam em hemangioblastos. (b) Os hemangioblastos aglomeram-se originando ilhas celulares formadas por angioblastos, células externas, que revestem as células precursoras hematopoéticas. (c) As ilhas celulares coalescem originando os capilares primários formados pelos angioblastos que se diferenciam em células endoteliais e revestem as células hematopoéticas. (d) Os capilares primários se organizam na rede vascular primária. Adaptada de [20].

2.2 Modelagem da vasculogênese

O fenômeno biológico denominado vasculogênese trata-se de um processo complexo que envolve diversos fatores. A completa caracterização dos mecanismos que

conduzem a vasculogênese envolve observações experimentais, quantificação dos dados experimentais e a reprodução desse fenômeno por meio de modelos matemáticos e computacionais [13], conforme ilustrado na Fig.2.3. A observação experimental representa a coleta dos dados por meio de técnicas, tal como a microscopia óptica de campo claro. Na microscopia óptica de campo claro a amostra é iluminada com um feixe de luz uniforme, parte dessa luz é absorvida pela amostra, e por meio da diferença de iluminação entre a amostra e seu meio de imersão, ou seja por meio do contraste, é possível caracterizar as estruturas da amostra em análise. A partir dessa caracterização é realizada a quantificação dos dados experimentais que permite lançar hipóteses e fornecer parâmetros para a modelagem matemática. A modelagem desempenha um ponto importante na caracterização de fenômenos biológicos, pois por meio dela é possível testar hipóteses e prever os princípios físicos que conduzem as interações entre os componentes de um sistema complexo projetando assim a necessidade de novos experimentos. A física biológica, assim como a biologia teórica, opera como elemento chave conectando os dados experimentais à modelagem de um determinado fenômeno biológico. A convergência dos resultados teóricos e experimentais é fundamental para a validação de um dado modelo como ilustrado na Fig.2.3.

Vários modelos matemáticos e computacionais que exploram diferentes mecanismos de auto-organização dos aglomerados celulares em uma rede vascular têm sido propostos [21, 19, 16, 13]. A grande maioria desses modelos descrevem as interações biológicas de acordo com dados experimentais obtidos a partir de células endoteliais em cultura. Cada modelo assume que a locomoção das células é conduzida por meio de um mecanismo de interação entre as células e a matriz extracelular. Esses modelos podem ser classificados em três tipos: modelo ativador-inibidor, modelo mecânico e modelos de atração a um gradiente químico, ou quimiotaxia [13].

Modelo ativador-inibidor: é um modelo descrito em função da equação de difusão em que há interação entre pelo menos duas substâncias. Uma das substâncias age como um ativador autocatalítico, ou seja, é criado na própria reação, e a outra substância é uma espécie de inibidor antagonista. A ação conjunta destas substâncias resulta na formação de padrões espontâneos desde que a difusão do inibidor seja rápida comparada com a difusão do ativador [22, 23]. No modelo de depleção de substrato a síntese do ativador envolve a redução do substrato que é substituída no modelo por um agente inibidor. O acoplamento do modelo de depleção do substrato com o modelo ativador-inibidor é suficiente para obter o padrão de uma rede reticular [24]. Enquanto o modelo de depleção do substrato gera um padrão de picos isolados (lacunas), o mo-

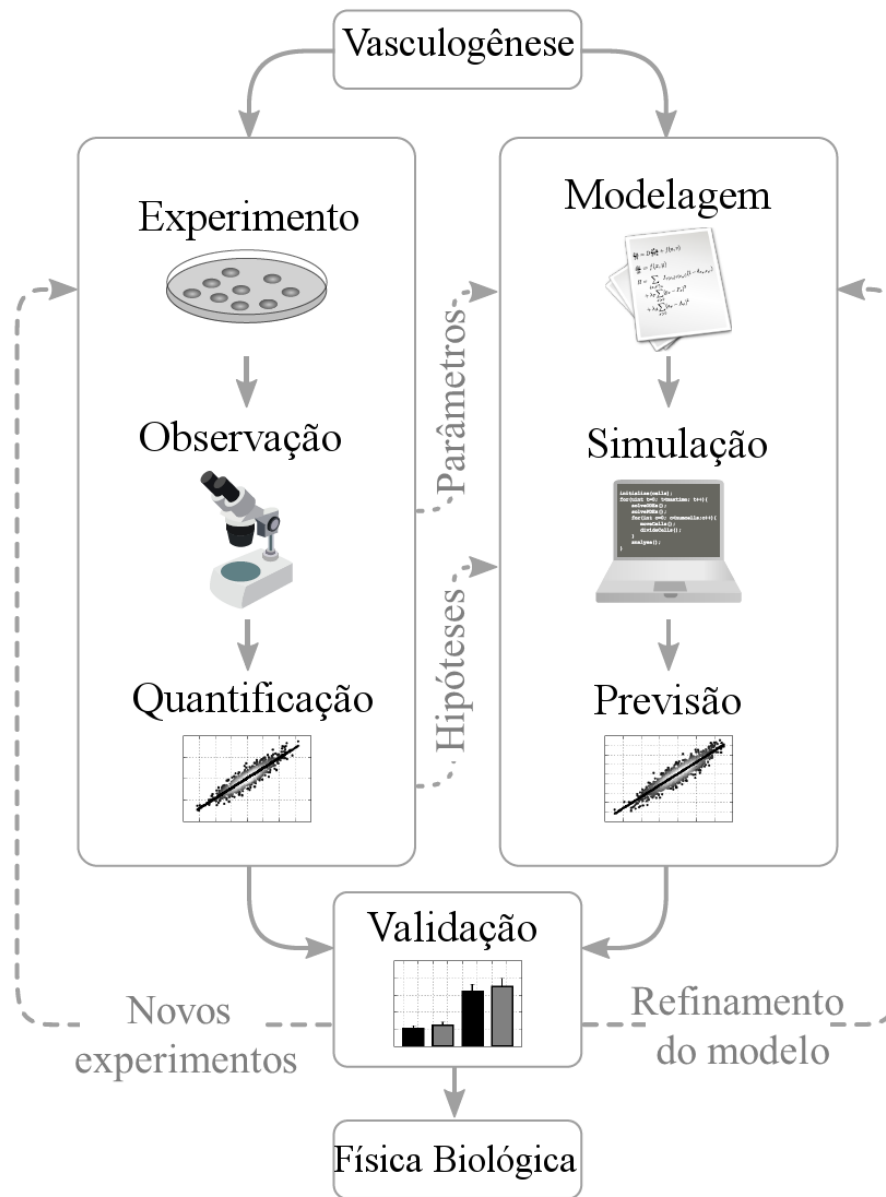


Figura 2.3: Esquema ilustrando o trabalho conjunto entre as abordagens teórica e experimental para descrever um determinado fenômeno biológico, como a vasculogênese. Adaptada de [13].

delo ativador-inibidor produz listras (vasos) ao redor dos picos. A combinação destes modelos resulta em estruturas poligonais com notável semelhança às redes vasculares nos primeiros estágios de desenvolvimento como ilustra a Fig.2.4 (a). Embora a combinação destes modelos descreva o processo de criação de uma estrutura reticular ele mantém o tamanho característico dos polígonos constante e não reproduz as proprie-

dades moleculares das substâncias interagentes, as quais possuem um papel chave no processo de formação da rede vascular.

Modelo mecânico: uma hipótese alternativa para a formação da rede vascular é descrita pela atividade mecânica entre as células e a matriz extracelular (MEC) [25, 26, 27]. A capacidade de formação de padrões semelhantes às redes pode ser observada em modelos considerando um mecanismo unicamente mecânico da interação das células com a MEC, como ilustra Fig.2.4 (b). Szabo e colaboradores por meio de dados experimentais de células endoteliais em cultura mostraram que a formação das redes depende principalmente dos aspectos mecânicos das células, como a capacidade de criar forças de tração, bem como as propriedades mecânicas da matriz através da sua rigidez mecânica [28]. Merks e colaboradores usaram o *Cellular Potts Model* acoplado a um modelo de elementos finitos para modelar as interações mecânicas entre as células e a matriz extracelular [27]. O *Cellular Potts Model* (CPM) trata-se de um modelo computacional usado em biologia para estudar o comportamento coletivo de estruturas celulares [29]. Esse modelo permite modelar fenômenos como a migração, aglomeração e crescimento celular considerando forças adesivas, ou forças de tração, que cada célula, σ_i , de área A_{σ_i} exerce sobre outra célula adjacente, σ_j , de área A_{σ_j} , e ainda considera a influência do meio extracelular sobre as células, como ilustrado na Fig.2.5 (a). Os resultados obtidos mostram que a formação da estrutura reticular da rede é conduzida por uma força motriz por intermédio da mobilidade celular. Esses resultados somados aos dados experimentais mostram que as trações mecânicas, entre as células e a matriz extracelular, são fundamentais na formação de redes reticulares. No entanto, interações mecânicas por si só não podem explicar o papel crucial dos fatores químicos, tais como o *vascular endothelial growth factors* (VEGF) conhecidos por serem essenciais na formação da rede vascular no embrião e em culturas celulares [13].

Modelo de quimiotaxia autócrina: este modelo considera que a formação da rede vascular é conduzida pela mobilidade celular em decorrência da resposta da célula à um estímulo químico. Na quimiotaxia autócrina considera-se que a célula libera seu próprio fator de crescimento como ilustra a Fig.2.5 (b). A maioria dos modelos matemáticos de quimiotaxia assumem que há no sistema a liberação por difusão de um gradiente químico, identificado por exemplo como o VEGF pelas células endoteliais [30, 21, 19, 31]. Esses modelos descrevem as mudanças na densidade celular e na distribuição espacial das células de maneira contínua, e representam a formação da rede através da agregação de aglomerados celulares em estruturas poligonais, como ilustra Fig.2.4 (c). No entanto, essas morfologias são transitórias e eventualmente se

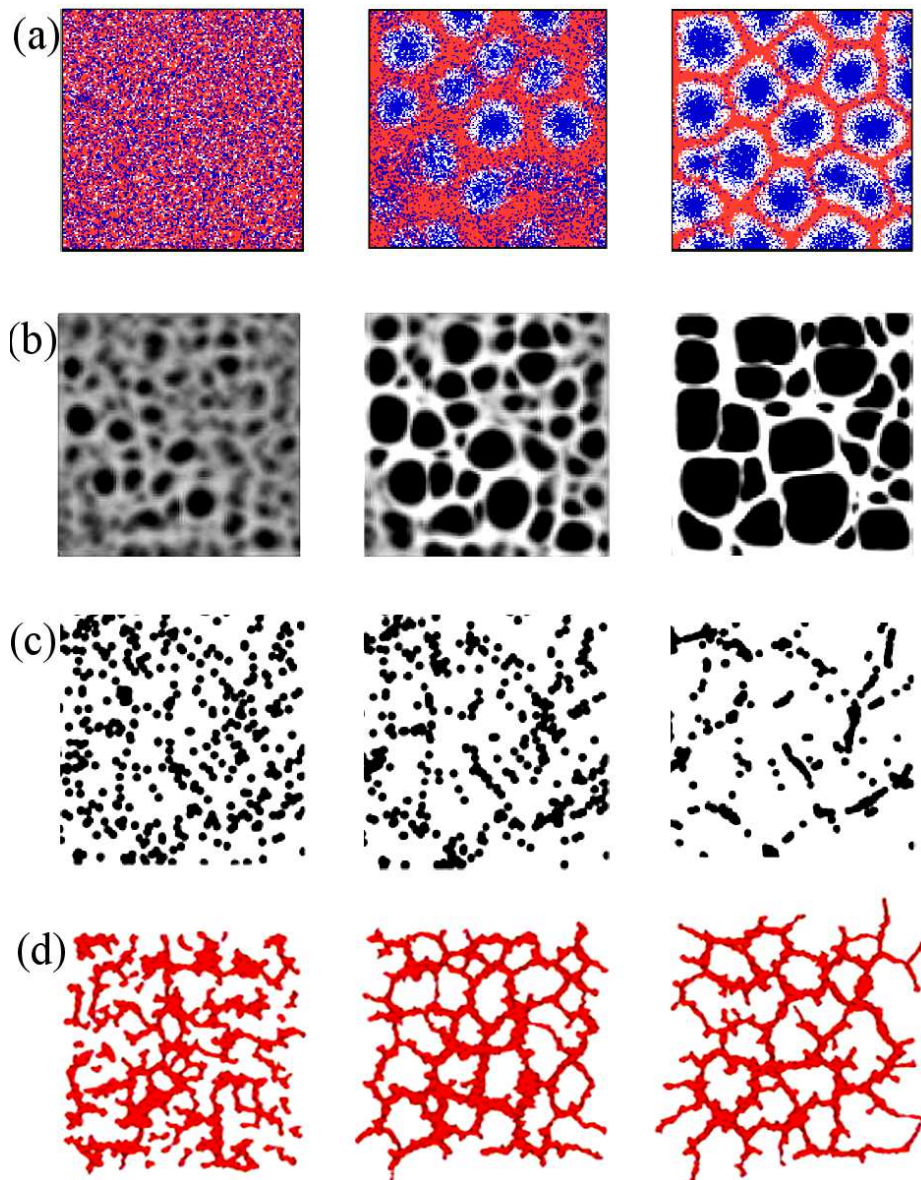


Figura 2.4: Resultados simulacionais de padrões obtidos a partir de modelos propostos na literatura. (a) Modelo ativador-inibidor: o modelo de depleção de substrato produz pontos (azul), enquanto o modelo ativador-inibidor produz redes poligonais (vermelho). (b) Modelo mecânico: forças de tração exercidas pelas células na matriz extracelular produzem redes celulares (os tons de cinza ilustram as densidades celulares). (c) Modelo de quimiotaxia autócrina: redes surgem através da atração dos aglomerados celulares à um gradiente químico produzido pelas células endoteliais (os pontos pretos ilustram os centróides das células). (d) Modelo híbrido: envolve a quimiotaxia, difusão e é modelado através do CPM (Cellular Potts Model). Retirada de [13].

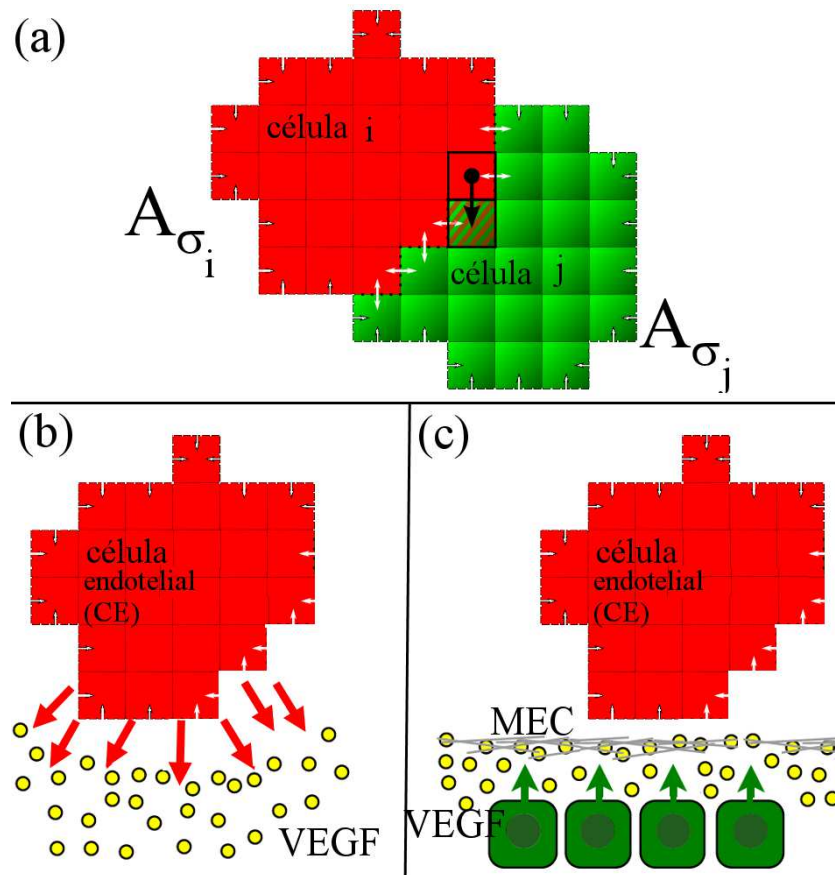


Figura 2.5: (a) Ilustração do *Cellular Potts Model*, evidenciando a interação entre as células de áreas A_{σ_i} e A_{σ_j} . (b) Modelo autócrino: a célula endotelial (EC) produz seu próprio fator de crescimento. (c) Modelo parácrino: o fator de crescimento é liberado na matriz extra celular, ou seja, na vizinhança das células endoteliais. A distribuição espacial das células está diretamente relacionada aos microdomínios de VEGF distribuídos na matriz extracelular. A diferença chave entre os modelos autócrino e parácrino está na fonte assumida para o VEGF. Adaptada de [13].

estabilizam em estruturas desconectadas, além disso, não reproduzem corretamente o aumento no calibre dos vasos da rede ao longo do tempo. Para corrigir essas observações os modelos de quimiotaxia foram reformulados, e usando o CPM foi possível explicitar a forma da célula e manter os pressupostos biológicos, considerando a resposta das células aos gradientes químicos. Os modelos reformulados identificaram vários mecanismos a nível celular como por exemplo a adesão celular, a alongação celular ativa e a inibição por contato. Associando os mecanismos a nível celular à secreção autócrina foi possível reproduzir a formação da rede vascular e prever sua reestruturação, como ilustrado em

2.4 (d) [13].

Embora o modelo de quimiotaxia autócrina descreva sob várias condições a formação da rede, ele se baseia em algumas hipóteses que não são sustentadas por observações biológicas, como a capacidade das células em produzir e liberar seu próprio ligante. Por outro lado, várias evidências experimentais sugeriam uma fonte alternativa de VEGF, no embrião por exemplo, tecidos próximos a rede vascular em formação liberam fatores de crescimento como o VEGF. Além disso, em ensaios de *Human Umbilical Vascular Endothelial Cells* (HUVECs), observações mostraram que era necessário a adição de VEGF externo para que houvesse a formação da rede vascular, indicando que se houvesse VEGF produzido pelas células em cultura ele não é suficiente para promover a agregação dos aglomerados celulares em uma topologia de rede [32]. Sendo assim, um novo modelo denominado de modelo parácrino foi proposto, o qual considera que a principal fonte de VEGF está na matriz extracelular, como ilustra Fig.2.5 (c). Além do papel mecânico desempenhado pela matriz extracelular, por meio da sua rigidez mecânica, ela também desempenha um papel importante na retenção e sinalização dos fatores de crescimento. As células endoteliais produzem moléculas na matriz extracelular que possuem domínios de ligação do VEGF. A diferença chave entre os modelos autócrino e parácrino está na fonte assumida para o VEGF como ilustra Fig.2.5 (b) e (c).

Modelo parácrino e a formação da rede vascular: o modelo parácrino considera que o VEGF é produzido na matriz extracelular, como ilustra Fig.2.5 (c). Alvaro Kohn-Luque e Walter de Back respaldados em modelos anteriormente propostos e em evidências biológicas extraídas de dados experimentais propuseram um novo modelo para a formação da rede vascular [7, 33]. Eles assumiram que os angioblastos produzem moléculas que possuem domínios de ligação de VEGF na matriz extracelular, como ilustrado pelas regiões em amarelo na Fig.2.6 (a) [16, 13]. A fração de VEGF ligada aos domínios está representada por $VEGF^b$. Além disso, eles assumiram que a endoderme é a principal fonte do fator de sinalização das células endoteliais, ilustrado por $VEGF^s$ na Fig.2.6 (a). Neste modelo, dentre outras condições, assume-se que o VEGF que se liga às moléculas da matriz extracelular formam caminhos que orientam as células endoteliais no processo de migração e formação da rede vascular [16, 13].

O modelo proposto por Alvaro Kohn-Luque e colaboradores se mostrou bastante robusto reproduzindo tanto a topologia da rede vascular para um determinado estágio de evolução do sistema, mostrada na Fig.2.6 (b), como a distribuição de tamanhos, ilustrada na Fig.2.6 (c). A distribuição dos tamanhos dos aglomerados celulares foi obtida

para duas simulações, a saber 500 *Monte Carlo Step* (MCS) e 3000 MCS. Os resultados apresentados em ambas distribuições prevêem que inicialmente o sistema é ocupado por alguns pequenos aglomerados. Posteriormente, a população de aglomerados com tamanhos intermediários atinge um valor máximo. E nos passos finais da simulação, o número de aglomerados diminui rapidamente e o tamanho dos aglomerados celulares aumenta, assinalando assim, a emergência do maior aglomerado conectado no sistema. Embora esse modelo seja capaz de prever satisfatoriamente os passos intermediários do processo da vasculogênese a topologia de rede obtida no estágio final pelas simulações não apresenta uma topologia de rede do tipo árvore como é esperado para veias e artérias. A topologia de rede obtida no modelo é bastante similar às topologias de redes urbanas que também são semelhantes às topologias de redes obtidas para células endoteliais em cultura.

VEGF e a sinalização celular: as células endoteliais apresentam receptores na membrana, como o (VEGF-2), que ao se ligarem ao VEGF livre na matriz extracelular formam o conjunto (VEGF-2 + VEGF) que envia uma mensagem ao núcleo celular, assim a célula se torna ativa à angiogênese como ilustra a Fig.2.7 (a). Por outro lado, quando é adicionado um anticorpo como o Avastin que liga ao VEGF livre na matriz extracelular a ligação entre o VEGF e o receptor VEGF-2 diminui. Nesse caso, o núcleo celular não recebe sinalização e a célula não estará ativa à angiogênese, como ilustra a Fig.2.7 (b).

Como discutido anteriormente, um dos modelos que melhor representa a vasculogênese considera que a principal fonte de VEGF está concentrada em domínios na matriz extracelular. Estes domínios criam caminhos que orientam a migração das células endoteliais ao longo do processo de formação da rede vascular. Os domínios de VEGF já foram identificados experimentalmente em processos de clivagem *in vitro* por fluorescência, como mostrada na Fig.2.7 (c). As células tendem a se deslocar em direção aos domínios de VEGF como ilustra Fig.2.7 (d) [34]. Sendo assim a aplicação do Avastin implica basicamente em diminuir a concentração de VEGF nos microdomínios alterando assim o processo de sinalização e migração celular ao longo da formação da rede vascular.

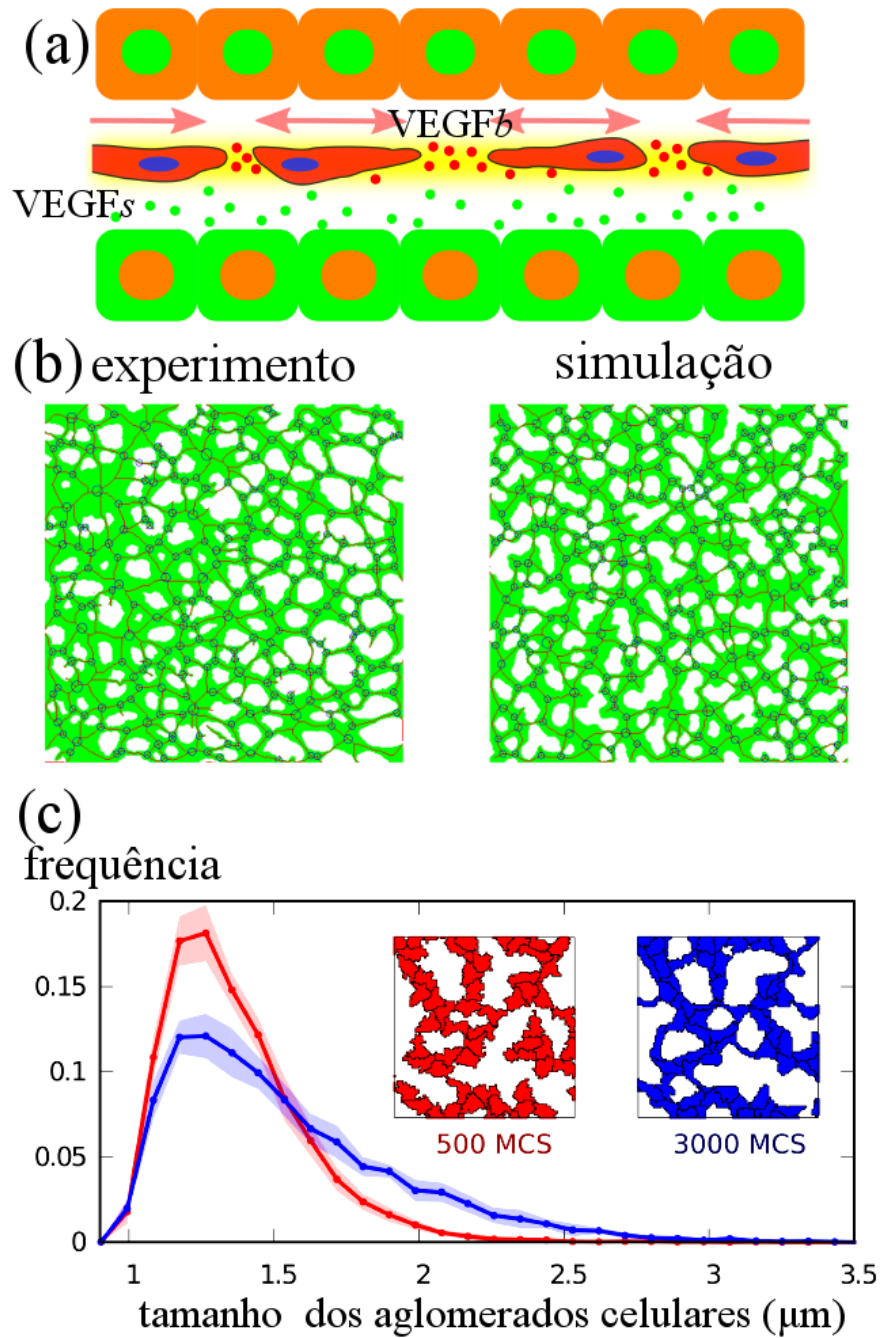


Figura 2.6: (a) Modelo para a vasculogênese proposto por Kohn-Luque e Walter de Back supõe que os angioblastos produzem moléculas na matriz extracelular que possuem microdomínios com grande afinidade ao VEGF, ilustrado pela região em amarelo. A fração ligada de VEGF está representada por $VEGF_b$. Esse modelo também considera que a fonte principal de VEGF é produzida em tecidos nas vizinhanças das células endoteliais e está identificado por $VEGF_s$. (b) Estrutura de rede obtida experimentalmente e calculada pelo modelo para um determinado estágio ao longo da formação da rede vascular. (c) Resultados das simulações para a distribuição dos tamanhos considerando 500 MCS e 3000 MCS ao longo do processo de formação da rede. Adaptada de [16]

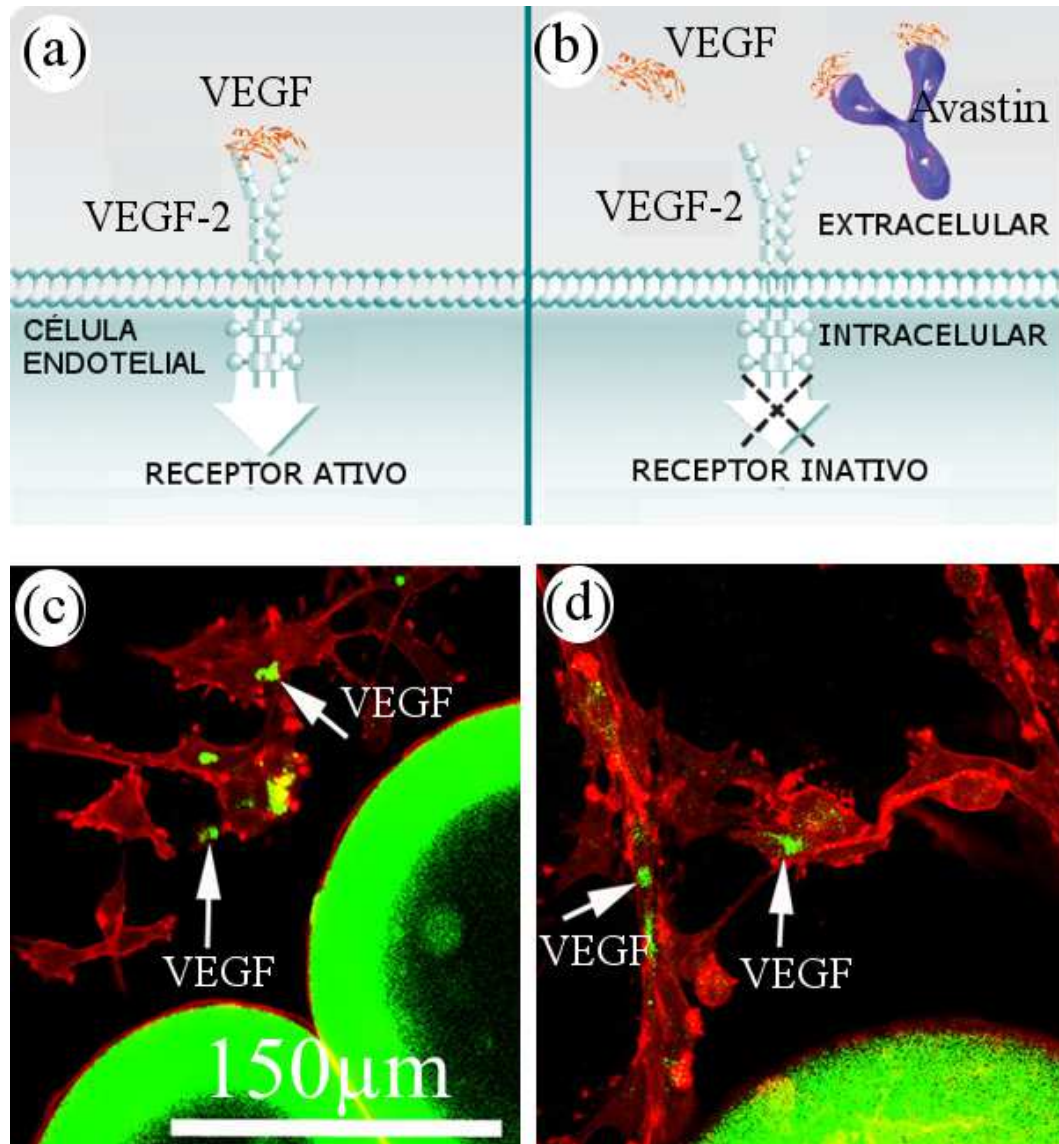


Figura 2.7: (a) O VEGF livre se liga ao receptor na membrana da célula endotelial, VEGF-2, que envia uma sinalização ao núcleo e a célula se torna ativa à angiogênese. Em contrapartida em (b) o Avastin se liga ao VEGF impedindo que ele se ligue ao VEGF-2 e célula endotelial torna-se inativa à angiogênese. (c) Domínios de VEGF na matriz extracelular de células endoteliais. (d) VEGF se concentra nas regiões de migração das células endoteliais. Figuras (a) e (b) adaptadas de [35]. Figuras (c) e (d) retiradas de [34].

Capítulo 3

A física estatística aplicada em processos dinâmicos

Neste capítulo será apresentado uma revisão dos conceitos em física estatística utilizados na caracterização de processos dinâmicos. Usamos alguns conceitos em física estatística com o objetivo de descrever a dinâmica de formação da rede vascular no embrião. O tratamento da física estatística aplicado à vasculogênese se mostrou bastante elegante devido a habilidade dessa teoria em caracterizar processos dinâmicos e sua relação com a teoria de grafos. A teoria de grafos fornece vários parâmetros que podem ser usados para caracterizar a organização estrutural e hierárquia de uma rede. Essas grandezas serão utilizadas para descrever a topologia da rede vascular em formação e para caracterizar a percolação no sistema. Nas seções seguintes vamos discutir alguns conceitos fundamentais em física estatística para descrever a vasculogênese como: dimensão fractal, teoria de grafos, percolação e densidade média de aglomerados. Ainda neste capítulo, apresentaremos alguns trabalhos da literatura que estudam a auto-organização de aglomerados celulares em uma rede única de capilares seja a partir de dados experimentais ou por meio de resultados numéricos oriundos de modelos teóricos.

3.1 Dimensão fractal

Na segunda metade do século XX Mandelbrot mostrou que grande parte dos objetos na natureza como: as costas marítimas, as superfícies das nuvens e as ramificações em uma árvore exibem uma geometria particular que é diferente da geometria euclidi-

ana [36]. Sendo assim, ele criou o nome fractal para essas formas complexas no intuito de expressar que a geometria exibida por objetos na natureza pode ser caracterizada por uma dimensão não-inteira (fractal). A partir de então a análise fractal passou a ser utilizada para caracterizar diversos sistemas e fenômenos físicos [36, 37, 38]. No final do século XX, a análise fractal expandiu horizontes além da física e se mostrou muito eficiente para caracterizar diversos padrões em sistemas biológicos, como colônias de bactérias e fungos em crescimento. Os resultados experimentais obtidos dessas colônias apresentaram uma relação de proporcionalidade entre o crescimento das colônias e a dimensão fractal exibida pelos padrões [39]. A partir de então, a análise fractal passou a ser usada como uma ferramenta pioneira capaz de caracterizar padrões nas ciências biomédicas [39, 40, 41, 42, 43, 44].

A dimensão fractal, D_f , é uma grandeza que está diretamente relacionada à auto-similaridade da fração ocupada por um determinado objeto imerso em uma área ou volume. Um objeto fractal apresenta auto-similaridade, isso significa que uma mudança na escala ou a ampliação de uma determinada região em pequenas partes exibe o mesmo padrão da estrutura geral do objeto inteiro. Um exemplo de uma estrutura fractal está ilustrado na Fig.3.1, uma foto obtida por fluorescência de uma rede vascular, em que é possível observar a auto-similaridade das ramificações vasculares em diferentes escalas de observação. A dimensão que trabalhamos usualmente é a dimensão euclidiana, d , a qual representa uma dimensão bem definida de imersão do objeto no espaço, por exemplo: um ponto possui $d = 0$, uma reta possui $d = 1$, e um plano possui $d = 2$. Em contrapartida, um objeto fractal possui uma dimensão fractal que transita em um intervalo aberto da dimensão euclidiana assim a dimensão fractal, D_f , exibida pela topologia de redes vasculares está contido em um intervalo aberto entre a dimensão euclidiana de uma reta e de um plano $1 < D_f < 2$. Como ilustra a Fig.3.1 a topologia da rede vascular exibe auto-similaridade, e a análise fractal tem sido amplamente aplicada para caracterizar topologias vasculares [46, 47]. Em especial, a análise fractal pode ser usada para caracterizar alterações na morfologia vascular promovida por patologias como o câncer [40], hipertensão e diabetes [48], alzheimer [49], entre outras [42].

A retina humana exibe um estrutura hierárquica e a análise fractal vem sendo usada para detectar alterações topológicas na vasculatura da retina promovida por doenças como diabetes e hipertensão [41, 48, 43]. A Fig.3.2 apresenta a topologia vascular da retina: (a) em um indivíduo saudável que apresenta uma topologia vascular normal (N), (b) em um paciente com hipertensão, a topologia vascular de um hipertenso (H) apresenta uma rarefação na estrutura da árvore vascular e (c) em um paciente diabé-

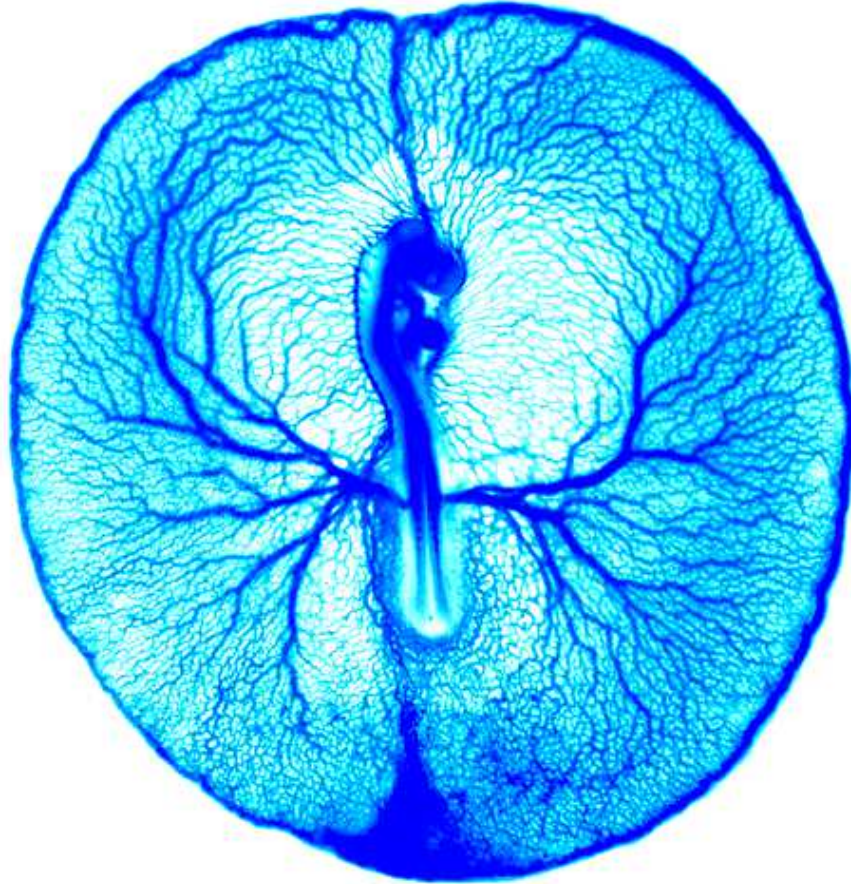


Figura 3.1: Imagem de fluorescência apresentando a rede vascular completamente formada em um embrião de galinha. As ramificações vasculares exibem auto-similaridades em diferentes escalas de ampliação. Retirada de [45].

tico, a topologia vascular de um diabético, exibe uma morfologia vascular com poucos vasos de menor diâmetro. A dimensão fractal, D_f , apresentada na figura foi calculada para os grupos: controle ou normal (N) $D_f = (1.61 \pm 0.02)$; de pacientes hipertensos (H) $D_f = (1.54 \pm 0.06)$; e de pacientes diabéticos (D) $D_f = (1.55 \pm 0.05)$. Estes dados experimentais certificam que a dimensão fractal é sensível às mudanças topológicas promovidas pela diabetes e hipertensão na vasculatura da retina. Com o propósito de ilustrar a relação entre a dimensão fractal, D_f , e a complexidade de um sistema a Fig.3.3 apresenta os vasos do córtex cerebral humano ao longo do desenvolvimento fetal para (a) 4^o mês, (b) 5^o mês, (c) 6^o mês e (d) 7^o mês [50]. A dimensão fractal foi calculada aplicando as topologias do córtex cerebral humano o método de contagem de caixas, apresentado na Seção 4.2 do Capítulo 4. O estágio inicial ilustra o padrão vascular mais simples extraído no 4^o mês do desenvolvimento fetal, Fig.3.3 (a), conse-

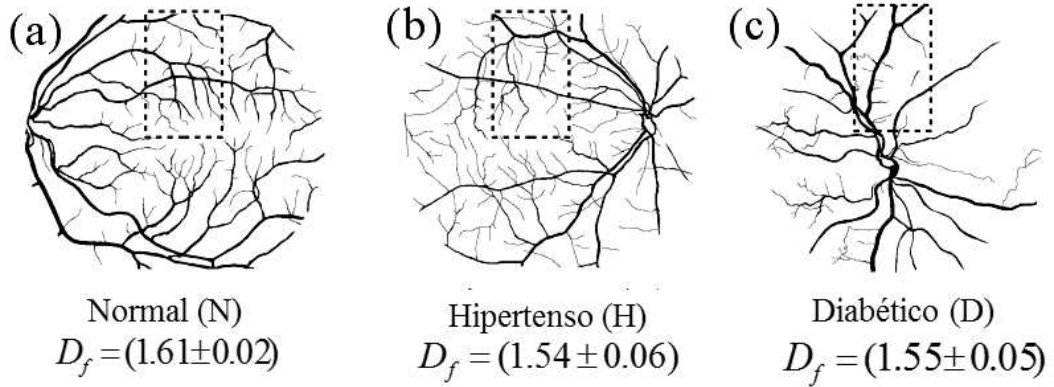


Figura 3.2: Ilustração da topologia vascular da retina em três casos diferentes: (a) indivíduo saudável ou normal (N), (b) paciente com hipertensão e (c) paciente com diabetes. Os valores apresentados para a dimensão fractal com o respectivo desvio padrão foram calculados para: um grupo de 10 indivíduos normais, 8 pacientes hipertensos e 9 pacientes diabéticos. Adaptada de [48]

quentemente esse padrão exibe a menor dimensão fractal, $D_f \approx 1.3$ [50]. Entretanto o padrão obtido para o córtex cerebral humano no 7^o mês ao longo do desenvolvimento fetal exibe a maior dimensão fractal, $D_f \approx 1.6$ [50], e conseqüentemente essa rede exibe um número maior de conexões entre as regiões do cérebro como mostra Fig.3.3 (d). Assim podemos fazer a seguinte associação, a medida que a complexidade das topologias do córtex cerebral humano aumenta a dimensão fractal extraída dos padrões também aumenta. Nessa tese, com o objetivo de quantificar a complexidade da rede vascular em formação, ao longo de 15h do desenvolvimento embrionário, calculamos a dimensão fractal nas topologias das redes vasculares para os dois grupos estudados e os resultados serão apresentados no Capítulo 5.

3.2 Teoria de grafos e redes

A teoria de grafos é uma ampla área de estudo da matemática aplicada em ciência de redes para codificar sistemas complexos. Nos últimos anos a representação das interações de sistemas complexos em redes cresceu bastante e ganhou um importante espaço na física biológica, podendo ser aplicada desde mapeamento das doenças humanas [51] até o mapeamento das interações entre proteínas em um organismo unicelular [52, 53]. Um dos principais desafios da biologia é entender como interações intercelulares desempenham um papel chave na estrutura e no funcionamento de uma célula

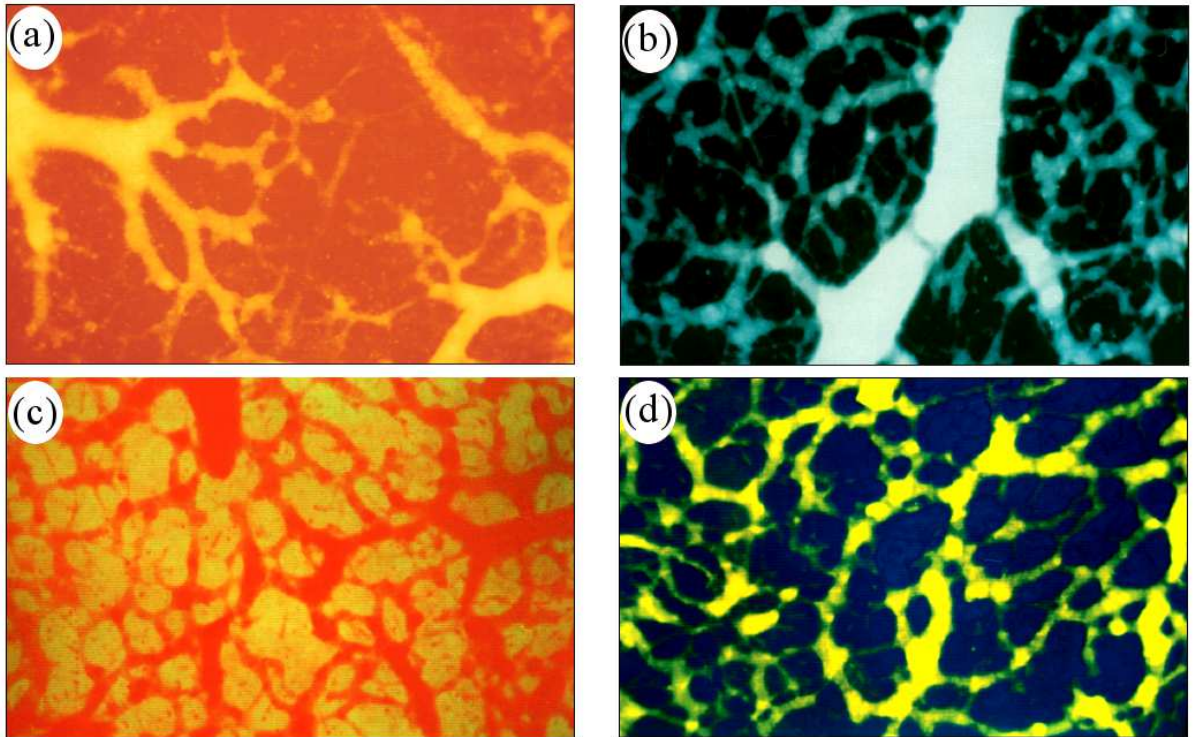


Figura 3.3: Padrões vasculares do córtex cerebral humano ao longo do desenvolvimento fetal e os respectivos valores calculados para a dimensão fractal: (a) 4^o mês possui $D_f \approx 1.26$; (b) 5^o mês possui $D_f \approx 1.53$; (c) 6^o mês possui $D_f \approx 1.60$ e (d) 7^o mês possui $D_f \approx 1.60$. Adaptada de [50].

viva [52]. Por meio da ciência de redes é possível estudar as estruturas e a dinâmica das interações de uma gama muito grande dos sistemas complexos [54]. De um modo geral, uma rede é qualquer sistema que pode ser matematicamente representado como um grafo cujos vértices identificam os elementos do sistema e o conjunto de ligações existentes entre eles representa as interações, ou a relação, entre os elementos da rede. Para ilustrar, a representação de uma rede real, a Fig.3.4 apresenta as interações entre as proteínas em um organismo unicelular pertencente ao reino dos Fungos. Esse organismo é a levedura utilizada na produção do pão, da cerveja, além de ser usada para a produção de etanol.

Utilizando-se a teoria de grafos foi possível estudar a vasculogênese em uma perspectiva diferente da apresentada na literatura, pois a partir das topologias de redes vasculares medimos alguns parâmetros de rede que foram fundamentais para caracterizar a percolação no sistema. A completa descrição da metodologia usada na

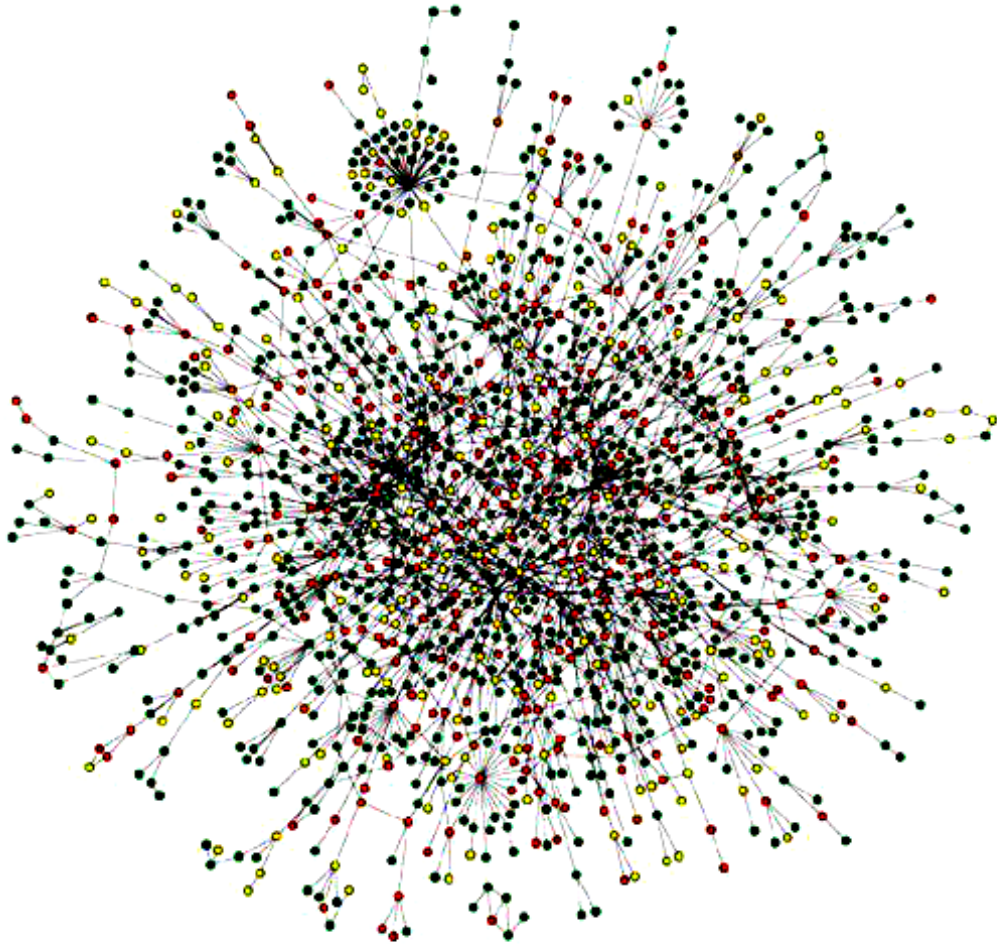


Figura 3.4: Mapa das interações proteína-proteína na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo eucariota unicelular que pertence ao reino dos Fungos. A cor de cada vértice indica o efeito fenotípico na rede ao remover uma determinada proteína (vermelho=letal; verde=não letal; laranja=crescimento lento e amarelo=desconhecido). Retirada de [53].

extração das topologias assim como a obtenção da matriz de adjacência a partir das imagens, será apresentada no Capítulo 4.

3.2.1 Caracterização e a estatística de grafos

A topologia de redes vasculares foi codificada considerando-se os vasos como as conexões e os pontos de bifurcações representam os vértices da rede vascular em formação. Tal representação da topologia de rede em um grafo formado por vértices e

suas conexões foi um passo crucial que permitiu tratar o sistema em uma perspectiva diferente, por meio da aplicação das ferramentas proveniente da teoria de grafos. A Fig.3.5 (a) ilustra um grafo típico obtido neste trabalho, formado por vértices e suas conexões, extraído da topologia de uma rede vascular completamente formada. A distribuição espacial das bifurcações da rede é codificada em vértices, e as conexões entre os vértices representam os *links* no grafo. O grafo ilustrado na Fig.3.5 (a) está imerso em um plano (x, y) e a distribuição espacial dos vértices é análogo à distribuição espacial dos vértices em um grafo planar. Em teoria de grafos um grafo de n vértices é definido planar se a distribuição espacial dos n vértices em um plano não apresenta cruzamentos entre os *links* como ilustra a Fig.3.5 (b). Por outro lado, um grafo com o mesmo número de vértices é definido como um grafo não planar se este apresenta cruzamentos entre os *links* que conectam os n vértices do grafo como ilustra a Fig.3.5 (c) [55]. Em ciência de redes há dois tipos de grafos característicos e são denominados como

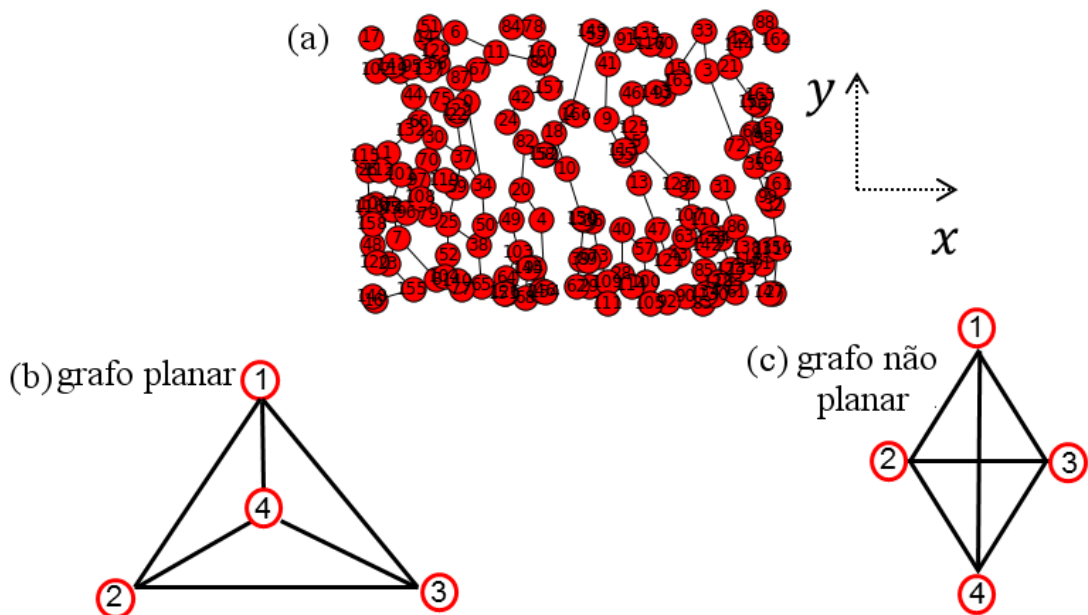


Figura 3.5: (a) Representação gráfica de uma rede vascular completamente formada. Este grafo ilustra a distribuição espacial dos vértices e suas conexões, em que cada vértice do grafo ilustra uma bifurcação na rede vascular, e os *links* entre os vértices da rede ilustra as conexões no grafo. Ilustração de um grafo planar (b) e de um grafo não planar (c).

grafos *não-direcionados* e *direcionados*, como ilustra Fig.3.6 (a),(b) respectivamente. Em um grafo não-direcionado a relação de adjacência é simétrica, ou seja, um vértice i

é adjacente a um vértice j se e somente se j é adjacente a i . Em um grafo direcionado essa relação de adjacência não é simétrica, ela é determinada pelo sentido das conexões estabelecidas entre os vértices do grafo. Na Fig.3.6 (b) a adjacência é ilustrada pelo sentido das setas, ou seja, os vértices 1 e 4 estão conectados ao vértice 2, mas o vértice 2 não está conectado a nenhum vértice. Neste trabalho consideramos a topologia de

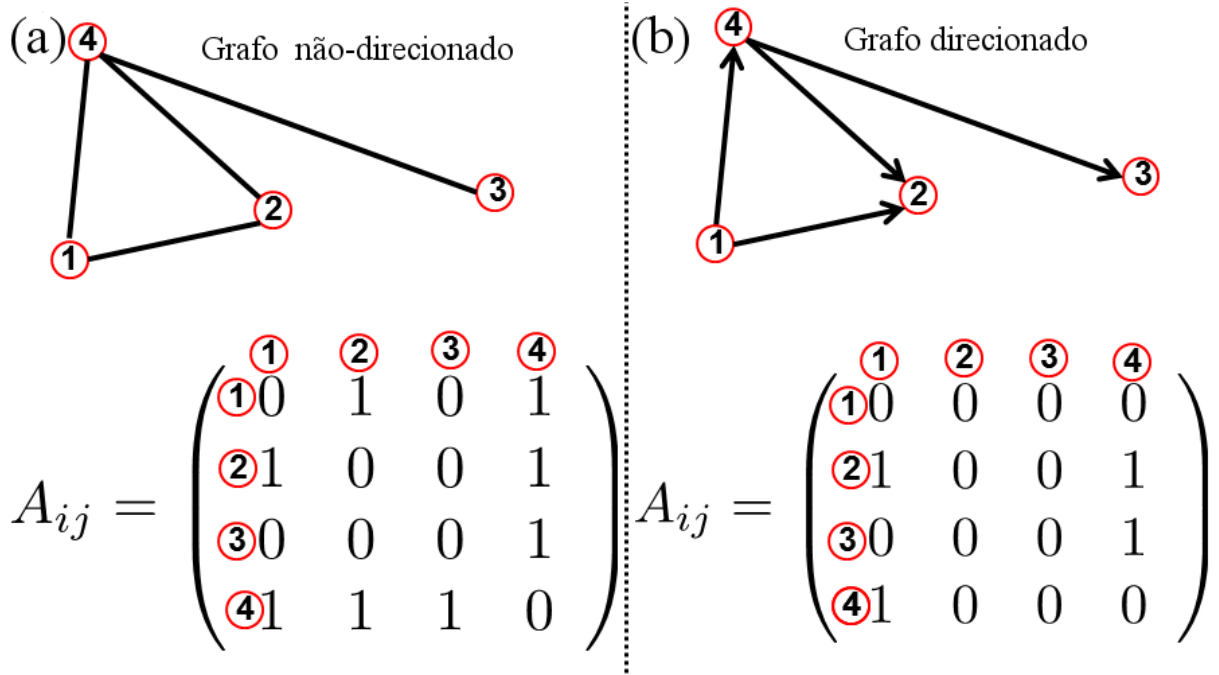


Figura 3.6: Representação da matriz de adjacência de grafos (a) não-direcionados, e (b) direcionados respectivamente. Adaptada de [54]

uma rede vascular como um grafo não-direcionado e planar. Um grafo não-direcionado é definido como um par de conjuntos dado por $G(V,E)$, em que V representa um conjunto de vértices, e E representa um conjunto de conexões entre os vértices do grafo. O conjunto de vértices V é composto por i vértices, ou seja, se uma rede possui N vértices a nomenclatura usada para identificar cada elemento do conjunto é dada por $V = V(i, j, \dots, N)$. Uma ligação ou a relação entre dois vértice quaisquer i e j representa uma conexão do grafo, (i, j) . O conjunto de conexões é representado pelo conjunto $E = E((i, j), (j, k), \dots, (i, N))$, e é extremamente importante na caracterização do grafo. O número total de vértices, N , define a ordem de um grafo. O número máximo de ligações de um grafo de ordem N é definido como o número de maneiras em que podemos escolher dois vértices quaisquer deste grafo dentre o total de N vértices. Para um grafo não direcionado e não planar o número máximo de conexões é dado pela

combinação de N vértices 2 a 2, ou seja, $\frac{N(N-1)}{2}$. Enquanto que para um grafo planar e não direcionado o número total conexões é dado por $(3N - 6) = 3(N - 2)$ [56].

Um aspecto importante na caracterização dos grafos é a obtenção de parâmetros estatísticos que descrevam a distribuição das conexões. Para tal análise é preciso codificar matematicamente um grafo como um conjunto de vértices e suas respectivas conexões. A representação matemática do grafo é denominada em ciência de redes de *matriz de adjacência*, \mathbf{A} [$N \times N$], (sendo N número de vértices) como elementos $A_{ij} = 1$ se os vértices i e j estiverem conectados e $A_{ij} = 0$ caso contrário. Fig.3.6 ilustra a obtenção da matriz de adjacência de dois tipos característicos de grafos não direcionado (a) e direcionado (b), respectivamente.

A seguir, apresentamos um breve resumo das métricas de redes [56, 52, 57, 54, 58, 59] implementadas para caracterizar as redes obtidas durante o processo de vasculogênese. A acessibilidade dos vértices, ou seja, as conexões presentes na rede representam um aspecto importante acerca da estrutura dos grafos. O grau de cada vértice i do grafo, k_i , é determinado pelo número de conexões que esse vértice possui com os vértices adjacentes. Nesse sentido o grau de cada vértice é definido por,

$$k_i = \sum_{j=1}^N A_{ij} . \quad (3.1)$$

- *Distribuição de graus*, $P(k)$, é a probabilidade de que um vértice escolhido aleatoriamente tenha k vizinhos. Essa distribuição é calculada pela razão entre o número de vértices que possuem k vizinhos, $N(k)$, pelo número total de vértices, N :

$$P(k) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_{k_i, k} . \quad (3.2)$$

No intuito de ilustrar a distribuição de graus, a Fig.3.7 apresenta (a) um grafo com 4 vértices conectados, que exibe um vértice de grau 1, dois vértices de grau 2 e um vértice de grau 3. A distribuição de graus desse grafo está ilustrada na Fig.3.7 (b). Agora vamos avaliar um grafo com uma topologia diferente, ilustrado na Fig.3.7 (c), neste grafo todos os vértices apresentam grau 2. Assim, a distribuição de graus desse grafo está concentrada no grau 2 como ilustra Fig.3.7 (d).

- *O grau médio*, $\langle k \rangle$, de uma rede representa o primeiro momento da distribuição $P(k)$ da rede e pode ser calculado como:

$$\langle k \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N k_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N A_{ij} . \quad (3.3)$$

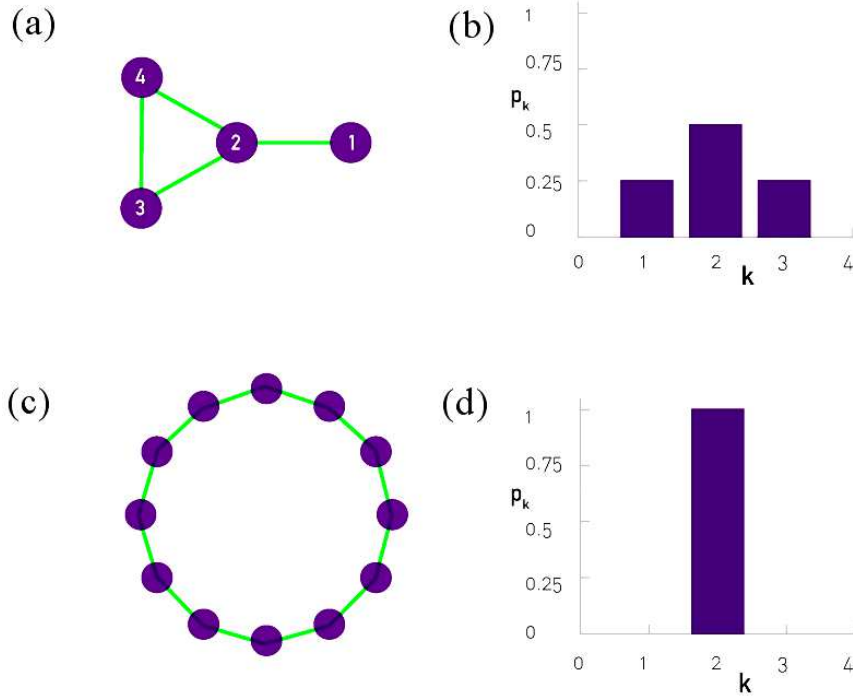


Figura 3.7: Representação de diferentes grafos com a respectiva distribuição de graus. (a) Grafo com 4 vértices com suas respectivas conexões. (b) Distribuição de grau da topologia de rede apresentada em (a), nessa distribuição observa-se que as conexões estão distribuídas em torno de um valor médio, $k = 2$. (c) Grafo de N vértices em que cada vértice possui o mesmo grau de conexões. (d) Distribuição de grau do grafo exibido em (c), a distribuição está concentrada em um único valor de $k = 2$. Adaptada de [54]

- *O índice gama*, γ , mede a conectividade em uma rede. Ele é definido como a razão entre o número de conexões na rede, n_ℓ , pelo o número máximo possível de conexões entre os vértices, que em um grafo planar é igual a $3(N - 2)$. Sendo assim, a expressão do índice γ é dada por:

$$\gamma = \frac{n_\ell}{3(N - 2)}. \quad (3.4)$$

O valor de gama encontra-se no intervalo, $\gamma \in [0, 1]$, pode-se observar que $\gamma = 0$ representa um caso em que não há conexões entre os vértices, enquanto que $\gamma = 1$ corresponde a máxima conexão na rede [59, 56].

- *O menor caminho médio* de um grafo, $\langle L \rangle$, mede uma distância característica entre cada par de vértices na rede [60, 58, 56]. A distância d_{ij} entre dois vértices

i e j é calculada como o número mínimo de conexões que devem ser percorridas para ir de i até j . Considerando todos os pares de vértices na rede o menor caminho médio da rede é dado por:

$$\langle L \rangle = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i \neq j} d_{ij}. \quad (3.5)$$

- *Treeness*, ϕ , é usada para medir o quanto a topologia de uma rede exibe uma organização hierárquica [61]. Um grafo do tipo árvore, por exemplo, exibe uma grande hierarquia entre as conexões dos vértices e pode ser descrito como um conjunto de vértices conectados sem caminhos fechados. A *Treeness* é definida pela Eq.3.6 [59] como:

$$\phi = \frac{\xi_{\text{Tree}}}{\langle \xi \rangle}. \quad (3.6)$$

Em que ξ_{Tree} representa o tamanho da rede sem circuito fechado, e $\langle \xi \rangle$ corresponde ao tamanho original da rede. A partir dessa definição verifica-se que uma rede do tipo árvore possui $\phi = 1$, e quanto mais circuitos fechados a rede possui a *treeness* dessa rede aproxima de zero, $\phi \approx 0$.

- O *coeficiente de agrupamento*, $\langle C \rangle$, mede a coesão da rede. É calculado como a média de todos os coeficientes de agrupamento locais (ou de cada vértice i) na rede, dividida pelo número total de vértices N . O coeficiente de agrupamento local é dado pela razão entre o número ligações entre os vizinhos conectados ao vértice i , e_i , e o número máximo de conexões entre eles $k_i(k_i - 1)/2$:

$$\langle C \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{2e_i}{k_i(k_i - 1)}. \quad (3.7)$$

Por definição, o valor do coeficiente de agrupamento médio da rede está no intervalo: $0 \leq \langle C \rangle \leq 1$, [60, 58]. Com o intuito de ilustrar o significado geométrico dessa grandeza a Fig.3.8 ilustra o vértice i , de grau $k_i = 4$, em diferentes configurações de vizinhança. As conexões entre os vértices vizinhos ao vértice i são diferentes e conseqüentemente o coeficiente de agrupamento local C_i em cada caso também é diferente. O coeficiente de agrupamento local mede a densidade local de conexões na vizinhança de um vértice. Observe por exemplo que na Fig.3.8 (a) nenhum dos vértices vizinhos ao vértice i estão conectados, $e_i = 0$, e conseqüentemente usando a Eq.3.7 obtemos $C_i = 0$. Ao passo que na Fig.3.8 (c) todos os vértices estão conectados, $e_i = 6$, e conseqüentemente usando a Eq.3.7 temos que $C_i = 1$.

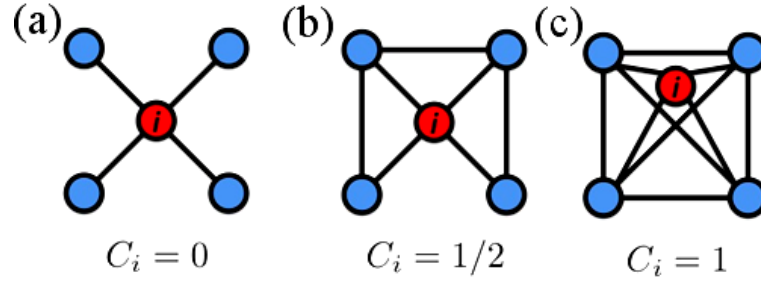


Figura 3.8: Coeficiente de agrupamento local C_i do vértice i , o qual possui grau $k_i = 4$, e está ilustrado em três configurações de vizinhanças diferentes. (a) Nenhum vizinho conectado assim $C_i = 0$, (b) dois vizinhos que apresentam dupla conexão, $C_i = \frac{1}{2}$, (c) todos os vizinhos conectados, $C_i = 1$. Retirado de [54].

- *Coeficiente de correlação dos graus*, r , também conhecido como coeficiente de associatividade, mede a tendência dos vértices com graus similares estarem conectados entre si, ou de conectarem com vértices com graus distintos [62, 63] e pode ser escrito como:

$$r = \frac{\langle k_i k_j \rangle - \langle k \rangle^2}{\langle k^2 \rangle - \langle k \rangle^2}, \quad (3.8)$$

em que $\langle k_i k_j \rangle$ corresponde a média dos produtos dos graus de vértices que estão conectados uns aos outros, $\langle k \rangle^2$ é o quadrado do grau médio do vértice e $\langle k^2 \rangle$ representa o segundo momento da distribuição de graus $P(k)$. A Fig.3.9 ilustra três tipos de grafos, em cada um a organização estrutural das ligações entre os vértices na rede é diferente. *Grafo associativo*: os vértices mais conectados, *hubs*, tendem a se conectarem entre si como ilustra Fig.3.9 (a), o coeficiente de associatividade nesse grafo é menor que zero, $r < 0$. *Grafo neutro*: vértices se conectam entre si com probabilidades aleatórias como ilustra Fig.3.9 (b), o coeficiente de associatividade nesse grafo é nulo, $r = 0$. *Grafo desassociativo*: os vértices mais conectados tendem a se conectarem aos vértices menos conectados, ou seja os *hubs* evitam se conectarem entre si, como ilustra Fig.3.9 (c), o coeficiente de associatividade nesse grafo é maior que zero, $r > 0$.

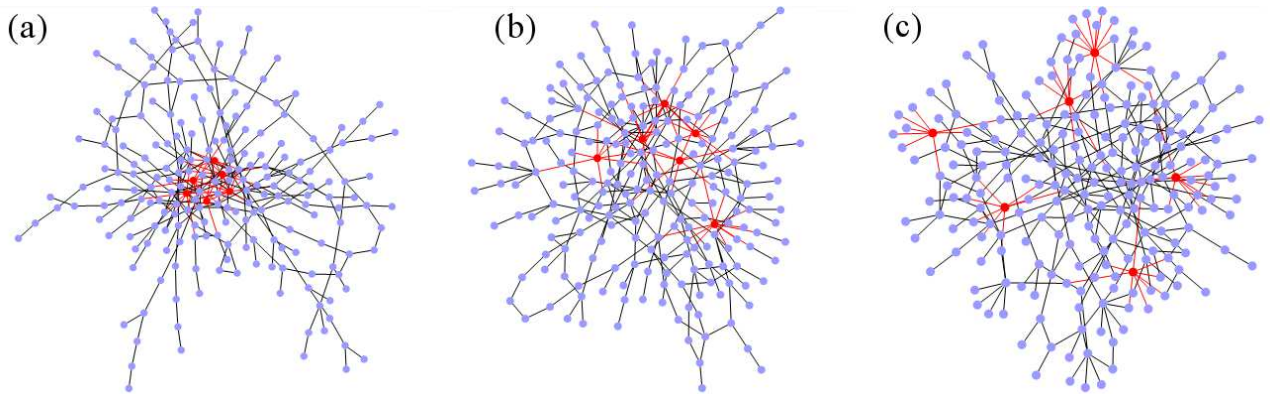


Figura 3.9: Três tipos de grafos com grau de correlação distintos. O grau de correlação extraído a partir da organização estrutural dos vértices na rede exibe três comportamentos característicos. (a) Grafo associativo, os *hubs* tendem a se conectarem entre si, e coeficiente de associatividade $r < 0$. (b) Grafo neutro, vértices se conectam entre si com probabilidades aleatórias, e o coeficiente de associatividade nesse grafo é nulo, $r = 0$. (c) Grafo desassociativo, os vértices mais conectados tendem a se conectarem aos vértices menos conectados, o coeficiente de associatividade nesse grafo maior que zero, $r > 0$. Retirada de [54].

3.3 Transição de fase para modelos de percolação

Nos últimos anos tem se desenvolvido uma vasta abordagem para tratar transições de fase fora do contexto termodinâmico. As transições de fase podem ser definidas como uma mudança abrupta e singular das propriedades macroscópicas de um sistema em função de determinados parâmetros de controle como ilustra a Fig.3.10 (a) [54, 64, 65, 66].

Com o objetivo de ilustrar uma transição de fase em um processo dinâmico analisaremos a evolução de uma rede aleatória. Para tanto, vamos considerar que em um coquetel de uma dada conferência composta de N participantes, cada participante será representado por um vértice na rede, e as conexões dessa rede serão adicionadas gradualmente por meio de encontros aleatórios entre estes participantes. A figura Fig.3.10 (b) ilustra a evolução topológica desse sistema, inicialmente possui poucos vértices conectados como está ilustrado em I e no final da conferência teremos uma configuração completamente diferente da inicial em que todos os vértices da rede estarão conectados como está ilustrado em IV . Para quantificar esse processo, vamos avaliar como o tamanho do maior aglomerado conectado

dentro da rede, S_{MA} , varia em relação ao grau de conectividade, $\langle k \rangle$. Um gráfico apresentando a relação entre a fração ocupada pelo maior aglomerado em relação ao tamanho total da rede, $\frac{S_{MA}}{S_{total}}$, e o grau de conectividade, $\langle k \rangle$, está ilustrado na Fig.3.10 (a). Observe que a fração do maior aglomerado conectado em função do grau de conectividade apresenta quatro regimes diferentes, a seguir vamos discutir um pouco sobre o comportamento geral da rede em cada um destes regimes. Regime *subcrítico I*, o grau de conectividade é menor que um, $\langle k \rangle < 1$, e ainda não existe o maior aglomerado conectado. Nesse regime os aglomerados estão desconectados e a probabilidade de que um vértice, escolhido ao acaso pertença ao maior aglomerado, p , é menor que a probabilidade crítica, p_c , assim podemos escrever $p < p_c = 1/N$. No Regime *crítico II*, o *maior aglomerado conectado* surge no sistema e o grau de conectividade da rede é da ordem de um, $\langle k \rangle \approx 1$. Nesse regime, grande parte dos vértices estão conectados ao maior aglomerado, e esse aglomerado exibe uma topologia de um grafo do tipo árvore com poucos circuitos fechados. Ainda no regime crítico, o maior aglomerado conectado liga dois extremos da distribuição de pontos. A probabilidade de um vértice escolhido ao acaso pertencer ao maior aglomerado é dado por $p = p_c = 1/N$. No Regime *supercrítico III* há apenas um componente, ou seja o maior aglomerado se alastra por todo o sistema, e exibe uma topologia em que há vários circuitos fechados. Nesse estágio, o grau de conectividade da rede é maior que um, $\langle k \rangle > 1$. A probabilidade de que um vértice escolhido ao acaso pertença ao maior aglomerado é dado por $p > p_c = 1/N$. E finalmente no regime *conectado*, há apenas um único aglomerado extremamente denso, e nesse regime o grau de conectividade da rede é muito maior que um, $\langle k \rangle \gg 1$. A probabilidade no regime conectado de um vértice, escolhido ao acaso, pertencer ao maior aglomerado é dado por $p > \frac{\ln N}{N}$ [54].

Percolação e o maior aglomerado: o aglomerado infinito de uma rede, em teoria de percolação, refere-se ao maior aglomerado conectado que surge por intermédio de uma abrupta transição no sistema. A transição é observada a partir da adição gradual de conexões aos elementos de rede inicialmente desconectados [67]. A percolação em redes físicas atribui-se às mudanças abruptas e singulares das propriedades físicas do sistema. Em propagação de doenças a percolação é também usada para detectar as fases epidêmicas e endêmicas de uma determinada doença [68, 69].

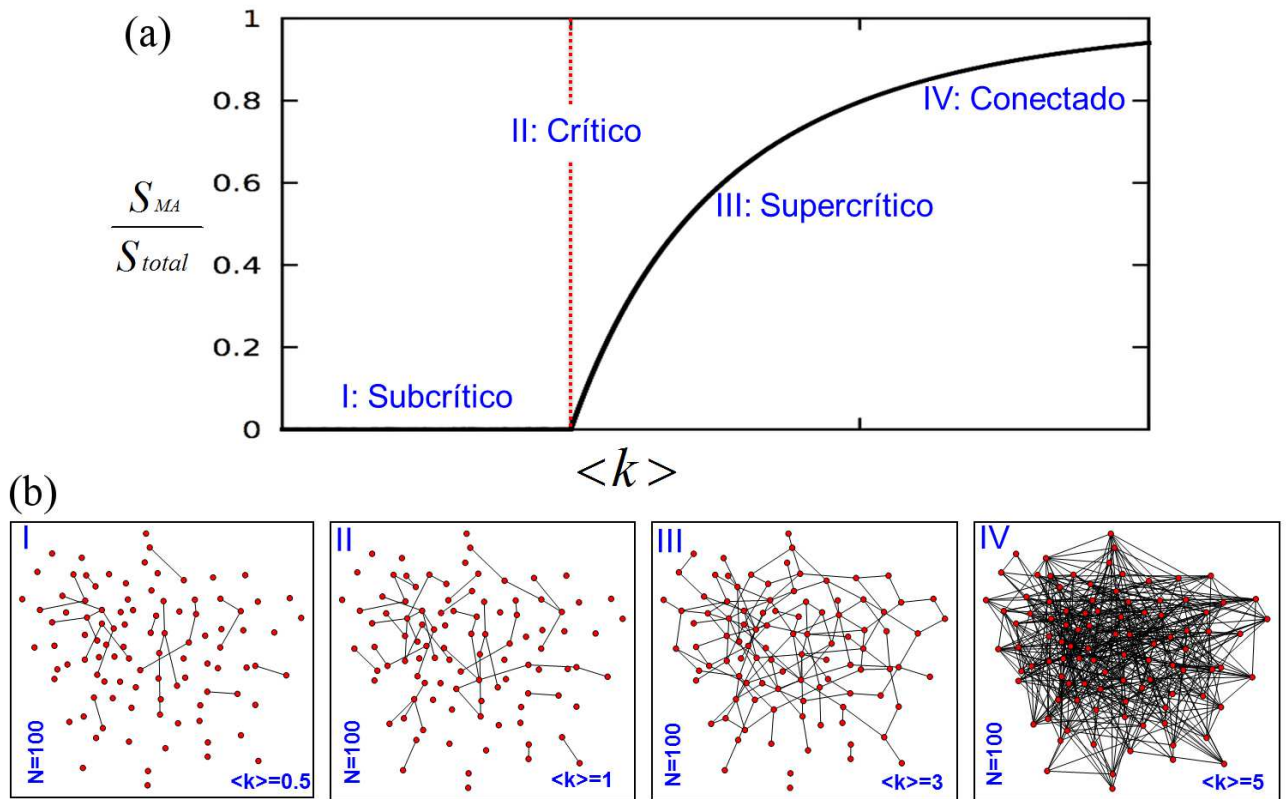


Figura 3.10: Ilustração do surgimento do maior aglomerado conectado em uma rede aleatória identificando os regimes: subcrítico I, crítico II, supercrítico III e conectado IV. (a) Fração do maior aglomerado conectado, $\frac{S_{MA}}{S_{total}}$, em função do grau de conectividade médio, $\langle k \rangle$. (b) Topologia apresentando o crescimento do maior aglomerado conectado. Adaptada de [54].

Recentemente Shin e colaboradores aplicaram o conceito de percolação para investigar a emergência do câncer colorretal a partir da mutação somática em pacientes em diferentes estágios da doença. As mutações somáticas estão diretamente relacionadas às alterações ocorridas no material genético e essas alterações podem incitar o desenvolvimento do tumor. A figura Fig.3.11 apresenta tanto o início da mutação somática em uma rede de interação proteína-proteína, como também a emergência e o alastramento do maior aglomerado conectado (MA). A percolação em um sistema biológico real pode ser observada por meio do alastramento do MA sobre a rede, o qual ilustra uma transição abrupta e singular que culmina no desenvolvimento do câncer. Fig.3.11 (a) apresenta a rede da interação proteína-proteína, ainda nesta figura está ilustrado o alastramento do maior aglomerado conectado pela rede. A figura Fig.3.11 (b) apresenta um gráfico do

tamanho do maior aglomerado conectado, S_{MA} , em função da acumulação das mutações somáticas que se propaga pela rede desencadeando o tumor colorretal. Esse gráfico exibe um comportamento típico de sistemas em que há percolação. O tamanho do maior aglomerado conectado, S_{MA} , se alastra por toda a rede e sofre uma transição abrupta e singular em um determinado valor crítico da mutação somática, desencadeando a partir desse ponto a manifestação do tumor [67]. Portanto, o alastramento do maior aglomerado conectado, ou aglomerado

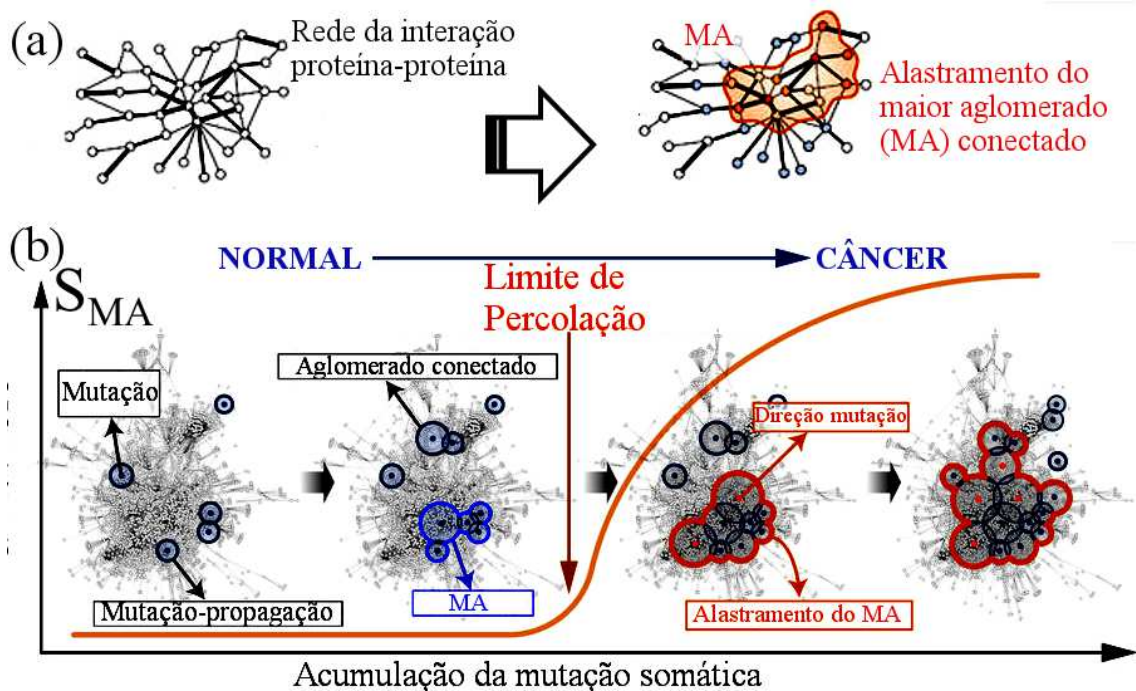


Figura 3.11: (a) Rede representando a interação proteína-proteína em um paciente diagnosticado com câncer colorretal, e o alastramento do maior aglomerado (MA) na rede. (b) Gráfico do tamanho do maior aglomerado, S_{MA} , em função da da acumulação das mutações somáticas, exibe um comportamento típico de sistemas que apresentam percolação. A percolação representa uma transição no sistema e é observada a partir de um valor crítico de mutação sinalizando o desencadeamento do tumor. Adaptada de [67].

infinito, pela rede é caracterizado por promover uma mudança abrupta e singular no sistema. A emergência do maior aglomerado conectado é definido como um ponto crítico, denominado de limite de percolação, que representa o limiar que separa dois comportamentos distintos no sistema. Acima desse limite existe o maior aglomerado conectado que se alastra por toda a rede e abaixo dele a

rede exibe algumas conexões espalhadas. A percolação está diretamente relacionada ao alastramento do maior aglomerado por todo o sistema em análise [38, 65, 64, 66].

3.4 A percolação e a formação da rede vascular.

Ao longo da formação da rede vascular a percolação possui uma relevância fisiológica importante e está diretamente relacionada a funcionalidade dos vasos sanguíneos [19]. Com o objetivo de caracterizar o alastramento do maior aglomerado conectado, Serini e colaboradores realizaram experimentos de células endoteliais em cultura para diferentes densidades iniciais de células endoteliais, n , [21]. Os resultados experimentais mostram que após 10 horas em cultura é observado a percolação no sistema para uma determinada densidade crítica de células endoteliais, n_c [21]. Abaixo dessa densidade crítica, $n < n_c$, os aglomerados celulares formam ilhas desconectadas como mostra a Fig.3.12 (a), caracterizando o ponto subcrítico da percolação. Na densidade crítica, $n = n_c \approx 100$ células/mm², ocorre o alastramento do maior aglomerado conectado pela área analisada Fig.3.12 (b), representando o ponto crítico da percolação. Acima da densidade crítica, $n > n_c$, é observada um aglomerado denso na área analisada Fig.3.12 (c,d), correspondendo ao ponto supercrítico da percolação [21].

Gamba e colaboradores propuseram um modelo baseado em quimiotaxia [19]. O principal objetivo desse modelo era reproduzir observações experimentais a partir da cultura de células endoteliais *in vitro* [21]. O modelo reproduziu os padrões observados experimentalmente e detectou a percolação para uma determinada densidade crítica de células em cultura. A figura Fig.3.12 (e-h) ilustra os padrões reproduzidos pelo modelo, as regiões em negro, representa as regiões ocupadas pelas células endoteliais. Para uma densidade crítica de células endoteliais, $n \geq n_c$, é observado o alastramento do maior aglomerado conectado na área analisada, ilustrado na Fig.3.12 (f). Abaixo dessa densidade crítica, a cultura de células endoteliais exibe aglomerados celulares desconectados, ilustrados na Fig.3.12 (f), [19]. As simulações numéricas propostas pelo modelo foram expandidas para diferentes caixas de tamanhos $L = 1, 2, 4, 8$ mm e os resultados, além de representarem as observações experimentais caracterizaram a transição de fase no sistema. A probabilidade de percolação, Π , foi apresentada em função

de $(n - n_c)L^{1/\nu}$, em que n representa a densidade de células no sistema, n_c representa a densidade crítica de células, L os tamanhos das caixas usadas e ν é um índice crítico proposto pelo modelo. A probabilidade de percolação, Π , para diferentes tamanhos de caixas, está apresentada na Fig.3.12 (i). Outro resultado importante deste modelo foi a distribuição de tamanhos, $SL^{\gamma_c/\nu}$, (em que γ_c/ν representa uma razão entre índices críticos) em função $(n - n_c)L^{1/\nu}$. A distribuição de tamanhos, ilustrada na Fig.3.12 (j), exibe um comportamento coletivo característico para a população de aglomerados em sistemas que exibem uma transição de fase .

Szábo e colaboradores mostraram que a formação de redes não era propriedade restrita às células endoteliais, alguns outros tipos de células também se organizam em estruturas reticulares como por exemplo as células da glia, Fig.3.13 (a), e as células musculares, Fig.3.13 (b). As células da glia e as células musculares cultivadas sobre um substrato de plástico exibem um padrão semelhante ao observado para células endoteliais em cultura. Sendo assim, no intuito de explicar os mecanismos que governam a formação de estruturas reticulares em culturas celulares alguns modelos teóricos assumiam que a mobilidade celular poderia estar relacionada a um estresse mecânico da célula com o substrato ao longo da auto-organização das células em cultura. Sendo assim, Szábo e colaboradores apostaram nessa idéia propondo que a organização das células em rede poderia estar relacionada à um mecanismo mais abrangente, como a atração preferencial das células por estruturas alongadas. Esse mecanismo, estritamente mecânico, retratou a organização das células em redes irregulares [28]. A Fig.3.13 (c,e) apresenta os resultados obtidos a partir de simulações numéricas, variando-se a densidade de partículas observou-se diferentes padrões de formação. O limite de percolação foi definido calculando-se o tamanho relativo do maior aglomerado conectado, P , em função da fração de volume, σ , como ilustrado na Fig.3.13 (f) [28].

Embora o modelo mecânico represente bem o limite de percolação a partir da análise do tamanho do maior aglomerado conectado, esse modelo não inclui a sinalização do VEGF, fator de sinalização da célula endotelial, que representa um elemento fundamental na dinâmica celular nos estágios iniciais de formação da rede vascular. Por outro lado, alguns modelos na literatura que consideravam a dinâmica celular governada estritamente pela sinalização do VEGF não consegui-

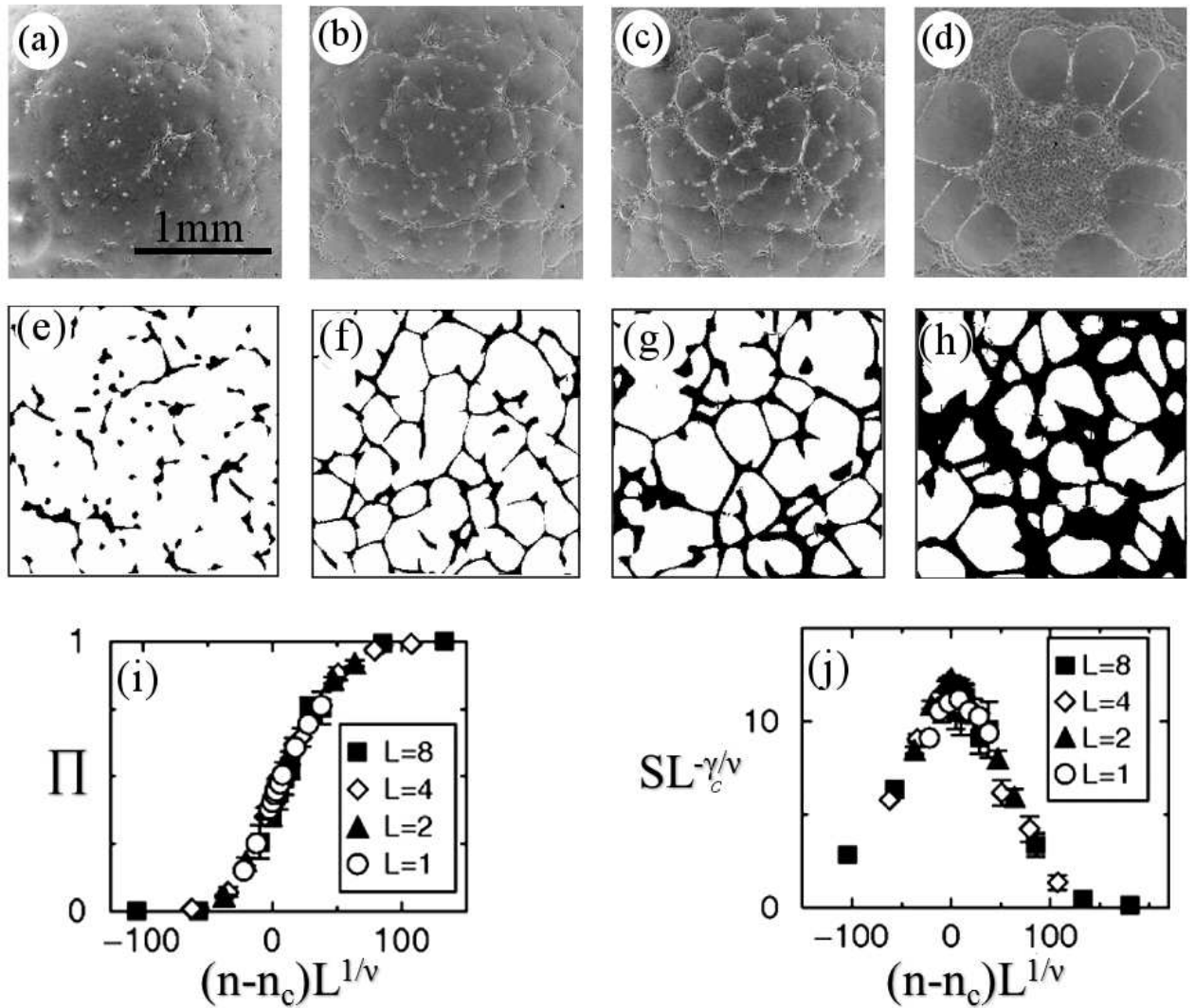


Figura 3.12: (a-d) Imagens experimentais de redes vasculares para um sistema de tamanho $L = 2$ mm observadas após 10 h de cultura para diferentes densidades iniciais de células: (a) 50 células/mm², (b) 100 células/mm², (c) 200 células/mm², (d) 400 células/mm². (e-h) Simulação numérica de um sistema de tamanho $L = 2$ mm, obtida começando a partir de quatro valores diferentes de densidades de células: (e) 50 células/mm², (f) 100 células/mm², (g) 200 células/mm², (h) 400 células/mm². Resultados numérico do modelo proposto para a probabilidade de percolação Π (i) e a distribuição de tamanho em função de $(n - n_c)L^{1/\nu}$. Adaptada de [19].

ram resultados numéricos que se ajustavam muito bem aos dados experimentais para os estágios iniciais de formação da rede. Assim Khon e colaboradores empenhados em reproduzir os estágios iniciais de formação da rede vascular não

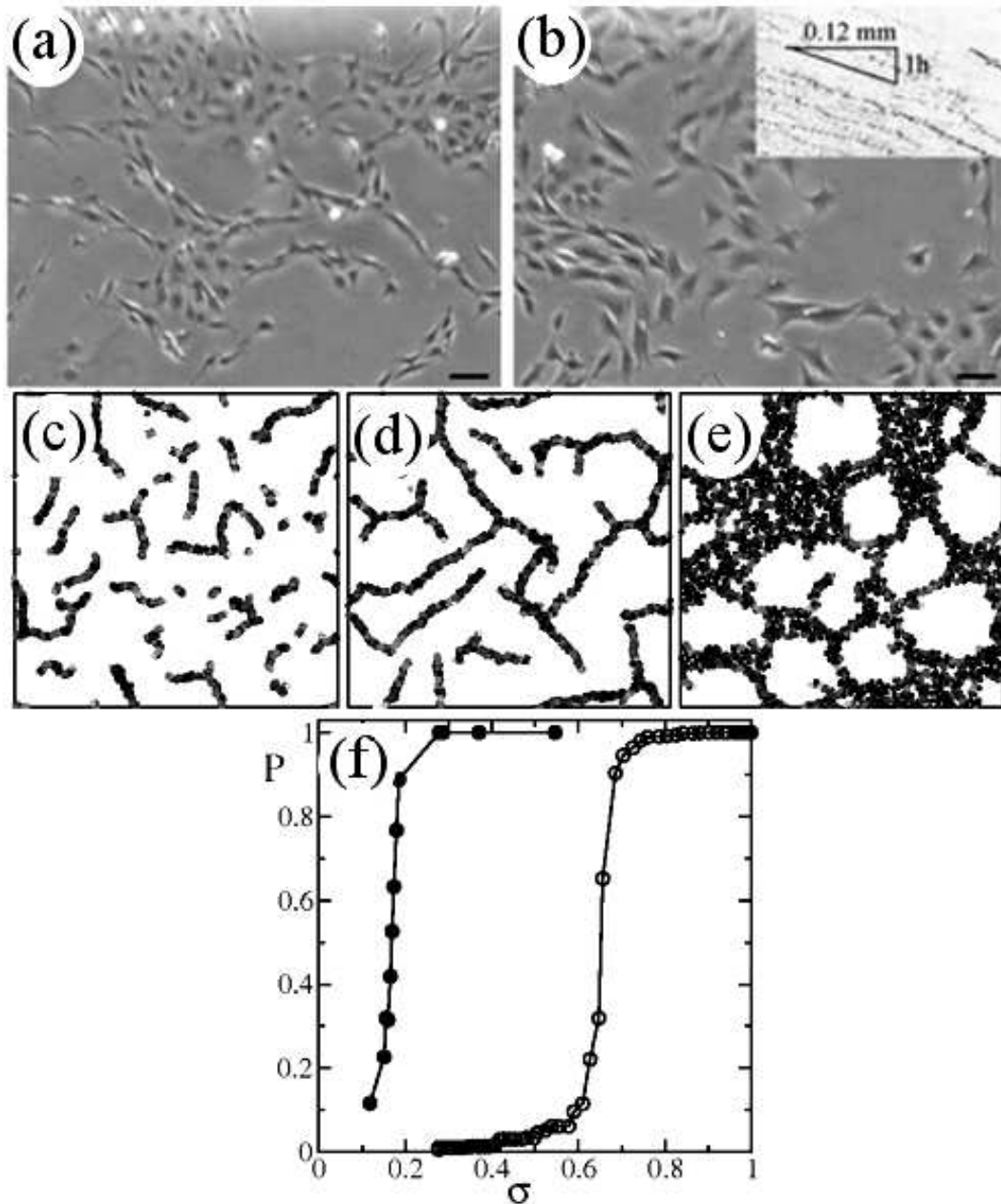


Figura 3.13: (a) células da glia, (b) células musculares. Configurações de $N = 2000$ partículas para vários valores de densidades, $\frac{N}{L^2}$, (c) 0.31, (d) 0.44 e (e) 1.54. Tamanho do maior aglomerado, P , em função da fração de volume, σ , (d). Gráfico ilustra o limite de percolação considerando o modelo de atração preferencial das partículas por estruturas alongadas que ocorre em $\sigma \approx 0.2$ (discos sólidos), que é menor que o limite de percolação para discos aleatoriamente distribuídos (círculos vazios). Adaptada de [28].

descartaram que a sinalização do VEGF desempenhava um papel fundamental na organização dos aglomerados celulares. Eles propuseram um modelo diferente em que a MEC (matriz extracelular) executava um papel de mediadora entre as células e o VEGF. Os resultados numéricos desse modelo estão apresentados na Fig.3.14. A distribuição dinâmica dos aglomerados celulares formando uma estrutura conectada ao longo do tempo em MCS (*Monte Carlo step*) estão apresentados na Fig.3.14: (a) 100 MCS, (b) 1000 MCS e (c) 3000 MCS. A evolução dinâmica deste modelo representou de maneira satisfatória os padrões observados experimentalmente nos estágios iniciais de formação da rede vascular. O modelo proposto por Khon apresentou a probabilidade de percolação, P , ilustrado na Fig.3.14 (c), e o número de estruturas, N , ilustrado na Fig.3.14 (d), em função da densidade de células. A probabilidade de percolação P apresenta um comportamento bem característico assim como nos outros modelos e exibe a percolação no intervalo de (0.5, 1.0) células/mm². O número de estruturas interagentes variável, N , proposto por Khon e colaboradores representou um importante passo para o desenvolvimento da modelagem da rede vascular em formação. Os resultados numéricos obtidos representam de maneira satisfatória o processo de aglomeração dos agregados celulares caracterizando diferentes estágios do processo: inicialmente N aumenta atingindo uma população máxima entre o intervalo de (0.5, 1.0) células/mm², posteriormente N diminui continuamente. A região hachurada em rosa, ilustrada em Fig.3.14 (c,d), exibe o comportamento coletivo característico dos aglomerados celulares ao longo da precolação.

3.5 A densidade média de vasos

Grande parte dos resultados experimentais e simulacionais apresentados na literatura identificam uma transição abrupta e singular durante o processo da vasculogênese. Assim, optamos por usar um modelo não-linear, aplicado à transição de fase [70, 71], para propor uma equação que descreva a densidade de vasos ao longo da formação da rede vascular no embrião.

Para tanto vamos considerar que a variável $\rho(t)$ representa a densidade de vasos normalizada. Com o objetivo de modelar este sistema consideraremos que $\rho(t)$ cresce a uma determinada taxa ω ao longo da formação da rede vascular no

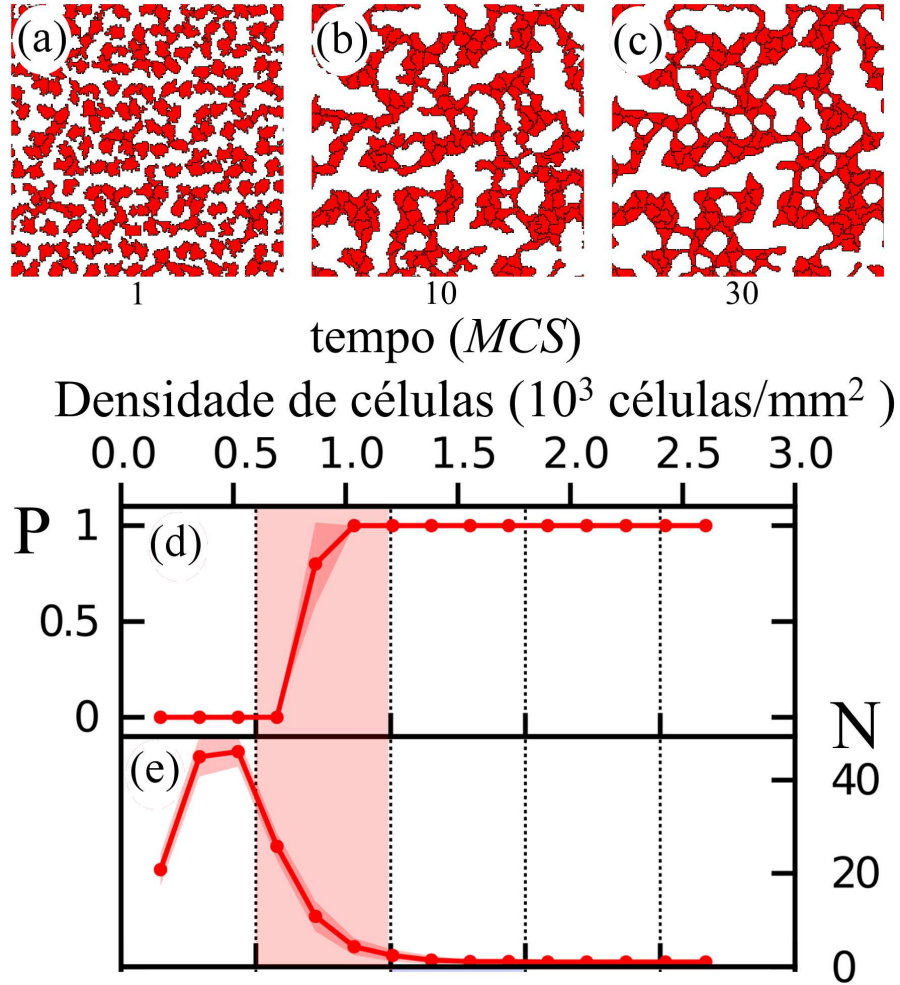


Figura 3.14: Resultados numéricos considerando-se a matriz extracelular como a mediadora entre a célula e o VEGF. Distribuição dos aglomerados celulares para três estágios da simulação em (a)100 MCS (b) 1000 MCS e (c)3000 MCS. (d) Probabilidade de percolação P em função da densidade de células. (e) Número de estruturas, N , em função da densidade de células. A região assinalada em rosa evidência o comportamento mútuo das duas grandezas P e N obtidos através da simulação ao longo da organização de aglomerados inicialmente dispersos. Adaptada de [16].

embrião. Escrevemos a variação de ρ usando a equação,

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = \omega \left(1 - \frac{\rho(t)}{\rho_{\max}} \right) \rho(t) \quad (3.9)$$

em que a constante ρ_{\max} representa a densidade máxima de vasos. Como a densidade de vasos não cresce infinitamente, ou seja, essa grandeza tende a um valor constante quando a rede vascular está completamente formada. Observe

que quando ρ for igual a ρ_{\max} a taxa de variação neste instante é nula. Isso mostra que, neste ponto, a densidade de vasos, ρ , no sistema estudado atingiu um valor máximo, ou seja, ρ atinge a saturação. Reorganizando a equação Eq.3.9 obtemos,

$$\frac{d\rho(t)}{\left[1 - \frac{\rho(t)}{\rho_{\max}}\right] \rho(t)} = \omega dt . \quad (3.10)$$

A equação, Eq.3.10, representa a variação da densidade ρ em função do tempo para um sistema de vasos em crescimento, integrando esta equação obtemos,

$$\rho(t) = \frac{1}{\left[\frac{1}{\rho_{\max}} + \left(\frac{1}{\rho_0} - \frac{1}{\rho_{\max}}\right) e^{-\omega t}\right]} , \quad (3.11)$$

em que ρ_0 representa a densidade inicial de vasos presente na região analisada. Assumimos que o modelo proposto represente de maneira satisfatória a densidade de vasos no embrião, $\rho(t)$, em função do tempo. Usando a equação, Eq.5.1, obtemos a evolução temporal de $\rho(t)$ para dois valores de taxa de crescimento distintos a saber $\omega = 1h^{-1}$ (quadrado cheio) e $\omega = 0.5h^{-1}$ (círculo cheio), ilustrado na Fig.3.15. Como podemos observar no gráfico ambas as curvas partem da mesma densidade inicial, $\rho_0 \approx 0.01$, e progridem para um valor de saturação, próximo a $\rho_{\max} = 0.5$, e a curva com maior taxa de crescimento, (quadrado cheio), atinge a saturação de maneira mais rápida.

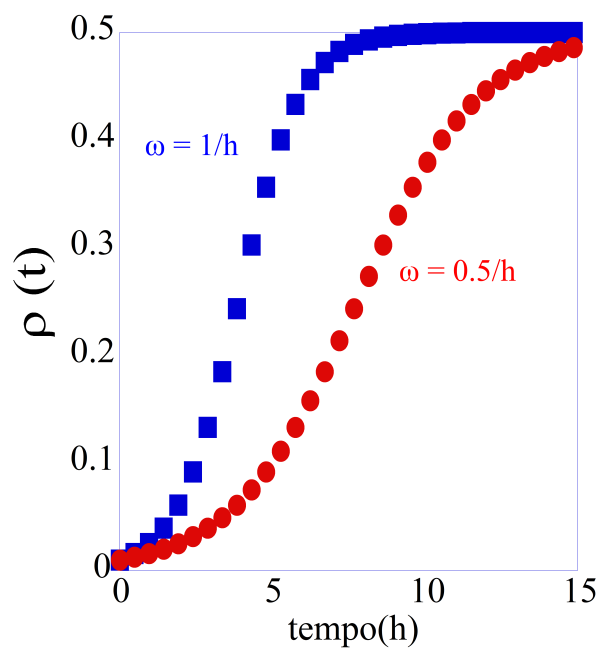


Figura 3.15: Ilustração da densidade de vasos em função do tempo para duas taxas de crescimento diferentes obtida através da Eq.5.1. Em ambos conjuntos de dados a densidade inicial, $\rho_0 \approx 0,01$, e a saturação ocorre próximo a, $\rho_{\max} = 0,5$, o conjunto de dados com a maior taxa de crescimento $\omega = 1h^{-1}$ atinge a saturação de modo mais rápido.

Capítulo 4

Métodos experimentais

Neste capítulo apresentaremos a metodologia desenvolvida neste trabalho para extrair os padrões de aglomerados celulares de redes vasculares em formação. Trataremos a metodologia em duas seções diferentes: primeiro, vamos apresentar a montagem experimental usada na aquisição das imagens da rede vascular em formação no embrião. A montagem experimental foi adaptada de modo a manter o embrião em condições favoráveis ao desenvolvimento. Segundo, vamos apresentar os processamentos realizados nas imagens para obtenção: dos padrões binários, das topologias de redes e das matrizes de adjacência. A partir dos padrões binários, das topologias de redes e das matrizes de adjacência faremos uma caracterização quantitativa obtendo parâmetros estatísticos e as métricas de rede ao longo do processo de formação da rede vascular no embrião.

4.1 Montagem experimental

Para obter os embriões, ovos de galinha *Gallus gallus domesticus* fertilizados, fornecidos pela empresa *Rivelli*, foram incubados por um período de 40 horas em uma estufa, a qual mantém o ambiente à temperatura de 37°C e com uma umidade de 50%, ilustrada na Fig.4.1 (a). Após 40 horas de incubação o embrião se encontra geralmente no estágio HH 11 [12], ilustrado na Fig.4.1 (b). Nesse estágio, o embrião é aproximadamente um disco bi-dimensional composto por duas regiões bem características, a região interna ao corpo do embrião em tonalidade (amarelo-azul) representa a *área pelucida*, ilustrada na Fig.4.1 (b), e a região ex-

terna, em vermelho, representa a *área opaca*. A montagem experimental usada na extração do embrião está ilustrada na Fig.4.1 (c). As amostras são preparadas através da extração do embrião usando papel filtro, PBS (*Phosphate-buffered saline*), e meio de cultura. O meio de cultura é preparado com *Agar*, HIMEDIA RM666, e albumina aproximadamente 12 horas antes do experimento. Após este período, o meio de cultura apresenta a consistência de um gel, como ilustrado na Fig.4.1 (d). O embrião recém-extraído é depositado sobre a superfície do gel. A amostra preparada é levada à uma incubadora acoplada ao microscópio de campo-claro, ilustrado na Fig.4.1 (e). A completa descrição apresentando os passos para a preparação do meio de cultura está apresentada em [72, 73].

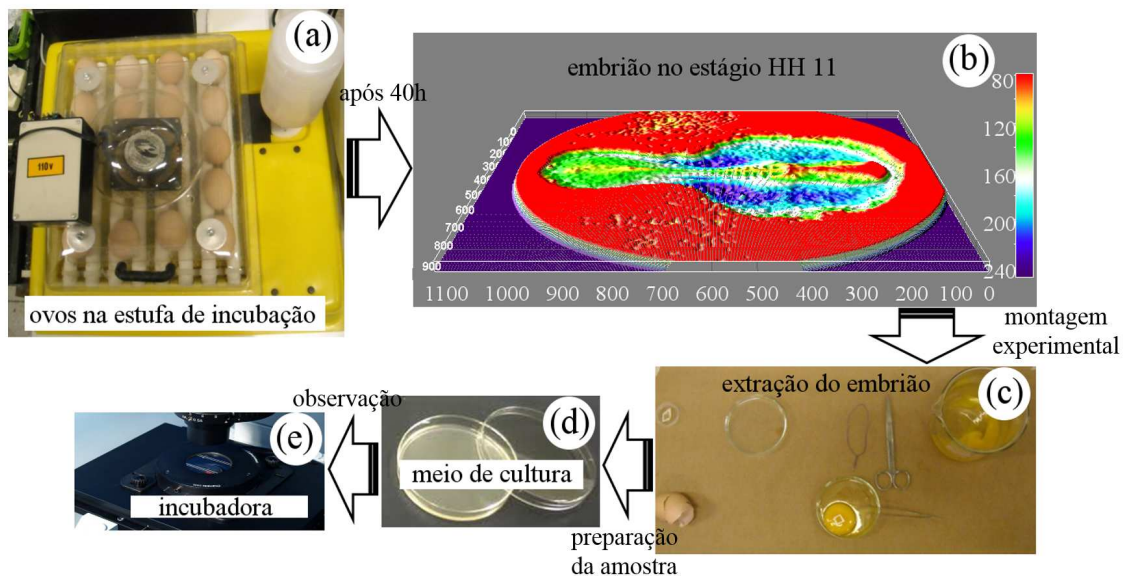


Figura 4.1: (a) Incubadora com capacidade para 20 ovos mantém o ambiente à temperatura de 37°C e umidade de 50%. (b) Embrião, após 40 horas de incubação, encontra-se aproximadamente no estágio HH 11. (c) Bancada preparada para extração dos embriões. (d) Meio de cultura preparado com agar e albumina apresenta uma consistência de gel. (e) Incubadora acoplada ao microscópio de campo-claro.

Neste trabalho propomos estudar dois grupos de embriões. O primeiro nomeado por *grupo controle*, grupo sem nenhum tratamento, usado para estudar a auto-organização dos aglomerados celulares ao longo do processo da vasculogênese. A partir do grupo controle foi possível extrair parâmetros quantitativos ao longo da formação da rede vascular no embrião e a partir desses dados discutir os princípios físicos que conduzem o processo da vasculogênese no embrião. O segundo

grupo nomeado por *grupo tratado*, recebeu um tratamento com o bevacizumabe (Avastin[®]), um anticorpo que inibe a sinalização do fator de crescimento de células endoteliais do inglês *vascular endothelial growth factor* (VEGF). O grupo tratado foi usado neste trabalho para estudar a auto-organização dos aglomerados celulares ao longo do processo da vasculogênese ao diminuir a concentração de VEGF livre no sistema. O anticorpo presente no Avastin se liga ao fator de crescimento das células endoteliais VEGF inibindo sua sinalização. O Avastin é incorporado ao embrião recém-extraído adicionando 30 μ L de Avastin à uma concentração de 6 μ g/ μ L.

O objetivo principal em ambos os grupos é acompanhar a auto-organização dos aglomerados celulares em uma única rede vascular, e também avaliar as mudanças promovidas nas topologias das redes ao diminuir a concentração de VEGF livre na matriz extracelular. A figura Fig.4.2 (a) apresenta a imagem de um embrião completo antes do surgimento dos primeiros aglomerados celulares, a partir deste estágio monitoramos o surgimento dos vasos na *area opaca*. Ao todo, acompanhamos 15 horas do desenvolvimento embrionário que compreende a evolução do estágio HH-11 ao HH-16. Na figura Fig.4.2 apresentamos três instantes de tempo extraídos dos vídeos que correspondem à 0h, 7h e 15h do desenvolvimento para um embrião controle ilustrado na Fig.4.2 (b) e para um embrião tratado com Avastin ilustrado na Fig.4.2 (c). A região apresentada corresponde à uma área aproximadamente de (6.58mm²) dentro da *area opaca*. A figura Fig.4.3 ilustra o processo geral de captura de imagens e os passos subsequentes seguidos para extrair os padrões dos aglomerados celulares a partir dos quais calculamos parâmetros quantitativos da rede vascular em formação. Os filmes foram capturados usando um microscópio *Nikon Eclipse TI* invertido, ilustrado na Fig.4.3 (a), equipado com uma objetiva 1X *Nikon Plan* com abertura numérica de 0.04 e distância de trabalho 3.2mm. No estágio do microscópio acoplamos uma incubadora modelo (*IC-CU:109, Live Cell Instrument*) que mantém o ambiente a 37^oC de temperatura, 5% CO₂ e 60% de umidade ilustrado na Fig.4.3 (b). As sequências de imagens foram capturadas usando uma câmera *Uniq (model 1800 CL, Epix Inc)* de 12 bit, ou 4096 níveis de cinza, ilustrado na Fig.4.3 (c), na qual um lado do *pixel* quadrado corresponde à 6.4 μ m, ajustamos o ganho para 11.04 db, e o intervalo de captura das imagens foi de 17.28 segundos. A sequência de imagens em nível de cinza, ilustrado na Fig.4.3 (d), é capturada e armazenada

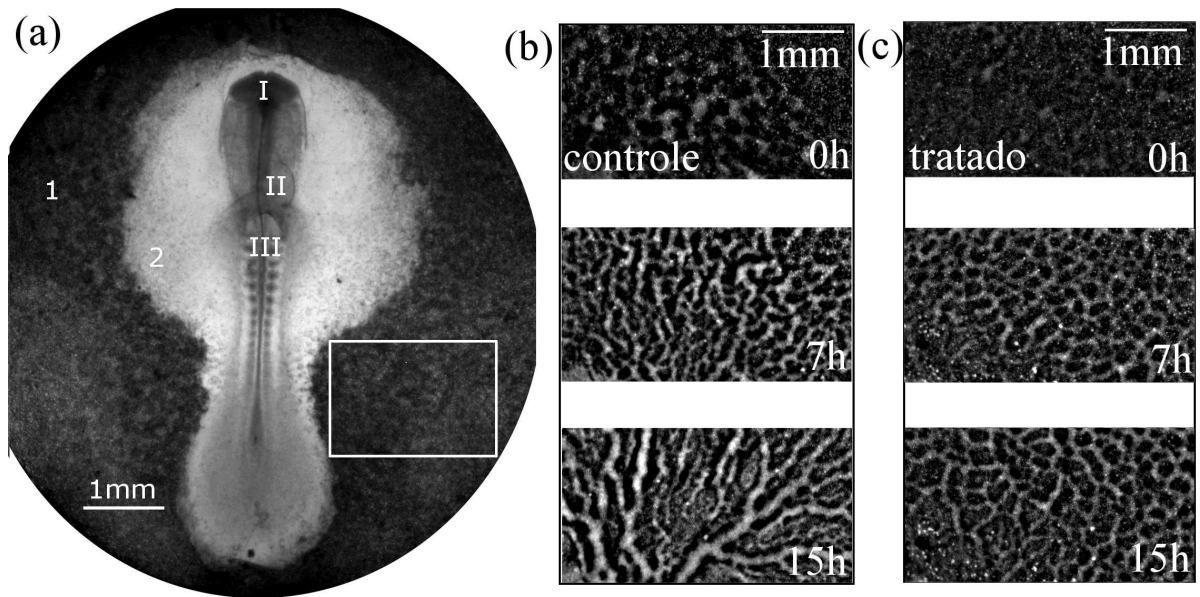


Figura 4.2: (a) Imagem de um embrião inteiro no estágio (HH-11). De cima para baixo, próximo à linha média, temos a dobra da cabeça *I*, o coração em formação *II*, e os somitos *III* (blocos de células que formarão músculos, ossos, cartilagem e pele). O número 1 identifica a *area opaca* e 2 a *area pellucida*. O retângulo de área (6.58mm^2), selecionado na *area opaca*, é usado para monitorar a rede vascular em formação. A área retangular ampliada foi extraída de um embrião (b) controle e (c) tratado com Avastin para os tempos: 0h, 7h e 15h, de cima para baixo.

em um computador. A partir das imagens em nível de cinza extraímos: os padrões binários, os perfis de rede e as matrizes de adjacência como ilustra a Fig.4.3 (e). Usamos os padrões binários, os perfis de rede e as matrizes de adjacência para extrair parâmetros quantitativos ao longo do processo da vasculogênese e apresenta-lós em gráficos como ilustra a Fig.4.3 (f). Na seção seguinte apresentamos o passo-a-passo seguido para extrair os padrões binários, os perfis de rede e as matrizes de adjacência a partir das imagens em nível de cinza.

Os aglomerados de células endoteliais que emergem na *area opaca* apresentam um densidade diferente das células que compõem a *area opaca*. E com a microscopia de campo claro foi possível obter um contraste em nível de cinza suficiente para acompanhar a auto-organização desses aglomerados. A microscopia de campo claro é uma técnica simples e de baixo custo. As amostras no estágio do microscópio foram ajustadas com objetivo de obter o melhor contraste dos aglomerados

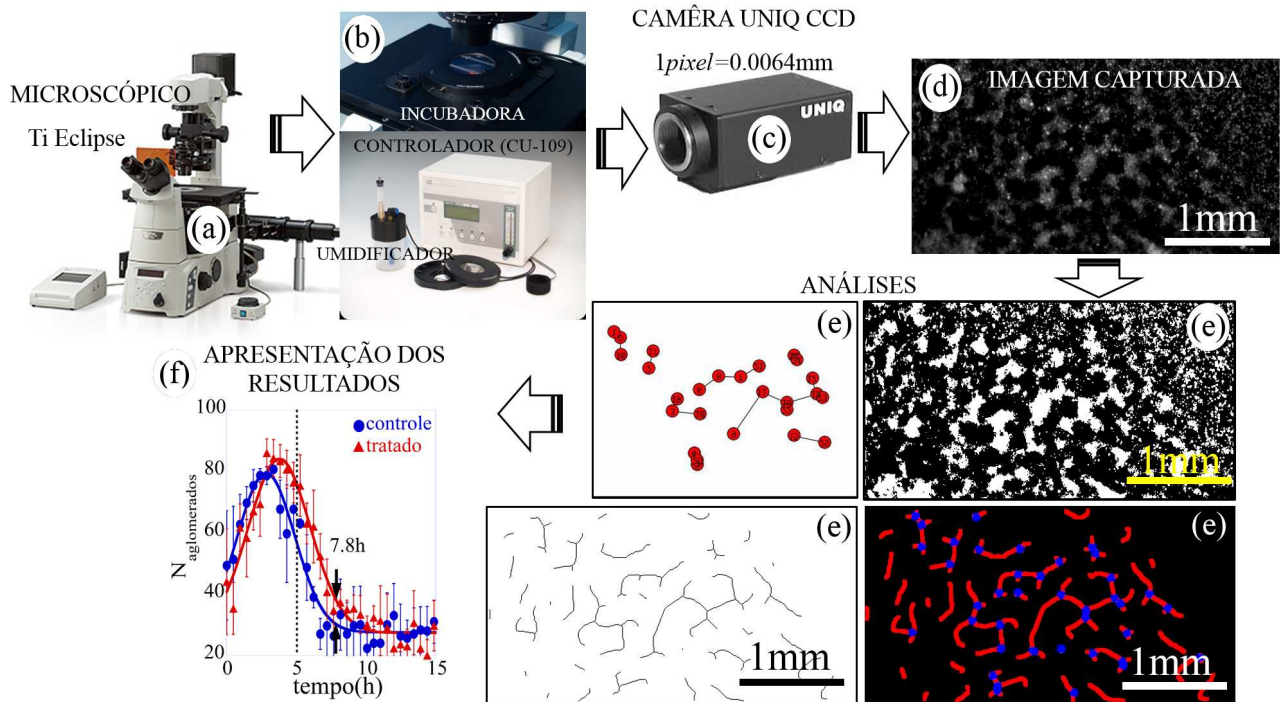


Figura 4.3: (a) Microscópio *Nikon Eclipse TI invertido*. (b) Incubadora modelo (*IC-CU:109, Live Cell Instrument*) mantém o ambiente à 5% CO_2 , 37°C de temperatura e 60% de umidade. (c) Câmera *Uniq (model 1800 CL, Epix Inc)*. (d) Ilustração de uma imagem em nível de cinza capturada no estágio inicial de formação da rede vascular capturada no embrião controle. (e) Ilustração dos padrões típicos obtidos após a aplicação de um determinado processamento na imagem em nível de cinza. (f) Apresentação dos parâmetros que quantificam a dinâmica do processo.

em nível de cinza.

4.2 Processamento de imagens

Nesta seção vamos apresentar os processamentos de imagens usados para obter: os padrões binários, as topologias de redes e as matrizes de adjacência das redes vasculares em formação nos grupos controle e tratado. A partir desses dados extraímos parâmetros quantitativos da vasculogênese que serão apresentados no Capítulo 5.

4.2.1 Padrões binários

Para estudar a dinâmica dos aglomerados celulares extraímos os padrões binários das imagens em nível de cinza. Posteriormente usando o *plug-in Analyze Particles* do *ImageJ* [74] fizemos uma *Análise Estatística dos Padrões Binários*, cujos resultados estão apresentados na Seção 5.1 no Capítulo 5.

Os padrões binários são obtidos considerando-se um determinado limite para o nível de cinza no qual abaixo desse limite o valor do *pixel* é zero e acima o valor é um. Este limite foi selecionado para cada embrião a fim de manter as informações presentes nas imagens originais. Para ilustrar o processamento das imagens e a aplicação do *plug-in Analyze Particles* mostramos na Fig. 4.4 três imagens originais capturadas e previamente apresentadas na Fig. 4.2 (b), suas versões correspondentes após definir um limite para o nível de cinza nas imagens originais estão ilustradas na Fig.4.4 (d-f). Os padrões binários resultantes, Fig.4.4 (d-f), foram usados para calcular as distribuições de áreas e o número de aglomerados celulares ilustrados na Fig. 4.4 (g-i). Por meio desse processamento analisamos a auto-organização espaço-temporal dos aglomerados celulares ao longo da formação da rede vascular. A Fig. 4.4 (j-l) apresenta a distribuição de áreas dos aglomerados celulares ilustrados na Fig.4.4 (a-c). O gráfico da distribuição apresenta o número de aglomerados celulares em função do logaritmo da área (sendo que os aglomerados menores que $1.2 \times 10^{-4} \text{mm}^2$ foram descartados da análise). Mediante a evolução temporal da distribuição da área ilustrada na Fig. 4.4 (j-l) observa-se a emergência do maior aglomerado conectado no sistema (identificado pelo círculo pontilhado). A análise da rede vascular em formação, a partir de padrões binários, foi desenvolvida neste trabalho com o objetivo de avaliar o crescimento da densidade de vasos, o número de aglomerados e a densidade do maior aglomerado conectado no sistema ao longo do tempo.

Para validar o método de análise a partir dos *padrões binários* a Fig.4.5 apresenta (a) os limites inferiores do nível de cinza selecionados para os grupos controle e tratado com Avastin. Na Fig.4.5 (b) está apresentada a densidade total de vasos obtida usando dois métodos diferentes como: a análise estatística a partir dos *padrões binários* e a análise através do *AngioTool* [75], uma ferramenta disponível gratuitamente para análise de vasos. Os resultados obtidos pelo método usando os padrões binários concordam satisfatoriamente com os resultados obtidos usando o programa *AngioToll*, o qual têm sido amplamente utilizado no

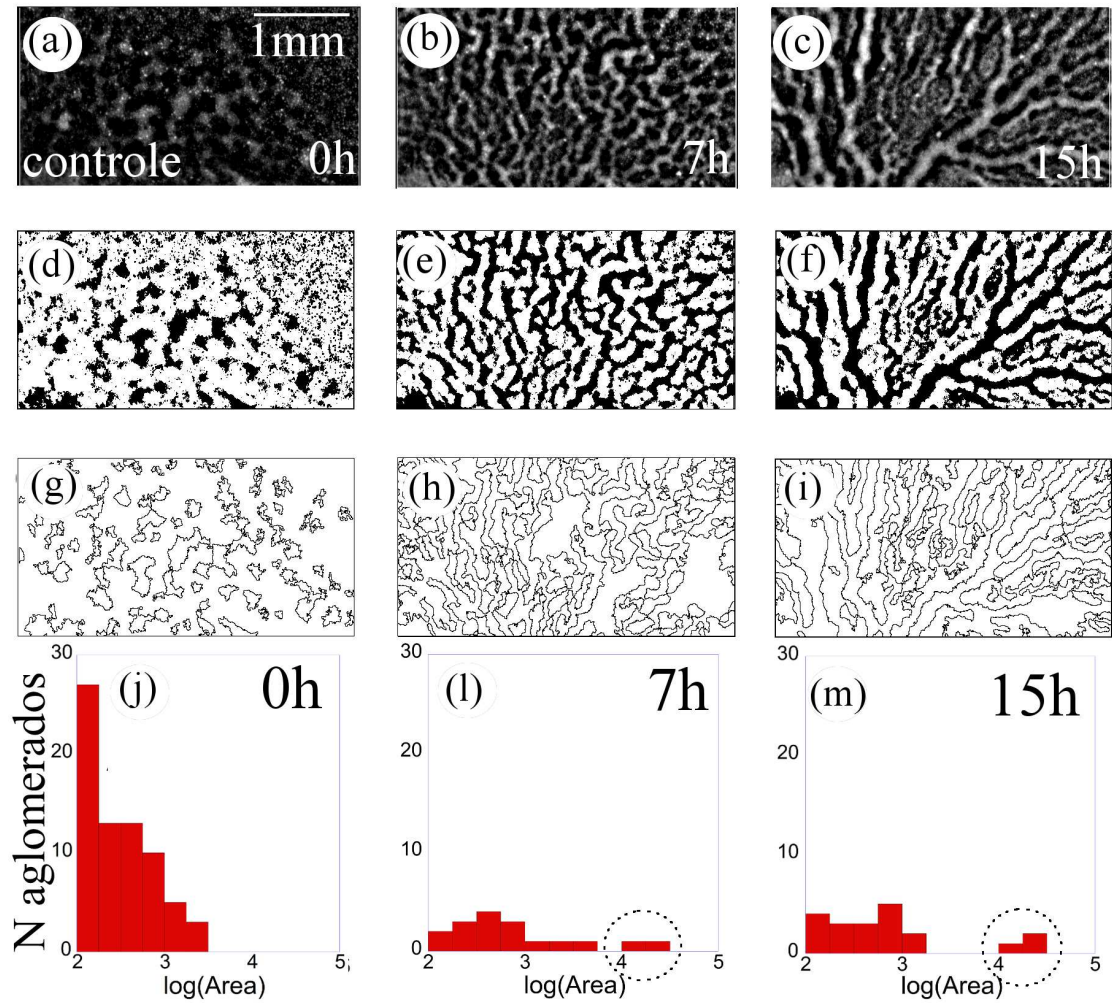


Figura 4.4: (a-c) Imagens originais. (d-f) Imagens binárias, após a definição de um limite inferior para o nível de cinza. Os contornos dos aglomerados, (g-i), identificados pelo *plug-in Analyze Particles*. A partir das imagens processadas medimos o número de aglomerados celulares e suas respectivas áreas. (j-l) Distribuição dos aglomerados celulares obtidos a partir da sequência das imagens (d-f). (j) Exibe a distribuição de áreas no estágio inicial. O maior aglomerado conectado está identificado pelo círculo pontilhado na distribuição obtida para o estágio intermediário ilustrada em (k). No último estágio apresentado para a distribuição de tamanhos observa-se que o maior aglomerado conectado está bem definido (l).

processo detecção e quantificação de vasos [75, 76, 77, 78, 79].

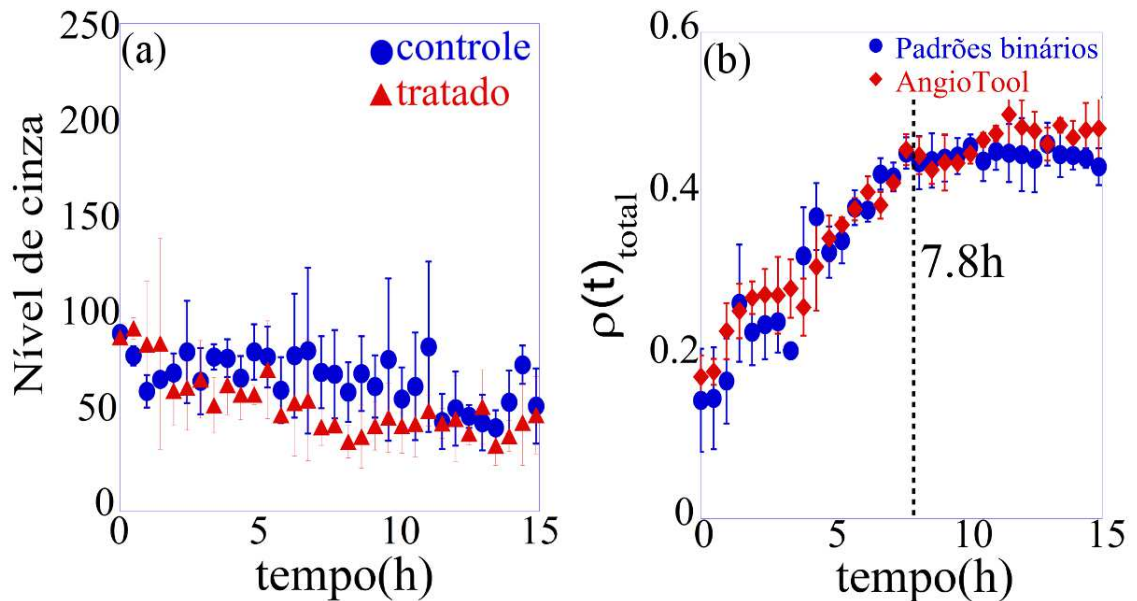


Figura 4.5: (a) Limite inferior selecionado para o nível de cinza para os grupos controle e tratado. (b) Cálculo da densidade total de vasos para o grupo controle usando a análise estatística dos padrões binários e usando o programa *AngioTool*.

4.2.2 Topologia da rede vascular

As topologias das redes vasculares foram obtidas ao aplicar o *AngioTool* diretamente na imagem original com o nível de cinza ilustrado na Fig.4.6 (a). A detecção da área vascularizada é obtida selecionando-se previamente o nível de cinza e a espessura dos capilares no *AngioTool*. A área vascularizada identificada pelo *AngioTool* é contornada por uma linha amarela como ilustra a Fig.4.6 (b). O valor para o nível de cinza médio para ambos os grupos foi mantido o usado na aquisição dos padrões binários apresentado na Fig.4.5 (a). O valor médio da espessura dos capilares selecionado para a detecção nos grupos controle e tratado está ilustrado na Fig.4.6 (b). A topologia de rede ilustrada na Fig.4.6 (c) é formada por conexões, que representam os vasos, e suas interseções. A topologia da rede vascular é adquirida subtraindo-se a rede vascular identificada pelo *AngioTool*, ilustrada na Fig.4.6 (b), pela imagem original ilustrada na Fig.4.6 (a). Na Fig. 4.7 (d-f) e (n-p) apresentamos a topologia bidimensional da rede vascular extraída da sequência das imagens originais ilustradas em (a-c) e (j-m) para um embrião controle e um embrião tratado com Avastin, respectivamente. A topologia da rede vascular é representada pelos vasos, identificados em vermelho, e

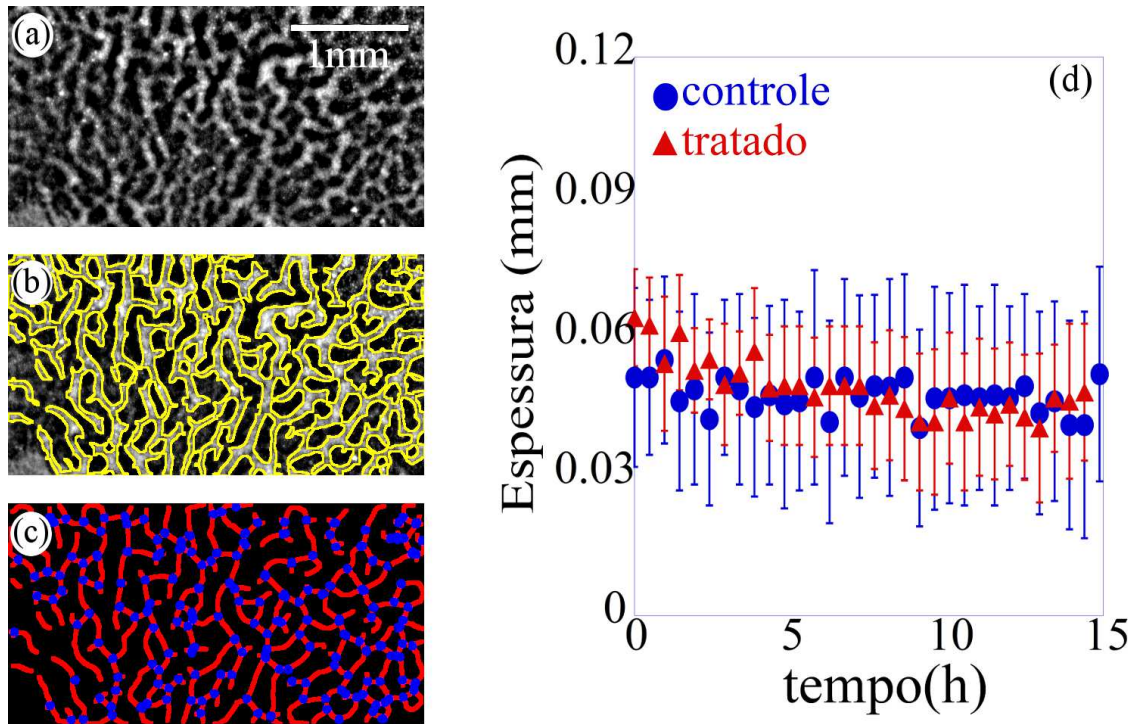


Figura 4.6: Imagem original (a), área vascularizada identificada usando o *AngioTool* (b), topologia de rede extraída usando o *AngioTool* (c). Espessura média dos capilares para os grupos controle e tratado com Avastin previamente selecionada no *AngioTool* (d). O círculo cheio representa a espessura dos capilares para o grupo controle e o triângulo cheio representa a espessura para o grupo tratado com Avastin.

por suas interseções, ilustradas em azul na Fig. 4.7 (d-f) e (n-p). A distribuição de cores nas topologias das redes vasculares ilustradas na Fig. 4.7 (g-i) e (q-s) identificam vértices com diferentes graus. A partir das topologias de rede calculamos as *Métricas Estruturais*, que englobam a dimensão fractal D_f , a treeness ϕ , o índice γ e o comprimento médio entre as bifurcações ℓ . Os resultados obtidos para estes parâmetros serão apresentados na Seção 5.3 no Capítulo 5.

Para calcular a dimensão fractal, D_f , as topologias de redes vasculares ilustradas na Fig.4.7 (a-c, j-m), foram transformadas em imagens binárias. Aplicamos às topologias binárias o método de contagem de caixas, do *plugin FracLac* [80], inserido na plataforma do *ImageJ* [74]. Ao aplicar o método de contagem de caixas, usamos um tamanho de caixa dentro de um intervalo de 2 a 200 *pixels*, como ilustra a Fig.4.8. (a), seguindo uma lei de potência para varrer as imagens de área igual á $6.58\mu\text{m}^2$. O número de caixas necessárias para varrer a área

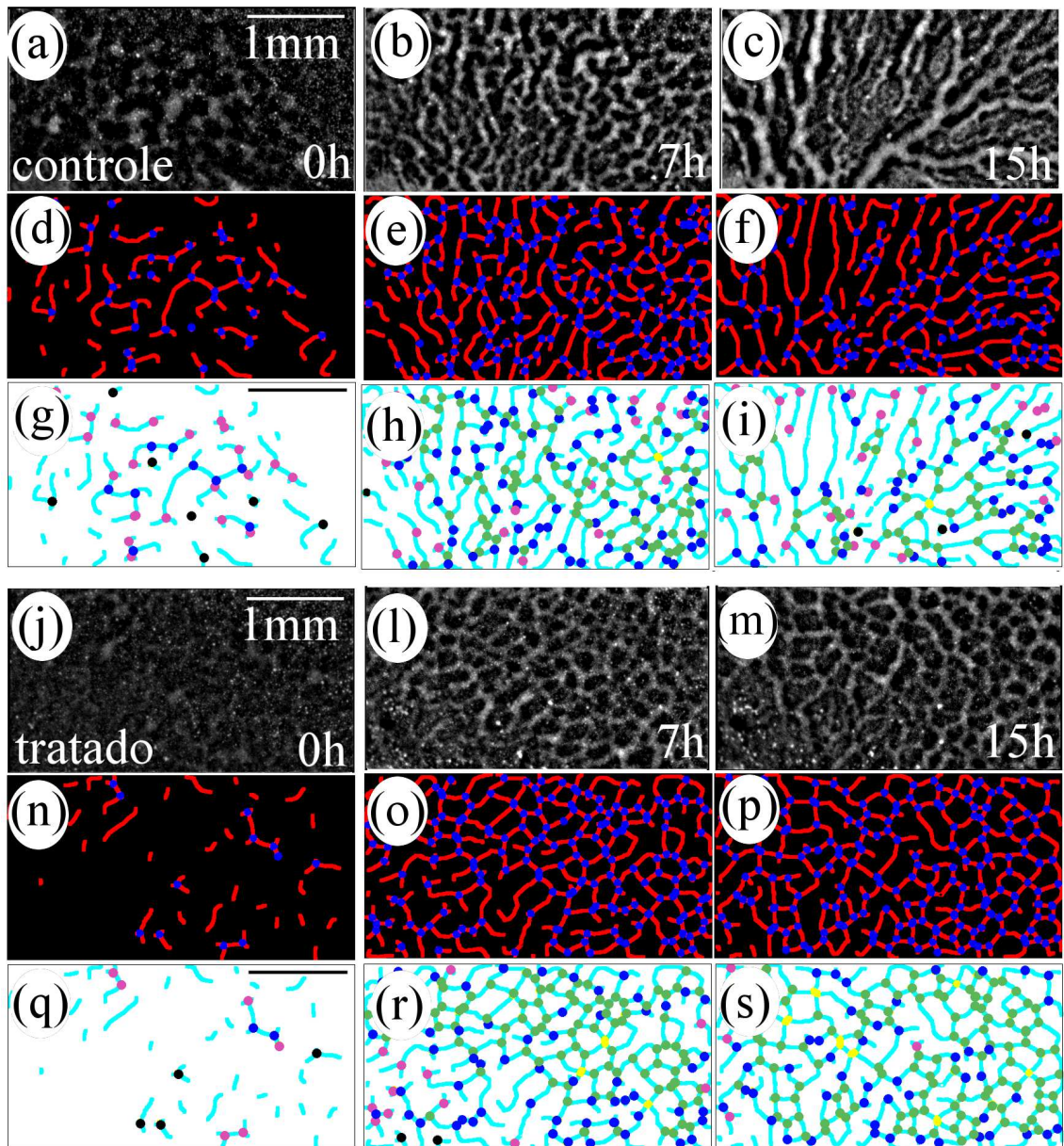


Figura 4.7: Imagens originais para um embrião controle (a-c), e para um embrião tratado com Avastin (j-m). Topologias de redes (d-f), (n-p) extraídas das imagens originais usando o *AngioTool*. Distribuição do grau de conectividade dos vértices (g-i) e (q-s) em que cada cor representa a conectividade de cada vértice ou a ausência de conexão (preto = nenhum vizinho), (rosa = um vizinho), (azul = dois vizinhos), (verde = três vizinhos) e (amarelo = quatro vizinhos).

analisada, $N(\varepsilon)$, é proporcional à escala, ε , como descrito pela equação Eq.4.1,

$$N(\varepsilon) \sim \varepsilon^{-D_f} \quad (4.1)$$

em que o expoente, D_f , representa a dimensão fractal. Assim, obtemos a dimensão fractal, D_f , dos padrões através da linearização do gráfico de $\ln[N(\varepsilon)]$ em função de $\ln[\varepsilon]$, como ilustra a Fig.4.8. (b).

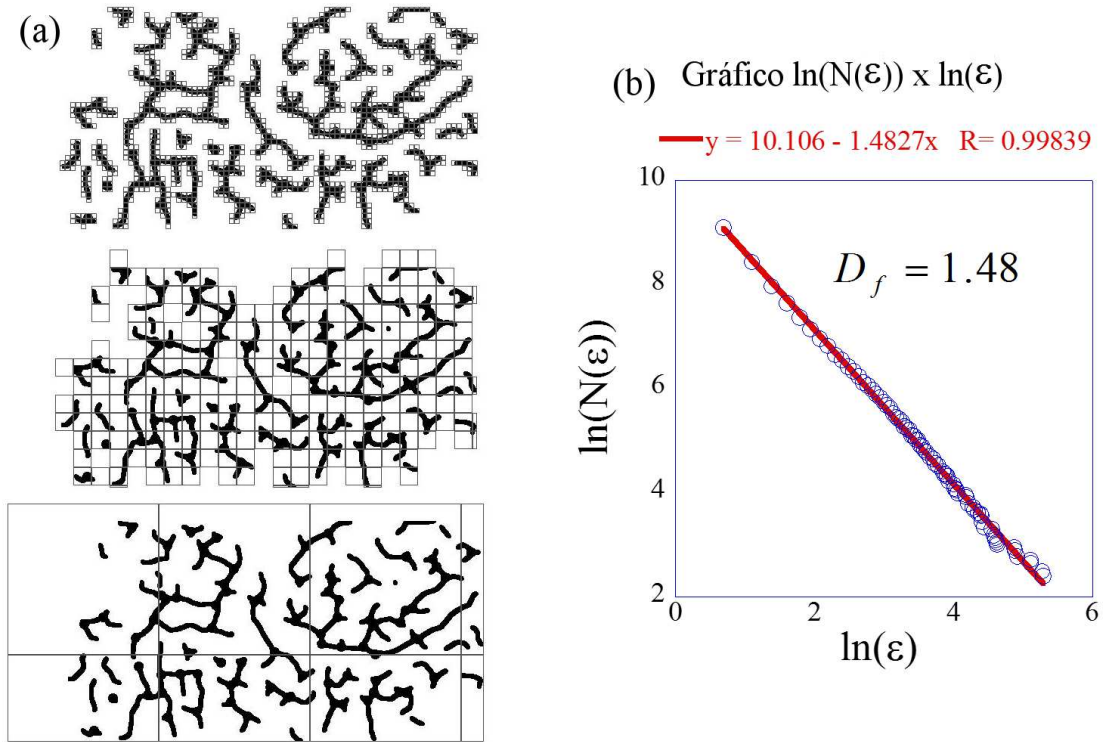


Figura 4.8: Cálculo da dimensão fractal, D_f , (a) número de caixas necessário para varrer a área analisada, $N(\varepsilon)$, (b) gráfico de $\ln[N(\varepsilon)]$ em função do $\ln[\varepsilon]$.

4.3 Matriz de adjacência

A matriz de adjacência é codificada a partir da topologia de rede. Na matriz de adjacência aplicamos as ferramentas da teoria de grafos para estudar a auto-organização dos aglomerados celulares em uma rede única de capilares sob a perspectiva da ciência de redes.

As topologias apresentadas na Fig. 4.7 foram codificadas em um grafo $N \times N$ (sendo N o número de vértices) da matriz de adjacência, \mathbf{A} , ilustradas na Fig.4.9 (g). Os elementos da matriz de adjacência são definidos por: $A_{ij} = 1$ se o vértice i e j são conectados e $A_{ij} = 0$ caso contrário.

A seguir vamos apresentar os passos do processo de extração da matriz de adjacência a partir das topologias de rede apresentadas na Fig. 4.7. Primeiro obtemos os perfis da rede os quais representam os vasos com suas respectivas interseções ilustrados na Fig.4.9 (a-c), em três tempos diferentes ao longo da formação da rede vascular em um embrião controle. Os perfis de rede foram obtidos aplicando o *plugins»skeleton»skeletonize* do Fiji/imageJ [81] às topologias ilustradas na Fig. 4.7. A matriz de adjacência representa as conexões entre os vértices da rede. Sendo assim, para fazer a leitura das conexões entre os vértices a partir das topologias de rede usamos o Fiji/imageJ [81] *Analyze»Skeleton* para obter a localização espacial dos vértices da rede, ou seja pontos de coordenadas (x_v, y_v) , e depois avaliar as conexões entre estes pontos com o intuito de construir a matriz de adjacência. A codificação das matrizes de adjacência apresentadas na Fig.4.9 (d-f) foram realizadas usando um programa desenvolvido em linguagem *Python*, apresentado no Apêndice A. Esse programa foi desenvolvido para ler os vértices com suas respectivas conexões e através da biblioteca de grafos do python, *Networkx*, calculamos os parâmetros de rede das matrizes de adjacência codificadas. Um exemplo da codificação da matriz de adjacência ilustrando as conexões entre os vértices da rede está apresentado na Fig4.9 (g). A codificação das topologias de redes vasculares em matrizes de adjacência foi fundamental para se aplicar as ferramentas da teoria de grafos. Com a teoria de grafos obtemos parâmetros fundamentais para descrever a percolação no sistema. Usando a matrizes de adjacência na plataforma do *Networkx* no *Python* calculamos a distribuição do grau médio de cada vértice, o grau médio dos vértices da rede, o coeficiente de correlação dos graus, o coeficiente de agrupamento e o livre caminho médio que serão apresentados na Seção 5.2 no Capítulo 5.

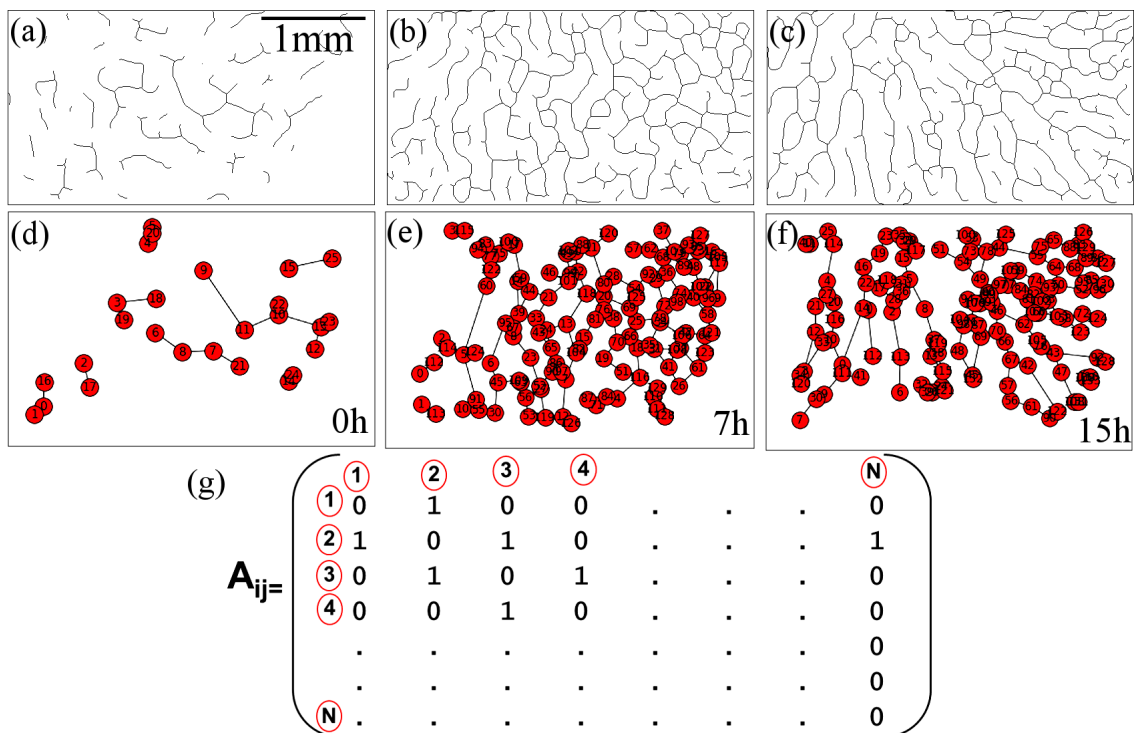


Figura 4.9: (a-c) Perfis de redes para 0h, 7h e 15h. (d-f) Ilustração dos vértices e suas conexões. (g) Exemplo da representação da matriz de adjacência A_{ij} , em que $A_{ij} = 1$ se o vértice i e j são conectados e $A_{ij} = 0$ caso contrário. Observe que os elementos da diagonal da matriz também são nulos, ou seja, não consideramos conexões de um vértice com ele mesmo.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentaremos os resultados extraídos a partir das análises dos aglomerados celulares ao longo da formação da rede vascular. Monitoramos a formação da rede vascular, em um grupo de embriões controle e em um grupo de embriões tratados com Avastin. Por meio das análises extraídas dos padrões binários, das topologias de rede e das matrizes de adjacência detectamos a emergência do maior aglomerado conectado no sistema. A densidade do maior aglomerado conectado, o coeficiente de agrupamento e o menor caminho médio também crescem abruptamente com emergência do maior aglomerado conectado. E o coeficiente de correlação dos graus tende a zero indicando que os vértices se conectam aleatoriamente neste estágio de formação da rede. Além disso, verificamos através das métricas estruturais que o Avastin modifica a estrutura hierárquica da rede vascular observada no grupo controle.

Organizamos os resultados em três grupos diferentes, em cada grupo apresentaremos parâmetros que melhor caracterizam um determinado estágio do processo de formação da rede vascular:

- *Formação primitiva da rede vascular*: envolve coalescência e migração de aglomerados celulares, este estágio é melhor caracterizado através da *Análise Estatística dos Padrões Binários* apresentados na Seção 5.1.
- *Formação da rede*: caracterizada pela emergência do maior aglomerado conectado no sistema. A percolação da rede vascular é definida pelo alastramento na área analisada do maior aglomerado conectado. A transição de aglomerados

desconectados para uma rede única de capilares é melhor caracterizada pelas *Métricas de Rede*, as quais apresentam uma mudança abrupta e singular próximo a 5 horas, como está ilustrado nos gráficos da Seção 5.2.

- *Estruturação das topologias de rede*: após a percolação a topologia de rede é reestruturada exibindo uma topologia hierárquica no grupo controle, enquanto no grupo tratado, a topologia atingida é semelhante à uma rede urbana. A diferença na estrutura topológica da rede vascular é identificada por uma divergência das *Métricas Estruturais* entre os dois grupos estudados. Essa divergência entre as métricas estruturais é perceptível a partir de 7.8 horas.

Grande parte dos resultados apresentados nos gráficos representam a média para três embriões em cada grupo e as barras de erro representam o desvio padrão em cada grupo, os casos especiais estão identificados na figura.

5.1 Análise Estatística dos Padrões Binários.

Nesta seção serão apresentados os principais resultados que caracterizam a auto-organização espaço-temporal dos aglomerados de células endoteliais formando uma única rede vascular em ambos grupos, controle e tratado com Avastin.

A partir da *densidade de vasos*, $\rho(t)$, avaliamos a dinâmica de ocupação dos aglomerados de células endoteliais na área opaca do embrião. A densidade de vasos é definida em nossa análise como $\rho(t) = (\text{área vascular identificada}) / (\text{área Total da Imagem})$. A figura Fig 5.1 apresenta a densidade média de vasos em função do tempo, $\rho(t)$, para ambos os grupos estudados. Para acompanhar o crescimento de vasos em ambos grupos usamos como modelo uma equação não-linear aplicada à modelos de transição de fase [70, 71]. Ajustamos os dados experimentais da densidade de vasos apresentados na Fig. 5.1 usando a solução da equação de crescimento logístico Eq (5.1),

$$\rho(t) = \frac{1}{\left[\frac{1}{\rho_{\max}} + \left(\frac{1}{\rho_0} - \frac{1}{\rho_{\max}} \right) e^{-\omega t} \right]}, \quad (5.1)$$

Em que $\rho(t)$ representa a densidade média de vasos, ρ_0 a densidade inicial de vasos, ρ_{\max} a densidade máxima de vasos e ω representa a taxa de crescimento da

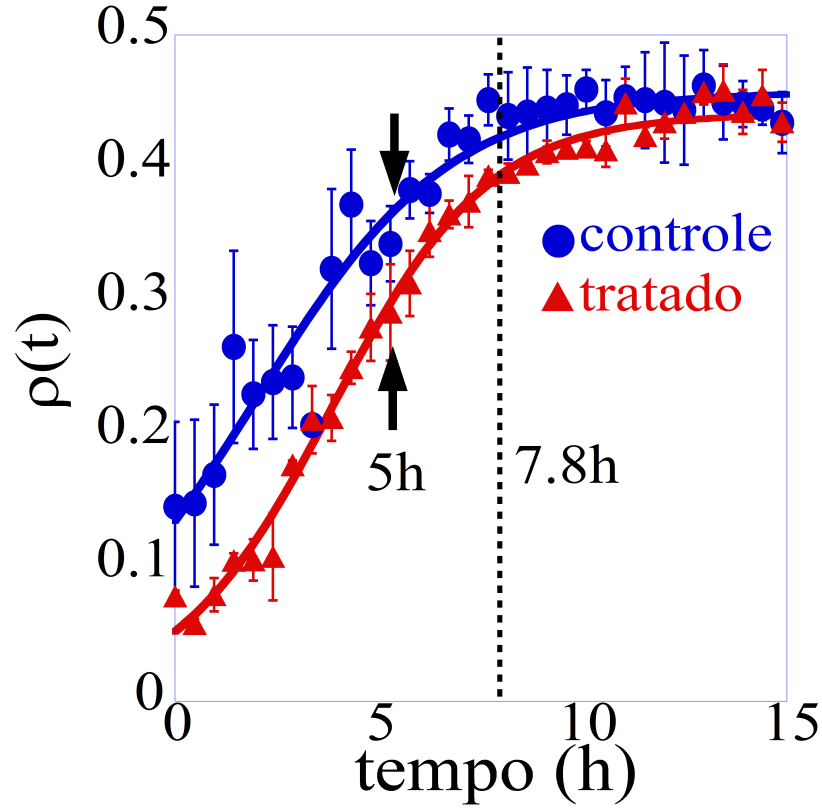


Figura 5.1: Densidade média de vasos em função do tempo obtida a partir dos aglomerados de células endoteliais. A barra de erro representa o desvio padrão obtido a partir de três amostras em cada grupo. A linha cheia representa o ajuste obtido usando a equação Eq. (5.1). A linha pontilhada identifica o tempo de 7.8h em que ocorre a saturação da densidade de vasos.

densidade de vasos. A densidade máxima alcançada no grupo controle, $\rho_{\max}^{\text{controle}} = (0.46 \pm 0.01)$, é indistinguível, dentro da barra de erros, da densidade obtida para o grupo tratado $\rho_{\max}^{\text{tratado}} = (0.44 \pm 0.01)$. Esse resultado representa um indício de que a concentração de Avastin usada neste trabalho altera ligeiramente a densidade de vasos no embrião. A concentração de Avastin usada não é suficiente para inibir a formação da rede vascular no embrião, entretanto promove algumas alterações na topologia da rede que serão discutidas posteriormente nas Seções 5.2 e 5.3.

A taxa de crescimento média obtida no grupo controle $\omega^{\text{controle}} = (0.42 \pm 0.04)/h$ é ligeiramente menor que a taxa de crescimento obtida no grupo tratado $\omega^{\text{tratado}} =$

$(0.52 \pm 0.02)/h$. Este resultado, sugere que no grupo tratado, o Avastin se liga aos domínios de VEGF presentes na matriz extracelular inibindo a sinalização desses domínios aos aglomerados celulares. A inibição dos domínios de VEGF diminui a sinalização da matriz extracelular aos aglomerados celulares enfraquecendo assim a interação célula-matriz extracelular. Em contrapartida, isso pode aumentar ligeiramente a interação célula-célula no grupo tratado favorecendo assim a coalescência aleatória dos aglomerados celulares neste grupo e, conseqüentemente, a taxa de crescimento é ligeiramente maior.

Avaliamos o *número de aglomerados* celulares, $N_{\text{aglomerados}}$, em função do tempo. Este é um parâmetro importante pois caracteriza o comportamento coletivo dos aglomerados celulares ao longo do processo de formação da rede vascular. A Fig. 5.2 apresenta a evolução temporal do número médio de aglomerados celulares, $N_{\text{aglomerados}}$, para os grupos controle e tratado com Avastin. A distribuição de aglomerados ilustra um comportamento geral da vasculogênese em ambos os grupos estudados. Inicialmente o número de aglomerados celulares na região analisada aumenta, atingindo uma população máxima, que diminui abruptamente com a emergência do maior aglomerado conectado no sistema. A linha cheia ilustrada na Fig.5.2 representa um ajuste gaussiano usado como guia para acompanhar a distribuição de aglomerados ao longo da formação da rede vascular. No grupo controle o valor máximo atingido pelo $N_{\text{aglomerados}}$, ocorre próximo à 2.7 horas, enquanto que no grupo tratado, o máximo é observado próximo à 3.5 horas. O número de aglomerados celulares, $N_{\text{aglomerados}}$, nos estágios finais em ambos grupos apresentam o menor valor ao longo de todo o processo. A diminuição no $N_{\text{aglomerados}}$ pode representar uma assinatura do comportamento coletivo da coalescência dos aglomerados celulares formando o maior aglomerado conectado, que se alastra pela área analisada.

Avaliamos também a emergência do maior aglomerado conectado no sistema, acompanhando a *densidade do maior aglomerado* em função do tempo. A densidade do maior aglomerado conectado, ρ^{MA} , é definida como a área do maior aglomerado dividida pela área total analisada. A Fig. 5.3 apresenta a densidade do maior aglomerado conectado (a) para um embrião controle e (b) para um embrião tratado com Avastin durante as primeiras 10 horas de experimento. Os gráficos inseridos em cada figura apresentam os dados médios obtidos para cada um dos grupos ao longo de 15 horas de observação. Destacamos nessa figura os

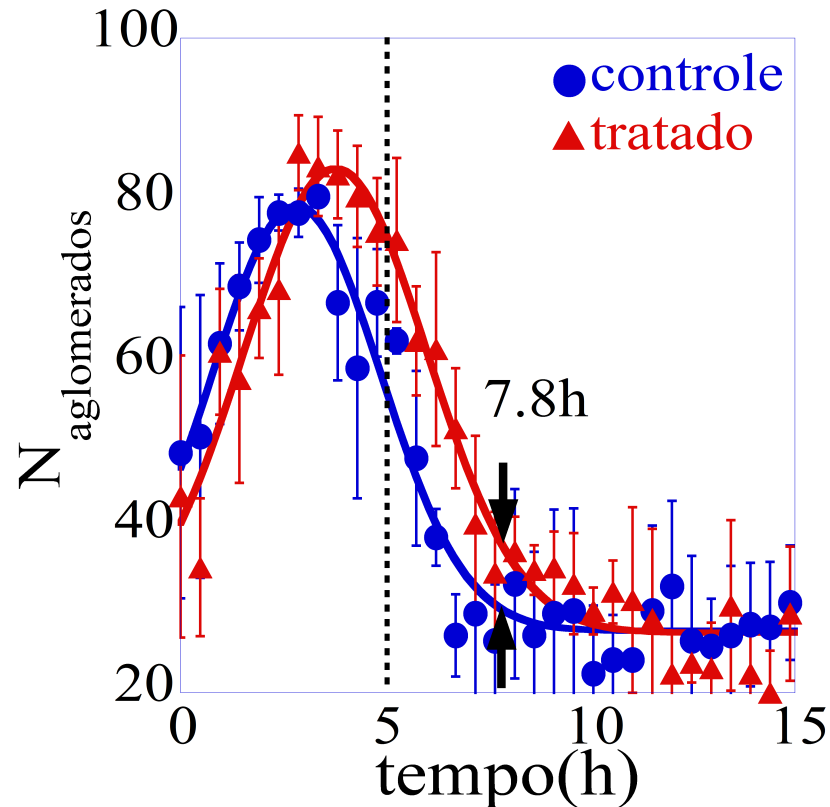


Figura 5.2: Número de aglomerados celulares em função do tempo para os grupos controle e tratado com Avastin. A barra de erro representa o desvio padrão obtido a partir de três amostras em cada grupo. A linha cheia representa um ajuste gaussiano usado como guia. A linha pontilhada sinaliza o tempo de 5 horas e as setas identificam o tempo de 7.8 horas.

dados de embriões individuais para ilustrar o quão acentuado é o crescimento do maior aglomerado conectado na área analisada. A percolação em sistemas dinâmicos está relacionada ao alastramento do maior aglomerado conectado, ou aglomerado infinito, pelo sistema [64, 65, 38, 66]. O tamanho relativo do maior aglomerado conectado em relação ao tamanho do sistema também tem sido usado para caracterizar a percolação na vasculogênese seja, por meio de dados experimentais de células endoteliais em cultura [21], ou ainda, por intermédio de dados numéricos obtidos em modelos teóricos [13, 28, 19, 16]. No embrião avaliamos a densidade do maior aglomerado conectado com o intuito de caracterizar o limite de percolação em ambos os grupos, o qual ocorre próximo a 5 horas, ilustrado nos gráficos da Fig. 5.3 (a) e (b). A partir desses dados observa-se que inicialmente

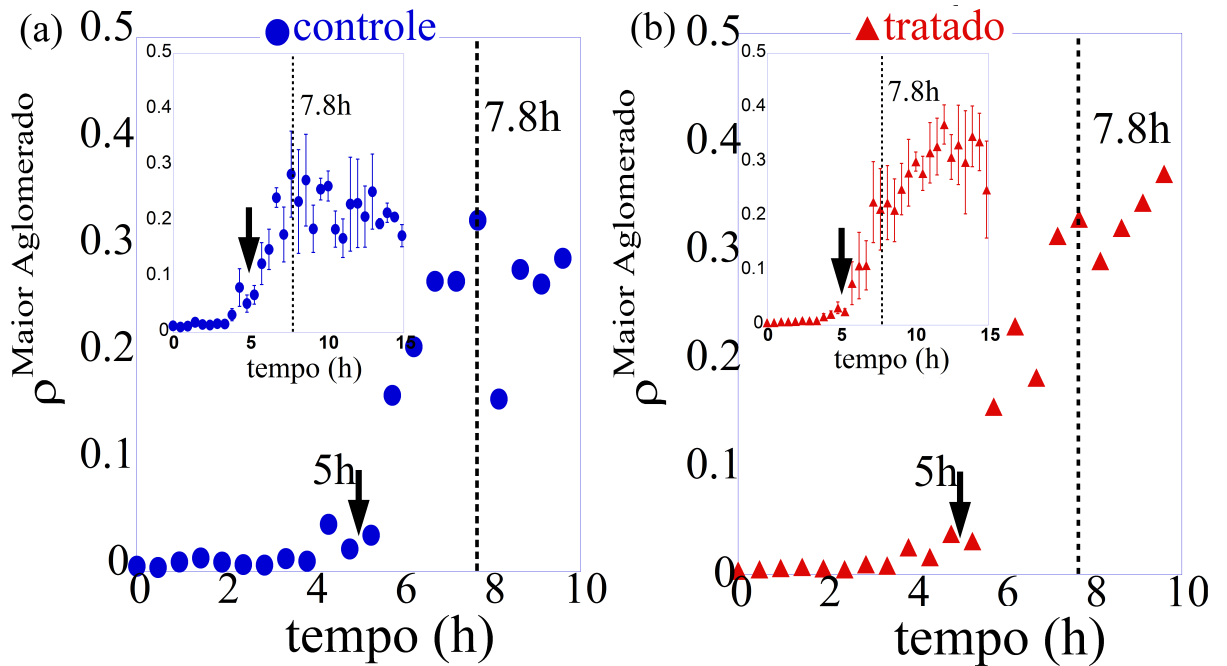


Figura 5.3: Densidade do maior aglomerado conectado em função do tempo para um único embrião (a) controle e (b) tratado com Avastin. Os gráficos inseridos apresentam a densidade média do maior aglomerado conectado para um grupo controle e para um grupo tratado com Avastin. O círculo fechado representa os dados para o grupo controle e o triângulo fechado representa os dados do grupo tratado. A barra de erro representa o desvio padrão obtido a partir de três amostras em cada grupo. A linha vertical pontilhada é um guia para acompanhar o tempo de 5 horas e as setas sinalizam o tempo de 7.8 horas.

a densidade do aglomerado maior é muito pequena, e próximo à 5h, ocorre um aumento abrupto nesta densidade. O valor máximo atingido pela densidade é da ordem de, ($\rho^{\text{AM}} \approx 0.3$), que ocorre próximo à 7.8h, e tende a se manter constante. O valor alcançado na saturação é da ordem do valor da densidade total de vasos no estágio final da vasculogênese indicando que o aglomerado infinito ou o aglomerado de percolação foi formado [64]. O comportamento médio obtido para os grupos controle e tratado são apresentados nos gráficos inseridos para o intervalo de 15 horas de experimento e apresentam o mesmo comportamento.

A percolação na vasculogênese representa coalescência dos aglomerados celulares dando origem ao maior aglomerado conectado que se estende por toda a área analisada formando a rede vascular. O surgimento do maior aglomerado conectado

é identificado por uma mudança abrupta e singular no sistema, o qual definimos por um ponto crítico, denominado de limite de percolação. O limite de percolação representa o limiar que separa dois comportamentos distintos no sistema: acima desse limite existe o maior aglomerado que se alastra por toda área analisada conectando todo o sistema enquanto que abaixo dele o sistema exhibe ilhas de aglomerados celulares. Neste trabalho, ρ^{AM} é o primeiro parâmetro que caracteriza a percolação para a vasculogênese no embrião. Esse parâmetro identifica dois tempos característicos: um próximo à 5 horas, que identifica a emergência do maior aglomerado conectado, e outro próximo à 7.8h, que determina o tamanho máximo desse aglomerado.

Na próxima seção vamos apresentar os resultados experimentais obtidos para as métricas de rede, apresentadas no Capítulo 3. Algumas dessas medidas corroboram para identificar a emergência do maior aglomerado conectado no sistema. Os tempos característicos identificados avaliando, ρ^{MA} , contribuíram para detectar a emergência do maior aglomerado conectado no sistema. Assim, verificamos que seu surgimento em ambos os grupos ocorre, no intervalo de 5 horas às 7.8 horas. A partir de 7.8 horas a rede vascular está formada em ambos os grupos, e partir desse momento, as topologias de rede são reestruturadas.

5.2 Métricas de Rede.

Agora usaremos as *Métricas de Rede* aplicadas em de ciência de redes [56, 82, 58, 59], para medir parâmetros que caracterizem as topologias das redes vasculares. Alguns destes parâmetros corroboram para destacar a emergência do maior aglomerado conectado, próximo a 5 horas. As métricas de rede apresentadas nesta seção foram calculadas a partir das matrizes de adjacência, ilustradas em Fig. 4.9 (d-f), para ambos os grupos. A evolução temporal da *distribuição de grau*, $P(k)$ obtida por meio da Eq. 3.2, para o grupo controle e tratado com Avastin está ilustrada em Fig. 5.4 (a-c) e (d-f), respectivamente. As distribuições de graus dos vértices para as redes vasculares foram obtidas construindo histogramas normalizados dos graus dos vértices. As redes vasculares obtidas neste trabalho são redes planas que contém vértices com poucos vizinhos, o grau de cada vértice varia de 1 até 4. No estágio inicial, 0h, no grupo controle aproximadamente: 55% dos vértices possuem grau 1, 35% possuem grau 2, 10% possuem grau 3 e não

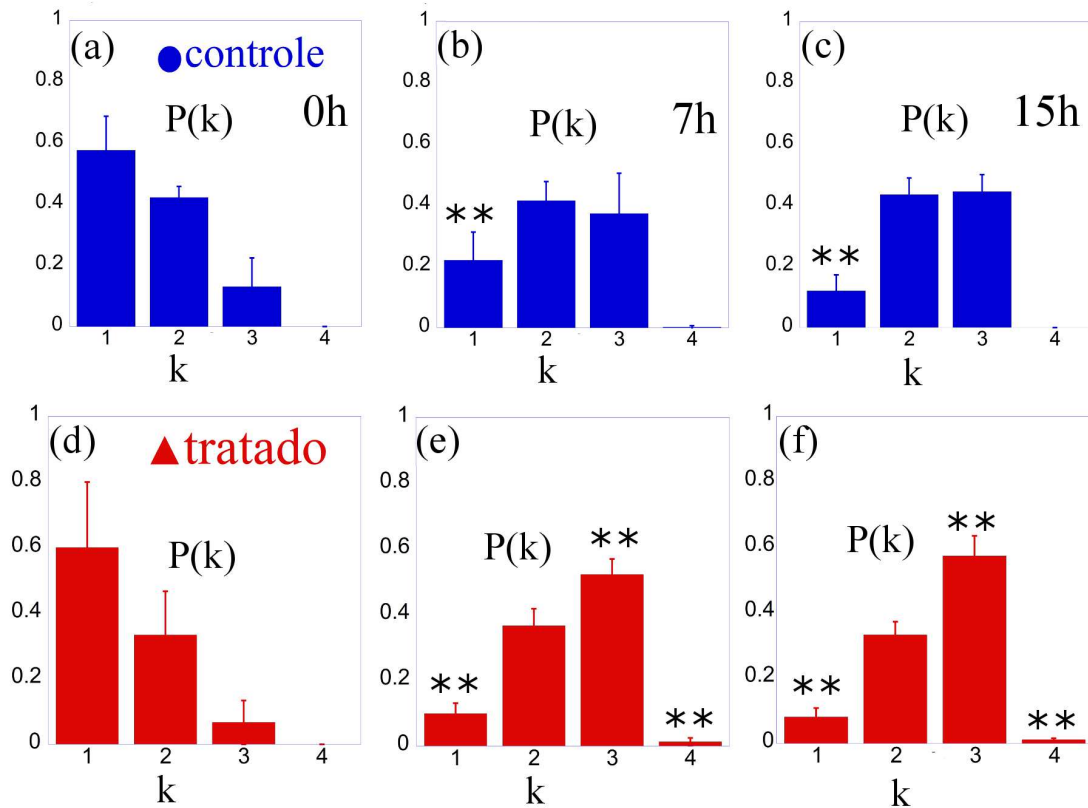


Figura 5.4: A distribuição de graus, $P(k)$, obtida a partir de três embriões em cada grupo, (a-c) grupo controle e (d-f) grupo tratado com Avastin. O símbolo (**) representa a presença de diferença estatística significativa entre as distribuições, calculada usando o teste KS. Este teste compara a distribuição no estágio inicial, no instante de tempo $t = 0h$, com as distribuições nos tempos subsequentes. Os tempos das distribuições assinalados, com (**), mostram que há diferença estatística entre as distribuições.

é observado vértice de grau 4. Para 7h apenas 20% dos vértices possuem grau 1, 40% possuem grau 2, 39% possuem grau 3 e apenas 1% dos vértices possuem grau 4. No estágio final observamos que 12% dos vértices possuem grau 1, 43% possuem grau 2, 45% possuem grau 3, e não se observa vértices com grau 4, estas distribuições estão ilustradas em Fig. 5.4 (a-c). Embora, a distribuição de grau, $P(k)$, para o grupo tratado apresente um comportamento semelhante ao grupo controle, a fração de vértices com grau 3 no estágio final é maior, alcançando aproximadamente 60% dos vértices, em contrapartida a fração de vértices com grau 2 diminui. Usando o teste Kolmogorov-Smirnov para detectar a diferença estatística, p , entre as distribuições ao longo do tempo em relação à distribuição

inicial. Os vértices que apresentaram uma diferença estatística significativa no grupo tratado foram os vértices com graus 1, 3 e 4, em que apresentaram $p < 0.05$ como identificados nas distribuições pelo símbolo (**). Enquanto, no grupo controle apenas os vértices de grau 1 apresenta $p < 0.005$. A distribuição de graus das redes vasculares apontam uma pequena diferença entre os dois grupos. O grupo tratado com Avastin, exibe uma estrutura de rede com mais vértices de graus maiores em relação ao grupo controle. A evolução temporal da distribuição de grau apresenta o comportamento coletivo dos graus dos vértices à medida em que a rede vascular se forma em ambos os grupos. Observe que nos instantes iniciais, a distribuição está concentrada nos vértices de grau 1 e a medida que a rede vascular se forma essa distribuição é deslocada para vértices de maior grau.

No intuito de avaliar a evolução dos graus dos vértices, ao longo da rede vascular em formação, para ambos os grupos calculamos *grau médio* dos vértices em função do tempo. O grau médio dos vértices, $\langle k \rangle$, foi calculado usando a Eq. 5.5, e a evolução temporal para os grupos controle e tratado com Avastin está ilustrado em Fig. 5.5. O grau médio dos vértices, $\langle k \rangle$, inicialmente aumenta, e posteriormente atinge uma saturação próximo à $\langle k_{\text{controle}} \rangle = (2.28 \pm 0.06)$ no grupo controle, e $\langle k_{\text{tratado}} \rangle = (2.54 \pm 0.05)$ no grupo tratado com Avastin. O grau médio exibe o comportamento coletivo dos vértices para as topologias de rede em formação em ambos os grupos. Embora a saturação nos dois grupos ocorram próximo a 7.8h, os valores claramente divergem entre si neste instante, como identificado pelas setas pretas na Fig. 5.5. A saturação, a partir de 7.8h, é um indício que nesse instante a topologia das redes vasculares estará completamente formada. E a divergência entre estes valores apontam para uma mudança estrutural entre as topologias de rede dos dois grupos.

Avaliamos também a tendência dos vértices de se conectarem com outros vértices de graus similares ou diferentes po meio do cálculo *coeficiente de correlação dos graus*. A Fig. 5.6 apresenta o coeficiente de correlação dos graus, r , em função do tempo para os grupos controle e tratado. Inicialmente, $r < 0$, para ambos grupos. Isso implica que as redes apresentam um comportamento disassociativo, ou seja, os vértices mais conectados tendem a se conectar aos vértices poucos conectados. Esse comportamento explica nos estágios iniciais a existência de uma população de pequenas estruturas desconectadas. Quando o maior aglomerado emerge no sistema, o que ocorre próximo a 5h, o coeficiente de correlação dos

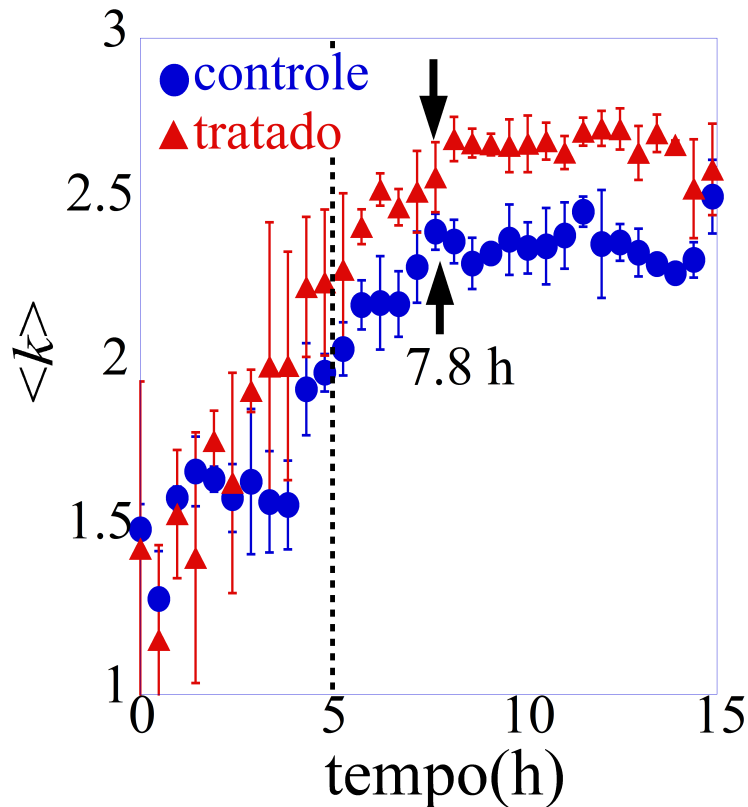


Figura 5.5: Grau médio dos vértices em função do tempo para os grupos controle e tratado com Avastin. A linha vertical pontilhada é um guia para acompanhar o tempo de 5h enquanto as setas pretas identificam o tempo de 7.8h.

graus aproxima de zero, $r \sim 0$, indicando que o grau de conectividade entre vértices é não correlacionado devido à similaridade das conexões entre os vértices da rede. A evolução da correlação dos graus é semelhante nos dois grupos. No estágio intermediário o coeficiente de correlação dos graus da rede vascular oscila, inicialmente aumenta e depois diminui atingindo um valor mínimo. Este mínimo é atingido ao mesmo tempo que a população de aglomerados atinge a população máxima como mostrado na Fig. 5.7. O surgimento de pequenas estruturas desconectadas compete com a emergência do maior aglomerado conectado que contribui para a diminuição abrupta do coeficiente de associatividade próximo de 3 horas e posteriormente quando o maior aglomerado é formado r tende abruptamente à zero, como ilustrado em Fig. 5.7 .

Com o objetivo de avaliar a coesão da rede vascular em formação obtemos o *coeficiente de agrupamento médio* em função do tempo para os dois grupos, como

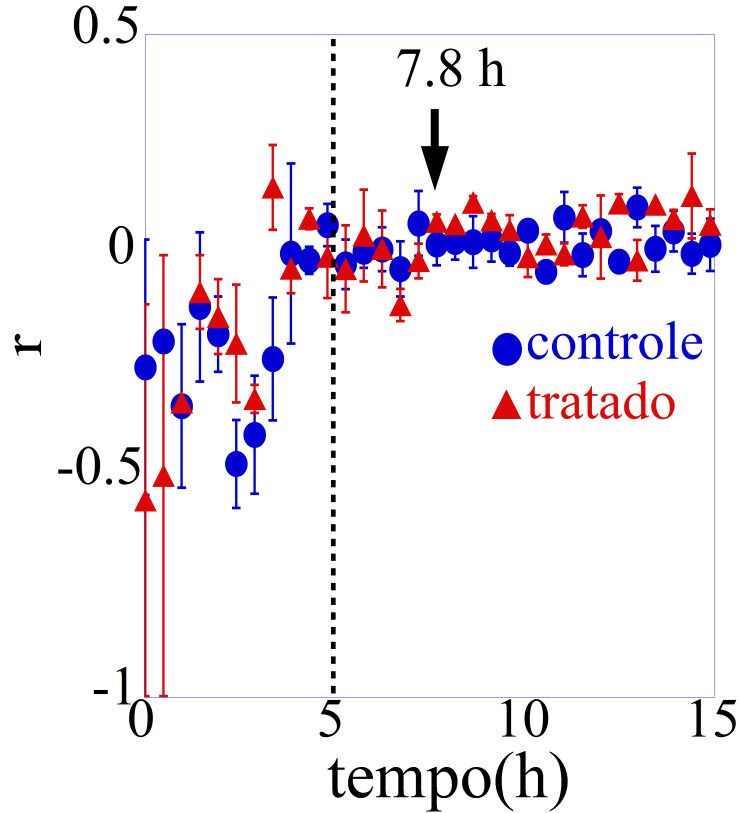


Figura 5.6: Coeficiente de correlação dos graus em função do tempo para os grupos controle e tratado com Avastin. A linha vertical pontilhada é um guia para acompanhar o tempo de 5h.

ilustra a Fig. 5.8. O coeficiente de agrupamento médio, $\langle C \rangle$, foi calculado usando a Eq. 3.7. Esse resultado foi extraído a partir do maior aglomerado conectado, emergente na rede vascular em formação para ambos os grupos estudados. O coeficiente de agrupamento mede o quão coeso está um determinado conjunto de vértices em uma rede. Nos estágios iniciais, $\langle C \rangle$ é muito pequeno, evidenciando a existência de estruturas desconectadas nestes instantes. Entretanto, próximo a 5h, $\langle C \rangle$, apresenta um crescimento abrupto para ambos grupos, sinalizado pela linha pontilhada ilustrada na Fig. 5.8. Após esse salto, o coeficiente de agrupamento alcança um *platau*, estabilizando próximo à um pequeno valor $\langle C \rangle \approx (0.021 \pm 0.007)$ para os grupos controle e tratado.

A distância característica, entre cada par de vértice i e j das redes, foi avaliada através do *menor caminho médio*. Calculamos o menor caminho médio, $\langle L \rangle$, no maior aglomerado conectado por meio da Eq. 3.5. A Fig. 5.9 exibe a evolução

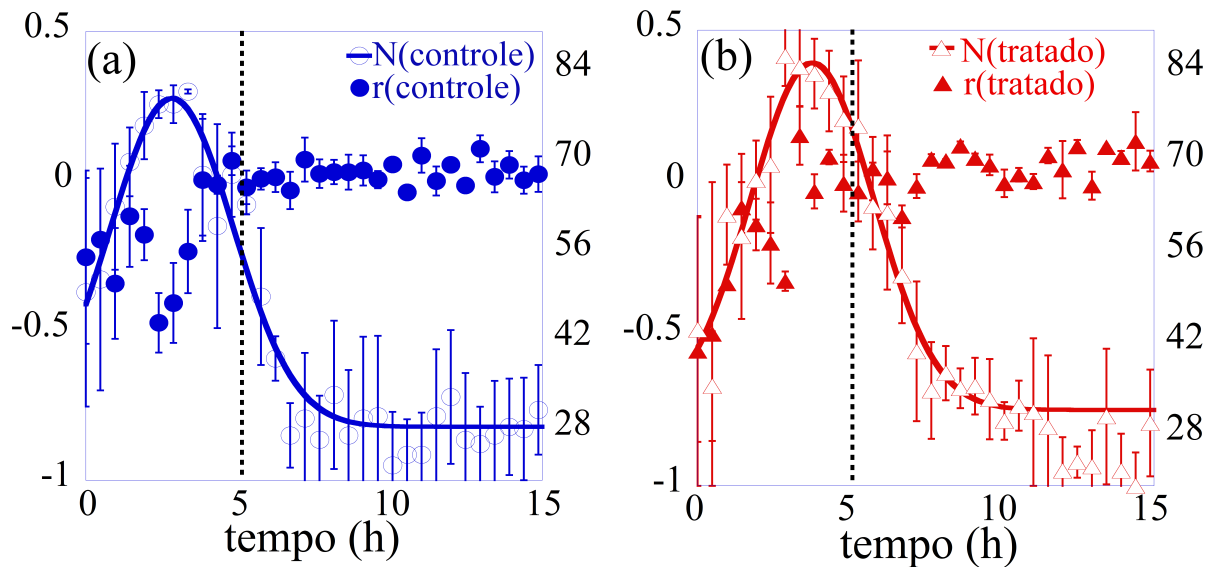


Figura 5.7: Coeficiente de associatividade e o número de aglomerados em função do tempo para os grupos controle (a) e tratado com Avastin (b). A linha vertical pontilhada é um guia para acompanhar o tempo de 5h.

temporal do menor caminho médio, $\langle L(t) \rangle$. Enquanto, o gráfico de barra interno, apresenta o número médio de vértices em cada grupo. Inicialmente, a distância característica, entre os pares de vértices no maior aglomerado conectado, é pequena. Quando o maior aglomerado conectado se alastra pela área analisada, o que ocorre próximo a 5 horas, $\langle L \rangle$ apresenta um aumento súbito, e alcança um valor constante, em torno de $\langle L \rangle \approx 13$, em ambos grupos. Entretanto, no estágio final $\langle L \rangle$ aumenta significativamente no grupo controle como ilustrado pelas setas pretas. Embora, o valor de $\langle L \rangle$ seja bem próximo em ambos grupos, o número de vértices no grupo tratado é maior (observe o gráfico interno) sugerindo assim que a topologia de rede no grupo tratado está mais coesa.

Ainda no intuito de caracterizar a emergência do maior aglomerado conectado no sistema, avaliamos a *fração de vértices* no maior aglomerado, f , em função do tempo. A fração de vértices, f , é calculada como a razão entre o número de vértices no maior aglomerado conectado pelo número máximo de vértices do maior aglomerado conectado ao longo do processo de formação da rede vascular. A Fig. 5.10 apresenta a fração de vértices em função do tempo para um embrião controle (a) e para um embrião tratado com Avastin (b). A fração de vértices

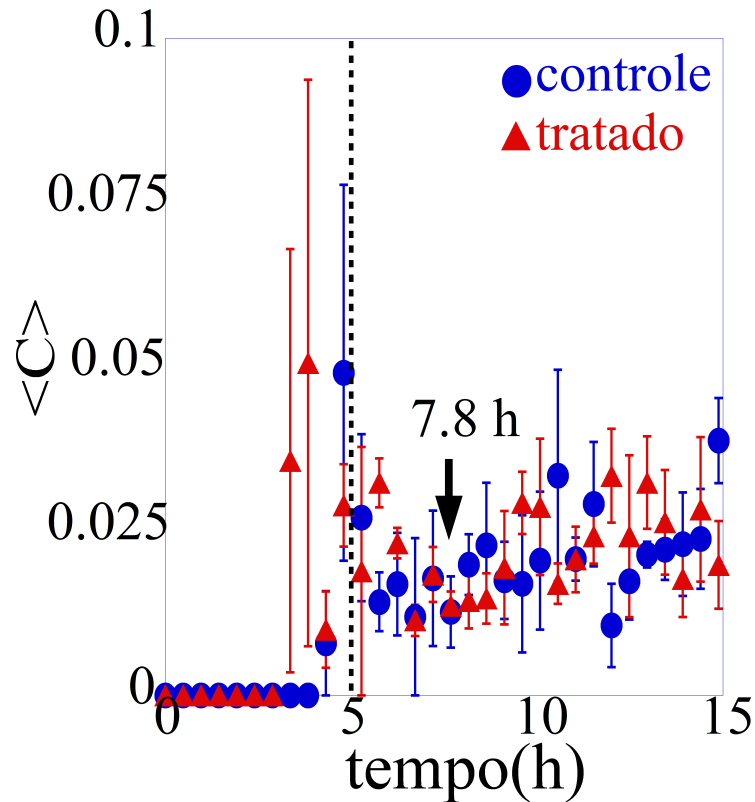


Figura 5.8: Coeficiente de agrupamento médio em função do tempo para os grupos controle e tratado com Avastin. A linha pontilhada sinaliza o tempo de 5h.

no maior aglomerado conectado, inicialmente, é pequena e abruptamente cresce, próximo a 5h, alcançando seu valor máximo, $f = 1$, tanto para o embrião controle quanto para o embrião tratado. Essa transição abrupta de pequenos valores para o valor máximo é bem pronunciada considerando-se apenas um embrião, como ilustra Fig. 5.10 (a,b). Os valores médios apresentados na Fig. 5.10 (c,d) acompanham a emergência do maior aglomerado conectado nos grupos controle e tratado respectivamente, próximo a 5h, embora a transição observada seja mais suave para ambos os grupos em comparação ao conjunto de dados obtidos para cada embrião.

As métricas de rede, apresentadas nesta seção, descrevem o comportamento coletivo dos vértices e suas conexões na rede vascular em formação. Algumas das métricas de rede como *coeficiente de agrupamento médio*, *menor caminho médio* e a *fração de vértices* apresentam um crescimento abrupto, próximo a 5 horas, o que pode ser uma assinatura da emergência do maior aglomerado conectado

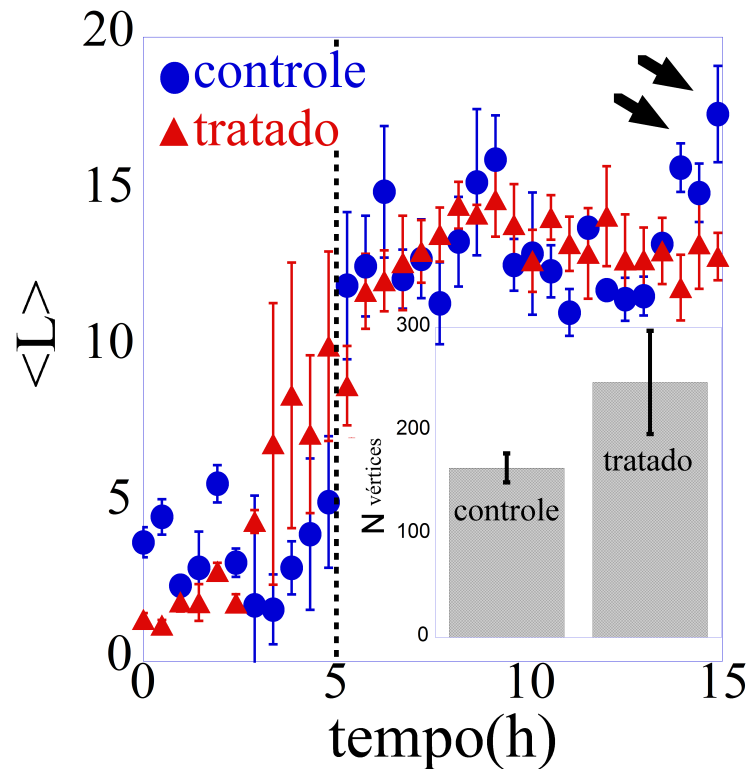


Figura 5.9: Evolução temporal do menor caminho médio, $\langle L \rangle$, medida nas topologias de rede dos grupos controle e tratado com Avastin. A linha vertical pontilhada é um guia para acompanhar o tempo de 5h. O gráfico interno apresenta o número de aglomerados médio em ambos grupos. As setas pretas ilustram os valores alcançados no grupo controle no estágio final da formação da rede vascular.

em ambos os grupos estudados. O *coeficiente de correlação dos graus* também apresenta um comportamento característico, sugerindo que com a emergência do maior aglomerado conectado no sistema r tende abruptamente à zero. Esta transição abrupta, pode estar intrinsecamente relacionada à geometria do sistema, que passa de uma rede de poucos vértices ligados para uma rede em que grande parte dos vértices estão conectados. A *distribuição de grau*, $P(k)$, e o *grau médio* dos vértices, $\langle k \rangle$, assinalam uma possível diferença morfológica entre a conectividade dos vértices nas topologias de rede.

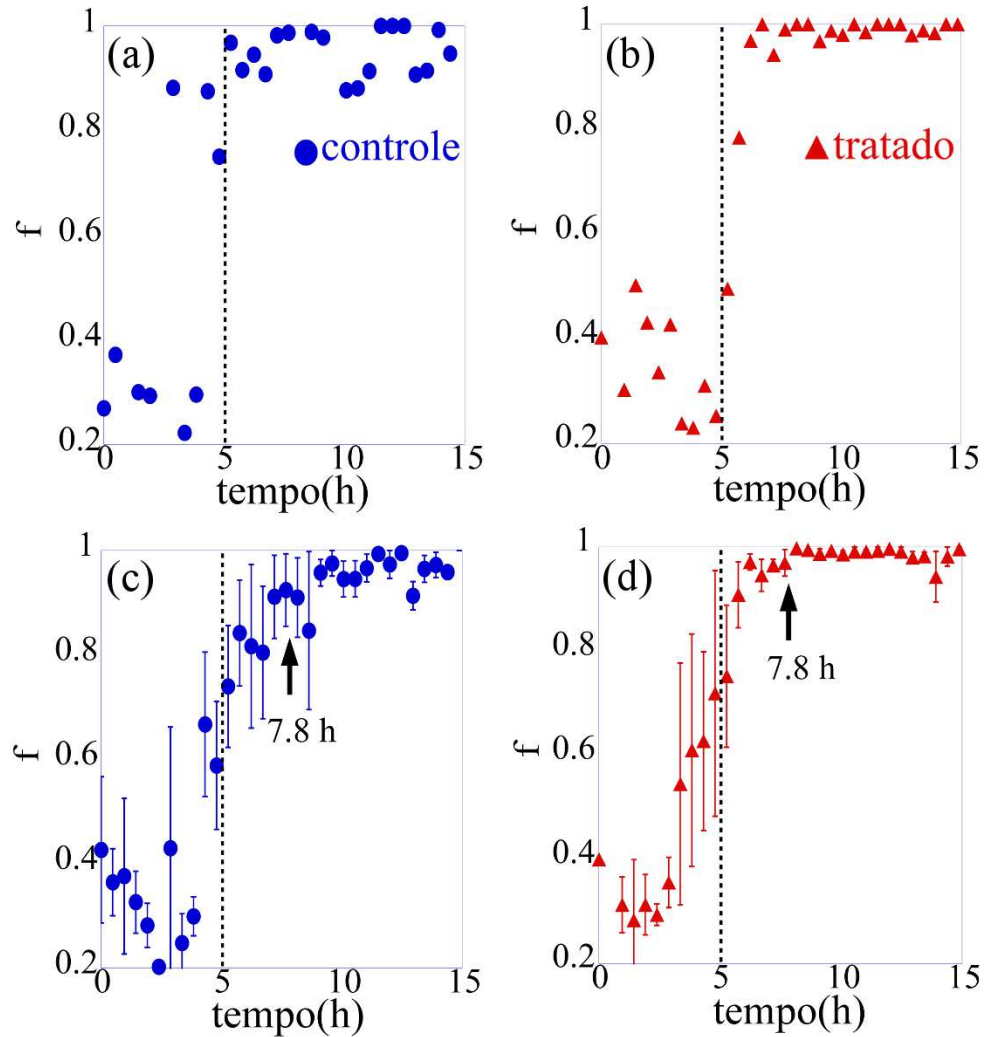


Figura 5.10: Fração de vértices no maior aglomerado em função do tempo (a) para um único embrião controle e (b) para um único embrião tratado com Avastin. A fração de vértices para um grupo de três embriões (c) controle e (d) tratado com Avastin. As barras de erro representam o desvio padrão de três amostras em cada grupo. A linha vertical pontilhada identifica o tempo de 5h. O círculo cheio representa os dados do (embrião/grupo) controle e o triângulo cheio representa os dados para (embrião/grupo) tratado.

5.3 Métricas Estruturais.

Com o objetivo de caracterizar as mudanças estruturais promovidas pelo Avastin na morfologia da rede vascular calculamos através das topologias de rede, ilustradas em Fig. 4.7 (d-f) e (n-p), a evolução temporal dos seguintes parâme-

tros: comprimento médio entre as bifurcações, $\ell(mm)$, a dimensão fractal D_f , a treeness ϕ e o índice γ .

A fim de caracterizar a distância média entre as bifurcações da rede calculamos o comprimento médio entre as bifurcações, $\ell(mm)$. A Fig. 5.11 exibe a evolução temporal da distância média entre as bifurcações da rede, ℓ , para os grupos controle e tratado com Avastin. No estágio inicial, a distância média entre as bifurcações em ambos grupos é $\ell = (0.25 \pm 0.03)mm$. À medida em que os aglomerados celulares vão se reorganizando espacialmente e novos aglomerados surgem no sistema, a distância média entre as bifurcações diminui. Próximo à 7.8h de experimento, como está sinalizado pela linha pontilhada na Fig. 5.11, a distância média entre as bifurcações da rede vascular diverge para dois valores distintos. A partir de 7.8h até o final do experimento, o valor médio para o grupo controle é $\ell^{\text{Control}} = (0.26 \pm 0.01)mm$, enquanto que o valor médio alcançado no grupo tratado com Avastin é $\ell^{\text{Avastin}} = (0.22 \pm 0.01)mm$. O menor valor obtido no grupo tratado, sugere que o Avastin interage no sistema promovendo uma mudança estrutural, aproximando os vértices da rede vascular. A distância média entre as bifurcações obtida no grupo tratado, é próximo ao valor encontrado para células endoteliais espalhadas aleatoriamente em uma matriz gel. Para células endoteliais em cultura, o comprimento médio entre as bifurcações é $\ell^{\text{EC Matrigel}} = (0.20 \pm 0.02)mm$ [21, 19]. Essa mudança estrutural detectada a partir de 7.8h, é um indício que ao adicionar o Avastin ao longo do processo, os aglomerados celulares perdem a sinalização da matriz extracelular e as conexões entre eles se tornam mais aleatórias. Assim, nos estágios finais da vasculogênese, a topologia de rede no grupo tratado assume uma estrutura semelhante às topologias de redes observadas em células endoteliais em cultura, ou seja, assume uma estrutura semelhante à estrutura de uma rede urbana.

No intuito de avaliar a complexidade, da rede vascular em formação, usamos o método de contagens de caixa por meio da Eq. 4.1, para calcular a *dimensão fractal*. A Fig. 5.12 apresenta a evolução temporal da dimensão fractal para o grupo controle e para o grupo tratado com Avastin. A dimensão fractal calculada no grupo controle, nos estágios iniciais, é da ordem de $D_f = (1.49 \pm 0.01)$, enquanto que para o grupo tratado o valor obtido é da ordem de $D_f = (1.44 \pm 0.04)$. Estes valores são bem próximos da dimensão fractal medida em sistemas que envolvem *cluster-cluster aggregation*, o qual apresenta uma dimensão fractal da ordem de

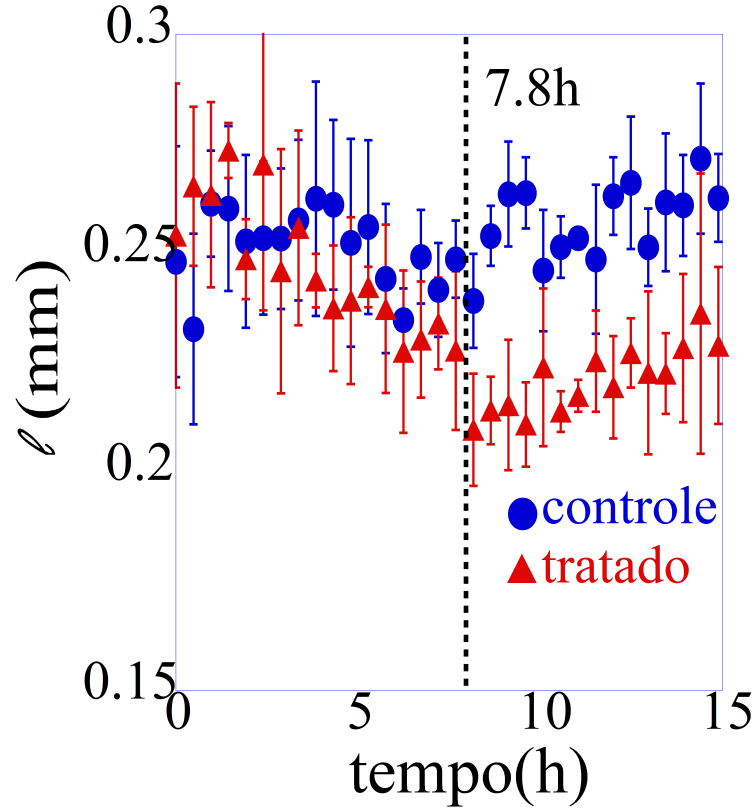


Figura 5.11: Evolução temporal do comprimento médio entre as bifurcações ℓ (mm). O círculo cheio representa os dados do grupo controle e o triângulo cheio representa os dados do tratado. As barras de erro representam o desvio padrão de três amostras em cada grupo. A linha vertical pontilhada é um guia para o tempo de 7.8h

$D_f \approx 1.5$ [83, 17]. Isto sugere que, nas primeiras horas de desenvolvimento, a interação aglomerado-aglomerado, prevalece na dinâmica de crescimento do sistema. Como novos aglomerados surgem na *area opaca*, como ilustrado na Fig. 5.2, inicialmente, a dimensão fractal média em ambos grupos aumenta. Após 5h do início do experimento, a dimensão fractal em ambos grupos tende à um valor constante. E próximo 7.8h, a dimensão fractal média alcança um *plateau* diferente em cada grupo, como ilustrado em Fig. 5.12. O valor médio da dimensão fractal alcançado no grupo controle, a partir 7.8h até 15h, é da ordem de $D_f = (1.69 \pm 0.01)$. Para este mesmo intervalo, o valor médio calculado no grupo tratado com Avastin é da ordem de $D_f = (1.74 \pm 0.02)$. Este aumento na dimensão fractal, nos estágios finais de formação da rede vascular, é um indício que neste grupo há uma distribuição mais uniforme de vasos na região analisada.

O valor médio encontrado para as estruturas de rede está próximo aos valores encontrados na literatura para estruturas vasculares [40, 42, 46]. A divergência entre os valores da dimensão fractal obtida em ambos os grupos, aponta novamente que, nos estágios finais, existe uma diferença estrutural entre as topologias de rede dos dois grupos estudados.

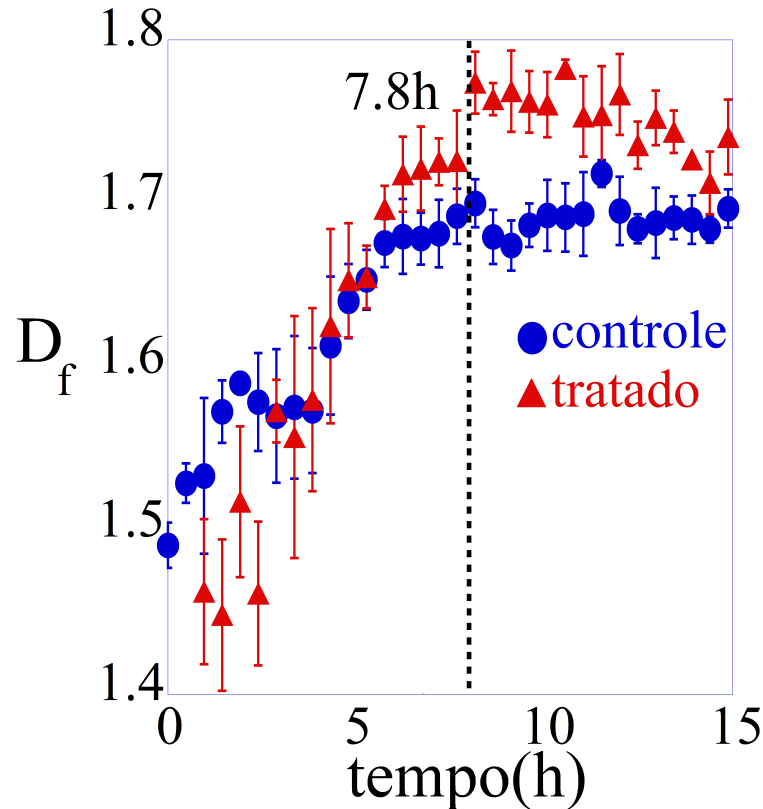


Figura 5.12: Dimensão fractal, D_f , em função do tempo para o grupo controle e tratado. A linha vertical pontilhada é um guia para o tempo de 7.8h. O círculo cheio representa os dados do grupo controle e o triângulo cheio representa os dados obtidos nos embriões tratados. As barras de erro representam o desvio padrão de três amostras em cada grupo.

Até o presente momento, os resultados obtidos divergem a partir de 7.8h, sugerindo que a partir desse momento as topologias de rede assumem configurações diferentes em ambos os grupos estudados. No intuito de avaliar a alteração morfológica promovida pelo Avastin na topologia de rede, calculamos a *treeness* usando a Eq. 3.6. A Fig. 5.13 apresenta a evolução temporal da *treeness*, ϕ , para o grupo controle e tratado com Avastin. No estágio inicial, a *treeness* em ambos os gru-

pos exibe valores similares da ordem ($\phi \approx 0.1$). A medida que a rede vascular é formada, a *treeness* aumenta consideravelmente em ambos os grupos. Próximo à 7.8h, (sinalizada pela linha vertical pontilhada), a *treeness* diminui em ambos grupos. O valor médio para a *treeness*, no intervalo de 7.8h até 15h, é próximo $\phi_{\text{Control}} = (0.39 \pm 0.04)$ no grupos controle, e da ordem de $\phi_{\text{Avastin}} = (0.19 \pm 0.09)$ no grupo tratado com Avastin. Lembrando que os valores para este parâmetro está inserido no intervalo, $0 < \phi < 1$. Em que, $\phi \approx 0$, representa a topologia de uma rede completamente conectada, ou seja, não há estruturas livres, todos os circuitos são fechados. E para, $\phi \approx 1$, representa uma rede sem circuito fechado, sua estrutura se assemelha a uma árvore genealógica. Assim, o maior valor da *treeness* alcançado no grupo controle sugere que a topologia das redes vasculares neste grupo assemelha-se à topologia de rede do tipo árvore. Estes resultados indicam que, provavelmente, o Avastin interage no sistema ligando-se aos domínios de VEGF, diminuindo assim a sinalização entre as células e a matriz extracelular. Consequentemente, a topologia de rede nesse grupo perde a arquitetura ramificada dos embriões controle e exibe uma arquitetura semelhante às topologias de redes quadradas [59].

Com intuito ainda de caracterizar a mudança estrutural entre as topologias de redes, calculamos o índice γ usando a Eq. 3.4, após a formação do maior aglomerado conectado, no intervalo de 7.8h até 15h. A Fig. 5.14 apresenta o índice γ em função do tempo para ambos os grupos estudados. A evolução do índice γ mostrado na Fig. 5.14 indica que a densidade das conexões no grupo tratado com Avastin é maior que no grupo controle. Todos os resultados apresentados nessa seção corroboram para descrever quantitativamente a mudança estrutural promovida pelo Avastin na topologia das redes vasculares. Como descrito na literatura, o Avastin têm sido aplicado em tratamento tumorais devido a sua habilidade de promover mudanças estruturais nas topologias de redes em regiões tumorais controlando assim, o crescimento desordenado do tumor [84].

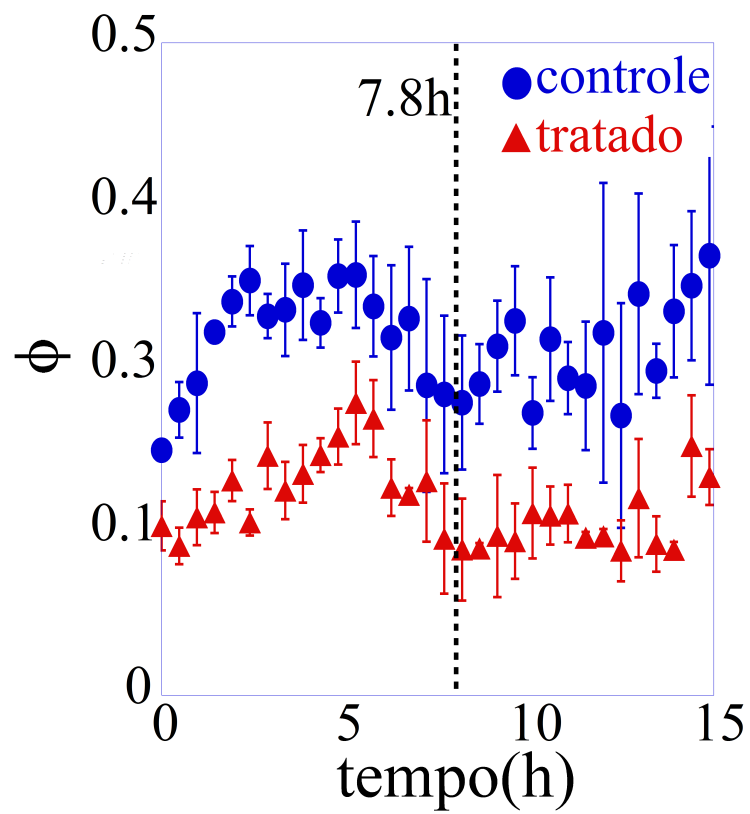


Figura 5.13: *Treeness*, ϕ , em função do tempo para o grupo controle e tratado. A linha vertical pontilhada é um guia para o tempo de 7.8h. As barras de erro representam o desvio padrão de três amostras em cada grupo.

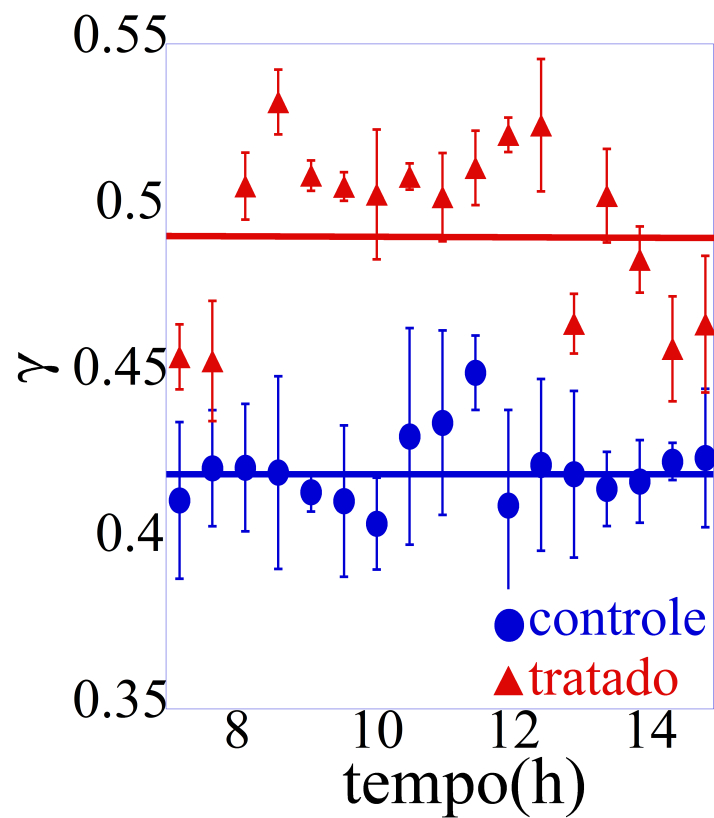


Figura 5.14: Índice γ em função do tempo medido nas topologias de rede formadas tanto para o grupo controle e tratado. As barras de erro representam o desvio padrão de três amostras em cada grupo. A linha cheia horizontal representa o valor médio do índice γ em cada grupo.

Capítulo 6

Conclusões

Neste trabalho, estudamos a auto-organização espaço-temporal de aglomerados celulares formando redes vasculares em embriões sob uma perspectiva física. Para isso, usamos conceitos de física estatística associados à ciências de redes de forma a descrever quantitativamente o sistema e caracterizar a percolação ao longo do processo. Além disso, avaliamos os efeitos nas topologias de rede ao diminuir a concentração de VEGF livre na matriz extracelular. Em suma, observamos que, após a percolação a topologia da rede vascular, no grupo controle, assume uma estrutura típica de artérias e veias, que apresentam uma organização similar à uma topologia de rede do tipo árvore. Em contrapartida, quando aplicamos o fator antiangiogênico, o qual diminui a concentração de VEGF livre na matriz extracelular, observamos que a topologia da rede vascular assumida neste grupo é semelhante às estruturas de redes quadradas. Essas observações, são asseguradas por diferentes evidências ao monitorar a evolução temporal das métricas como: (i.) comprimento médio entre as bifurcações, (ii.) a dimensão fractal, D_f , (iii.) a distribuição dos graus, $P(k)$, (iv.) o grau médio dos vértices, $\langle k \rangle$, (v.) o índice γ e (vi.) a *treeness*, ϕ . Alguns desses parâmetros, exibem uma divergência entre os dois grupos, próximo a 7,8 horas sugerindo que a partir deste instante, as redes vasculares em desenvolvimento assumem uma mudança estrutural em suas topologias. Essa mudança evidencia a importância dos microdomínios de VEGF na matriz extracelular ao longo do processo normal da vasculogênese. Tal mudança topológica, sugere que ao desequilibrar a concentração de VEGF livre na matriz extracelular, pode-se promover uma mal formação da rede vascular. Por outro lado, outras medidas, como (i.) coeficiente de agrupamento médio,

$\langle C \rangle$, (ii.) o coeficiente de correlação r , (iii.) o menor caminho médio, $\langle L \rangle$, e (iv.) a fração de vértices no maior aglomerado conectado, f , apontaram para uma transição abrupta próximo a 5 horas de experimento. Essa transição, consiste basicamente no alastramento do maior aglomerado conectado pelo sistema, conectando basicamente toda a área analisada. Além dos resultados obtidos neste trabalho caracterizando a vasculogênese no embrião, acreditamos que a metodologia utilizada pode ser generalizada para avaliar alterações em redes vasculares de diferentes sistemas. Essa metodologia pode, por exemplo, ser diretamente aplicada em estudos oftalmológicos com o objetivo de detectar quantitativamente mudanças nas topologias vasculares promovidas por doenças ou fármacos. Em linhas gerais, acreditamos que desenvolvemos um método quantitativo que poderá ser empregado em diferentes sistemas biológicos. A ciência de redes, por meio das suas métricas, mostrou ser uma ferramenta promissora para caracterizar as diferenças entre as topologias de redes vasculares aprimorando a aplicação da física nas ciências biomédicas.

Referências Bibliográficas

- [1] AP Alves, ON Mesquita, J Gómez-Gardeñes, and U Agero. Graph analysis of cell clusters forming vascular networks. *Royal Society Open Science*, 5(3):171592, 2018.
- [2] Gleisy Kelly Goncalves, Sergio Scalzo, Ana Paula Alves, Ubirajara Agero, Silvia Guatimosim, and Adelina M Reis. Neonatal cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin-1 is blocked by estradiol acting on gper. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 314(3):C310–C322, 2017.
- [3] Barbara Hissa, Bruno Pontes, Paula Magda S Roma, Ana Paula Alves, Carolina D Rocha, Thalita M Valverde, Pedro Henrique N Aguiar, Fernando P Almeida, Allan J Guimarães, Cristina Guatimosim, et al. Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes. *Plos One*, 8(12):e82988, 2013.
- [4] U Agero, CH Monken, C Ropert, RT Gazzinelli, and ON Mesquita. Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy. *Physical Review E*, 67(5):051904, 2003.
- [5] José Coelho Neto, Ubirajara Agero, Ricardo T Gazzinelli, and Oscar N Mesquita. Measuring optical and mechanical properties of a living cell with defocusing microscopy. *Biophysical Journal*, 91(3):1108–1115, 2006.
- [6] WC Aird. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(7):1392–1406, 2005.
- [7] Werner Risau and Ingo Flamme. Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11(1):73–91, 1995.
- [8] A. Czirok , C.D. Little. Pattern formation during vasculogenesis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 96(2):153–162, 2012.

- [9] Kelsey E Derricks, Vickery Trinkaus-Randall, and Matthew A Nugent. Extracellular matrix stiffness modulates vegf calcium signaling in endothelial cells: individual cell and population analysis. *Integrative Biology*, 7(9):1011–1025, 2015.
- [10] Kelsey D Sack, Madelane Teran, and Matthew A Nugent. Extracellular matrix stiffness controls vegf signaling and processing in endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 231(9):2026–2039, 2016.
- [11] A Köhn-Luque, W de Back, Y Yamaguchi, K Yoshimura, MA Herrero, and T Miura. Dynamics of vegf matrix-retention in vascular network patterning. *Physical Biology*, 10(6):066007, 2013.
- [12] Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88(1):49–92, 1951.
- [13] Walter de Back. *Multicellular systems biology of development*. PhD thesis, Zentrum für Informationsdienste und Hochleistungsrechnen (ZIH) angefertigt, 2015.
- [14] Margriet M Palm and Roeland MH Merks. Vascular networks due to dynamically arrested crystalline ordering of elongated cells. *Physical Review E*, 87(1):012725, 2013.
- [15] Miguel A Herrero, Alvaro Koehn, and Jose M Perez-Pomares. Modelling vascular morphogenesis: Current views on blood vessels development. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, 19(supp01):1483–1537, 2009.
- [16] Kohn-Luque A, De Back W, Starrua J, Mattiotti A, Deutsch A, Pérez-Pomares JM, Herrero MA. Early embryonic vascular patterning by matrix-mediated paracrine signalling: a mathematical model study. *PloS One*, 6(9):e24175, 2011.
- [17] Antonio Coniglio, Antonio de Candia, Stefano Di Talia, and Andrea Gamba. Percolation and burgers dynamics in a model of capillary formation. *Physical Review E*, 69(5):051910, 2004.
- [18] Scianna M, Bell CG, Preziosi L. A review of mathematical models for the formation of vascular networks. *Journal of Theoretical Biology*, 333:174–209, 2013.

- [19] Gamba A, Ambrosi D, Coniglio A, De Candia A, Di Talia S, Giraudo E, Serini G, Preziosi L, Bussolino F. Percolation, morphogenesis, and burgers dynamics in blood vessels formation. *Physical Review Letters*, 90(11):118101, 2003.
- [20] Bruno de Oliveira. *Estudo do potencial vascular de precursores de vasos coronários em sítio adulto*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2011.
- [21] Serini G, Ambrosi D, Giraudo E, Gamba A, Preziosi L, Bussolino F. Modeling the early stages of vascular network assembly. *The EMBO Journal*, 22(8):1771–1779, 2003.
- [22] Alan Mathison Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 237(641):37–72, 1952.
- [23] Alfred Gierer and Hans Meinhardt. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik*, 12(1):30–39, 1972.
- [24] AJ Koch and Hans Meinhardt. Biological pattern formation: from basic mechanisms to complex structures. *Reviews of Modern Physics*, 66(4):1481, 1994.
- [25] JD Murray, George F Oster, and AK Harris. A mechanical model for mesenchymal morphogenesis. *Journal of Mathematical Biology*, 17(1):125–129, 1983.
- [26] D Manoussaki, SR Lubkin, RB Vemon, and JD Murray. A mechanical model for the formation of vascular networks in vitro. *Acta Biotheoretica*, 44(3-4):271–282, 1996.
- [27] René FM van Oers, Elisabeth G Rens, Danielle J LaValley, Cynthia A Reinhart-King, and Roeland MH Merks. Mechanical cell-matrix feedback explains pairwise and collective endothelial cell behavior in vitro. *Plos Computational Biology*, 10(8):e1003774, 2014.
- [28] Szabo A, Perryn ED, Czirok A. Network formation of tissue cells via preferential attraction to elongated structures. *Physical Review Letters*, 98(3):038102, 2007.
- [29] François Graner and James A Glazier. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Physical Review Letters*, 69(13):2013, 1992.

- [30] Roeland MH Merks, Erica D Perryn, Abbas Shirinifard, and James A Glazier. Contact-inhibited chemotaxis in de novo and sprouting blood-vessel growth. *Plos Computational Biology*, 4(9):e1000163, 2008.
- [31] Roeland MH Merks, Sergey V Brodsky, Michael S Goligorsky, Stuart A Newman, and James A Glazier. Cell elongation is key to in silico replication of in vitro vasculogenesis and subsequent remodeling. *Developmental Biology*, 289(1):44–54, 2006.
- [32] Irina Arnaoutova and Hynda K Kleinman. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nature Protocols*, 5(4):628, 2010.
- [33] Beatrice Nico, Angelo Vacca, Michela De Giorgis, Luisa Roncali, and Domenico Ribatti. Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in the chick embryo area vasculosa. *The Histochemical Journal*, 33(5):283–286, 2001.
- [34] Sunyoung Lee, Shahla M Jilani, Ganka V Nikolova, Darren Carpizo, and M Luisa Iruela-Arispe. Processing of vegf-a by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *The Journal of Cell Biology*, 169(4):681–691, 2005.
- [35] About avastin: Proposed mechanism of actions. 2018.
- [36] Benoit B Mandelbrot. *The fractal geometry of nature*, volume 173. WH freeman New York, 1983.
- [37] Tam s Vicsek. *Fractal growth phenomena*. World scientific, 1992.
- [38] Allbens Atman Picardi Faria. *Aspectos Fractais em Sistemas Complexos*. PhD thesis, Tese de Doutorado, UFMG, 2002.
- [39] M Obert, P Pfeifer, and M Sernetz. Microbial growth patterns described by fractal geometry. *Journal of Bacteriology*, 172(3):1180–1185, 1990.
- [40] Gazit Y, Berk DA, Leunig M, Baxter LT, Jain RK. Scale-invariant behavior and vascular network formation in normal and tumor tissue. *Physical Review Letters*, 75(12):2428, 1995.
- [41] Barry R Masters. Fractal analysis of the vascular tree in the human retina. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 6:427–452, 2004.

- [42] Reishofer G, Koschutnig K, Enzinger C, Ebner F, Ahammer H. Fractal dimension and vessel complexity in patients with cerebral arteriovenous malformations. *PloS One*, 7(7):e41148, 2012.
- [43] Sarah B Wang, Paul Mitchell, Gerald Liew, Tien Yin Wong, Kevin Phan, Aravinda Thiagalingam, Nichole Joachim, George Burlutsky, and Bamini Gopinath. A spectrum of retinal vasculature measures and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 268:215–224, 2018.
- [44] Theo F Nonnenmacher, Gabriele A Losa, and Ewald R Weibel. *Fractals in biology and medicine*. Birkhäuser, 2013.
- [45] Mihai Andrei. Fluorescent chicken embryo. 2012.
- [46] Sylvie Lorthois and Francis Cassot. Fractal analysis of vascular networks: insights from morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 262(4):614–633, 2010.
- [47] Pierre G Vico, Soula Kyriacos, Olivier Heymans, Stéphane Louryan, and Louis Cartilier. Dynamic study of the extraembryonic vascular network of the chick embryo by fractal analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 195(4):525–532, 1998.
- [48] Natasa Popovic, Miroslav Radunovic, Jelena Badnjar, and Tomo Popovic. Fractal dimension and lacunarity analysis of retinal microvascular morphology in hypertension and diabetes. *Microvascular Research*, 118:36–43, 2018.
- [49] Shawn Frost, Yogi Kanagasingam, Hamid Sohrabi, Janardhan Vignarajan, P Bourgeat, Olivier Salvado, Victor Villemagne, Christopher C Rowe, S Lance Macaulay, Cassandra Szoek, et al. Retinal vascular biomarkers for early detection and monitoring of alzheimer’s disease. *Translational Psychiatry*, 3(2):e233, 2013.
- [50] Alicja Kedzia, Marek Rybaczuk, and Ryszard Andrzejak. Fractal dimensions of human brain cortex vessels during the fetal period. *Medical Science Monitor*, 8(3):MT46–MT51, 2002.
- [51] Kwang-Il Goh, Michael E Cusick, David Valle, Barton Childs, Marc Vidal, and Albert-László Barabási. The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21):8685–8690, 2007.

- [52] Albert-Laszlo Barabasi and Zoltan N Oltvai. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*, 5(2):101, 2004.
- [53] Hawoong Jeong, Bálint Tombor, Réka Albert, Zoltan N Oltvai, and A-L Barabási. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*, 407(6804):651, 2000.
- [54] Albert-László Barabási and Márton Pósfai. *Network science*. Cambridge university press, 2016.
- [55] Douglas Brent West et al. *Introduction to graph theory*, volume 2. Prentice hall Upper Saddle River, 2001.
- [56] Barthélemy M. Spatial networks. *Physics Reports*, 499(1):1–101, 2011.
- [57] Réka Albert and Albert-László Barabási. Statistical mechanics of complex networks. *Reviews of Modern Physics*, 74(1):47, 2002.
- [58] Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang D-U. Complex networks: Structure and dynamics. *Physics Reports*, 424(4):175–308, 2006.
- [59] Levinson D. Network structure and city size. *PloS One*, 7(1):e29721, 2012.
- [60] Boccaletti S, Bianconi G, Criado R, Del Genio C. I, Gómez-Gardenes J, Romance M, Sendina-Nadal I, Wang Z, Zanin M. The structure and dynamics of multilayer networks. *Physics Reports*, 544(1):1–122, 2014.
- [61] Corominas-Murtra B, Goñi J, Solé R. V, Rodríguez-Caso C. On the origins of hierarchy in complex networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33):13316–13321, 2013.
- [62] Newman M. E. J. Assortative mixing in networks. *Physical Review Letters*, 89(20):208701, 2002.
- [63] Noldus R, Van M. P. Assortativity in complex networks. *Journal of Complex Networks*, 3(4):507–542, 2015.
- [64] Stauffer D, Aharony A. *Introduction to percolation theory*. CRC press, 1994.
- [65] Adriana G Dickman, Ronald Dickman, and Fabricio Almeida Barbosa. Transições de fase sem termodinâmica. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 28(1):23–33, 2006.

- [66] N Araújo, P Grassberger, B Kahng, KJ Schrenk, and RM Ziff. Recent advances and open challenges in percolation. *The European Physical Journal Special Topics*, 223(11):2307–2321, 2014.
- [67] Dongkwan Shin, Jonghoon Lee, Jeong-Ryeol Gong, and Kwang-Hyun Cho. Percolation transition of cooperative mutational effects in colorectal tumorigenesis. *Nature Communications*, 8(1):1270, 2017.
- [68] Mark EJ Newman. Spread of epidemic disease on networks. *Physical Review E*, 66(1):016128, 2002.
- [69] Romualdo Pastor-Satorras and Alessandro Vespignani. Epidemic spreading in scale-free networks. *Physical Review Letters*, 86(14):3200, 2001.
- [70] Hinrichsen H. Non-equilibrium critical phenomena and phase transitions into absorbing states. *Advances in Physics*, 49(7):815–958, 2000.
- [71] West BJ. Exact solution to fractional logistic equation. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 429(7):103–108, 2015.
- [72] Ana Paula Alves. Desenvolvimento embrionário: das células ao coração. Master’s thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Pós-Graduação em Física, 2011.
- [73] Cui C. *Dynamics of cell movement and tissue motion in gastrulation and micromass cell culture*. Bloomington (Indiana): Indiana University, 2005.
- [74] Abràmoff M.D, Magalhães P.J, Ram S.J. Image processing with imagej. *Biophotonics International*, 11(7):36–42, 2004.
- [75] Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PloS One*, 6(11):e27385, 2011.
- [76] Linda Klotz, Sophie Norman, Joaquim Miguel Vieira, Megan Masters, Mala Rohling, Karina N Dubé, Sveva Bollini, Fumio Matsuzaki, Carolyn A Carr, and Paul R Riley. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature*, 522(7554):62, 2015.
- [77] Seema M Ehsan, Katrina M Welch-Reardon, Marian L Waterman, Christopher CW Hughes, and Steven C George. A three-dimensional in vitro model of tumor cell intravasation. *Integrative Biology*, 6(6):603–610, 2014.
- [78] Samuel McLenachan, Aaron Len Magno, David Ramos, Joana Catita, Paul G McMenamin, Fred Kuanfu Chen, Elizabeth Piroaska Rakoczy, and

- Jesus Ruberte. Angiography reveals novel features of the retinal vasculature in healthy and diabetic mice. *Experimental Eye Research*, 138:6–21, 2015.
- [79] Valeria V Orlova, Francijna E Van Den Hil, Sandra Petrus-Reurer, Yvette Drabsch, Peter Ten Dijke, and Christine L Mummery. Generation, expansion and functional analysis of endothelial cells and pericytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 9(6):1514, 2014.
- [80] Karperien A. Fraclac for imagej. *Charles Sturt University*, 2013.
- [81] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7):676, 2012.
- [82] Newman M. *Networks: An Introduction*. Oxford university press, 2010.
- [83] Vicsek T, Meakin P, Family F. Scaling in steady-state cluster-cluster aggregation. *Physical Review A*, 32(2):1122, 1985.
- [84] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in anti-angiogenic therapy. *Science*, 307(5706):58–62, 2005.

Apêndice A

Programa desenvolvido no *Python*

- Neste apêndice será apresentado o programa desenvolvido no *Python* para ler a matriz adjacência e calcular os parâmetros de rede como o coeficiente de agrupamento, o livre caminho médio, o coeficiente de correlação dos graus entre outros.

```
import networkx as nx
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
import csv

with open('28.csv', 'r') as f:
    reader = csv.reader(f)
    lista = list(reader)

del lista[0]
floatlista=np.zeros((len(lista),len(lista[0])))

for i in range(len(lista)):
    for j in range(len(lista[0])):
        floatlista[i][j]=float(lista[i][j])

intlista=floatlista.astype(np.int64)

A=intlista[:,3:5]
```

```
B=intlista [: ,6:8]

numnos=0

E=nx.Graph()

nos=[[A[0,0],A[0,1]]]
E.add_node(numnos, pos=(A[0,0],A[0,1]))
for i in range(len(A)):
    x=A[i,0]
    y=A[i,1]
    for j in range(1,len(A)):
        if A[j,0]!=x and A[j,1]!=y:
            if not ([A[j,0],A[j,1]] in nos):
                numnos+=1
                nos.append([A[j,0],A[j,1]])
                E.add_node(numnos, pos=(A[j,0],A[j,1]))

if not ([B[0,0],B[0,1]] in nos):
    numnos+=1
    nos.append([B[0,0],B[0,1]])
    E.add_node(numnos, pos=(B[0,0],B[0,1]))

for i in range(len(B)):
    x=B[i,0]
    y=B[i,1]
    for j in range(1,len(B)):
        if B[j,0]!=x and B[j,1]!=y:
            if not ([B[j,0],B[j,1]] in nos):
                numnos+=1
                nos.append([B[j,0],B[j,1]])
                E.add_node(numnos, pos=(B[j,0],B[j,1]))

numnos+=1
```

```
for i in range(len(intlista)):
    a=nos.index([intlista[i,3],intlista[i,4]])
    b=nos.index([intlista[i,6],intlista[i,7]])
    E.add_edge(a,b)

pos=nx.get_node_attributes(E,'pos')
nx.draw(E, pos, with_labels = True)
plt.figure()
nx.draw_networkx_edges(E,pos)

splE=nx.shortest_path_length(E)

asplE=nx.average_shortest_path_length(E)

dij=[]
for i in splE.values():
    d=list(i.values())
    dij.append(d)

dij=np.array(dij)

avgdij=np.sum(dij)/(numnos*(numnos-1))

invdij=1/dij

invdij[np.isinf(invdij)]=0

avginvdij=np.sum(invdij)/(numnos*(numnos-1))

k=nx.k_nearest_neighbors(E)

r=nx.degree_assortativity_coefficient(E)

bij=nx.betweenness_centrality(E)
```

```
c=nx.average_clustering(E)
```

```
bij=nx.betweenness(E)
```

```
nk=nx.average_degree_connectivity(E)
```

Apêndice B

Artigo Publicado

- Neste apêndice será apresentado o artigo *Graph analysis of cell clusters forming vascular networks*, em 14 de março de 2018, na revista **Royal Society open science**. Alves, AP and Mesquita, ON and Gómez-Gardeñes, J and Agero, U. (2018).



Cite this article: Alves AP, Mesquita ON, Gómez-Gardeñes J, Agero U. 2018 Graph analysis of cell clusters forming vascular networks. *R. Soc. open sci.* **5**: 171592. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.171592>

Received: 9 October 2017

Accepted: 2 January 2018

Subject Category:

Physics

Subject Areas:

statistical physics/systems
biology/developmental biology

Keywords:

vasculogenesis, complex networks,
anti-angiogenic regulators, percolation

Author for correspondence:

A. P. Alves

e-mail: anafisic@gmail.com

Electronic supplementary material is available online at <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4016632>.

Graph analysis of cell clusters forming vascular networks

A. P. Alves¹, O. N. Mesquita¹, J. Gómez-Gardeñes^{2,3} and U. Agero¹

¹Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais- 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

²Departamento de Física de la Materia Condensada, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

³GOTHAM Lab, Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), University of Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain

APA, 0000-0003-0594-8215; JG-G, 0000-0001-5204-1937

This manuscript describes the experimental observation of vasculogenesis in chick embryos by means of network analysis. The formation of the vascular network was observed in the *area opaca* of embryos from 40 to 55 h of development. In the *area opaca* endothelial cell clusters self-organize as a primitive and approximately regular network of capillaries. The process was observed by bright-field microscopy in control embryos and in embryos treated with Bevacizumab (Avastin[®]), an antibody that inhibits the signalling of the vascular endothelial growth factor (VEGF). The sequence of images of the vascular growth were thresholded, and used to quantify the forming network in control and Avastin-treated embryos. This characterization is made by measuring vessels density, number of cell clusters and the largest cluster density. From the original images, the topology of the vascular network was extracted and characterized by means of the usual network metrics such as: the degree distribution, average clustering coefficient, average short path length and assortativity, among others. This analysis allows to monitor how the largest connected cluster of the vascular network evolves in time and provides with quantitative evidence of the disruptive effects that Avastin has on the tree structure of vascular networks.

1. Introduction

Vasculogenesis is the process of de novo blood vessel formation [1,2]. At early stages of development, a forming vascular network involves several processes such as migration, proliferation and aggregation of endothelial cells (ECs) [1,3]. In this process, the vascular endothelial growth factor (VEGF) is the principal

regulator of EC dynamics [4]. In recent years, spurred by the potential application to therapies aimed to reduce tumour growth rate, a large body of mathematical models have been developed to better understand vessel formation [2,5–10]. Several studies have shown that cultures of EC aggregates coalesce forming a connected vascular network [7,8,11] so that, at a critical cell density, a percolation transition was observed [8,12]. Although the mechanisms involved in vasculogenesis have been largely studied using EC assembly [7–10,13], we still lack quantitative analysis to understand how a vascular network is formed in a more complex system [14,15]. In this regard, the development of new visualization techniques has allowed to monitor the vasculogenesis process on a whole embryo [2,15,16]. In parallel to the studies aimed at understanding vasculogenesis, a large effort has been made to find anti-angiogenic regulators that control vessel density preventing tumour nourishment [17–19]. In particular, it has been shown that a low dose of Bevacizumab (Avastin®) administered in tumour regions induces the renormalization of the vascular network, improving the oxygenation and drug penetration into tumours. As a consequence, the anti-angiogenic factor slows down the tumour dissemination and enhances the effectiveness of chemo- and radiotherapies [19].

The goal of this work is twofold. First, we have performed experiments by means of bright-field video-microscopy in order to monitor the vasculogenesis process in chicken embryos during the first 15 h of development. These experiments allow us to obtain quantitative data about vessel formation through a systematic characterization of the vascular network evolution from its onset on control and on Avastin-treated embryos. The quantitative data include vessel density, number of cell clusters and the largest cluster density measured as a function of time. Second, taking advantage of the experimental parameters derived by monitoring vasculogenesis, we extract the topology of the forming vascular network and measure the effect of Avastin on its morphology. The quantitative comparison between the structural properties of vascular network on control and Avastin-treated embryos is carried out by measuring network topological features [20] and monitoring its evolution along the vasculogenesis process. The results obtained allow to better understand how EC aggregates self-organized to form a connected vascular network and quantify the morphological differences between the vascular networks of control and Avastin-treated groups.

2. Material and methods

2.1. Experimental set-up

The first cell clusters emerge in the *area opaca* after nearly 40 h of incubation. At this time, the whole embryo was extracted and put under a bright-field microscope to follow vessel formation. Bright-field microscopy is the simplest and cheaper optical microscopy technique. We used it because the contrast obtained was good enough for the imaging analysis we have performed. The complete description of embryo preparation is presented in [21,22]. An image of a whole embryo before formation of vessels at Hamburger and Hamilton (HH) stage 11 [23] is shown in figure 1*a*, showing that, at this stage, the chicken embryo is a two-dimensional small disc. We then monitor the emergence of vessels in the *area opaca* from stage HH-11 to HH-16 [23], i.e. comprising 15 h of development. The original movies can be found in the electronic supplementary material; *VesselGrowth-ControlEmbryo.avi* and *VesselGrowth-TreatedEmbryo.avi* show the formation of vessels on control and Avastin-treated embryos. In figure 1, we show three snapshots of these movies corresponding to 0 h, 7 h and 15 h for control (figure 1*b*) and Avastin-treated (figure 1*c*) embryos in a region (6.58 mm^2) within the *area opaca*. Avastin is incorporated by adding $30 \mu\text{l}$ at a concentration of $6 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ just after the embryo is extracted. The movies were captured using a Nikon Eclipse TI inverted microscope equipped with an objective 1X Nikon Plan UW NA 0.04 and WD 3.2 mm (Nikon Part # MRL 00012) and an environmental chamber (model ChamSlide IC-CU:109, Live Cell Instrument) which provides the environment at 5% CO_2 atmosphere, 37°C temperature and 60% humidity. Finally, the images were captured using a 12 bit UniQ camera (model 1800 CL, Epix Inc.) with 4096 grey levels, $6.4 \mu\text{m}$ of pixel square side, a gain of 11.04 dB and a time resolution of one image captured every 17.28 s.

2.2. Image processing

Vessel patterns were extracted by means of the plug-in *Analyze Particles from ImageJ* [24]. To use this plug-in, a grey level threshold was carefully chosen for each embryo to keep as much information as possible about the contours of the original images. To illustrate this process, we show in figure 2*a–c* three real

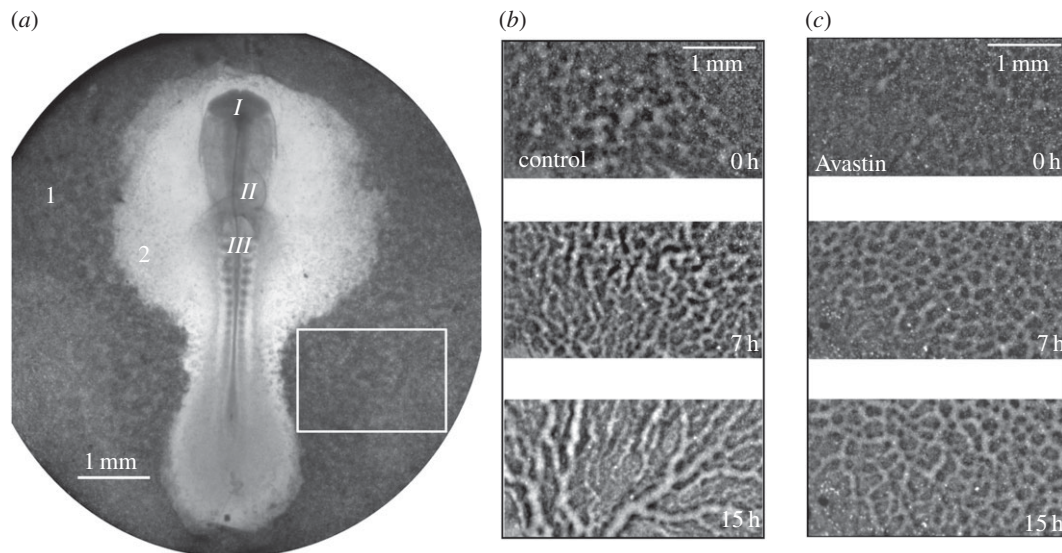


Figure 1. (a) Whole embryo image. From top to bottom, around the middle line, we see the head fold *I*, forming heart *II* and somites *III*, which are blocks of cells which will give rise to muscles, bone, cartilage and skin. The number 1 indicates the *area opaca* and 2 is the *area pellucida*. A selected rectangle (6.58 mm²) in the *area opaca* is used to monitor the forming vascular network. A zoom of the rectangular area was taken from (b) a control embryo, (c) an Avastin-treated embryo, at times: 0, 7 and 15 h, from top to bottom.

pictures captured (already shown in figure 1b) and below, in figure 2d–f, we show their corresponding version once the threshold has been applied. The resulting binary images are then used to identify the EC clusters, as shown in figure 2g–i. Binary images were also used to measure fractal dimension on binary images applying the box counting method using the plug-in *FracLac* [25], also from *ImageJ* [24]. We used a box size ranging from 2 to 200 pixels following a power series to scan rectangular images with an area of 6.58 μm². These techniques allow us to analyse the spatio-temporal self-organization of EC clusters forming the vascular network. For instance, in figure 2j–l, we show the area distribution of the EC clusters of images in figure 2a–c obtained for control embryos. Each distribution displays the number of cell clusters as a function of its area (those clusters smaller than 1.2×10^{-4} mm² were excluded). From the evolution of the area distribution, it is clear that a large cluster (marked by the dotted circle) emerges as time increases.

2.3. Network analysis

Vascular networks are constructed, as usual in spatial networks formed by roads and intersections [26], by considering the vessels as the links and the bifurcation points as representing the nodes of the network. The topology of the network is obtained by means of the free software *AngioTool*, developed to extract the quantitative analysis of angiogenesis [27]. This software is applied directly on original images to identify the vessels for a range of diameters and intensities previously selected. In figure 3(a2–c2) and (d2–f2), we show how the two-dimensional network topology is extracted from the original image sequences (a1–c1) and (d1–f1) for a control and an Avastin-treated embryo, respectively. The resulting networks are represented in figure 3(a3–c3) and (d3–f3), where the colours of nodes represent the number of neighbours (the degree) particular to each node. Once the network is constructed, and in order to apply graph-theoretic tools, we encode its topology into an $N \times N$ (N being the number of nodes) adjacency matrix, \mathbf{A} , whose elements are: $A_{ij} = 1$ if nodes i and j are connected and $A_{ij} = 0$ otherwise. This way the degree of a node i is

$$k_i = \sum_{j=1}^N A_{ij}. \quad (2.1)$$

In what follows, we present a brief summary of the graph metrics [26,28,29] implemented to characterize the networks obtained during the vasculogenesis process:

- *Degree distribution*, $P(k)$ is the probability that a node chosen at random has k neighbours. This distribution is computed by measuring the number of nodes $N(k)$ with k neighbours divided by

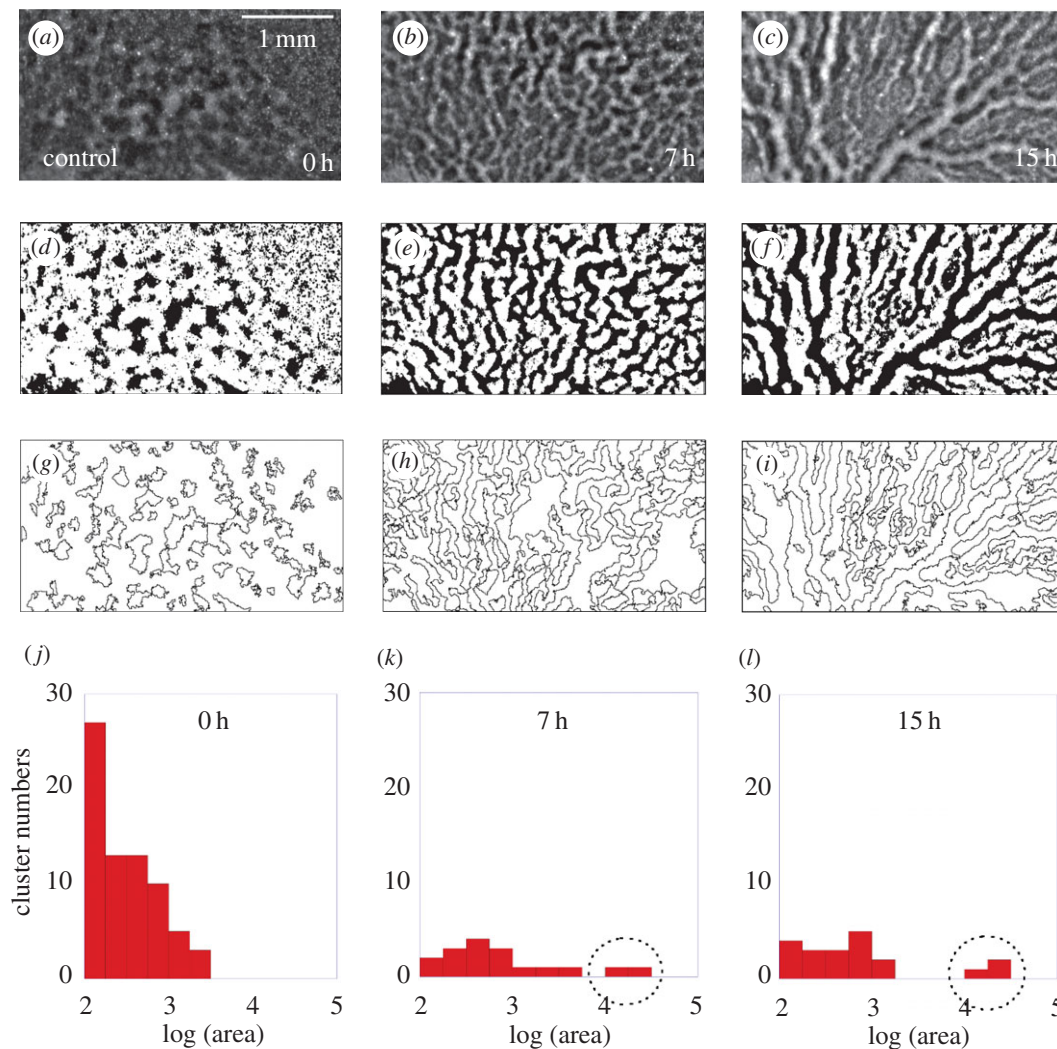


Figure 2. Original images (*a–c*). Binary images (*d–f*), after a threshold operation show an equivalent pattern when compared with the original images. Contour lines of clusters, (*g–i*), identified by the plug-in *Analyze Particles*. From the processed images, we measure the number of endothelial cell clusters and their area. Area distribution of endothelial cell clusters (*j–l*) from the image sequence (*d–f*). (*j*) Displays the distribution at the initial stage. In the middle of the time-interval analysed the distribution is represented in (*k*), where a large cluster starts to appear as identified by the dotted circle.

the total number of nodes, N :

$$P(k) = \frac{1}{N} \sum_{k'=k}^{\infty} N(k'). \quad (2.2)$$

— The average degree $\langle k \rangle$ of a network is the first moment of its degree distribution $P(k)$ and can be calculated as

$$\langle k \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N k_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N A_{ij}. \quad (2.3)$$

— The gamma index γ measures the connectivity in a network. It is defined as the ratio of the number of links in the network, n_ℓ , to the maximum possible number of links between nodes that, in a planar graph, is equal to $3(N-2)$. Therefore, the expression of the γ index reads

$$\gamma = \frac{n_\ell}{3(N-2)}. \quad (2.4)$$

The value of gamma lies in the range $\gamma \in [0, 1]$, where $\gamma = 0$ represents a case in which there are no connections between nodes, whereas $\gamma = 1$ correspond to maximally connected network [26,29].

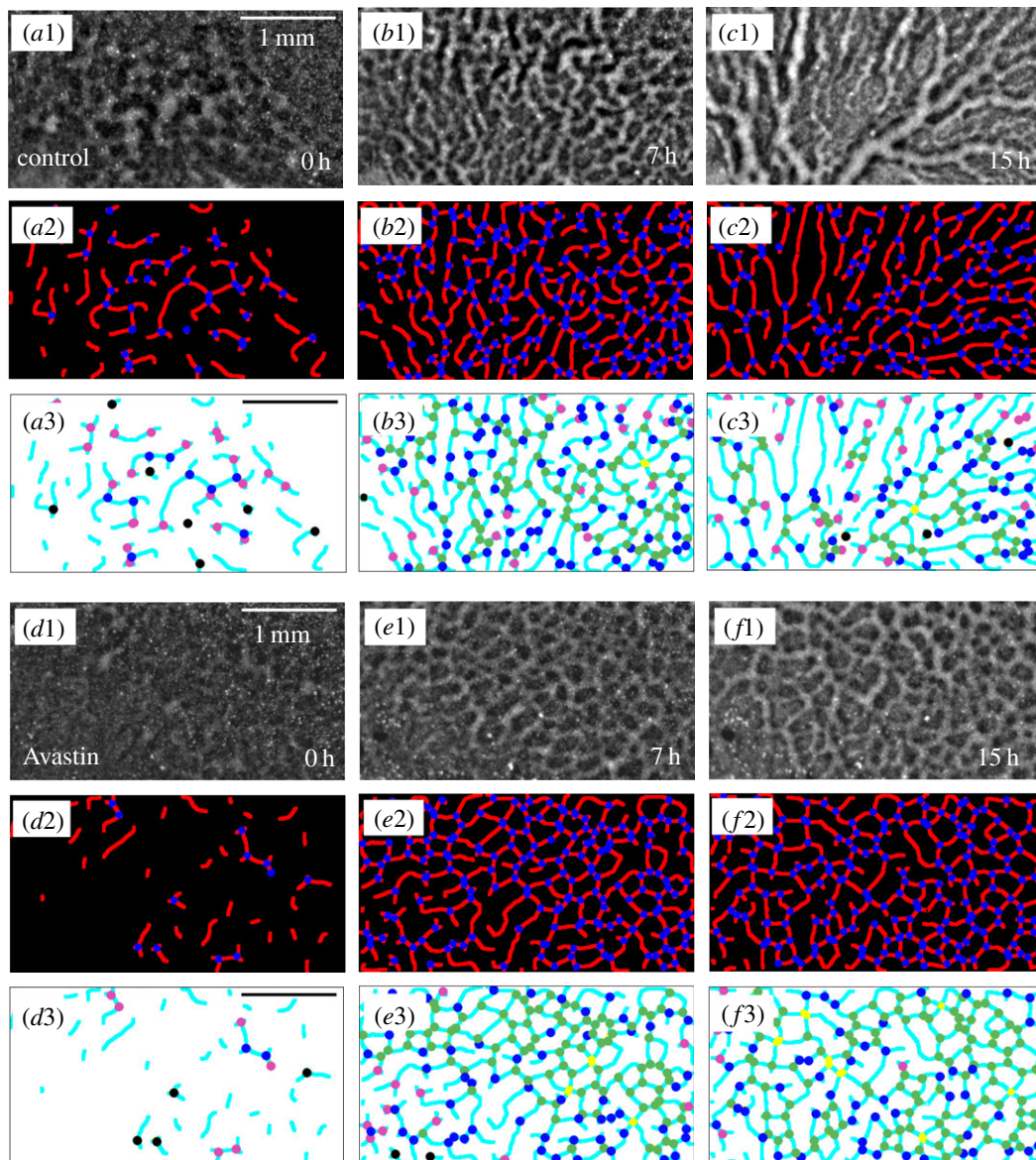


Figure 3. Original images ($a1-c1$), ($d1-f1$) for a control and an Avastin-treated embryo, respectively. Network topology ($a2-c2$), ($d2-f2$) obtained using the program AngioTool shows an equivalent pattern when compared with the original images. The node degree ($a3-c3$ and $d3-f3$) where each colour represents the node degree or its absence (black = without link, pink = one link, blue = two links, green = three links, yellow = four links).

- The average shortest path length of a network $\langle L \rangle$ measures the characteristic distance between each pair of nodes in the network [26,28,30]. The distance d_{ij} between two nodes i and j is computed as the minimum number of links that has to be crossed to go from i to j . By considering all the couples in the network, L can be written as

$$\langle L \rangle = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i \neq j} d_{ij}. \quad (2.5)$$

- Treeness ϕ is used to measure the hierarchical organization on network topologies [29]. A tree graph can be described as a set of connected nodes without closed paths. The treeness covers the ranges from non-hierarchical, $\phi = 0$ (the graph displays all closed paths), to hierarchical, $\phi = 1$ (the graph displays a tree-like structure) which is defined by the following equation:

$$\phi = \frac{L_{\text{Tree}}}{\langle L \rangle}, \quad (2.6)$$

where L_{Tree} is the sum of the average path length of the graph without closed circuits and $\langle L \rangle$ is the average path length of the entire graph.

- The clustering coefficient $\langle C \rangle$ measures the cohesiveness of the network. It is measured as the average of all local (nodal) clustering coefficients in the network divided by the total number of nodes N . The local clustering of a node i is the ratio between the number of links among the neighbours connected to i , e_i , and the maximum possible number of links between them: $k_i(k_i - 1)/2$:

$$\langle C \rangle = \frac{1}{N} \sum_i^N \frac{2e_i}{k_i(k_i - 1)}. \quad (2.7)$$

By the definition, the value is in the interval of $0 \leq \langle C \rangle \leq 1$ [28,30].

- The assortativity coefficient r measures the tendency of nodes with similar degree to be connected [31,32] and can be written as

$$r = \frac{\langle k_i k_j \rangle - \langle k \rangle^2}{\langle k^2 \rangle - \langle k \rangle^2}, \quad (2.8)$$

where $\langle k_i k_j \rangle$ is the average of the products of the degrees of nodes that are connected to each other, $\langle k \rangle^2$ is the square of the mean node degree and $\langle k^2 \rangle$ is the second moment of the degree distribution $P(k)$.

3. Results and discussion

We organize the results assembling the parameters that better characterize the stages of the network formation as follows.

- Early network formation: involves migration and aggregation among EC clusters, which is characterized through *Statistical analysis of binary patterns*.
- Network formation: identified by a percolation phase transition in the system, which can be determined by *Network metrics*, some parameters display an abrupt transition near 5 h.
- Network remodelling: differentiation of vascular network, which will be identified by *Structural metrics* parameters measured on network topologies. We were able to distinguish tree-like topology from the more lattice-like structure near 7.8 h.

3.1. Statistical analysis of binary patterns

We now proceed to show the main results that characterize the spatio-temporal self-organization of EC clusters forming the vascular network in both groups of control and Avastin-treated chick embryos. As anticipated above, in [figure 2j–l](#) we show the area distribution at three different stages. In the initial stage, cell clusters are still small; in the middle of the process, the area distribution in [figure 2k](#) points out many small clusters while a largest cluster appears. At the final stage, the largest cluster is clearly far apart from the distribution of small clusters, as shown in [figure 2l](#). The area of the largest cluster reaches a maximum value of $A_{\text{Largest Cluster}} = 1.7 \pm 0.2 \text{ mm}^2$, which is three orders of magnitude larger than the area of the initial clusters. The movies provided in the electronic supplementary material show the vessels' growth within the *area opaca* for both control and Avastin-treated embryos over 15 h of the vasculogenesis process.

[Figure 4a](#) shows the mean vessel density $\rho(t)$, for control and for Avastin-treated embryos as a function of time. This quantity is defined as $\rho(t) = (\text{detected vessel area}) / (\text{total image area})$, and it is fitted by equation (3.1).

To characterize vessel growth for both groups, we use a nonlinear equation as a model which displays a similar behaviour of non-equilibrium phase transition models [33,34]. We fitted the experimental data shown in [figure 4](#) using the solution of a logistic growth equation, as follows:

$$\rho(t) = \frac{1}{[1/\rho_{\text{max}} + (1/\rho_0 - 1/\rho_{\text{max}})e^{-\omega t}]}, \quad (3.1)$$

where $\rho(t)$ is the vessel density, ρ_0 is the initial vessel density, ρ_{max} is the maximum density value and ω is the growth rate. The maximum density value reached for control, $\rho_{\text{max}}^{\text{Control}} = 0.46 \pm 0.01$, is close to the maximum density obtained for the treated embryos, $\rho_{\text{max}}^{\text{Avastin}} = 0.44 \pm 0.01$. It shows that although the Avastin concentration used in this work decreases vessels density, is not enough to inhibit the vessel

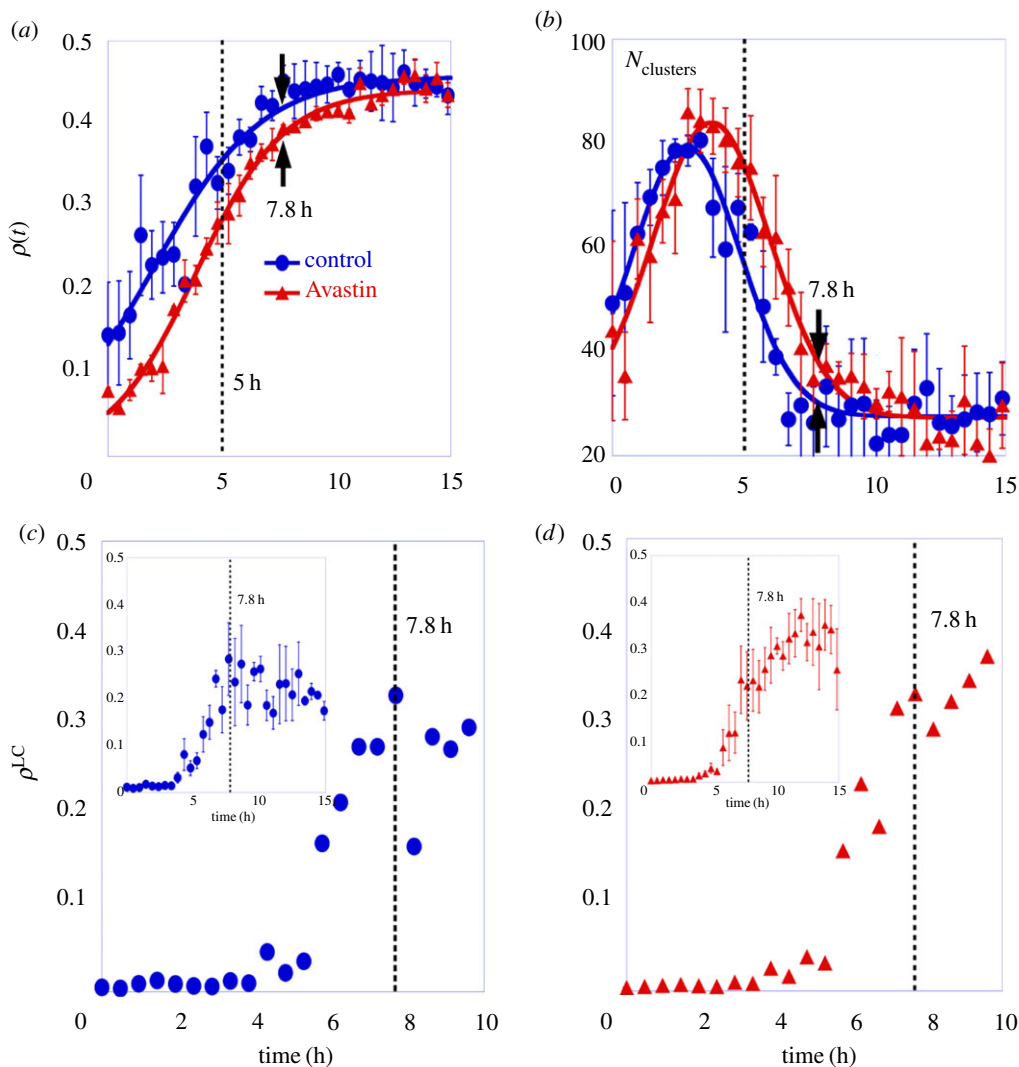


Figure 4. Statistical analysis of binary patterns which characterize the spatio-temporal self-organization of cell clusters forming the vascular network for three embryos in each group. The error bars are the standard deviation. (a) Mean vessel density of endothelial cell clusters, $\rho(t)$, as a function of time; the full lines are the fit obtained from equation (3.1). (b) The mean number of cell clusters, N_{clusters} , as a function of time, where the full line is a Gaussian fit just to guide the eye. The largest cluster density, ρ^{LC} , as a function of time for (c) one control embryo and (d) one Avastin-treated embryo. The insets display the average of the largest cluster density as a function of time for both groups. The vertical line is a guide to the eye for two characteristic times at 5 h in (a) and (b), 7.8 h in (c) and (d). The full circles represent the data for control, and the full triangles the data for Avastin-treated embryos.

formation. The vessel density growth rate is $\omega^{\text{Control}} = (0.42 \pm 0.04)/h$ for a control group and $\omega^{\text{Avastin}} = (0.52 \pm 0.02)/h$ for Avastin-treated group. The saturation *plateau* obtained on treated embryos is a little lower than the one reached for control ones.

Figure 4b shows the time evolution of the mean number of cell clusters, N_{clusters} , for a group of control and for a group of Avastin-treated embryos. In control embryos the value of N_{clusters} increases reaching a maximum after 2.7 h, then it decreases to a minimum value when the vascular network is completely assembled. On the other hand, for Avastin-treated embryos N_{clusters} shows the same qualitative behaviour, although it reaches a maximum next to 3.5 h. The N_{clusters} measured at final stages are the smallest value measured, indicating that the EC clusters aggregate giving rise to a largest cluster on *area opaca*.

The relative size of the largest interconnected cluster has been measured to characterize the percolation phase transition on vasculogenesis as shown in [8,35]. The largest cluster density, ρ^{LC} , is defined as the ratio between the area of the largest interconnected cluster formed by aggregation of cell clusters, divided by the total area. To show the emergence of the percolating cluster on it the system,

figure 4c shows the largest cluster density for one control embryo in an interval of 10 h, and the inset shows the average in 15 h for a group of control embryos. The same data are shown in figure 4d for one treated embryo in a interval of 10 h, which starts with a small value and undergoes an abrupt change after 5 h, reaching a maximum value ($\rho^{\text{LC}} \approx 0.3$). And the inset shows the average in 15 h for a group of Avastin-treated embryos. At an interval of 10 h, the largest cluster density is approximately equal to that of the system, indicating that a percolating cluster is formed, as described in [36]. In this work, the largest cluster density is the first measurement which points out the abrupt phase transition on the vasculogenesis process identifying two important times, one at 5 h, where the ρ^{LC} starts to grow, and the other at 7.8 h where it reaches a saturation value. A percolation transition has been previously observed analysing ECs in culture, as reported in [8,35].

3.2. Network metrics

Now we focus our attention to characterize the structural properties by means of *Network metrics* [26, 28,29] of vascular network topology as introduced in figure 3(a2–c2) and (d2–f2). The structure of these networks will reveal an important percolation transition in the system. Figure 5(a1–c1) shows the skeleton of a forming vascular network in which we extracted the adjacent matrix that encodes the structure of the graphs plotted in figure 5(a2–c2). We start by showing the time evolution of the degree distribution $P(k)$ for a group of control and Avastin-treated embryos (see figure 5(a3–c3) and (d–f), respectively). The planar vascular networks contain nodes with few neighbours, as the degrees of the vertices range from 1 to 4. At the initial stage, 0 h, on control group $\approx 60\%$ of nodes have degree 1, $\approx 40\%$ have degree 2, $\approx 15\%$ degree 3 and nodes with degree 4 are not observed. Once a large connected cluster has been formed, to 7 h, we find that just $\approx 20\%$ of nodes have degree 1, $\approx 37\%$ have degree 2, $\approx 40\%$ have degree 3, and just $\approx 2\%$ of nodes have degree 4. At the final stage, we observe that $\approx 20\%$ of nodes have degree 1, $\approx 40\%$ have degree 2 and 3, and nodes with degree 4 are not observed as shown on figure 5(a3–c3). The evolution of the degree distribution $P(k)$ shows the maturation of the vascular networks during the vasculogenesis process. On the other hand, although a similar behaviour is observed for the evolution of $P(k)$ in the Avastin-treated group, in this case the fraction of nodes with degree 3 is significantly larger at the final stage, reaching to $\approx 60\%$ of nodes in the final stage. This increase is achieved at the expense of a decrease in the fraction of nodes connected to two neighbours.

The more densely connected structure of vascular networks in the Avastin-treated group is also confirmed by monitoring the evolution of the average degree $\langle k \rangle$ during vasculogenesis. In figure 6a, we show this evolution for control and Avastin-treated embryos. It becomes clear that, once the network has been formed, the average degree increases and reaches a *plateau* close to $\langle k_{\text{control}} \rangle = 2.28 \pm 0.06$ on control, and $\langle k_{\text{Avastin}} \rangle = 2.54 \pm 0.05$ on Avastin-treated embryos. The average degree tends to remain constant after 7.8 h as identified by the black arrows in figure 6a, pointing out that the vascular network has been completely formed.

We now monitor the evolution of other network metrics during vasculogenesis. In figure 6b, we show the time evolution of the assortativity coefficient r for control and Avastin-treated embryos. Initially, the assortativity coefficient is negative $r < 0$ for both groups, pointing out that networks are disassortative at this initial stage due to the formation of many small star-like structures before the large connected cluster shows up. When this happens, assortativity becomes nearly zero, $r \sim 0$, indicating that the degrees of connected nodes tend to be uncorrelated due to their similarity. This evolution holds for control and Avastin-treated embryos because both for tree-like (control embryos) and lattice-like (Avastin-treated embryos) structures the degrees of adjacent nodes are similar. In between the assortativity oscillates, with a minimum near the same time we observe the maximum number of clusters, as shown in figure 4b. The creation of new small star-like clusters compete with the large emerging cluster which contributes to abruptly decreasing the assortativity coefficient around the time of 3 h.

The evolution of the clustering coefficient $\langle C \rangle$ of the networks of control and Avastin-treated embryos is shown in figure 6c. At the initial stages of development, clustering is very small, as it obviously follows from the abundance of star-like structures in the early vascular network. However, a sudden growth takes place both for control and Avastin-treated embryos at $t \simeq 5$ h. After this jump the clustering reaches a *plateau*, stabilizing around a small value $\langle C \rangle \approx 0.021 \pm 0.007$ for both control and Avastin-treated groups, which is consistent with the tree-like and lattice structures that appear in their respective developed networks.

The time evolution of the average shortest path length, $\langle L \rangle$, is shown in figure 6d, while the inset shows the mean number of nodes on control and Avastin-treated groups. We computed $\langle L \rangle$ of the largest connected cluster in order to avoid its divergence due to the presence of disconnected nodes.

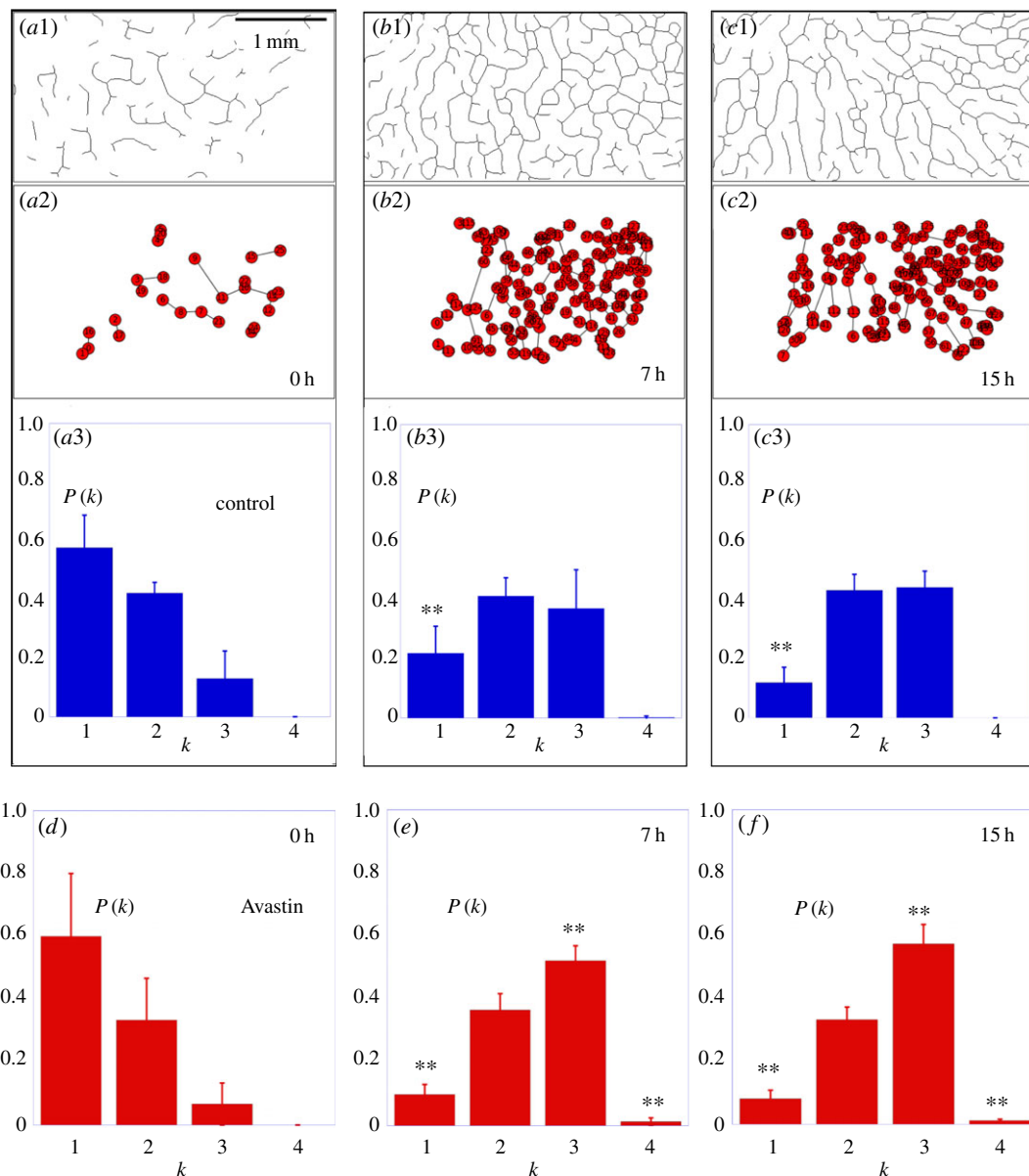


Figure 5. The codification process of adjacent matrix: (a1–c1) show the skeleton topology of a forming vascular network for a control embryo and (a2–c2) represent the adjacent matrix extracted from the skeleton, where each bifurcation is identified as a node, and the distance interaction represents the links. The node degree distributions obtained from three embryos in each group as displayed for (a3–c3) the control and (d–f) Avastin-treated group. The symbol (**) indicates the statistical difference of the distributions from the initial stage at $t = 0$ h, which have $p < 0.05$ calculated by the Smirnov–Kolmogorov test. The error bars are the standard deviations.

The evolution of $\langle L \rangle(t)$ shows a sharp increase at $t \simeq 5$ h, reaching a stationary value close to $\langle L \rangle \approx 13$ for both control and Avastin-treated groups. However, in the last hours (see black arrows) $\langle L \rangle$ increases on control group. Although the value of $\langle L \rangle$ is very close for both groups, the larger number of nodes in the Avastin-treated embryos (see inset) is a signature that the connectivity of its vascular network is larger.

Finally, in figure 7*a,b*, we show the fraction of nodes on the largest cluster, f , as a function of time in one control and one Avastin-treated embryo, respectively. The insets in the plots show the particular vascular networks at the final stage. The fraction of nodes on the largest cluster starts with small values and abruptly grows at approximately 5 h on control and Avastin-treated embryos reaching soon afterwards its maximum possible value $f = 1$. This abrupt transition from small to larger values is clear when just one sample is monitored. In figure 7*c,d*, we show the evolution of f averaged in a group of control and Avastin-treated embryos. In this case, the transition becomes smoother although the jump at approximately 5 h is still clear.

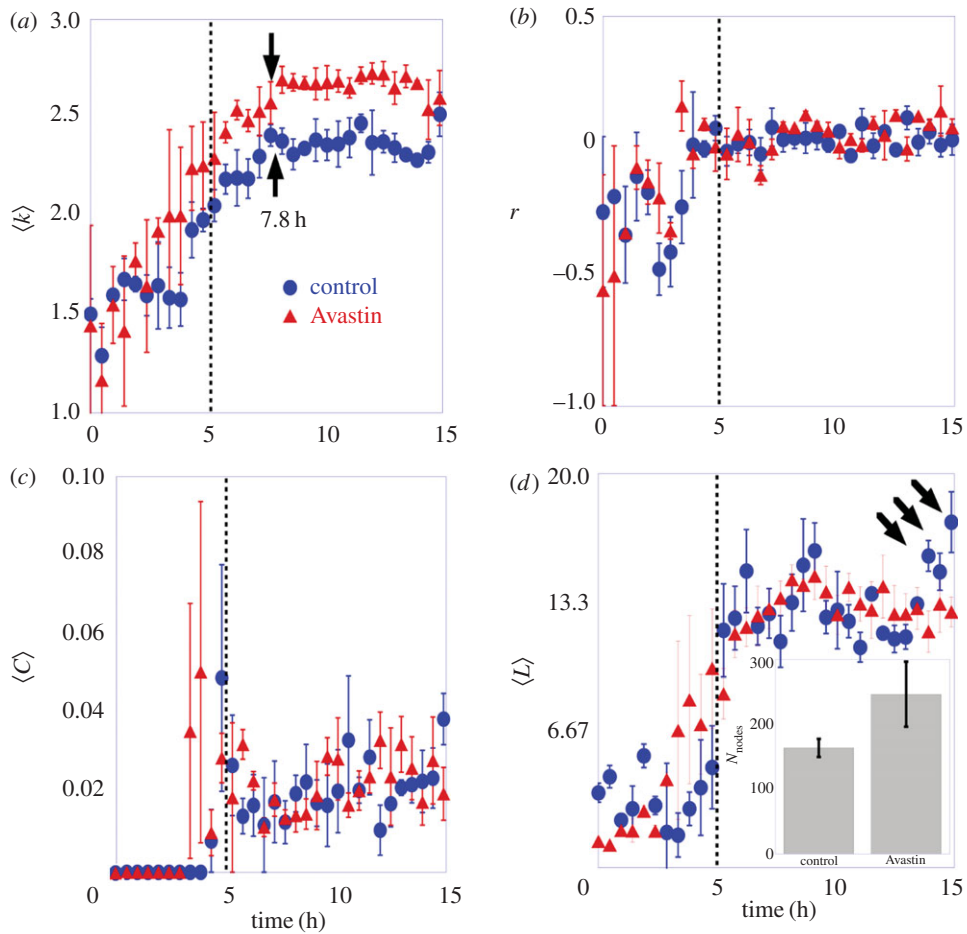


Figure 6. Network descriptors of vascular network topologies. The filled circles represent the group of control, and the filled triangles a group of Avastin-treated embryos. (a) The mean node degree as a function of time measured on a complete vascular network. (b) The coefficient of assortativity measured on the largest cluster as a function of time. (c) The average clustering coefficient as a function of time measured on a complete vascular network. (d) The shortest path length measured on the largest cluster as a function of time. The error bar is the standard deviation for three embryos in each group. The black arrows highlight the larger value reached by the control group at the final stage. The inset graph shows the average number of nodes with the respective error bar for both groups. The vertical line is a guide to the eye for the time of 5 h.

3.3. Structural metrics

To point out the structural change promoted by Avastin in the vascular network morphology we measured: the chord length ℓ (mm), the fractal dimension D_f , the treeness ϕ and the γ index.

Figure 8a shows the mean chord length ℓ (mm), which represents the distance between vessel bifurcations as a function of time, for a group of control and Avastin-treated embryos. At the initial stages, the mean chord length measured on both control and Avastin-treated embryos is $\ell = 0.25 \pm 0.03$ mm. After approximately 7.8 h of the experiment, we observe in figure 8a that the mean chord length splits out in two distinct values, reaching a mean value of $\ell^{\text{Control}} = 0.26 \pm 0.01$ mm on control, and a mean value of $\ell^{\text{Avastin}} = 0.22 \pm 0.01$ mm on Avastin-treated embryos. The smaller value measured on Avastin-treated embryos indicates that Avastin interacts on the system promoting structural changes on the vascular network. The mean chord length obtained on the treated group is near to the value measured for ECs randomly spread on a matrigel $\ell^{\text{ECMatrigel}} = 0.20 \pm 0.02$ mm as reported in [8,13].

Figure 8b shows the evolution of the mean fractal dimension over time for control and for Avastin-treated embryos. The fractal dimension measured during the initial stages in control is $D_f = 1.49 \pm 0.01$ while in Avastin-treated embryos is $D_f = 1.44 \pm 0.04$. These values are close to the fractal dimension measured on *cluster-cluster aggregation*, which presents $D_f \approx 1.5$ as shown in [12,37]. It suggests that, in the first hours of development, *cluster-cluster aggregation* prevails on the growth dynamics and new clusters emerge on the *area opaca* as shown in figure 4b. The fractal dimension increases during

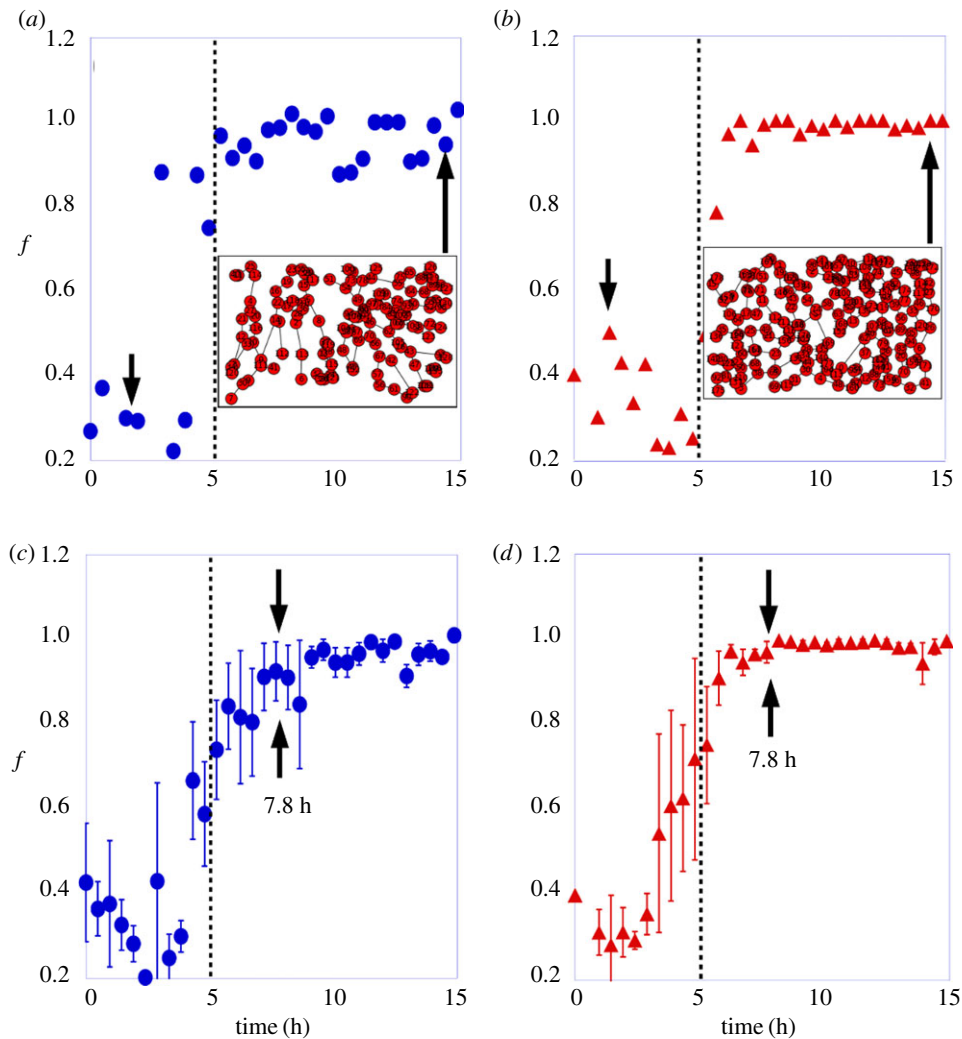


Figure 7. The fraction of nodes in the largest cluster, f , as a function of time for (a) one control sample, and (b) for one Avastin-treated embryo. The insets display the spatial position of vascular network bifurcation. The f as a function of time in a group of three embryos for (c) control, and (d) Avastin-treated ones. The error bar is the standard deviation. The filled circles represent the data for control, the filled triangles the data for Avastin-treated embryos, and the vertical dotted line is a guide to the eye for the time of 5 h.

the first hours. After 5 h of experiment the mean fractal dimension measured for both groups splits out in two different values near 7.8 h and reaches a plateau as shown in figure 8b. The mean fractal dimension measured from 5 to 15 h is $D_f = 1.69 \pm 0.01$ in the control group and $D_f = 1.74 \pm 0.02$ in the Avastin-treated group. A higher fractal dimension measured on the Avastin-treated group indicates that this group presents a large uniform vessel distribution; a similar behaviour has been reported for vascular tissue as shown in [38–40].

The former result corroborates that in the Avastin-treated group the tree structure is broken and, consequently, the number of connections on the vascular network grows. To get more insight on this effect of Avastin, we have measured the treeness ϕ (equation (2.6)) to characterize the evolution of the ramification in vascular networks. In figure 8c, we plot the time evolution of ϕ for control and Avastin-treated embryos. At the initial stage, the treeness of both groups displays similar values ($\phi \sim 0.1$). As the network evolves, treeness increases considerably for the control and Avastin-treated embryos and, close to 7.8 h (dotted line), it decreases in both groups to finally stabilize around $\phi_{\text{Control}} = 0.39 \pm 0.04$ on control and $\phi_{\text{Avastin}} = 0.19 \pm 0.09$ on Avastin-treated embryos. The larger stationary treeness for the control group suggests that their vascular networks resemble more a tree-like topology while, in this regard, the action of Avastin promotes more densely connected regions, thus losing the branched architecture of control embryos and displaying an architecture that resembles that of urban-like structures [29]. This effect of Avastin may play an important role against tumour growth. To further

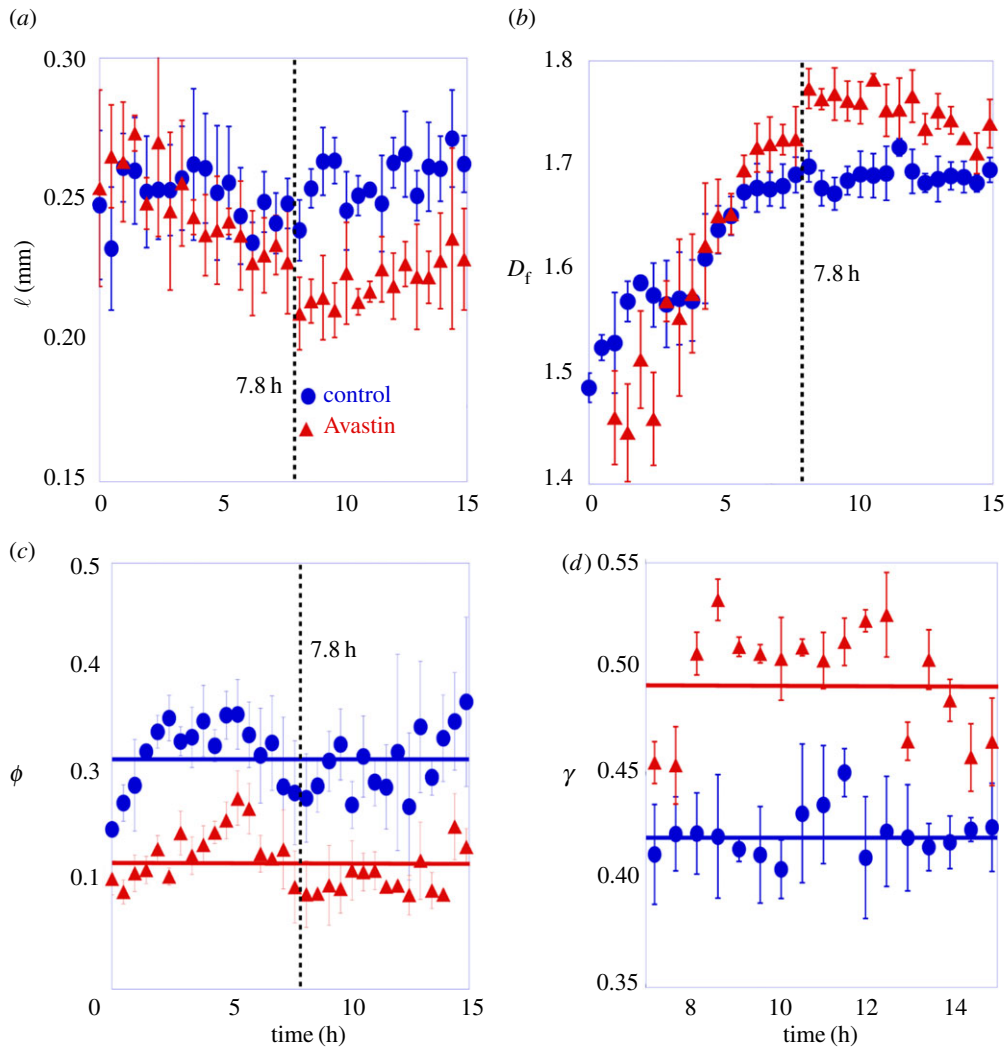


Figure 8. Structural metrics measured on network topologies. (a) The mean cord length, ℓ , (b) the mean fractal dimension measured on a forming vascular network, D_f , (c) the treeness, ϕ and (d) the γ index measured on a formed vascular network. The error bar is the standard deviation of each group, compound by three samples. The full lines in (c) and (d) indicate the mean value of the indexes. The vertical line is a guide to the eye for the time of 7.8 h.

validate these findings, we have monitored the evolution of vascular networks in terms of their γ index (equation (2.4)). The evolution of γ , shown in figure 8d, indicates that the density of links in Avastin-treated networks is larger than that found in the networks of control embryos. All the results shown in figure 8 corroborate the described structural changes promoted by Avastin and go in the same line as some previous reports made in [19].

4. Conclusion

In this article, we characterize the spatio-temporal self-organization of EC clusters forming vascular networks on control and on Avastin-treated embryos. To this aim, we monitor how EC clusters aggregate to form a connected vascular network and pinpoint the main differences between the two groups through statistical and network analysis. In a nutshell, we have observed that while the percolation transition of control networks yields a typical tree-like structure, the anti-angiogenic factor makes the resulting networks more lattice-like. This observation is supported by different evidence when monitoring the time evolution of metrics such as: (i) the mean chord length, (ii) the fractal dimension of networks D_f , (iii) the degree distribution $P(k)$, (iv) the mean degree $\langle k \rangle$, (v) the γ -index and (vi) the treeness ϕ ; some of these parameters display a discrepancy near 7.8 h, evidencing the structural change in the network topology. On the other hand, other measures such as (i) the clustering coefficient C , (ii) the network

assortativity r , (iii) the average path length (L) and (iv) the fraction of nodes in the largest cluster f , do not display differences between control and Avastin-treated embryos, because tree-like and lattice-like structures display similar values for these quantities. Also importantly, we have shown for both groups that, after approximately 5 h, some of these parameters point to an abrupt transition from disconnected cell clusters to a large connected vascular network which is a signature of the percolation in the system.

These results attest that an optimal dose of an anti-angiogenic factor VEGF on a normal embryo shapes the resulting vascular network. The new graph structure could be more prone to drug circulation and penetration than the usual vascular architecture. Apart from these results, we believe that the methodology used in this study can be easily generalized to evaluate the goodness of different anti-angiogenic therapies based on network metrics that allow quantitative comparisons. On more general grounds, the mechanisms governing the vascular network formation may be universal and similar analysis in other species should give similar results.

Data accessibility. To give support for the data present in this work, there are two movies which show the growth of vessels within the *area opaca* for control and for Avastin-treated embryos. *VesselGrowth-ControlEmbryo.avi* is a movie which shows the self-organization of endothelial cell clusters forming the vascular network within the *area opaca* for an embryo without drugs. *VesselGrowth-TreatedEmbryo.avi* is a movie which shows the self-organization of endothelial cell clusters forming the vascular network within the *area opaca* for an embryo treated with Avastin.

Authors' contributions. A.P.A. designed experiments, analysed data, performed experiments, studied network descriptors, drafted the manuscript, discussed results and edited the manuscript. O.N.M. discussed results and edited the manuscript. J.G.-G. studied network descriptors, discussed results and edited the manuscript. U.A. designed the experiments, analysed the data, discussed the results and edited the manuscript. All the authors gave their final approval for publication.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. The authors are grateful for financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 465259/2014-6 and 793988/2013), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the National Institute of Science and Technology Complex Fluids (INCT-FCx), the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2014/50983-3) and the Minas Gerais Research Foundation FAPEMIG (APQ-01446-14). J.G.-G. acknowledges financial support from MINECO (under projects FIS2014-55867-P and FIS2012-38266-C02-01), from the Departamento de Industria e Innovación del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo (FENOL group E-19) and the Brazilian CNPq through the grant PVE of the Ciencias Sem Fronteiras programme.

References

- Risau W, Flamme I. 1995 Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73–91. (doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000445)
- Sato Y, Poynter G, Huss D, Filla MB, Czirok A, Rongish BJ, Little CD, Fraser SE. 2010 Dynamic analysis of vascular morphogenesis using transgenic quail embryos. *PLoS ONE* **5**, e12674. (doi:10.1371/journal.pone.0012674)
- Drake CJ, Brandt SJ, Trusk TC, Little CD. 1997 TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev. Biol.* **192**, 17–30. (doi:10.1006/dbio.1997.8751)
- Köhn-Luque A, de Back W, Yamaguchi Y, Yoshimura K, Herrero MA, Miura T. 2013 Dynamics of VEGF matrix-retention in vascular network patterning. *Phys. Biol.* **10**, 066007. (doi:10.1088/1478-3975/10/6/066007)
- Conant GC, Wolfe KH. 2014 Effect of treatment on the global dynamics of delayed pathological angiogenesis models. *Phys. Biol.* **363**, 13–21. (doi:10.1016/j.jtbi.2014.08.012)
- Czirok A, Little CD. 2012 Pattern formation during vasculogenesis. *Birth Defects Res. Part C* **96**, 153–162. (doi:10.1002/bdrc.21010)
- Scianna M, Bell CG, Preziosi L. 2013 A review of mathematical models for the formation of vascular networks. *J. Theor. Biol.* **333**, 174–209. (doi:10.1016/j.jtbi.2013.04.037)
- Gamba A, Ambrosi D, Coniglio A, De Candia A, Di Talia S, Giraudo E, Serini G, Preziosi L, Bussolino F. 2003 Percolation, morphogenesis, and Burgers dynamics in blood vessels formation. *Phys. Rev. Lett.* **90**, 118101. (doi:10.1103/PhysRevLett.90.118101)
- Szabo A, Perryn ED, Czirok A. 2007 Network formation of tissue cells via preferential attraction to elongated structures. *Phys. Rev. Lett.* **98**, 038102. (doi:10.1103/PhysRevLett.98.038102)
- Köhn-Luque A, De Back W, Starrua J, Mattiotti A, Deutsch A, Pérez-Pomares JM, Herrero MA. 2011 Early embryonic vascular patterning by matrix-mediated paracrine signalling: a mathematical model study. *PLoS ONE* **6**, e24175. (doi:10.1371/journal.pone.0024175)
- Palachanis D, Szabó A, Merks RMH. 2015 Particle-based simulation of ellipse-shaped particle aggregation as a model for vascular network formation. *Comput. Part. Mech.* **2**, 371–379. (doi:10.1007/s40571-015-0064-5)
- Coniglio A, de Candia A, DiTalia S, Gamba A. 2004 Percolation and Burgers dynamics in a model of capillary formation. *Phys. Rev. E* **69**, e051910. (doi:10.1103/PhysRevE.69.051910)
- Serini G, Ambrosi D, Giraudo E, Gamba A, Preziosi L, Bussolino F. 2003 Modeling the early stages of vascular network assembly. *EMBO J.* **22**, 1771–1779. (doi:10.1093/emboj/cdg176)
- St Johnston D. 2015 The renaissance of developmental biology. *PLoS Biol.* **13**, e1002149. (doi:10.1371/journal.pbio.1002149)
- Pantazis P, Supatto W. 2014 Advances in whole-embryo imaging: a quantitative transition is underway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 327–339. (doi:10.1038/nrm3786)
- Walls JR, Coultas L, Rossant J, Henkelman RM. 2008 Three-dimensional analysis of vascular development in the mouse embryo. *PLoS ONE* **3**, e2853. (doi:10.1371/journal.pone.0002853)
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. 2004 Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 391–400. (doi:10.1088/0957-4484/26/25/255102)
- Battaglia L, Gallarate M, Peira E, Chirio D, Solazzi I, Giordano SMA, Gigliotti Ca L, Riganti C, Dianzani C. 2015 Bevacizumab loaded solid lipid nanoparticles prepared by the coacervation technique: preliminary in vitro studies. *Nanotechnology* **26**, 255102. (doi:10.1088/0957-4484/26/25/255102)
- Jain RK. 2005 Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**, 58–62. (doi:10.1126/science.1104819)
- Newman MEJ. 2010 *Networks: an introduction*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Cui C. 2005 *Dynamics of cell movement and tissue motion in gastrulation and microtissue cell culture*. Bloomington, IN: Indiana University.

22. Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. 2001 Improved method for chick whole embryo culture using a filter paper carrier. *Dev. Dyn.* **220**, 284–289. (doi:10.1002/1097-0177(20010301)220:3<284::AID-DVDY1102>3.0.CO;2-5)
23. Hamburger V, Hamilton HL. 1951 A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49–92. (doi:10.1002/jmor.1050880104)
24. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004 Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–42.
25. Karperien A. 2013 *FracLac for ImageJ*. Sydney, Australia: Charles Sturt University.
26. Barthélemy M. 2011 Spatial networks. *Phys. Rep.* **499**, 1–101. (doi:10.1016/j.physrep.2010.11.002)
27. Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S. 2011 A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS ONE* **6**, e27385. (doi:10.1371/journal.pone.0027385)
28. Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang D-U. 2006 Complex networks: structure and dynamics. *Phys. Rep.* **424**, 175–308. (doi:10.1016/j.physrep.2005.10.009)
29. Levinson D. 2012 Network structure and city size. *PLoS ONE* **7**, e29721. (doi:10.1371/journal.pone.0029721)
30. Boccaletti S, Bianconi G, Criado R, Del Genio CI, Gómez-Gardenes J, Romance M, Sendina-Nadal I, Wang Z, Zanin M. 2014 The structure and dynamics of multilayer networks. *Phys. Rep.* **544**, 1–122. (doi:10.1016/j.physrep.2014.07.001)
31. Newman MEJ. 2002 Assortative mixing in networks. *Phys. Rev. Lett.* **89**, 208701. (doi:10.1103/PhysRevLett.89.208701)
32. Noldus R, Van MP. 2015 Assortativity in complex networks. *J. Complex Netw.* **3**, 507–542. (doi:10.1093/comnet/cnv005)
33. Hinrichsen H. 2000 Non-equilibrium critical phenomena and phase transitions into absorbing states. *Adv. Phys.* **49**, 815–958. (doi:10.1080/00018730050198152)
34. West BJ. 2015 Exact solution to fractional logistic equation. *Phys. A: Stat. Mech. Appl.* **429**, 103–108. (doi:10.1016/j.physa.2015.02.073)
35. Szabo A, Perryn ED, Czirok A. 2007 Network formation of tissue cells via preferential attraction to elongated structures. *Phys. Rev. Lett.* **98**, 038102. (doi:10.1103/PhysRevLett.98.038102)
36. Stauffer D, Aharony A. 1994 *Introduction to percolation theory*. Boca Raton, FL: CRC press.
37. Vicsek T, Meakin P, Family F. 1985 Scaling in steady-state cluster-cluster aggregation. *Phys. Rev. A* **32**, 1122. (doi:10.1103/PhysRevA.32.1122)
38. Gazit Y, Berk DA, Leunig M, Baxter LT, Jain RK. 1995 Scale-invariant behavior and vascular network formation in normal and tumor tissue. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 2428. (doi:10.1103/PhysRevLett.75.2428)
39. Reishofer G, Koschutnig K, Enzinger C, Ebner F, Ahammer H. 2012 Fractal dimension and vessel complexity in patients with cerebral arteriovenous malformations. *PLoS ONE* **7**, e41148. (doi:10.1371/journal.pone.0041148)
40. Lorthois S, Cassot F. 2010 Fractal analysis of vascular networks: insights from morphogenesis. *J. Theor. Biol.* **262**, 614–633. (doi:10.1016/j.jtbi.2009.10.037)