

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ESTRUTURAS

Gabriel Santos Rosalem

**Modelagem Computacional da Migração de Células
Aderentes em Meios Porosos**

2018

Modelagem Computacional da Migração de Células Aderentes em Meios Porosos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Estruturas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de “Mestre em Engenharia de Estruturas”.

Orientador: Prof. Estevam Barbosa de Las Casas

Co-orientador: Prof. Libardo Andrés González Torres

Belo Horizonte

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ESTRUTURAS

Modelagem Computacional da Migração de Células Aderentes em Meios Porosos

Gabriel Santos Rosalem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Estruturas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de “Mestre em Engenharia de Estruturas”.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Estevam Barbosa de Las Casas
DEES/UFMG - (Orientador)

Prof. Dr. Libardo Andrés González Torres
ICT/UFVJM - (Coorientador)

Prof. Dr. Rodrigo Guerra Peixoto
DEES/UFMG

Prof. Dr. Gregory Thomas Kitten
DM/UFMG

Belo Horizonte, 07 de março de 2018

“Do or do not. There is no try.”
Y.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, irmãos e Marina pelo amor, carinho e apoio essenciais para concretizar mais essa etapa.

Aos responsáveis pela realização deste trabalho, os professores Estevam e Libardo, pela paciência e apoio, pelos valiosos conselhos e especialmente pelo inestimável conhecimento e sabedoria transmitidos.

Ao Professor Thiago Parente Lima pela colaboração para o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas do Grupo de Engenharia Biomecânica e do departamento pelas conversas, ajudas e momentos de distração.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Estruturas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

RESUMO

A migração celular é um processo importante em fenômenos biológicos como a cicatrização de feridas e metástase de tumores, e que pode ser estimulada por fatores mecânicos. A sensibilidade da célula a esses estímulos é denominada *mechanosensing*, e governa a resposta celular ao ambiente mecânico extracelular. O fluido intersticial, que preenche a matriz extracelular, também pode influenciar a resposta mecânica da célula devido às forças de cisalhamento. Uma ferramenta capaz de representar a influência do fluido intersticial na migração celular é a modelagem computacional. Assim, neste trabalho, é apresentado um modelo mecanobiológico de migração de células aderentes baseado na *mechanosensing*, que permite estudar a influência do fluido intersticial na resposta celular. Foi formulado, implementado e resolvido um sistema de equações diferenciais que representam o processo de migração celular por meio do método dos elementos finitos para três casos diferentes. O comportamento celular em uma matriz elástica (caso 1) e uma matriz poroelástica (caso 2) foi estudado. O terceiro caso foi o estudo da migração de células tumorais em um dispositivo de microfluídica com a presença de um fluxo de fluido intersticial e foi baseado em um estudo experimental prévio, que reportou o movimento das células contra o fluxo. Os resultados para os modelos elásticos e poroelástico (casos 1 e 2) apontaram para uma migração na direção das regiões mais deformadas da ECM, enquanto no estudo do dispositivo de microfluídica obteve-se um comportamento de migração celular contra o fluxo. O modelo de *mechanosensing* desenvolvido foi capaz de prever o comportamento biológico de células aderentes na presença de fluido intersticial, se mostrando uma ferramenta útil para o estudo de migração celular.

Palavras-chaves: migração celular; *mechanosensing*; fluido intersticial; microfluídica; método dos elementos finitos;

ABSTRACT

Cell migration is an important process in biological phenomena such as wound healing and tumor metastasis, which can be stimulated by mechanical factors. The sensibility of the cell to these stimuli is denoted called mechanosensing, and governs the cellular response to the extracellular mechanical environment. Interstitial fluid, which fills the extracellular matrix, may also influence the mechanical response of the cell due to shear forces. One tool capable of representing the influence of the interstitial fluid on cell migration is computational modeling. In this work, it is presenting a mechanobiological model of adherent cell migration based on mechanosensing, including the influence of the interstitial fluid on the cellular response. A system of differential equations was formulated, implemented and solved that represent the cellular migration process using the finite element method for three different cases. The cellular behavior in an elastic matrix (case 1) and the poroelastic matrix (case 2) was studied. The third case was the study of tumor cells in a microfluidic device with the presence of an interstitial fluid flow and was based on a previous experimental study, which reported the movement of the cells against the flow. The results for elastic and poroelastic models (cases 1 e 2) showed to a migration towards the more strained regions of the ECM, while those of the microfluidic study reported a behavior of cell migration against the flow. The developed mechanosensing model was able to predict the biological behavior of adherent cells in the presence of interstitial fluid, proving to be a useful tool for the study of cell migration.

Keywords: cellular migration; *mechanosensing*; interstitial fluid; microfluidic; finite element method.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Motivação.....	1
1.2 Objetivo.....	2
1.3 Descrição do trabalho.....	2
2 MECÂNICA CELULAR	3
2.1 Introdução	3
2.2 Migração celular.....	4
2.2.1 <i>Mechanosensing</i>	6
2.2.2 Mecanotransdução devido ao fluido intersticial.....	8
3 MODELO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ADERENTES EM MEIOS POROSOS	10
3.1 Modelo mecanobiológico de migração celular	10
3.2 Hipóteses do trabalho.....	11
3.3 Formulação matemática do problema	12
3.3.1 Modelo de <i>mechanosensing</i>	12
3.3.2 Modelo de migração celular	16
3.4 Formulação de elementos finitos.....	20
3.4.1 Formulação fraca.....	21
3.4.2 Discretização temporal.....	22
3.4.3 Discretização espacial	23
3.4.4 Método de Newton-Raphson.....	25
3.4.4.1 Algoritmo de implementação do Método de Newton-Raphson.....	31
4 SIMULAÇÕES NUMÉRICAS E MODELOS REAIS.....	32
4.1 Implementação do modelo	32

4.1.1	Geometria	32
4.1.2	Condições de contorno e iniciais	33
4.1.3	Aplicação do método dos elementos finitos	34
4.2	Modelos numéricos e reais	34
4.2.1	Modelo de migração em um substrato elástico	34
4.2.2	Modelo de migração em um substrato poroelástico	35
4.2.3	Modelo de microfluídica	36
4.3	Parâmetros dos modelos	37
4.3.1	Modelos elásticos e poroelásticos	37
4.3.2	Modelo de dispositivo de microfluídica	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	Modelo elástico	41
5.2	Modelo poroelástico	46
5.3	Modelo de dispositivo de microfluídica	52
5.3.1	Simulação de microfluídica	53
5.3.2	Resultados numéricos do modelo de <i>mechanosensing</i>	54
5.3.3	Migração celular: velocidade da célula e direção de migração.	58
5.3.4	Discussão dos resultados obtidos para o dispositivo de microfluídica	59
6	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Modelo de Abercrombie. (a) protrusão decorrente da força de polimerização. (b) formação das novas adesões. (c) liberação das adesões envelhecidas; (d) contração gerada pelos motores de actomiosina. (Adaptado de Danuser et al., 2013).	4
Figura 2.2 - Modo de migração definido pelo confinamento geométrico. (Adaptado de Charra e Sahai, 2014).	5
Figura 2.3 - Fatores que estimulam a migração celular. (Adaptado de Zamora, 2013).	5
Figura 2.4 - Direção da migração sob fatores externos. (Adaptada de Polacheck et al., 2013). .	6
Figura 2.5 - Influência da rigidez do substrato na estrutura das adesões e na dinâmica do citoesqueleto. (Adaptada de CALVO, 2008).....	7
Figura 2.6 - Esquema do mecanismo e componentes biológicos envolvidos na migração coletiva de células. Esquerda: resposta a durotaxis. Direita: resposta à influência do fluxo de fluido. (Adaptada de Haeger et al., 2015).	8
Figura 2.7 - Exemplo de dispositivo de microfluídica. (Adaptada de Polacheck et al., 2014). .	9
Figura 2.8 - Fluido intersticial e mecânica celular. (a) Fluxo gerado pelo gradiente de pressão; (b) Distribuição assimétrica de tensões. (Adaptado de Polacheck et al., 2014).....	9
Figura 3.1 - Diagrama com os constituintes mecânicos essenciais para o mecanismo de mechanosensing. (Adaptada de Zamora, 2013).....	12
Figura 3.2 - Modelo mechanosensing para uma célula aderente. (a) Modelo mecânico representativo. (b) Dependência da tensão contrátil p_c com a deformação contrátil θ_c . (Adaptada de Calvo, 2008).....	13
Figura 3.3 - Análise da deformação celular. (a) Substrato de lados igual o diâmetro da célula. (b) Substrato com dimensões muito maiores que o diâmetro da célula.	16
Figura 3.4 - Algoritmo da formulação do Método de Newton-Raphson.....	31
Figura 4.1 - Dimensão dos domínios das simulações. (a) Modelo elástico e poroelástico. (b) Modelo de dispositivo de microfluídica.	33
Figura 4.2 - Definição dos contornos e do domínio dos modelos.	33
Figura 4.3 - Esboço da região de aplicação da força.	35
Figura 5.1 - Distribuição da concentração celular no domínio gerada por uma força constante para um tempo de 9 horas.....	41

Figura 5.2 - Valores nodais da concentração celular n sob uma força constante (9 horas). ...	42
Figura 5.3 - Valores nodais da tensão celular efetiva p_{cell} para a aplicação de uma força (9 horas).	42
Figura 5.4 - Evolução temporal da concentração nos pontos de máximo e mínimo p_{cell} (9 horas).	43
Figura 5.5 - Comportamento da tensão celular para diferentes módulos de Young (9 horas).	43
Figura 5.6 - Distribuição da concentração celular para diferentes módulos de Young (9 horas).	44
Figura 5.7 - Distribuição da concentração celular para diferentes valores de M (9 horas).....	44
Figura 5.8 - Gradiente de pressão introduzido no domínio para um tempo de 9 horas.....	46
Figura 5.9 - Distribuição da concentração celular no domínio gerada por um gradiente de pressão para um tempo de 9 horas.....	47
Figura 5.10 - Valores nodais de concentração celular gerados por um gradiente de pressão (9 horas).	47
Figura 5.11 - Valores nodais da tensão celular efetiva gerados por um gradiente de pressão (9 horas).	47
Figura 5.12 – Evolução temporal da concentração celular.....	48
Figura 5.13 - Distribuição celular para diferentes gradiente de pressão (9 horas).	49
Figura 5.14 - Tensão celular efetiva para diferentes gradiente de pressão (9 horas).	49
Figura 5.15 - Curvas de pressão para diferentes valores de permeabilidade (9 horas).	50
Figura 5.16 - Curvas de p_{cell} para diferentes valores de permeabilidade (9 horas).	50
Figura 5.17 - Curvas de n para diferentes valores de permeabilidade (9 horas).	51
Figura 5.18 – Curvas geradas pela simulação de microfluídica para uma simulação de 15 minutos. (a) Gradiente de pressão gerado no domínio em Pa. (b) Curva da velocidade do fluido.	53
Figura 5.19 – Curvas da resposta do substrato e das células para 15 minutos de simulação. (a) Curva de deformação do substrato. (b) Curva da tensão celular efetiva.	55
Figura 5.20 - Distribuição do gradiente de pressão ao longo do eixo de simetria do modelo (15 minutos).	56
Figura 5.21 - Distribuição da concentração celular ao longo do eixo de simetria (15 minutos).	56
Figura 5.22 – Reposta dos fluxos (15 minutos). (a) Fluxo causado pela difusão. (b) Fluxo causado pela convecção. (c) Fluxo causado pela tensotaxia.	57

Figura 5.23 - Velocidade celular (15 minutos). O eixo x denota a posição na linha de simetria do substrato.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros para os modelos elástico e poroelástico	37
Tabela 2 - Erros para as velocidades simuladas em relação à velocidade experimental.....	59

LISTA DE SÍMBOLOS

- p_c - tensão contrátil gerada pelo maquinário de miosina II
- p_m - tensão suportada pelo citoesqueleto
- p_{cell} - tensão efetiva na célula
- p_s - tensão na ECM
- \mathbf{u} - vetor de deslocamentos da ECM
- θ - deformação volumétrica
- θ_c - deformação entre a miosina e os filamentos de actina
- θ_a - deformação dos filamentos de actina
- K_{act} - rigidez volumétrica da actina
- K_{pas} - rigidez volumétrica dos constituintes passivos
- K_{subs} - rigidez volumétrica do substrato
- θ_1 - máxima deformação de contração
- θ_2 - máxima deformação até a ruptura
- p_{max} - tensão máxima de contração exercida pelos motores de miosina
- θ_f - deformação causada pelo fluido intersticial
- F_f - força gerada pelo fluido
- d_{cell} - diâmetro da célula
- n - concentração celular
- \mathbf{J}_n - fluxo celular

D	- coeficiente de difusão
M	- parâmetro escalar que quantifica a migração celular por tensotaxia
σ_{cell}	- tensão na população celular
λ	- parâmetro de saturação da tensão celular
p	- pressão que gera o fluido
φ	- porosidade da matriz
β	- compressibilidade do fluido
κ	- permeabilidade da matriz
η	- viscosidade do fluido
\mathbf{v}	- velocidade de Darcy
σ_{ecm}	- matriz constitutiva da ECM
ε	- tensor de pequenas deformações da ECM
E	- módulo de Young
ν	- coeficiente de Poisson
c_a	- coeficiente de arrasto
\mathbf{f}_{ext}	- força externa aplicada na ECM
K_{cell}	- rigidez volumétrica efetiva da célula
k	- passo de tempo
q_{el}	- número de elementos
n^h	- variável de concentração interpolada
p^h	- variável de pressão interpolada
\mathbf{u}^h	- variável de deslocamento interpolada
e	- indicador de um elemento da malha

- \mathbf{n}^e - vetor coluna dos valores nodais de concentração
- \mathbf{p}^e - vetor coluna dos valores nodais de pressão
- \mathbf{u}^e - vetor coluna dos valores nodais de deslocamento
- \mathbf{N} - matriz de função de forma de cada variável associada a cada elemento
- N^i - função de forma associada a cada nó i do elemento
- q_{en} - número de nós
- δn^h - função de teste da variável de concentração interpolada
- δp^h - função de teste da variável de pressão interpolada
- $\delta \mathbf{u}^h$ - função de teste da variável de deslocamentos interpolada
- $\hat{\mathbf{J}}$ - matriz jacobiana
- a - indica o incremento do método iterativo de Newton-Raphson
- \mathbf{R} - vetor residual global
- \mathbf{K}_T - matriz global de rigidez
- \mathcal{S} - vetor solução global do sistema
- $\tilde{\mathbf{R}}$ - vetor residual local
- $\tilde{\mathbf{K}}_T$ - matriz local de rigidez
- \mathbf{f}^e - vetor de forças para cada elemento
- \mathbf{D}_{elas} - matriz do comportamento elástico mecânico
- \mathbf{D}_{cell} - matriz do comportamento celular mecânico
- \mathbf{k}^e - matriz de rigidez para cada elemento
- $\tilde{\mathbf{d}}^e$ - vetor local dos vetores nodais das variáveis
- \mathbf{S} - vetor global do vetores nodais das variáveis

v_{cell} - velocidade estimada da célula

1

INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

A migração celular é um processo central para o desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares. Compreendê-la apresenta um desafio intelectual por ser um produto de uma variedade de processos complexos e integrados. Devido à natureza deste problema, o grande desafio é desenvolver uma abordagem multidisciplinar para a elucidação de todos os mecanismos e fenômenos (HORWITZ e WEBB, 2003). O estudo do comportamento celular em matrizes extracelulares (*extracellular matrix*-ECM), ou substratos, com propriedades elásticas e viscoelásticas, vem sendo amplamente difundido por pesquisadores em trabalhos experimentais e computacionais ao longo dos anos, tendo como uma das ferramentas a utilização de modelos matemáticos para a simulação dos fenômenos biológicos (DIMILLA et al., 1991; LO et al., 2000; MOREO et al., 2008; BORAU et al., 2011). Entretanto, quando se estuda o processo de migração em condições biológicas, como por exemplo um tecido vivo, deve-se incorporar ao modelo, além das propriedades topográficas e mecânicas, um fluido intersticial. O fluido intersticial, que permeia as células do corpo humano (GUYTON, 2006), interagindo constante e intensamente com as mesmas, teve a sua influência em processos fisiológicos reconhecida com o trabalho de Levick (1987), com o qual foi possível adquirir uma melhor compreensão de fenômenos como a morfogênese e a sinalização célula-célula (SWARTZ e FLEURY, 2007). Sendo um meio poroso a melhor representação de uma matriz para o estudo de migração celular sobre a influência dos fluidos intersticiais (BORAU 2013; POLACHECK et al, 2011, 2014; HAESSLER et al., 2012), a consideração de uma migração em 3D, ou o ajuste dos parâmetros para representarem os mesmos fenômenos em 2D, converge para uma aproximação mais fidedigna do microambiente celular e das interações célula-ECM. Além disso, trabalhos recentes sugerem que os fluidos intersticiais induzem alguns tipos de células a terem o sentido da migração afetado pelo fluxo gerado por um gradiente de pressão

(POLACHECK et al, 2011, 2014), o que requer o desenvolvimento de uma nova abordagem nos modelos mecânicos e computacionais. Nesse caminho, esta dissertação apresenta um modelo de migração de células aderentes em meios porosos. O modelo representa a resposta das células devido às propriedades mecânicas e físicas da ECM e à influência do fluido intersticial.

1.2 Objetivo

Com base nos trabalhos experimentais e computacionais que buscam descrever o comportamento das células quando sujeitas às solicitações mecânicas, sejam elas deformações no substrato ou forças de arrasto nas células geradas pelo fluido, foi proposto um modelo capaz de representar a relação entre os componentes biológicos e mecânicos dos mecanismos de migração celular.

O objetivo principal do presente trabalho é criar um modelo de migração celular para uma ECM de comportamento bifásico, com uma fase sólida e uma líquida, afim de simular as forças mecânicas geradas pelas células, a concentração celular, as forças geradas pelo fluido sobre as células e a deformação do substrato durante o processo de migração. Como objetivo secundário, tem-se o desenvolvimento de um algoritmo que possibilite o estudo computacional da migração de células aderentes em substratos com diferentes propriedades.

1.3 Descrição do trabalho

O trabalho foi dividido em 6 partes: A introdução está apresentada no Capítulo 1; o Capítulo 2 contém uma revisão sobre a teoria de migração celular, incluindo os aspectos do comportamento mecânico e da resposta ao fluxo; no Capítulo 3 é apresentado o modelo de migração de células aderentes em meios porosos, estabelecendo todas as hipóteses e a incorporação do fluido intersticial; o Capítulo 4 apresenta os modelos de migração celular estudados, contemplando simulações numéricas e modelos reais de estudo; no 5 são apresentados os resultados e discussões; por fim, o Capítulo 6 contém as conclusões e os trabalhos futuros propostos.

2

MECÂNICA CELULAR

2.1 Introdução

As células biológicas são as unidades mais básicas que compõem os organismos vivos. O estudo das funções celulares para uma melhor compreensão dos processos fisiológicos, das estruturas das células, e interações célula-ECM, se tornou uma ciência essencial para as pesquisas biomédicas (JACOBS et al., 2013). Lauffenburger e Horwitz (1996) estudaram o comportamento das células no processo de migração celular, tendo um papel importante no desenvolvimento de ferramentas para o entendimento dos mecanismos patológicos e fisiológicos do corpo humano, tais como a morfogênese (LAUFFENBURGER e HORWITZ, 1996), cicatrização de feridas (VALERO et al., 2014) ou a metástase de tumores (CONDEELIS et al., 2005; ANANTHAKRISHNAN e EHRLICHER, 2007).

Como pioneiro no estudo dos mecanismos celulares, Abercrombie (1980), através de observações experimentais, compilou um modelo integrado de migração celular, postulando que ela ocorreria de acordo com um ciclo de quatro etapas (Fig. 2.1). Para que esse ciclo se inicie é necessário que a célula esteja polarizada, ou espacialmente assimétrica (LAUFFENBURGER e HORWITZ, 1996), o que seria gerado por algum sinal externo. A primeira etapa da migração é a protrusão na direção da fonte (Fig. 2.1a), onde a protrusão é a região que a célula estende na direção da fonte emissora do sinal; a segunda etapa consiste na formação de adesões na frente de avanço (Fig. 2.1b). As adesões, ou adesões focais, representam o ponto de interação entre a célula e a ECM; na terceira etapa, ocorre a liberação das adesões na traseira da célula (Fig. 2.1c); por fim, na 4 etapa, ocorre o processo de contração da célula mediada pelo maquinário de actomiosina (Fig. 2.1d) (DANUSER et al., 2013).

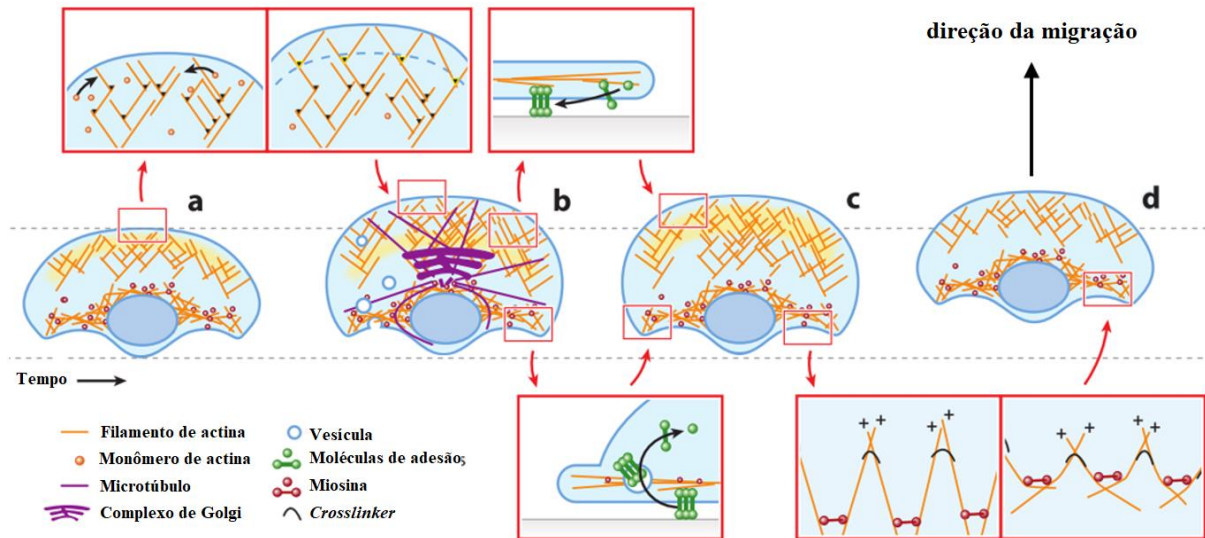


Figura 2.1 - Modelo de Abercrombie. (a) protrusão decorrente da força de polimerização. (b) formação das novas adesões. (c) liberação das adesões envelhecidas; (d) contração gerada pelos motores de actomiosina. (Adaptado de Danuser et al., 2013).

2.2 Migração celular

As pesquisas relacionadas ao movimento celular requerem o entendimento dos processos dinâmicos dos filamentos de actina, da polimerização dos microtúbulos, além da regulação da transdução espaço-temporal da sinalização celular (RIDLEY et al., 2003). No processo de migração, as células interagem com a microestrutura e bioquímica do microambiente celular (CHARRAS e SAHAI, 2014), mediada pelas propriedades do substrato e pelos constituintes celulares, guiados pelo citoesqueleto (CSK) (ZAMORA, 2013). Uma das propriedades da matriz extracelular que podem afetar diretamente os parâmetros da migração celular é o tipo de confinamento geométrico que ela impõe nas células. O confinamento geométrico define em qual dimensão está ocorrendo a migração: 1D, 2D ou 3D (Fig. 2.2). Em superfícies 2D, além da célula estar interagindo apenas com um plano da matriz, ela encontra um amplo espaço para migrar livremente, tal qual ocorre em placas de cultura celular. Já em tecidos tridimensionais, o efeito do confinamento está associado à porosidade da ECM. Quanto menor a dimensão dos poros, mais resistência a célula encontrará para se mover. Substratos 3D formados por hidrogéis são bons exemplo para esse tipo de confinamento (KURNIAWAN et al., 2016).

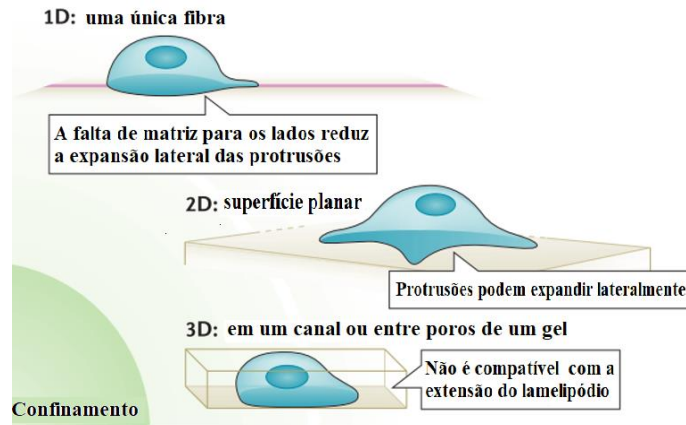


Figura 2.2 - Modo de migração definido pelo confinamento geométrico. (Adaptado de Charra e Sahai, 2014).

Além dessas interações, o mecanismo de resposta celular depende de fatores mecânicos, químicos e biológicos (ZAMAN et al., 2006; VUONG et al., 2017). Alguns exemplos dos tipos de fatores que influenciam a migração são: quimiotaxia, que é a resposta celular a um gradiente químico no substrato (RAPPEL et al., 2002; ZHELEV et al., 2004; RIBEIRO et al., 2016), migrando para as regiões de maiores concentrações; plitotaxia, que, em uma migração coletiva, estimula as células a migrarem ao longo de uma orientação de máxima tensão principal; galvanotaxia, que representa a migração ao longo de um gradiente de potencial elétrico; haptotaxia, que é a migração em favor dos gradientes de sítios de adesão na ECM; mecanotaxia, que se refere à resposta a estímulos mecânicos, onde a tensotaxia é a locomoção das células, estimuladas por deformações na matriz (LO et al., 2000; MOREO et al., 2008; ZAMORA, 2013), a durotaxia, que é a resposta das células à rigidez e topografia da ECM (BELOUSSOV, et al., 2000; MOREO et al., 2008; ZAMORA, 2013) (Figs. 2.3 e 2.4), e a influência de fluidos intersticiais (POLACHECK et al., 2011, 2014; KALCHMAN et al., 2013)



Figura 2.3 - Fatores que estimulam a migração celular. (Adaptado de Zamora, 2013).

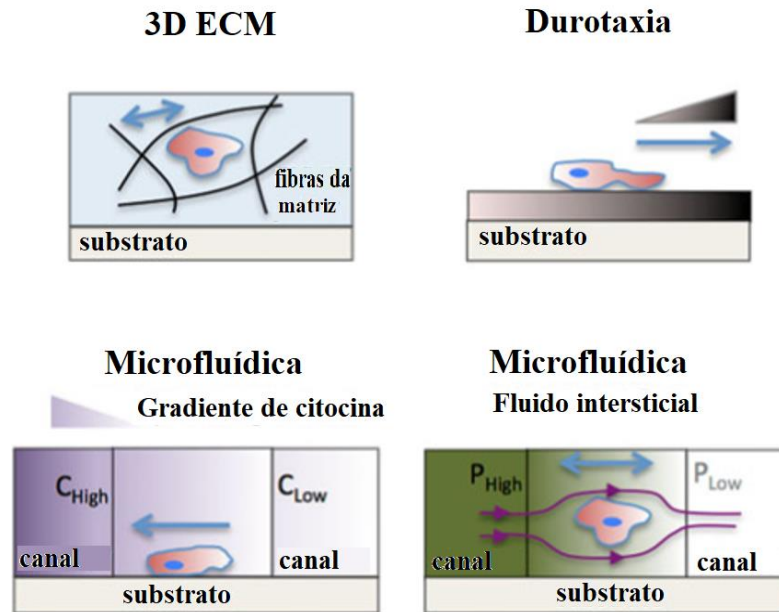


Figura 2.4 - Direção da migração sob fatores externos. (Adaptada de Polacheck et al., 2013).

2.2.1 *Mechanosensing*

Os efeitos mecânicos no comportamento celular vêm sendo estudados desde que se tomou conhecimento do papel da mecânica na resposta das células. O campo que estuda essas interações é denominado de mecanobiologia, que, em suma, estuda como ocorrem as vias de detecção-resposta das células em relação a um estímulo mecânico (LEE et al., 2011). Dentre os tipos de comportamento de cada célula, o das células aderentes é um foco de estudo (CALVO, 2008), apresentando um mecanismo de detecção-resposta onde a célula se adere ao substrato, exerce uma força contrátil e converte a resposta mecânica em sinais químicos. Esse mecanismo é conhecido como *mechanosensing* (DISCHER et al., 2005). Um outro termo utilizado que define a transdução de estímulos mecânicos em respostas biológicas é mecanotransdução (MIYAMOTO et al., 1995). Essas habilidades celulares têm sido avaliadas como sendo reguladores chave na diferenciação, proliferação e migração celular.

Esses processos podem ser entendidos como etapas sucessivas e dependentes, mediadas pela interação célula-substrato. Inicialmente a força contrátil é gerada pelos motores de actomiosina (miosina-II), transmitindo posteriormente essa força para a ECM pelas chamadas adesões focais (*focal adhesions-FA*) (BERSHADSKY et al., 2003). FA são estruturas macromoleculares que ligam os receptores do substrato com o citoesqueleto celular. Essa ligação é mediada pelas proteínas transmembrânicas da família das integrinas, que apresentam como principal função

estabelecer uma ligação entre os filamentos de actina do citoesqueleto celular e os receptores da matriz extracelular (ZAMIR e GEIGER, 2001; KURNIAWAN et al., 2016). A resistência mecânica que a célula irá experimentar terá como resposta biológica um desencadeamento de reorganização molecular e uma adaptação do citoesqueleto da célula. Existe, entretanto, uma dinâmica nos mecanismos das integrinas e da formação de adesões focais. Nas pesquisas de Sawada et al. (2006) e Riveline et al. (2001) foi observado que forças externas podem ativar as integrinas e influenciar a formação de adesões focais. Lo et al. (2000) e Ghassemi et al. (2012), observaram que as adesões focais são mais estáveis e apresentam um aumento na força de contração em substratos mais rígidos. Pelham e Wang (1997) postularam que as células aderentes ajustam a força de adesão de acordo com as propriedades mecânicas e geométricas do microambiente (Fig. 2.5). Esses estudos indicam o envolvimento das integrinas na *mechanosensing* celular.

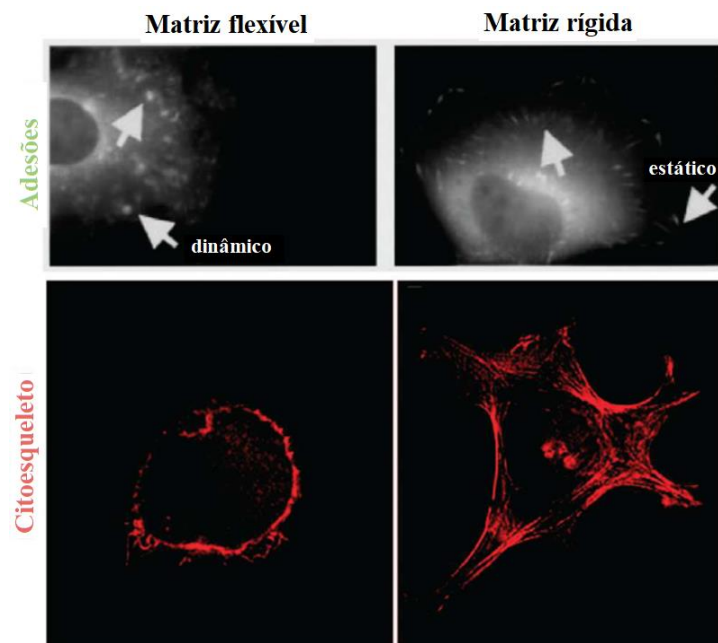


Figura 2.5 - Influência da rigidez do substrato na estrutura das adesões e na dinâmica do citoesqueleto. (Adaptada de CALVO, 2008)

No campo da *mechanosensing* existem dois tipos de estímulos mecânicos que podem gerar uma resposta biológica na célula: a durotaxia e a tensotaxia. O termo de durotaxia é definido como a resposta de movimento direcional estimulada por um gradiente de rigidez, podendo este ter orientação e direção positiva (em favor da maior rigidez) e negativa (menor rigidez). Ela é resultado da sinalização da *mechanosensing* e da dinâmica da mecanotransdução, com a tração gerada pela contração mediada pela miosina-II e transmitida através da adesão célula-ECM

(LANGE e FABRY, 2013) (Fig. 2.6a). Na linha de estudos sobre esse mecanismo, nos trabalhos de Lo et al. (2000); Bischofs e Schwarz (2003) e Schwarz e Bischofs (2005) foi demonstrado que as células preferem migrar para regiões da ECM ou substrato com uma maior rigidez. A resposta biológica governada pela tensotaxia ocorre de modo análogo ao da durotaxia: as células migram a favor das regiões mais deformadas do substrato (BELOUSSOV et al., 2000; MANDEVILLE et al., 1997; MOREO et al., 2008), mediada por dinâmica semelhante à da durotaxia.

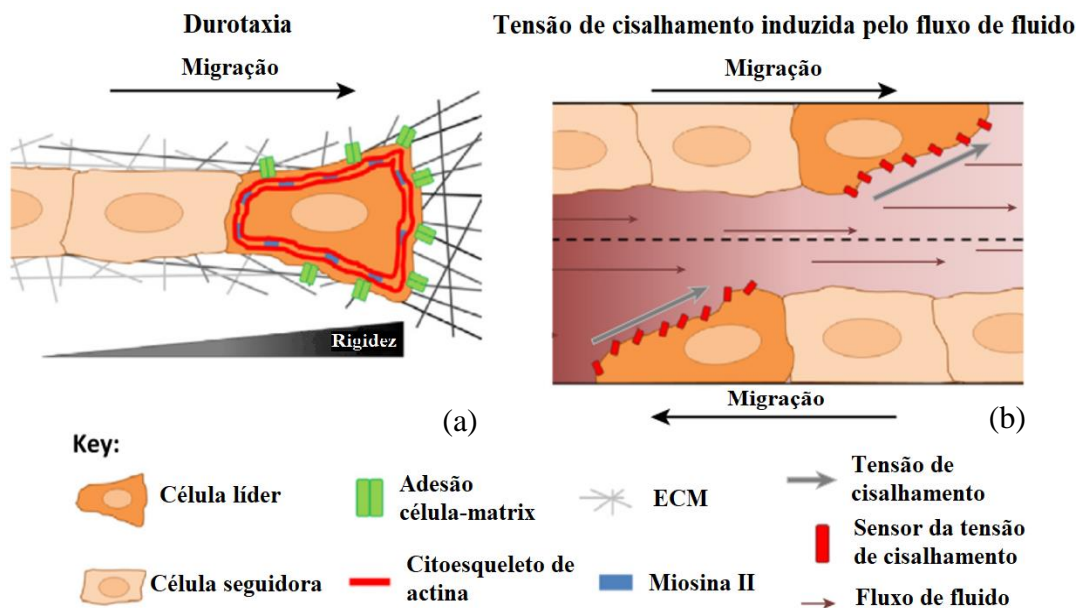


Figura 2.6 - Esquema do mecanismo e componentes biológicos envolvidos na migração coletiva de células. Esquerda: resposta a durotaxia. Direita: resposta à influência do fluxo de fluido. (Adaptada de Haeger et al., 2015).

2.2.2 Mecanotransdução devido ao fluido intersticial

O estudo da migração celular em 3D teve um significativo progresso com o advento dos dispositivos de microfluídicas (XIONG et al., 2014) que possibilitaram um melhor controle sobre os fatores biomecânicos e bioquímicos (POLACHEK et al., 2013) e com o desenvolvimento de melhores técnicas de otimização das resoluções de imagens em tempo real (KALCHMAN et al., 2013). Um dos fatores que tornam a microfluídica uma excelente ferramenta para as análises de migração celular é a possibilidade de experimentar a influência dos fluidos intersticiais nas células. De acordo com Guyton (2006), 20% da massa corporal é composta por esses fluidos, sendo que eles podem induzir a regeneração linfática *in vivo*, a manutenção da atividade funcional dos condrócitos e osteócitos e dirigir a diferenciação de

fibroblastos (SWARTZ e FLEURY, 2007). A Fig. 2.7 exemplifica umas das possíveis aplicações do dispositivo: uma cultura celular é embebida em uma solução de hidrogel e, posteriormente, um gradiente de pressão é introduzido região do gel de colágeno.

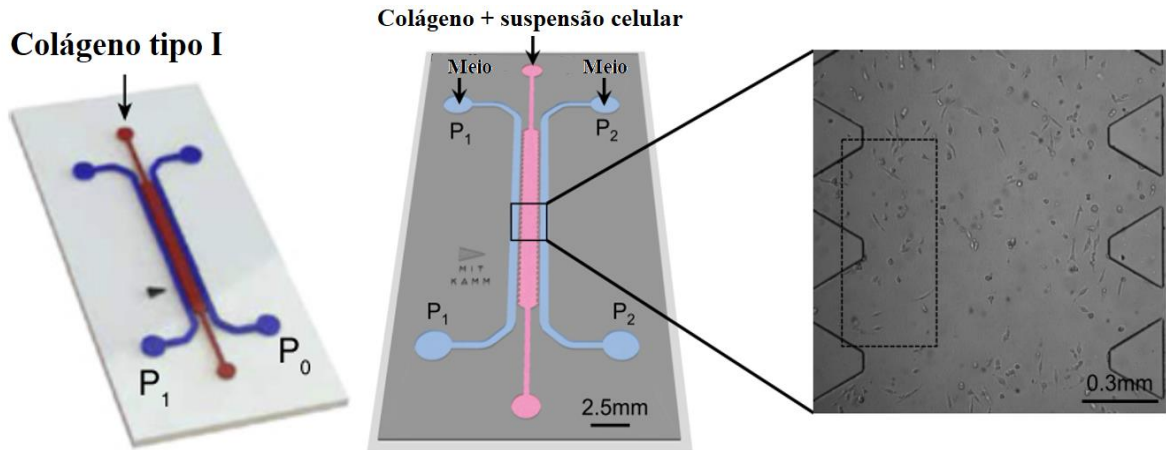


Figura 2.7 - Exemplo de dispositivo de microfluídica. (Adaptada de Polacheck et al., 2014).

Na presença de um fluxo de fluido intersticial (Fig. 2.8a), surgem na célula tensões de cisalhamento (Fig. 2.6b) que são distribuídas assimetricamente pela região de atuação do fluxo (Fig. 2.8b). Consequentemente, a mesma assimetria ocorre para a localização das máximas adesões focais. Resultados do trabalho de migração 3D de Polacheck et al. (2014) mostraram que as células, sobre influência do fluido intersticial, preferem migrar em sentido contrário ao fluxo, no sentido das regiões das adesões mais fortes. A resposta a este estímulo em 3D é análoga aos resultados de Lo et al. (2000) para a migração 2D sob um gradiente de rigidez da ECM.

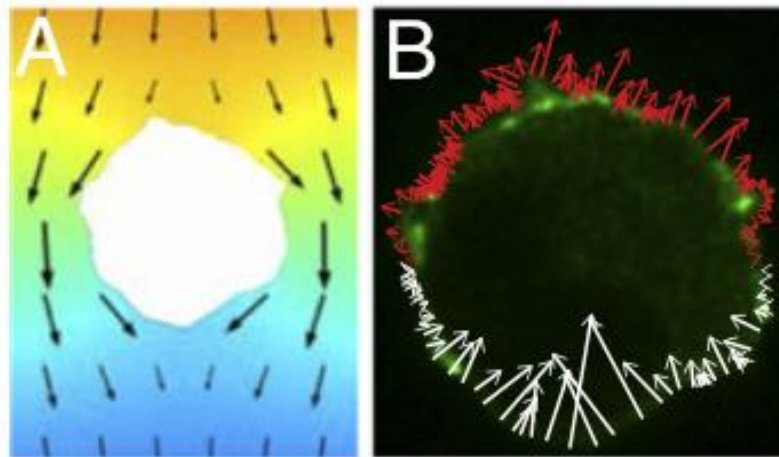


Figura 2.8 - Fluido intersticial e mecânica celular. (a) Fluxo gerado pelo gradiente de pressão; (b) Distribuição assimétrica de tensões. (Adaptado de Polacheck et al., 2014).

3

MODELO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ADERENTES EM MEIOS POROSOS

Nesse capítulo se fará uma breve abordagem sobre o modelo de migração celular em que foi baseado o nosso trabalho (MOREO et al., 2008), apresentando as hipóteses adotadas para o novo modelo e o desenvolvimento da formulação matemática e numérica do problema.

3.1 Modelo mecanobiológico de migração celular

Existem na literatura várias abordagens para a modelagem de migração celular: migração unicelular; coletiva; considerando uma geometria bidimensional e tridimensional; simulando interações célula-célula, célula-ECM; induzida por sinalizações químicas ou mecânicas; entre outros (VARGAS e ZAMAN, 2011; ZAMORA, 2013; VALERO et al., 2014; VUONG et al., 2017).

O modelo desenvolvido no presente trabalho apresenta a teoria da *mechanosensing* aplicada a migração de células aderentes. No que diz respeito a geometria utilizada, tem-se a implementação de um modelo bidimensional que fosse capaz de representar fenômenos em 2D e 3D. A análise da migração ocorre para um conjunto de células, uma migração coletiva, considerando uma interação célula-ECM no qual as células apresentam propriedades aderentes em relação à matriz extracelular. A ECM foi considerada como sendo constituída por duas fases, uma líquida e uma sólida, definindo um meio poroso que pode ser representando por propriedades poroelásticas. Os estímulos externos considerados foram de ordem mecânica, exclusivamente para a análise do fenômeno da tensotaxia. Esse modelo de *mechanosensing* foi baseado no proposto no trabalho de Moreo et al. (2008).

3.2 Hipóteses do trabalho

Devido à complexidade de se modelar um sistema completo de migração celular e a generalidade do modelo mecanobiológico, foram consideradas hipóteses de cunho biológicos e mecânicos necessárias para uma melhor definição dos problemas estudados.

Hipóteses biológicas

As interações célula-ECM são extremamente complexas e dependem exclusivamente do tipo da célula e das propriedades da matriz. Para que a adesão entre célula e ECM ocorra, é necessário que na matriz estejam presentes tipos específicos de proteínas que interagem com as células inseridas no substrato. Com base nisso, foi definido, por hipótese, que no substrato estão presentes todas as proteínas necessárias para uma adesão perfeita com os tipos celulares estudados. Em relação ao ambiente de adesão, o modelo pode ser aplicado em independentes naturezas: substratos elásticos, culturas em hidrogéis, superfícies de um *scaffold* ou ECM de tecidos. As interações célula-célula foram negligenciadas como componente explícito do modelo, mas, implicitamente, elas influenciaram na estimativa dos parâmetros que compõem o fluxo celular. No que diz respeito ao comportamento celular, não foram considerados os fenômenos de mitose, morte e diferenciação das células, negligenciando, portanto, a proliferação. O resultado disso é que não se tem o termo fonte nas equações difusivas associadas à concentração de células.

Hipóteses mecânicas

Primeiramente, foi considerado para todos os casos estudados um regime de pequenas deformações, o que valida as equações mecânicas desenvolvidas. Para a implementação da ECM, foi assumido por simplicidade que a secreção da matriz causada pelas células e a degradação pudessem ser negligenciadas, e além disso, como não foi considerada nenhuma dependência da resposta celular e dos deslocamentos com a densidade da ECM, a evolução temporal da densidade da matriz não seria relevante para o modelo. Como foi considerado a existência de um fluxo de fase líquida no modelo, a força que líquido impõe sobre a célula foi modelada como uma força de corpo, interagindo diretamente com a ECM e as células. Além disso, definindo uma nova abordagem para o modelo mecanobiológico, foi implementado na

deformação celular uma contribuição da fase líquida, relativa à interação direta com as células. Do âmbito do confinamento, considerou-se que o tamanho do poro seria menor que o comprimento do maior eixo da célula, ou, aproximando a geometria celular, menor que o diâmetro médio da célula, configurando uma migração 3D. No que diz respeito a dimensão da implementação do modelo, em um dos casos o estudo é baseado em um experimento de migração tridimensional, entretanto, assumindo-se que existe uma simetria espacial na migração, negligenciou-se uma dimensão para a implementação numérica do modelo, resultando assim em um modelo bidimensional.

3.3 Formulação matemática do problema

3.3.1 Modelo de *mechanosensing*

Dentre todos os elementos que constituem as células, alguns executam funções essenciais no mecanismo de *mechanosensing* e foram considerados no desenvolvimento do modelo biológico. Os componentes são os filamentos de actina, o maquinário contrátil da actomiosina e os componentes passivos da célula, compostos pelo citoesqueleto e a membrana (Fig. 3.1). No diagrama desenvolvido, o citoesqueleto está ligado à ECM através das integrinas transmembrânicas, integrinas essas que são assumidas como perfeitamente rígidas. O motor de miosina gera as forças contráteis que serão transmitidas pelos filamentos de actina, onde parte dessa força é balanceada pelos microtúbulos enquanto o resto atua na ECM através das proteínas transmembrânicas (CALVO, 2008). Outra forma de originar uma deformação no substrato e na célula, que é contemplada no modelo, é a ação de forças externas, por exemplo uma força gerada por uma microagulha ou um fluido.

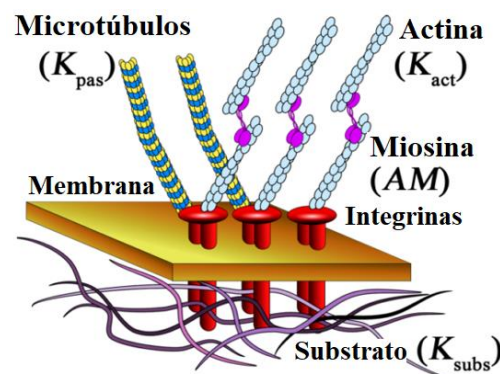


Figura 3.1 - Diagrama com os constituintes mecânicos essenciais para o mecanismo de *mechanosensing*. (Adaptada de Zamora, 2013).

Analisando a Fig. 3.1 não como um modelo biológico, mas como um sistema mecânico, é possível transformar os constituintes do diagrama em elementos elásticos, representados por molas, e que simulariam o comportamento celular (Fig. 3.2a). O modelo apresentado na Fig. 3.2a é uma representação unidimensional de um sistema mecânico de cada ramificação do citoesqueleto. Já a Fig. 3.2b representa o comportamento da tensão contrátil da célula para diferentes deformações, semelhante ao modelo de Hill para o comportamento do músculo ativo (HILL, 1938).

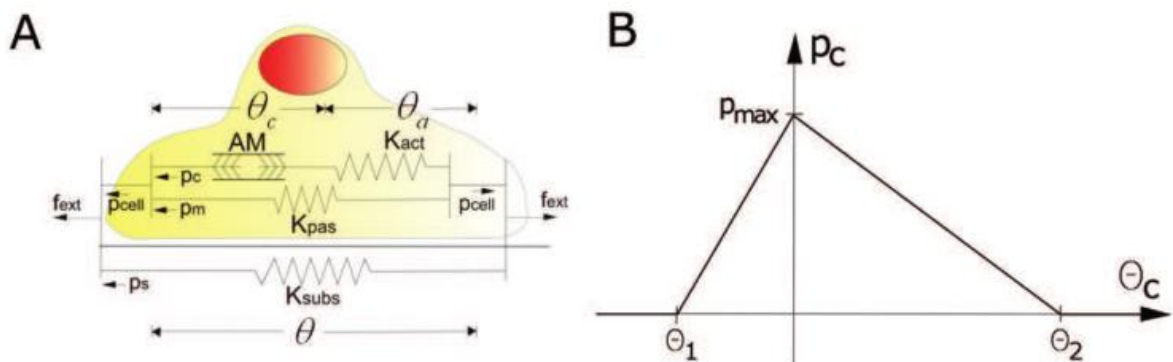


Figura 3.2 - Modelo *mechanosensing* para uma célula aderente. (a) Modelo mecânico representativo. (b) Dependência da tensão contrátil p_c com a deformação contrátil θ_c . (Adaptada de Calvo, 2008).

Na Fig. 3.2a:

- p_c é a tensão contrátil gerada pelo maquinário de miosina II e transmitida através dos filamentos de actina.
- p_m representa a tensão suportada pelos constituintes passivos da célula (microtúbulos do CSK).
- $p_{cell} = p_c + p_m$ é a soma das tensões ativas e passiva, respectivamente, e pode ser interpretada como sendo a tensão líquida na célula. p_{cell} também representa a tensão efetiva que a célula transmite para a ECM.
- p_s denota a tensão na ECM, que depende das forças geradas pela célula e de forças externas que atuam diretamente na ECM.
- θ representa a deformação da célula, considerando que a ligação entre a célula e a ECM é perfeitamente rígida.

- θ_c deformação que representa a mudança física entre a miosina e os filamentos de actina quando são exercidas forças sobre a célula. Pode se entender como a mudança do comprimento ativo do elemento com relação ao comprimento em repouso.
- θ_a é a deformação dos filamentos de actina, devido às forças ativas transmitidas por eles.

Se assumirmos que as molas têm comportamento elástico linear, os termos K_{act} , K_{pas} e K_{subs} podem ser denotados pela rigidez da actina, dos constituintes passivos e da ECM, respectivamente.

No modelo, foi considerado um comportamento isotrópico tanto para a célula e ECM, quanto para as forças geradas pela célula. Assim, as deformações e a tensão celular foram consideradas volumétricas, igual as rigidezes dos elementos internos da célula, e também da ECM. Na Fig. 3.2b apresenta-se o comportamento mecânico da actina quando sujeito a uma deformação mecânica: θ_1 representa a deformação relativa à máxima contração suportada pela actina, θ_2 denota a deformação máxima até a ruptura das ligações e p_{max} é a máxima tensão de contração exercida pelos motores de miosina. Aplicando condições de equilíbrio no sistema mecânico representado pela Fig. 3.2a, chega-se à Eq. (3.1), que representa a pressão ativa p_{cell} , que uma célula transmite à ECM, como uma função da deformação volumétrica θ :

$$p_{cell} = \begin{cases} K_{pas}\theta & \theta < \theta_1 \\ \frac{K_{act}p_{max}}{K_{act}\theta_1 - p_{max}}(\theta_1 - \theta) + K_{pas}\theta & \theta_1 \leq \theta \leq \theta^* \\ \frac{K_{act}p_{max}}{K_{act}\theta_2 - p_{max}}(\theta_2 - \theta) + K_{pas}\theta & \theta^* < \theta \leq \theta_2 \\ K_{pas}\theta & \theta > \theta_2 \end{cases} \quad (3.1)$$

onde $\theta^* = \frac{p_{max}}{K_{act}}$

Entretanto, umas das hipóteses sugeridas nesse trabalho é que o fluxo de fluido intersticial geraria uma deformação, denotada por θ_f , influenciando no cálculo do p_{cell} . Essa deformação

atua apenas nos filamentos de actina da célula, e foi incluído como uma deformação volumétrica adicional do substrato e da célula.

A inclusão desse termo modifica os intervalos que contemplam a atuação dos constituintes ativos da célula (intervalos 2 e 3) e faz com que a Eq. (3.1) seja governada por um parâmetro θ_r que depende da deformação volumétrica e da deformação causada pelo fluido intersticial.

De tal forma que:

$$p_{cell} = \begin{cases} K_{pas}\theta & \theta_r < \theta_1 \\ \frac{K_{act}P_{max}}{K_{act}\theta_1 - P_{max}}(\theta_1 - \theta_r) + K_{pas}\theta & \theta_1 \leq \theta_r \leq \theta^* \\ \frac{K_{act}P_{max}}{K_{act}\theta_2 - P_{max}}(\theta_2 - \theta_r) + K_{pas}\theta & \theta^* < \theta_r \leq \theta_2 \\ K_{pas}\theta & \theta_r > \theta_2 \end{cases} \quad (3.2)$$

com $\theta_r = \theta - \theta_f$.

A deformação θ_f foi expressa da forma $\theta_f = F_f / \left(10E_{subs}d_{cell}^2\right)$, onde F_f é a força gerada pelo fluido, E_{subs} é a rigidez do substrato e d_{cell} é o diâmetro da célula. Foi considerado que a célula exerce uma tração, proporcional à força de arrasto do fluido, em um elemento de volume de lados iguais a d_{cell} . Para esse caso, a deformação seria igual a $F_f / \left(E_{subs}d_{cell}^2\right)$ (Fig. 3.3a). Entretanto, como a célula é muito menor que o substrato, foi necessário a construção de um modelo que simulasse a deformação que uma célula causaria em um substrato, ambos com dimensões naturais, aplicando a mesma força utilizada para o modelo análogo ao ensaio de tração (Fig. 3.3b). O resultado obtido foi de que a deformação que a célula causa em um substrato muitas vezes maior que o seu diâmetro é, aproximadamente, para uma região central, 10 vezes menor do que a deformação causada em um substrato de lados igual ao diâmetro celular. Isso justifica a utilização desse fator para o cálculo da deformação θ_f .

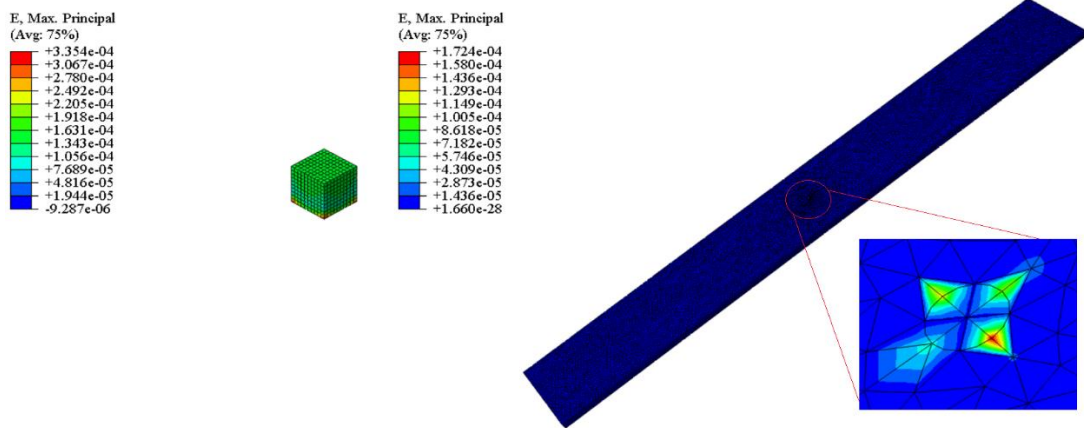


Figura 3.3 - Análise da deformação celular. (a) Substrato de lados igual o diâmetro da célula. (b) Substrato com dimensões muito maiores que o diâmetro da célula.

3.3.2 Modelo de migração celular

DiMilla et al. (1991) desenvolveram um modelo mecanobiológico que considerava a evolução espaço-temporal de quantidades físicas/biológicas da migração. O presente trabalho apresenta essa abordagem para a aproximação contínua da concentração de uma espécie, caracterizada como concentração celular (n), considerando a lei fundamental de conservação (MARTÍNEZ, 2011).

Lei de conservação $Q(\mathbf{x}, t)$

A variação da concentração volumétrica celular é dada pela equação de conservação escrita da forma:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{J}_Q + f_Q \quad (3.3)$$

onde \mathbf{J}_Q é o fluxo da quantidade de concentração celular (n) e f_Q é a fonte ou sumidouro da mesma quantidade.

Concentração celular $n(\mathbf{x}, t)$

O fluxo celular, definido por \mathbf{J}_n , caracteriza o movimento da célula e pode ser composto por diversos termos que representam fenômenos biológicos e mecânicos. Avaliou-se o fluxo celular

como sendo a soma da contribuição de um termo de difusão, convectivo e um relativo a tensotaxia.

Termo de difusão: Este termo caracteriza um movimento não-direcionado e aleatório das células como um fenômeno difusivo. Esses casos são modelados utilizando-se as leis de Fick, que consideram que o fluxo de uma substância é proporcional ao gradiente dessa mesma grandeza.

Denotando de \mathbf{J}_{dif} o termo do fluxo celular, temos:

$$\mathbf{J}_{dif} = -D\nabla n \quad (3.4)$$

onde D é o coeficiente de difusão celular, proporcional à velocidade de movimento

Convecção passiva: A convecção passiva está associada à migração celular gerada pela deformação da matriz. Essa deformação pode ser gerada pelas próprias células ou por outros tipos de solicitações mecânicas. Denotado por \mathbf{J}_{conv} , o fluxo convectivo é expresso como:

$$\mathbf{J}_{convec} = n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \quad (3.5)$$

sendo $\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}$ a velocidade média da ECM no ponto em que a célula está aderida.

Tensotaxia: A tensotaxia é a capacidade da célula responder às deformações mecânicas da ECM. Nas regiões de maiores deformações a ligação entre as integrinas e os receptores da matriz ocorrem através de adesões focais mais fortes, desencadeando uma reorganização celular do citoesqueleto na direção dessas adesões, induzindo uma migração direcional. Denotando por \mathbf{J}_{tenso} o fluxo por tensotaxia, temos:

$$\mathbf{J}_{tenso} = M\nabla \cdot \boldsymbol{\sigma}_{cell} \quad (3.6)$$

onde M é um parâmetro escalar que quantifica a influência do estímulo mecânico do ambiente na direção e magnitude do movimento celular e $\boldsymbol{\sigma}_{cell}$ é a tensão na população celular. A tensão celular, como aproximação para o modelo, foi considerada como sendo dependente da tensão de uma única célula como descrito na Eq. (3.2). Entretanto, para expandir essa abordagem para uma concentração celular, é necessário multiplicar o p_{cell} por uma função que dependa da

concentração. Foi proposto por Calvo (2008) que a tensão $\boldsymbol{\sigma}_{cell}$ se comportasse de acordo com a seguinte expressão:

$$\boldsymbol{\sigma}_{cell} = \frac{n}{1 + \lambda n} p_{cell} \mathbf{I} \quad (3.7)$$

onde λ é um parâmetro que caracteriza a saturação da tensão celular e \mathbf{I} é o tensor identidade de segunda ordem.

Somando todas as contribuições para o fluxo celular, obtêm-se o fluxo celular total:

$$\mathbf{J}_n = \mathbf{J}_{dif} + \mathbf{J}_{convec} + \mathbf{J}_{tenso} \quad (3.8)$$

$$\mathbf{J}_n = -D\nabla n + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + M\nabla \cdot \boldsymbol{\sigma}_{cell} \quad (3.9)$$

Expandindo a Eq. (3.9), com a definição dada pela Eq. (3.7), temos que:

$$\mathbf{J}_n = - \left(D - \frac{Mp_{cell}}{(1 + \lambda n)^2} \right) \nabla n + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + M \frac{n}{1 + \lambda n} \nabla p_{cell} \quad (3.10)$$

Analisando a Eq. (3.10), percebe-se duas características do modelo. O terceiro termo mostra a tendência das células em migrarem para as regiões de maiores valores de p_{cell} , logo, para as regiões mais deformadas. No primeiro termo surge uma nova característica do modelo: o coeficiente de difusividade efetiva. Esse coeficiente é dependente da concentração e do p_{cell} e é dado pela Eq. (3.11).

$$\tilde{D}(n, p_{cell}) = D - \frac{Mp_{cell}}{(1 + \lambda n)^2} \quad (3.11)$$

A difusividade efetiva é proporcional ao quadrado da velocidade de arrasto da célula e, como sendo função da concentração e da tensão, apresenta mudança no seu comportamento com a variação desses parâmetros. A mobilidade celular, definida por \tilde{D} , diminui com o aumento do p_{cell} , o que, em suma, significa que as regiões mais deformadas apresentam um menor

movimento das células. Porém, essa dependência com a deformação é reduzida com o aumento da concentração.

Pressão nos poros $p(\mathbf{x}, t)$

A teoria de materiais poroelásticos baseada no modelo de consolidação de Biot, utilizado para resolver problemas que envolvem matrizes porosas com a presença de fluidos, é governada por duas equações: uma que representa a relação constitutiva para o equilíbrio mecânico da matriz, apresentada posteriormente, e outra que representa a evolução espaço-temporal da pressão nos poros. A segunda equação, para um sistema saturado, homogêneo, isotrópico, com fluido incompressível e sem a presença de uma força externa, é escrita da forma

$$\frac{\partial}{\partial t}(\gamma p + \nabla \cdot \mathbf{u}) - \frac{\kappa}{\eta} \nabla^2 p = 0 \quad (3.12)$$

onde $\gamma = \varphi\beta$, com φ sendo a porosidade e β a compressibilidade do fluido, κ é a permeabilidade do fluido e η é o coeficiente de viscosidade do fluido. O primeiro termo da Eq. (3.12) representa o aumento do volume de fluido no sólido por unidade de volume. O segundo termo é derivado da lei de Darcy, que modela qual o comportamento do fluxo em um meio poroso. Este representa a velocidade do fluido, que é igual ao fluxo dividido pela porosidade, sendo representada pela seguinte expressão:

$$\mathbf{v} = -\left(\frac{1}{\varphi}\right) \frac{\kappa}{\eta} \nabla p \quad (3.13)$$

com \mathbf{v} conhecido por velocidade de Darcy.

Deslocamentos da ECM $\mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$

O cálculo dos deslocamentos é efetuado através do balanço do momento linear da ECM. Acoplando-se a equação constitutiva da matriz com o termo de tensão celular, a equação de equilíbrio é expressa da forma:

$$\nabla \cdot (\boldsymbol{\sigma}_{ecm} + \boldsymbol{\sigma}_{cell}) + \mathbf{f}_{ext} = 0 \quad (3.14)$$

O termo $\boldsymbol{\sigma}_{ecm}$ da Eq. (3.14), que é dependente dos deslocamentos \mathbf{u} da matriz, e, como considerado por hipótese, apresenta um comportamento linear poroelástico, tem a seguinte expressão:

$$\boldsymbol{\sigma}_{ecm} = \frac{E}{1+\nu} \left(\boldsymbol{\varepsilon} + \frac{\nu}{1-2\nu} \theta \mathbf{I} \right) + p \mathbf{I} \quad (3.15)$$

sendo $\boldsymbol{\varepsilon} = 1/2(\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T)$ o tensor de pequenas deformações da ECM, E e ν o módulo de Young e o coeficiente de Poisson, respectivamente, e \mathbf{f}_{ext} uma força externa. Partindo da consideração que o modelo tem como objetivo avaliar a influência do fluido intersticial no processo de migração celular, foi proposto adaptar essa força externa, ou força de corpo, como sendo o equivalente a uma força que arraste as células sobre a matriz, sendo esse arrasto transmitido, em forma de deslocamentos, para a ECM. A expressão de \mathbf{f}_{ext} foi definida como:

$$\mathbf{f}_{ext} = c_a \mathbf{v} n \quad (3.16)$$

onde c_a é um coeficiente de arrasto. Por fim, organizando as equações do problema, obtêm-se o seguinte sistema que governará o modelo:

$$\begin{aligned} \frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot \left[-D \nabla n + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + M \nabla \cdot \boldsymbol{\sigma}_{cell} \right] &= 0 \\ \frac{\partial}{\partial t} (\gamma p + \nabla \cdot \mathbf{u}) - \frac{\kappa}{\eta} \nabla^2 p &= 0 \\ \nabla \cdot (\boldsymbol{\sigma}_{ecm} + \boldsymbol{\sigma}_{cell}) + \mathbf{f}_{ext} &= 0 \end{aligned} \quad (3.17)$$

3.4 Formulação de elementos finitos

Na presente seção será descrita a formulação pelo método dos elementos finitos (MEF) utilizada para a solução numérica das Eqs. (3.17). Foram consideradas 3 variáveis de interesse para o problema: a concentração celular n , a pressão nos poros p e os deslocamentos \mathbf{u} da ECM.

3.4.1 Formulação fraca

A fim de se aplicar o método de discretização por elementos finitos nas Eqs. (3.17) deriva-se sua formulação fraca para a diminuição da ordem das equações diferenciais e a construção do sistema de equações integráveis. Para a aplicação desse método, funções de teste para a concentração, pressão e deslocamentos são consideradas como: δn , δp e $\delta \mathbf{u}$, respectivamente. Uma propriedade dessas funções de teste, definidas para o presente trabalho, é que elas zeram as integrais no contorno $\partial\Omega$ do domínio Ω . Aplicando a formulação fraca e organizando as integrais, têm-se o seguinte sistema de equações:

$$\begin{aligned} \int_{\Omega} \delta n \frac{\partial n}{\partial t} dV + \int_{\Omega} \delta n \nabla \cdot \left[-D \nabla n + n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + M \nabla \cdot \boldsymbol{\sigma}_{cell} \right] dV &= 0 \\ \int_{\Omega} \delta p \frac{\partial}{\partial t} (\gamma p + \nabla \cdot \mathbf{u}) dV - \int_{\Omega} \delta p \frac{\kappa}{\eta} \nabla^2 p dV &= 0 \\ \int_{\Omega} \delta \mathbf{u} \nabla \cdot (\boldsymbol{\sigma}_{ecm} + \boldsymbol{\sigma}_{cell}) dV + \int_{\Omega} \delta \mathbf{u} \mathbf{f}_{ext} dV &= 0 \end{aligned} \quad (3.18)$$

Para a redução da ordem das derivadas, aplica-se a primeira identidade de Green. Essa identidade é derivada do Teorema do Divergente e pode-se ser genericamente escrita como

$$\int_{\Omega} (\Psi \nabla^2 \Phi + \nabla \Psi \cdot \nabla \Phi) dV = \int_{\partial\Omega} \Psi \nabla \Phi \cdot d\mathbf{S} \quad (3.19)$$

onde Ψ e Φ são escalares. Definindo para a Eq. (3.19) que a integral é nula no contorno, temos que:

$$\int_{\Omega} \Psi \nabla^2 \Phi dV = - \int_{\Omega} \nabla \Psi \cdot \nabla \Phi dV \quad (3.20)$$

Substituindo a relação descrita pela Eq. (3.20) no sistema de equações representado pelas Eqs. (3.18), considerando que as funções testes são análogas às Ψ , deriva-se o seguinte sistema

$$\int_{\Omega} \delta n \frac{\partial n}{\partial t} dV + \int_{\Omega} \nabla \delta n \cdot \left[D \nabla n - n \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} - \frac{MK_{cell}n}{1 + \lambda n} \nabla \theta - \frac{Mp_{cell}}{(1 + \lambda n)^2} \nabla n \right] dV = 0 \quad (3.21)$$

$$\int_{\Omega} \delta p \frac{\partial}{\partial t} (\gamma p + \nabla \cdot \mathbf{u}) dV + \int_{\Omega} \nabla \delta p \cdot \left[\frac{\kappa}{\eta} \nabla p \right] dV = 0 \quad (3.22)$$

$$\int_{\Omega} \boldsymbol{\sigma} : \frac{1}{2} (\nabla \delta \mathbf{u} + \nabla^T \delta \mathbf{u}) dV = \int_{\Omega} \delta \mathbf{u} \cdot \mathbf{f}_{ext} dV \quad (3.23)$$

onde $\boldsymbol{\sigma} = \boldsymbol{\sigma}_{ecm} + \boldsymbol{\sigma}_{cell}$, o termo $K_{cell} \nabla \theta$ é resultado da derivada espacial da função p_{cell} e a função K_{cell} é expressa da forma

$$K_{cell} = \begin{cases} K_{pas} & \theta_r < \theta_1 \\ \frac{K_{act} K_1}{K_{act} + K_1} + K_{pas} & \theta_1 \leq \theta_r \leq \theta^* \\ \frac{K_{act} K_2}{K_{act} + K_2} + K_{pas} & \theta^* < \theta_r \leq \theta_2 \\ K_{pas} & \theta_r > \theta_2 \end{cases} \quad (3.24)$$

com $K_1 = -p_{max}/\theta_1$ e $K_2 = -p_{max}/\theta_2$.

3.4.2 Discretização temporal

A fim de aplicar a discretização temporal nas Eqs. (3.21), (3.22) e (3.23), foi particionado o intervalo de tempo \bar{T} em k_{passo} subintervalos $[t_k, t_{k+1}]$, como $\bar{T} = \bigcup_{k=0}^{k_{passo}-1} [t_k, t_{k+1}]$. Todas as incógnitas e suas derivadas são conhecidas no tempo t_k . Aplicando o método clássico implícito de Euler para uma das variáveis n , p e \mathbf{u} , a discretização temporal é escrita na seguinte forma, considerando o no primeiro caso:

$$n_{k+1} = n_k + \Delta t \dot{n}_{k+1} \quad (3.25)$$

onde n_{k+1} e \dot{n}_{k+1} são aproximações para $n(t_{k+1})$ e $(\partial n / \partial t)(t_{k+1})$, e $\Delta t = t_{k+1} - t_k > 0$ representa o incremento de tempo.

Substituindo a Eq. (3.25), e as equações para pressão e deslocamentos, na formulação fraca do problema dado pelas Eqs. (3.21) e (3.22) obtêm-se o seguinte conjunto semi-discreto de equações

$$\mathbf{f}_n = \int_{\Omega} \delta n \left(\frac{n_{k+1} - n_k}{\Delta t} \right) dV + \int_{\Omega} \nabla \delta n \cdot \left[D \nabla n - n \left(\frac{\mathbf{u}_{k+1} - \mathbf{u}_k}{\Delta t} \right) - \frac{MK_{cell} n}{1 + \lambda n} \nabla \theta - \frac{Mp_{cell}}{(1 + \lambda n)^2} \nabla n \right] dV = 0 \quad (3.26)$$

$$\mathbf{f}_p = \int_{\Omega} \delta p \left(\gamma \frac{(p_{k+1} - p_k)}{\Delta t} + \nabla \cdot \left(\frac{\mathbf{u}_{k+1} - \mathbf{u}_k}{\Delta t} \right) \right) dV + \int_{\Omega} \nabla \delta p \cdot \left[\frac{\kappa}{\eta} \nabla p \right] dV = 0$$

$$\mathbf{f}_u = \int_{\Omega} \boldsymbol{\sigma} : \frac{1}{2} (\nabla \delta \mathbf{u} + \nabla^T \delta \mathbf{u}) dV - \int_{\Omega} \delta \mathbf{u} \cdot \mathbf{f}_{ext} dV$$

3.4.3 Discretização espacial

O próximo passo é utilizar o método dos elementos finitos para discretizar no espaço o sistema semi-discreto obtido na última subseção. A interpolação das incógnitas, que é feita para cada elemento discretizado Ω^e , é obtida através da utilização das chamadas funções de forma, e pode ser expressa como:

$$\begin{aligned} n^h \Big|_{\Omega^e} &= \mathbf{N}_n \mathbf{n}^e \\ p^h \Big|_{\Omega^e} &= \mathbf{N}_p \mathbf{p}^e \\ \mathbf{u}^h \Big|_{\Omega^e} &= \mathbf{N}_u \mathbf{u}^e \end{aligned} \quad (3.27)$$

onde \mathbf{n}^e , \mathbf{p}^e e \mathbf{u}^e são os vetores com os valores nodais das incógnitas para cada elemento Ω^e ; \mathbf{N}_n , \mathbf{N}_p e \mathbf{N}_u são as matrizes contendo as funções de forma para cada elemento Ω^e e o sobescrito h representa a variável vai ser avaliada em cada elemento e para cada um dos pontos de integração. Cada variável desconhecida do problema é representada por uma função de forma característica, tal como se segue:

$$\begin{aligned}
\mathbf{N}_n &= [N_n^1, \dots, N_n^{q_{en}}] \\
\mathbf{N}_p &= [N_p^1, \dots, N_p^{q_{en}}] \\
\mathbf{N}_u &= \left[\begin{array}{c|c} N_u^1 & 0 \\ \hline 0 & N_u^1 \end{array} \left| \dots \right. \begin{array}{c|c} N_u^{q_{en}} & 0 \\ \hline 0 & N_u^{q_{en}} \end{array} \right]
\end{aligned} \tag{3.28}$$

com N^i sendo a função de forma associada a cada nó i do elemento e q_{en} o número de nós por elemento. Com base nas propriedades das funções de teste desenvolvidas por Bubnov-Galerkin, as mesmas funções de forma são utilizadas na interpolação das funções testes. Logo:

$$\begin{aligned}
\delta n^h \Big|_{\Omega^e} &= \mathbf{N}_n \delta \mathbf{n}^e \\
\delta p^h \Big|_{\Omega^e} &= \mathbf{N}_p \delta \mathbf{p}^e \\
\delta \mathbf{u}^h \Big|_{\Omega^e} &= \mathbf{N}_u \delta \mathbf{u}^e
\end{aligned} \tag{3.29}$$

Da mesma forma, a discretização dos gradientes das funções de teste e das variáveis desconhecidas são expressas de acordo como se segue:

$$\begin{aligned}
\nabla n^h \Big|_{\Omega^e} &= \nabla \mathbf{N}_n \mathbf{n}^e, \quad \nabla \delta n^h \Big|_{\Omega^e} = \nabla \mathbf{N}_n \delta \mathbf{n}^e \\
\nabla p^h \Big|_{\Omega^e} &= \nabla \mathbf{N}_p \mathbf{p}^e, \quad \nabla \delta p^h \Big|_{\Omega^e} = \nabla \mathbf{N}_p \delta \mathbf{p}^e
\end{aligned} \tag{3.30}$$

A interpolação das deformações e do gradiente das deformações é realizada seguindo as seguintes expressões:

$$\begin{aligned}
\boldsymbol{\varepsilon}^h \Big|_{\Omega^e} &= \mathbf{B}_u \mathbf{u}^e \\
\theta^h \Big|_{\Omega^e} &= \nabla^* \mathbf{N}_u \mathbf{u}^e \\
\nabla \theta^h \Big|_{\Omega^e} &= \text{Hess} \mathbf{N}_u \mathbf{u}^e
\end{aligned} \tag{3.31}$$

de forma que \mathbf{B}_u , $\nabla^* \mathbf{N}_u$ e $\text{Hess} \mathbf{N}_u$ representam diferentes matrizes de derivadas das funções de forma:

$$\mathbf{B}_u = \mathbf{H} \mathbf{N}_u$$

$$\mathbf{H} = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & 0 \\ 0 & \frac{\partial}{\partial y} \\ \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} \end{bmatrix} \quad (3.32)$$

$$\nabla^* \mathbf{N}_u = \left[\frac{\partial N_u^1}{\partial x} \quad \frac{\partial N_u^1}{\partial y}, \dots, \frac{\partial N_u^{q_{en}}}{\partial x} \quad \frac{\partial N_u^{q_{en}}}{\partial y} \right]$$

$$\text{Hess} \mathbf{N}_u = \left[\text{Hess} N_u^1 / \dots / \text{Hess} N_u^{q_{en}} \right] \quad (3.33)$$

$$\text{Hess} N_u^i = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 N_u^i}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 N_u^i}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 N_u^i}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 N_u^i}{\partial y^2} \end{bmatrix} \quad i = 1, \dots, q_{en} \quad (3.34)$$

3.4.4 Método de Newton-Raphson

O método de Newton-Raphson é uma técnica numérica para a solução de sistema de equações não lineares. Um sistema algébrico genérico de m equações pode ser escrito de forma vetorial como:

$$\mathbf{F}(\mathbf{X}) = \mathbf{0}, \quad \mathbf{F}(\mathbf{X}) = \begin{bmatrix} f_1(x_1, x_2, \dots, x_m) \\ f_2(x_1, x_2, \dots, x_m) \\ \vdots \\ f_m(x_1, x_2, \dots, x_m) \end{bmatrix} \quad (3.35)$$

onde f são funções e \mathbf{X} é um vetor de m incógnitas (WHITELEY, 2017). Supondo que \mathbf{X}_0 é uma solução do sistema, temos que $\mathbf{F}(\mathbf{X}_0) = \mathbf{0}$. Utilizando a série de Taylor para aproximar

um componente i de \mathbf{F} em torno do ponto \mathbf{X}_o , e incluindo apenas os termos lineares em $\mathbf{X}_o - \mathbf{X}$, têm-se que:

$$F_i(\mathbf{X}_o) \approx F_i(\mathbf{X}) + \sum_{j=1}^m \hat{J}_{ij} (X_{oj} - X_j), \quad i=1,2,\dots,m \quad (3.36)$$

com \hat{J}_{ij} denotando os elementos da matriz Jacobiana, que é dada por

$$\hat{J}_{ij} = \left. \frac{\partial F_i}{\partial X_j} \right|_{\mathbf{X}} \quad (3.37)$$

A Eq. (3.36) pode ser escrita em notação matricial tal como se segue:

$$\mathbf{F}(\mathbf{X}_o) \approx \mathbf{F}(\mathbf{X}) + \hat{\mathbf{J}}(\mathbf{X}_o - \mathbf{X})$$

$$\hat{\mathbf{J}} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \dots & \frac{\partial f_1}{\partial x_m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial f_m}{\partial x_1} & \dots & \frac{\partial f_m}{\partial x_m} \end{bmatrix} \quad (3.38)$$

Reorganizando a Eq. (3.38), valendo-se de que a matriz Jacobiana é invertível e já considerando os incrementos para a obtenção da solução, temos que:

$$\mathbf{X}^{a+1} = \mathbf{X}^a - \hat{\mathbf{J}}^{-1}(\mathbf{X}^a) \mathbf{F}(\mathbf{X}^a) \quad (3.39)$$

onde a indica o a -ésimo incremento e a solução para o problema é representada por \mathbf{X} .

A aplicação do método de Newton-Raphson na formulação de elementos finitos consiste em processo iterativo que envolve a solução de um sistema linear de equações desenvolvido a partir da formulação fraca e discretização temporal e espacial do modelo. Rearranjando a Eq. (3.39) para ser expressa de acordo como se apresenta no método dos elementos finitos, temos que

$$\mathbf{K}_T^a \delta \mathbf{S}^{a+1} = -\mathbf{R}^a \quad (3.40)$$

com \mathbf{R}^a denotando vetor residual global, \mathbf{K}_T^a a matriz global de rigidez tangente e $\delta \mathbf{S}^{a+1}$ o vetor solução global do sistema (NETO et al., 2008). O vetor residual é resultado do equilíbrio de forças globais internas e externas do modelo, sendo expresso matematicamente como

$$\mathbf{R}(\mathbf{X}_{k+1}) \equiv \mathbf{f}^{\text{int}}(\mathbf{X}_{k+1}) - \mathbf{f}_{k+1}^{\text{ext}} = \mathbf{F}(\mathbf{X}_{k+1}) = 0 \quad (3.41)$$

onde \mathbf{f}^{int} e \mathbf{f}^{ext} representam os vetores que atuam internamente e externamente, respectivamente, definidos pela formulação fraca como representados pelas Eqs. (3.21)-(3.23). A matriz de rigidez tangente tem as mesmas propriedades da matriz jacobiana, sendo formada pelas derivadas das funções em relação a cada variável. Como explicitado na Eq. (3.41), as Eqs. (3.40) e (3.39) são idênticas, com $\mathbf{K}_T^a = \hat{\mathbf{J}}$ e $\delta \mathbf{S}^{a+1} = \mathbf{X}^{a+1} - \mathbf{X}^a$.

Com base no que foi definido pelo método de Newton-Raphson, através das Eqs. (3.40) e (3.41), é necessário identificar as equações não lineares que compõem o vetor \mathbf{R} e a matriz \mathbf{K}_T . Para isso, é necessário definirmos um vetor residual local denominado aqui por $\tilde{\mathbf{R}}$ e uma matriz de rigidez tangente local denotada como $\tilde{\mathbf{K}}_T$. Substituindo as Eqs. (3.27), (3.29), (3.30) e (3.31) no sistema semi-discreto é possível desenvolver as funções que serão utilizados no método. Considerando que,

$$\mathbf{f}_{k+1}^e = \mathbf{f}_{k+1}^{\text{int},e} - \mathbf{f}_{k+1}^{\text{ext},e} \quad (3.42)$$

$$\tilde{\mathbf{R}}_{k+1}^e = \left[\mathbf{f}_{\mathbf{u},k+1}^e, \mathbf{f}_{n,k+1}^e, \mathbf{f}_{p,k+1}^e \right]^T \quad (3.43)$$

com $\tilde{\mathbf{R}}_{k+1}^e$ contendo as funções que governam o problema avaliadas em cada domínio Ω^e . A contribuição de cada termo é

$$\begin{aligned} \mathbf{f}_{\mathbf{u},k+1}^e &= \int_{\Omega^e} \mathbf{B}_{\mathbf{u}}^T \left[\mathbf{D}_{\text{elas}} \mathbf{H} \mathbf{u}^h + \mathbf{D}_{\text{cell}} \mathbf{H} \mathbf{u}^h + \frac{K_{\text{cell}}^* n^h}{1 + \lambda n^h} \mathbf{I}^c \right]_{k+1} dV \\ &+ \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_{\mathbf{u}}^T \left[\nabla p^h + c_a \frac{\kappa}{\varphi \eta} n^h \nabla p^h \right]_{k+1} dV \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \mathbf{f}_{n,k+1}^e = & \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_n^T \frac{n_{k+1}^h - n_k^h}{\Delta t} dV + \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_n^T \left[D \nabla n^h - n^h \frac{\mathbf{u}^h - \mathbf{u}_k^h}{\Delta t} \right. \\ & \left. - MK_{cell} \frac{n^h}{1 + \lambda n^h} \nabla \theta^h - \frac{Mp_{cell}(\theta^h)}{(1 + \lambda n^h)^2} \nabla n^h \right]_{k+1} dV \end{aligned} \quad (3.44)$$

$$\begin{aligned} \mathbf{f}_{p,k+1}^e = & \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_p^T \gamma \frac{p_{k+1}^h - p_k^h}{\Delta t} dV + \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_p^T \frac{\kappa}{\eta} \nabla p_{k+1}^h dV - \\ & - \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_p^T \frac{\mathbf{u}_{k+1}^h - \mathbf{u}_k^h}{\Delta t} dV \end{aligned}$$

onde \mathbf{D}_{elas} e \mathbf{D}_{cell} representam matrizes de comportamento mecânico e celular:

$$\mathbf{D}_{elas} = \begin{bmatrix} 1-\nu & \nu & 0 \\ \nu & 1-\nu & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1-2\nu}{2} \end{bmatrix} \quad (3.45)$$

$$\mathbf{D}_{cell} = \begin{bmatrix} K_{cell} \tilde{f}(n) & K_{cell} \tilde{f}(n) & 0 \\ K_{cell} \tilde{f}(n) & K_{cell} \tilde{f}(n) & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad \tilde{f}(n) = \frac{n^h}{1 + \lambda n^h} \quad (3.46)$$

Os termos K_{cell}^* e \mathbf{I}^c que aparecem na Eq. (3.44) são dados por:

$$K_{cell}^* = \begin{cases} 0 & \theta_r < \theta_1 \\ \frac{K_{act} p_{max}}{K_{act} \theta_1 - p_{max}} \theta_1 & \theta_1 \leq \theta_r \leq \theta^* \\ \frac{K_{act} p_{max}}{K_{act} \theta_2 - p_{max}} \theta_2 & \theta^* < \theta_r \leq \theta_2 \\ 0 & \theta_r > \theta_2 \end{cases} \quad \text{e } \mathbf{I}^c = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (3.47)$$

A construção da matriz local de rigidez tangente é baseada na definição da matriz Jacobiana \mathbf{J} dada pela Eq. (3.38). Para a montagem de cada termo da matriz, foi considerado como se segue:

$$\mathbf{k}^e \Big|_{k+1}^{(a)} = \mathbf{k}^{int,e} \Big|_{k+1}^{(a)} + \mathbf{k}^{ext,e} \Big|_{k+1}^{(a)} \quad (3.48)$$

Logo, a matriz $\tilde{\mathbf{K}}_T$ é expressa da forma

$$\tilde{\mathbf{K}}_T^e \Big|_{k+1}^{(a)} = \begin{bmatrix} \mathbf{k}_{uu}^e & \mathbf{k}_{un}^e & \mathbf{k}_{up}^e \\ \mathbf{k}_{nu}^e & \mathbf{k}_{nn}^e & \mathbf{0} \\ \mathbf{k}_{pu}^e & \mathbf{0} & \mathbf{k}_{pp}^e \end{bmatrix} \Big|_{k+1}^{(a)} \quad (3.49)$$

onde

$$\mathbf{k}_{ij}^e = \frac{\partial \mathbf{f}_i}{\partial j}, \quad i = j = \mathbf{u}, n, p \quad (3.50)$$

Abaixo foi incluído a contribuição dos componentes da matriz de rigidez tangente:

$$\begin{aligned} \mathbf{k}_{uu,k+1}^e &= \int_{\Omega^e} \mathbf{B}_u^T \mathbf{D}_{elas} \mathbf{B}_u dV + \int_{\Omega^e} \mathbf{B}_u^T \mathbf{D}_{cell} \mathbf{B}_u dV \\ \mathbf{k}_{un,k+1}^e &= \int_{\Omega^e} \mathbf{B}_u^T \left[\mathbf{D}_{cell}^* \mathbf{H} \mathbf{u}^h \mathbf{N}_n + \frac{K_{cell}^*}{(1 + \lambda n_{k+1}^h)^2} \mathbf{I}_c dV \right] + \\ &\quad + \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_u^T c_a \frac{\kappa}{\varphi \eta} \nabla p_{k+1}^h \mathbf{N}_n dV \\ \mathbf{k}_{up,k+1}^e &= \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_u^T \nabla \mathbf{N}_p dV + \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_u^T c_a \frac{\kappa}{\varphi \eta} n_{k+1}^h \nabla \mathbf{N}_p dV \\ \mathbf{k}_{nn,k+1}^e &= \frac{1}{\Delta t} \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_n^T \mathbf{N}_n dV + \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_n^T \left[D - \frac{Mp_{cell}(\theta^h)}{(1 + \lambda n^h)^2} \right] \Big|_{k+1} \nabla \mathbf{N}_n dV + \\ &\quad + \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_n^T \left[\frac{2\lambda Mp_{cell}(\theta^h)}{(1 + \lambda n^h)^3} \nabla n^h - \frac{\mathbf{u}_{k+1}^h - \mathbf{u}_{k+1}^h}{\Delta t} - \frac{MK_{cell} \nabla \theta^h}{(1 + \lambda n^h)^2} \right] \Big|_{k+1} \mathbf{N}_n dV \\ \mathbf{k}_{nu,k+1}^e &= -\frac{1}{\Delta t} \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_n^T n_{k+1}^h \mathbf{N}_u dV - \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_n^T \frac{MK_{cell} n_{k+1}^h}{1 + \lambda n_{k+1}^h} \text{Hess} \mathbf{N}_u dV - \\ &\quad - \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_n^T \frac{MK_{cell}}{(1 + \lambda n_{k+1}^h)^2} \nabla n_{k+1}^h \nabla^* \mathbf{N}_u dV \\ \mathbf{k}_{pp,k+1}^e &= \frac{1}{\Delta t} \int_{\Omega^e} \mathbf{N}_p^T \mathbf{N}_p dV + \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_p^T \frac{\kappa}{\eta} \nabla \mathbf{N}_p dV \\ \mathbf{k}_{pu,k+1}^e &= -\frac{1}{\Delta t} \int_{\Omega^e} \nabla \mathbf{N}_p^T \mathbf{N}_u dV \end{aligned} \quad (3.51)$$

sendo a matriz \mathbf{D}_{cell}^* expressa como:

$$\mathbf{D}_{cell}^* = \begin{bmatrix} K_{cell}^* \tilde{f}(n) & K_{cell}^* \tilde{f}(n) & 0 \\ K_{cell}^* \tilde{f}(n) & K_{cell}^* \tilde{f}(n) & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (3.52)$$

Concluindo a aplicação do método, é necessário a transformação das matrizes e dos vetores locais para as coordenadas globais. Considerando um operador padrão de montagem dado por \mathbf{A} , os termos definidos na Eq. (3.40) e um vetor coluna local das variáveis expresso como:

$$\tilde{\mathbf{d}}_{k+1}^e = [\mathbf{u}_{k+1}^e, n_{k+1}^e, p_{k+1}^e] \quad (3.53)$$

temos que as coordenadas globais são escritas da forma

$$\mathbf{S}_{k+1} = \mathbf{A} \sum_{e=1}^{q_{el}} \tilde{\mathbf{d}}_{k+1}^e \quad (3.54)$$

O vetor de forças globais e a matriz de rigidez global é montado considerando as contribuições dos elementos descritos nas Eqs. (3.44) e (3.51), respectivamente:

$$\mathbf{R}_{k+1} = \mathbf{A} \sum_{e=1}^{q_{el}} \tilde{\mathbf{R}}_{k+1}^e \quad (3.55)$$

$$\mathbf{K}_T|_{k+1}^{a+1} = \mathbf{A} \sum_{e=1}^{q_{el}} \tilde{\mathbf{K}}_T|_{k+1}^e \quad (3.56)$$

Sabendo que o termo $\delta \mathbf{S}^{a+1}$ pode ser escrito como vetor incremental do tipo

$$\delta \mathbf{S}_{k+1}^{a+1} = \Delta \mathbf{S}|_{k+1}^{a+1} = \mathbf{S}|_{k+1}^{a+1} - \mathbf{S}|_{k+1}^a \quad (3.57)$$

e utilizando o que foi definido pelo método de Newton-Raphson, finalmente obtemos:

$$\mathbf{K}_T|_{k+1}^a \Delta \mathbf{S}|_{k+1}^{a+1} = -\mathbf{R}|_{k+1}^a \quad (3.58)$$

Mesmo sendo possível o uso de diferentes expansões para cada variável, foram escolhidas ordens de interpolação iguais para as incógnitas do modelo.

3.4.4.1 Algoritmo de implementação do Método de Newton-Raphson

A última abordagem da seção 3.4 é a exposição em fluxograma da formulação apresentada na subseção 3.4.4. Afim de melhor representar como é organizada as operações iterativas do Método de Newton-Raphson, a Fig 3.4 apresenta a formulação algorítmicamente implementada.

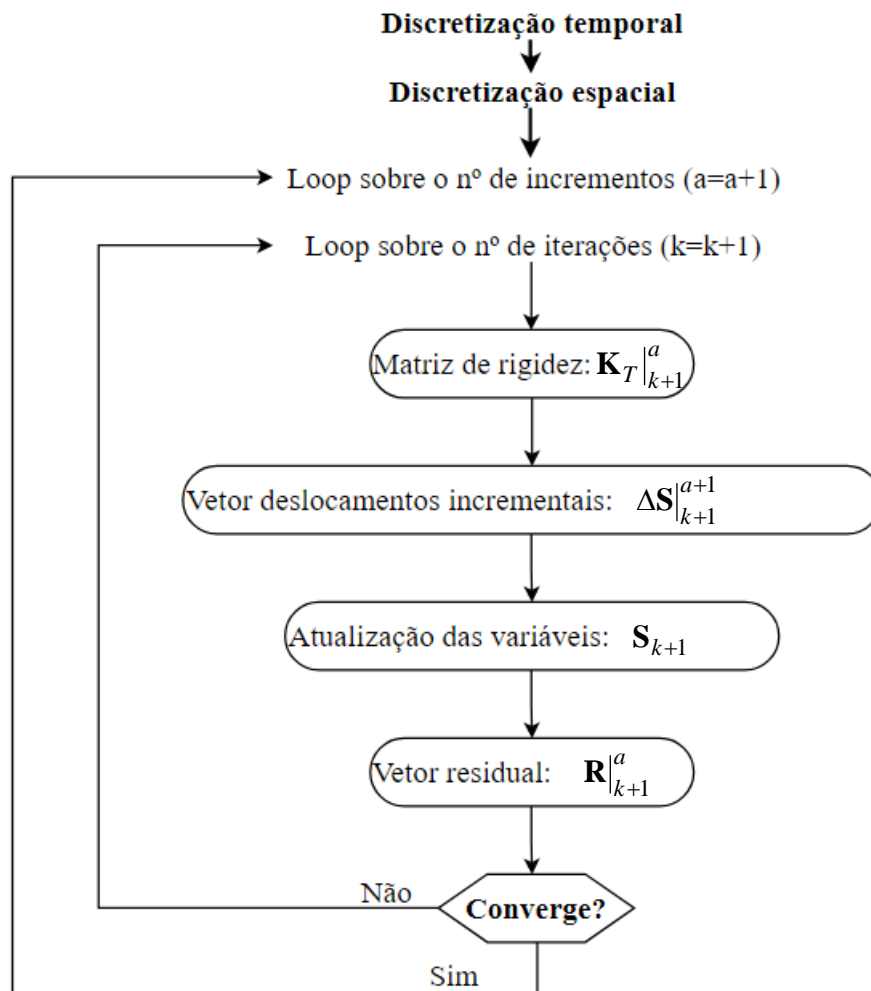


Figura 3.4 - Algoritmo da formulação do Método de Newton-Raphson

4

SIMULAÇÕES NUMÉRICAS E MODELOS REAIS

Esse capítulo será dividido em problemas estudados utilizando o modelo mecanobiológico desenvolvido. Na primeira seção serão expostos os casos de estudo, a construção dos modelos e a utilização do método dos elementos finitos para a implementação. A segunda seção aborda os estudos dos casos propostos. Na última seção estão presentes os parâmetros utilizados para cada modelo.

4.1 Implementação do modelo

Para o presente trabalho, foram considerados três casos de estudo tal qual como se segue:

Caso 1 - Modelo elástico

Caso 2 - Modelo poroelástico

Caso 3 - Modelo de dispositivo de microfluídica

4.1.1 Geometria

Para a implementação dos três modelos, foram desenvolvidas duas geometrias. Nos casos **1** e **2**, considerou-se uma ECM com uma geometria quadrada, de dimensões $1 \times 10^{-3} \times 1 \times 10^{-3}$ m, como ilustrado na Fig. (4.1a). No caso **3** a geometria foi extraída de um dispositivo de microfluídica utilizada no trabalho de Polachek et al. (2014). As dimensões foram: largura de $2,3 \times 10^{-3}$ m, altura de 17×10^{-3} m e profundidade de 200×10^{-6} m (Fig. 4.1b).

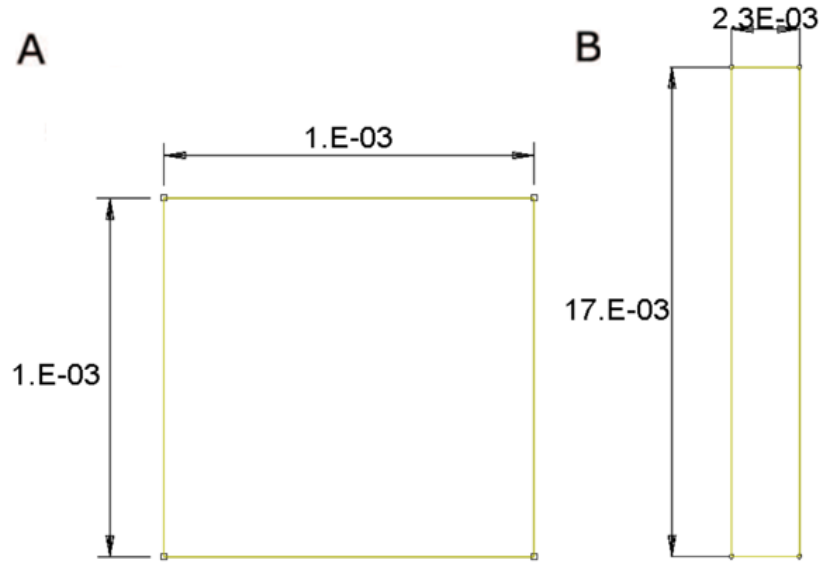


Figura 4.1 - Dimensão dos domínios das simulações. (a) Modelo elástico e poroelástico. (b) Modelo de dispositivo de microfluídica.

4.1.2 Condições de contorno e iniciais

Para os casos **1**, **2** e **3**, foi considerado sem perda de generalização, fluxos de células e de fluido nulos no contorno, $\partial\Omega$, do domínio e um deslocamento prescrito da ECM igual a zero nas fronteiras $\partial\Omega_1$ e $\partial\Omega_2$, onde $\partial\Omega = \partial\Omega_1 \cup \partial\Omega_2 \cup \partial\Omega_3 \cup \partial\Omega_4$, expresso como $\mathbf{u} = \mathbf{0}$ em $\partial\Omega_1$ e $\partial\Omega_2$ (Fig. 4.2)

Para a obtenção da formulação fraca, em ambos os casos, foi considerado, além da condição inicial da concentração celular constante, um estado de deslocamento inicial nulo.

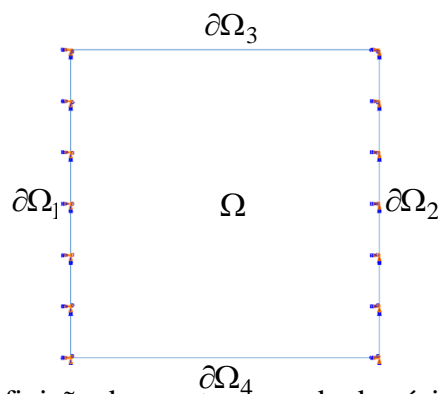


Figura 4.2 - Definição dos contornos e do domínio dos modelos.

Um gradiente de pressão também foi definido constante no contorno, com as pressões diferentes nas fronteiras $\partial\Omega_1$ e $\partial\Omega_2$, de modo que $p|_{\partial\Omega_1}(\mathbf{x},t) = p_0|_{\partial\Omega_1}(\mathbf{x}) > p|_{\partial\Omega_2}(\mathbf{x},t) = p_1|_{\partial\Omega_2}(\mathbf{x})$.

4.1.3 Aplicação do método dos elementos finitos

Na malha de elementos finitos, foram utilizados elementos quadrilaterais de oito nós e com quatro pontos de integração. O tamanho do elemento selecionado para a geometria quadrada dos casos **1** e **2** foi de 4×10^{-6} m, totalizando 62500 elementos. Foram considerados 18 passos com um incremento de tempo $\Delta t = 1800$ s. Esse passo de tempo foi retirado da literatura para uma simulação de migração celular influenciada apenas pela mecanotaxia. Para o modelo do chip de microfluídica, caso **3**, foi considerado um elemento de tamanho 5×10^{-5} m, totalizando 15640 elementos, e um incremento de tempo de $\Delta t = 9$ s para 100 incrementos. Para a implementação do modelo elástico foi escolhido um elemento do tipo CPS8 (estado plano de tensão / 8 nós / biquadrática) e para a implementação dos modelos de microfluídica e poroelástico o tipo do elemento foi CPS8T (acoplamento deslocamento-temperatura / estado plano de tensão / 8 nós / biquadrática). As simulações foram realizadas no software comercial de elementos finitos ABAQUS 6.14-2 (Simulia – Abaqus 6.14-2), sendo a implementação formulada em subrotinas *UEL* desenvolvidas pelo usuário. Essas subrotina representam toda a implementação do modelo, desde o desenvolvimento da formulação fraca e discretização aplicadas ao sistema que governa a migração celular e o cálculo das variáveis nos pontos de integração, até a montagem das matrizes de rigidez tangente local e global e do vetor residual local e global. Como o algoritmo de solução pelo método de Newton-Raphson não foi implementado, o software comercial foi utilizado para resolver as equações matriciais fornecidas pela implementação das subrotinas. Foi considerado em todos os casos um estado plano de tensões.

4.2 Modelos numéricos e reais

4.2.1 Modelo de migração em um substrato elástico

O primeiro problema estudado será um modelo de *mechanosensing* governado pela Eq. (3.1), representando uma ECM elástica e considerando apenas a interação mecânica da célula com o substrato. Para tal análise, foi aplicada uma força concentrada em uma região central do

domínio, gerando um gradiente de deformação nessa região (Fig. 4.3). A força aplicada teve uma magnitude de 5×10^{-9} N (ZAMORA, 2013).

Para o estudo do comportamento celular quando sujeito a um gradiente de deformação, a simulação foi realizada para substratos com diferentes módulos de elasticidade a fim de quantificar a influência da matriz na migração celular. Considerou-se, partindo do valor para E definido na Tab. 1, as seguintes elasticidades: $E \times 0,4$, $E \times 2,5$ e $E \times 5,0$. Para completar o estudo, foram feitas simulações considerando uma mudança na constante M , que governa o comportamento da tensotaxia dentro da equação de fluxo celular. Os valores utilizados para essa análise foram: $M \times 0,4$, $M \times 2,5$ e $M \times 5,0$.

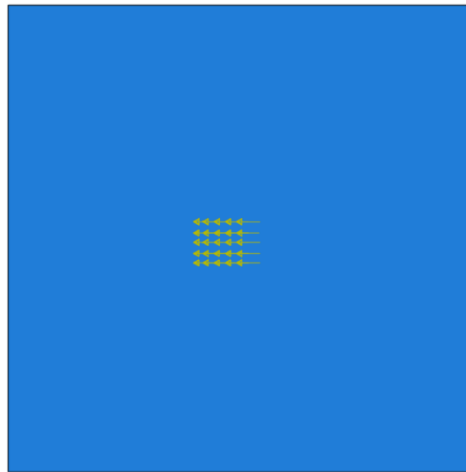


Figura 4.3 - Esboço da região de aplicação da força.

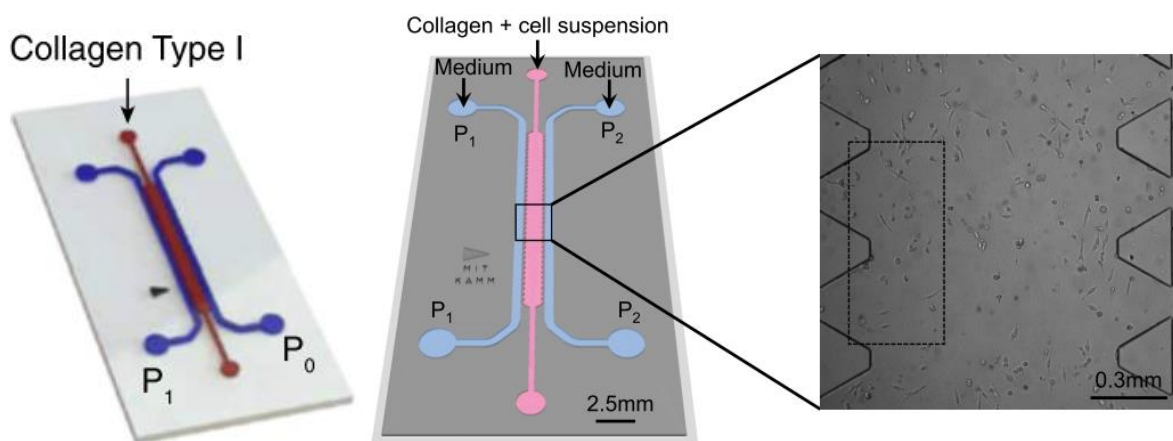
4.2.2 Modelo de migração em um substrato poroelástico

O segundo problema envolve a análise da evolução espaço-temporal da migração celular em um meio poroso permeado por um fluido intersticial. O modelo de *mechanosensing* corresponde à Eq. (3.2), que considera a influência do fluido intersticial na deformação celular e, conseqüentemente, na deformação do substrato. Uma diferença de pressão foi gerada nas extremidades do domínio, a fim de simular um fluxo com uma velocidade proporcional ao gradiente gerado. Com base nos trabalhos de Polacheck et al. (2011) e Zamora (2013), foi considerado inicialmente um gradiente $\Delta p = 40$ Pa.

Uma primeira simulação foi feita com as mesmas condições de controle do problema elástico, porém considerando o gradiente de pressão inicial definido acima. Além disso, a fim de mensurar a influência da pressão e da força de arrasto no movimento celular, foram feitas simulações com múltiplos do gradiente de pressão da forma: $\Delta p \times 1,5$ e $\Delta p \times 3$. Por fim, para complementar o estudo, considerou-se uma mudança nas propriedades físicas da ECM, que se refletiu em uma variação na permeabilidade da matriz porosa. Para uma permeabilidade igual a κ , foram avaliados valores com magnitude de $\kappa \times 10^{-7}$. Foram considerados valores muito pequenos para a permeabilidade pelo fato de que, para o tamanho do domínio e o passo de tempo utilizado, não é possível verificar o efeito da permeabilidade na distribuição da pressão.

4.2.3 Modelo de microfluídica

O terceiro problema estudado foi um experimento de migração celular em um dispositivo de microfluídica. Esse experimento foi descrito no trabalho de Polacheck et al. (2014), que avaliaram, sob a ótica da mecanotransdução, a resposta das células sob a influência do fluxo de fluido gerado por um gradiente de pressão de 60 Pa e por um gradiente químico no meio poroso. A análise desse experimento ocorreu em um intervalo de 8 horas, com imagens para cálculo dos parâmetros de velocidade e tempo de persistência sendo coletadas a cada 15 minutos. A ilustração do dispositivo de microfluídica utilizado no experimento é mostrada na Fig. 2.7.



Com o intuito de avaliar a capacidade do modelo de *mechanosensing* de representar o comportamento obtido experimentalmente, simulou-se computacionalmente o mesmo experimento sugerido por Polacheck et al. (2014). Para a simulação foi considerada uma simplificação do modelo: o coeficiente de difusão efetiva, definido pela Eq. (3.11), foi

considerado constante e igual a difusividade calculada conforme mostrado mais adiante na seção 4.3.2. Essa hipótese teve como objetivo exigir que a resposta do modelo mecanobiológico representasse as mesmas características previstas no artigo. O foco da simulação foi analisar computacionalmente o comportamento do modelo no mesmo intervalo de tempo utilizado para a coleta das imagens da migração celular, no caso de 15 minutos. Essa escolha foi feita porque, como a velocidade das células variou pouco, quantitativamente, já seria possível avaliar a resposta obtida no modelo. Além disso, foi considerado apenas a influência dos esforços mecânicos no processo de migração celular, e os resultados obtidos correspondem a pontos pertencentes à uma linha de simetria do substrato.

4.3 Parâmetros dos modelos

4.3.1 Modelos elásticos e poroelásticos

Os estudos de migração celular para os casos **1** e **2** foram realizados considerando o mesmo tipo de célula e a mesma matriz extracelular. Todos os parâmetros dos modelos foram obtidos da literatura para o fibroblasto, célula bastante utilizada em trabalhos experimentais de migração celular, e são apresentados na Tab. 1.

Tabela 1 - Parâmetros para os modelos elástico e poroelástico

Parâmetro	Valor	Referência
Coeficiente de difusão (D)	$1,7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$	Shreiber et al., 2003
Quantificador tensotaxia (M)	$1,8 \times 10^{-7} \text{ cell(Pas.s)}^{-1}$	Calvo, 2008
Módulo de Young (E)	10 kPa	Calvo, 2008
Coeficiente de Poisson (ν)	0,3	Calvo, 2008
Tensão máxima (p_{max})	$1,0 \times 10^{-7} (\text{N/cell})^\diamond$	Shreiber et al., 2003
Deformação mínima (θ_2)	-0,25	Calvo, 2008

Deformação máxima (θ_1)	0,5	Calvo, 2008
Rigidez da actina (K_{act})	$1,0 \times 10^{-4} \text{ Pa (m}^2/\text{cell)}^\diamond$	Valero et al., 2014
Rigidez passiva (K_{pas})	$2,0 \times 10^{-5} \text{ Pa (m}^2/\text{cell)}^\diamond$	Valero et al., 2014
Constante de saturação (λ)	$1,5 \times 10^{-7} \text{ (m}^2/\text{cell)}$	Manoussaki, 2003
Permeabilidade (κ)	$1 \times 10^{-13} \text{ m}^2$	Polacheck et al., 2011
Porosidade (ϕ)	0,9	Zamora, 2013
Viscosidade do fluido (η)	$1 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$	Zamora, 2013
Compressibilidade (β)	$5,1 \times 10^{-10} \text{ (Pa)}^{-1}$	Fine e Millero, 1973
Diâmetro da célula (d_{cell})	$1 \times 10^{-5} \text{ m}$	Zamora, 2013
Gradiente de pressão (Δp)	40 Pa	Zamora, 2013
Coefficiente de arrasto (c_a)	$6,9 \times 10^{-5} \text{ N.s/m}^\circ$	Polacheck et al., 2011

$^\diamond$ - Unidades consideradas para as simulações dos modelos elástico e poroelástico.

$^\circ$ - Parâmetros derivados dos trabalhos referenciados.

Uma concentração celular uniforme de 10^7 cell/m^2 , baseada no trabalho de Moreo et al. (2008), foi considerada para ambos os casos.

4.3.2 Modelo de dispositivo de microfluídica

Este modelo foi baseado em um trabalho experimental de microfluídica, no qual se avalia o comportamento de uma concentração de células sob a influência de um fluxo de fluido intersticial. O tipo de célula utilizada no modelo é MDA-MB-231, célula cancerosa com propriedades aderentes e que é encontrada nas glândulas mamárias. O substrato foi constituído por um hidrogel de colágeno tipo I com concentração de 2mg/ml.

Concentração celular: A concentração celular utilizada no experimento e portanto na simulação foi de 6×10^{11} cell/m³. Como a situação analisada foi de uma camada de hidrogel, a concentração foi estimada em $1,2 \times 10^8$ cell/m², isto foi feito multiplicando a concentração volumétrica pela profundidade.

Fluxo celular: O coeficiente de difusão D foi estimado de acordo com uma expressão que relaciona a velocidade de arrasto da célula ao quadrado com o tempo de persistência (duração do movimento em linha reta da célula durante a migração). No trabalho de microfluídica, Polacheck et al. (2014) obtiveram uma velocidade para a célula de $4,8 \times 10^{-9}$ m/s e um tempo de persistência de 255 segundos. Considerando que a relação é dada por $D = v_{\text{cell}}^2 p_{\text{time}} / 2$, onde v_{cell} é a velocidade da célula e p_{time} é o tempo de persistência, temos que o valor da difusão é de $2,94 \times 10^{-15}$ m²/s. O parâmetro M foi ajustado para que fosse aproximada a velocidade de migração das células nos experimentos na mesma ordem de grandeza da encontrada no trabalho de Polacheck et al. (2014), obtendo um valor de $2,51 \times 10^{-5}$ cell(Pa.s)⁻¹.

Propriedades do substrato: O módulo de Young da ECM de colágeno foi considerado como tendo valor de 328 Pa (POLACHECK et al. 2013). Para o coeficiente de Poisson ν , foi escolhido o valor de 0,3 (CALVO, 2008; ZAMORA, 2013).

A permeabilidade κ foi assumida como 1×10^{-13} m² Polacheck et al. (2014). A porosidade da matriz, ϕ , como 0,567, valor estimado para que se obtivesse a velocidade do fluido documentada no trabalho de Polacheck et al. (2014). O fluido considerado no problema é a água, que apresenta viscosidade η de 1×10^{-3} Pa.s (ZAMORA, 2013) e compressibilidade β com valor de $5,1 \times 10^{-10}$ (Pa)⁻¹ (FINE e MILLERO, 1973).

Propriedades e parâmetros associados às células: A tensão contrátil máxima p_{max} da célula considerada foi de 3×10^{-7} (N/cell) (POLACHECK et al. 2013). Os valores de deformação máximo e mínimo da actina, θ_1 e θ_2 , foram 0,5 e -0,25, respectivamente (CALVO, 2008). Baseado na rigidez reportada da célula do tipo MDA-MB-231 de 0,5 kPa (NIKKHAH et al., 2010; POLACHECK et al., 2013), e considerando que 1/5 da rigidez é devida ao citoesqueleto e o restante aos filamentos de actina (SCHÄFER e RADMACHER, 2005), a estimativa para os valores da rigidez da actina K_{act} e da passiva K_{pas} foram 5×10^{-2} Pa(m²/cell) e 1×10^{-2}

Pa(m²/cell), respectivamente. Para o cálculo do parâmetro λ , primeiramente foi estimada qual a capacidade máxima de densidade celular suportada pelo substrato. A área média projetada pela célula MDA-MB-231 em um substrato planar é na ordem de 400 μm^2 (SYED et al., 2017), com isso, a capacidade máxima do meio foi estimada em $2,5 \times 10^9$ cell/m². Considerando que a força efetiva que fibroblastos transmitem ao substrato, para grandes concentrações, é de 40% (MANOUSSAKI, 2003; CALVO, 2008) utilizou-se a mesma porcentagem para o cálculo do parâmetro de saturação, com o qual se tem que λ é de 6×10^{-10} (m²/cell).

O coeficiente de arrasto c_a foi ajustado para que se obtivesse a força de arrasto gerada pelo fluido nas células de acordo com o experimento de Polacheck et al. (2014), obtendo um valor de $5,465 \times 10^{-5}$ N.s/m.

5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esse capítulo está dividido em três seções: modelo de migração em um substrato elástico, modelo de migração em um substrato poroelástico e modelo de migração em um dispositivo de microfluídica. A discussão dos resultados é apresentada ao final de cada seção.

5.1 Modelo elástico

Como foi exposto no capítulo anterior, uma força constante foi aplicada em uma região específica do domínio, gerando uma distribuição de deformações no substrato, sendo que essa deformação é a sinalização externa que desencadeia a resposta biológica de migração celular. Analisando primeiramente o comportamento da migração, a Fig. 5.1 fornece a distribuição das células, ao final do último passo de tempo, para o caso controle onde se considerou o módulo de Young E com valor de 10 kPa, enquanto a Fig. 5.2 apresenta valores da concentração nos nós que compõem uma reta horizontal que secciona o domínio simetricamente, que é representada pelo eixo x .

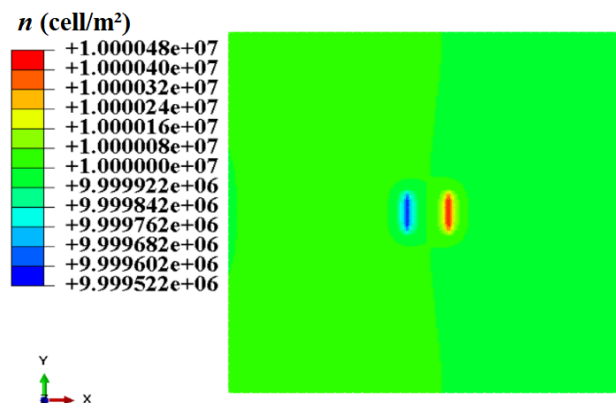


Figura 5.1 - Distribuição da concentração celular no domínio gerada por uma força constante para um tempo de 9 horas.

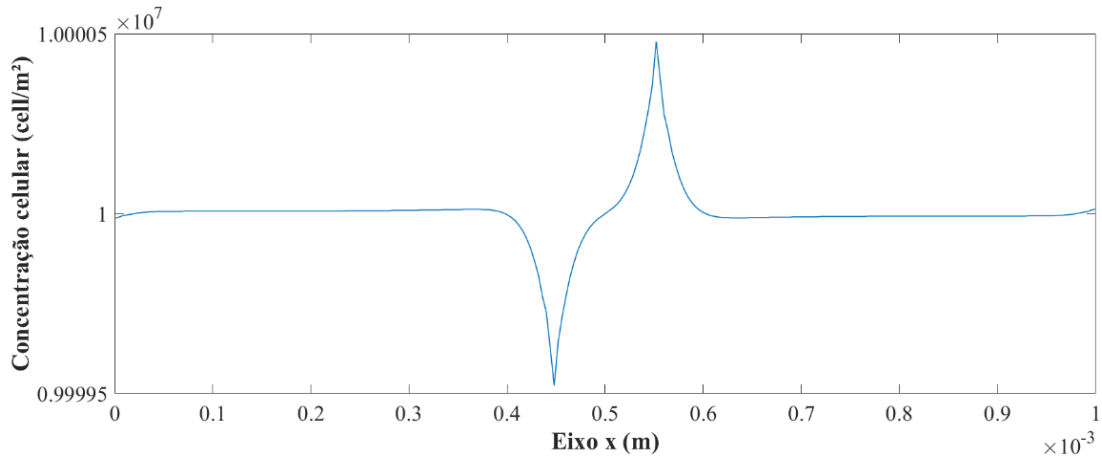


Figura 5.2 - Valores nodais da concentração celular n sob uma força constante (9 horas).

Nas Figs. 5.1 e 5.2, percebe-se que ocorreu uma variação na concentração das células na região, onde a força foi aplicada (Fig. 4.3). O máximo valor encontrando para a variável de concentração se encontra no centro da área de coloração vermelha, enquanto o mínimo foi observado na área de cor azul. Essa distribuição ocorre porque, como ilustrado na Fig. 5.3, o maior valor da variável p_{cell} , que governa a resposta celular por tensotaxia, é encontrado na extremidade direita da região de aplicação da força, direcionando a migração celular para essa área.

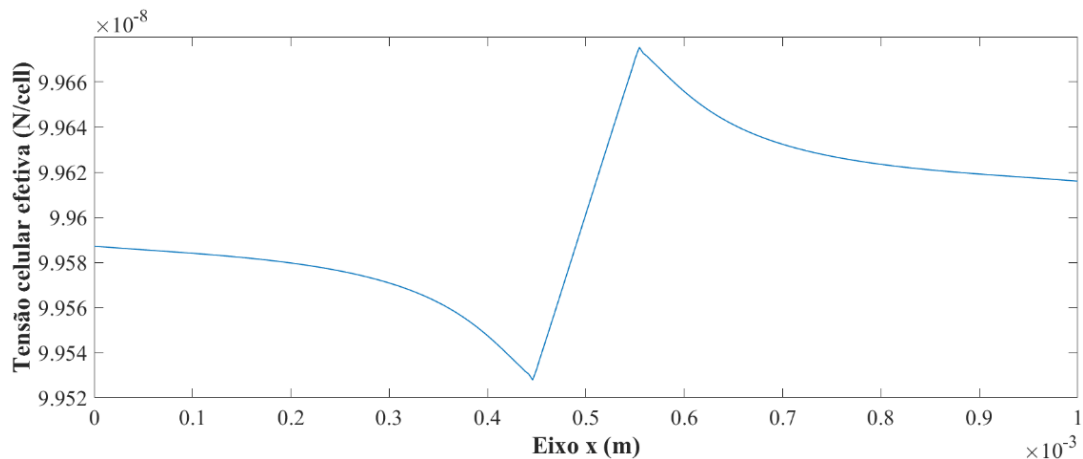


Figura 5.3 - Valores nodais da tensão celular efetiva p_{cell} para a aplicação de uma força (9 horas).

O ponto de menor tensão celular efetiva, que apresenta valor de aproximadamente $9,953 \times 10^{-8}$ (N/cell), coincide com o de menor concentração celular, $9,999522 \times 10^6$ (cell/m²). Essa relação coincidente também é verificada quando se analisa o ponto de maior tensão e concentração celular. Para um p_{cell} próximo a $9,967 \times 10^{-8}$ (N/cell) obteve-se a máxima

concentração celular, com o valor de $1,0000478 \times 10^7$ (cell/m²). A evolução temporal dos valores nodais de concentração nos pontos de máximo e mínimo, representados pela Fig. 5.2, está mostrada na Fig. 5.4.

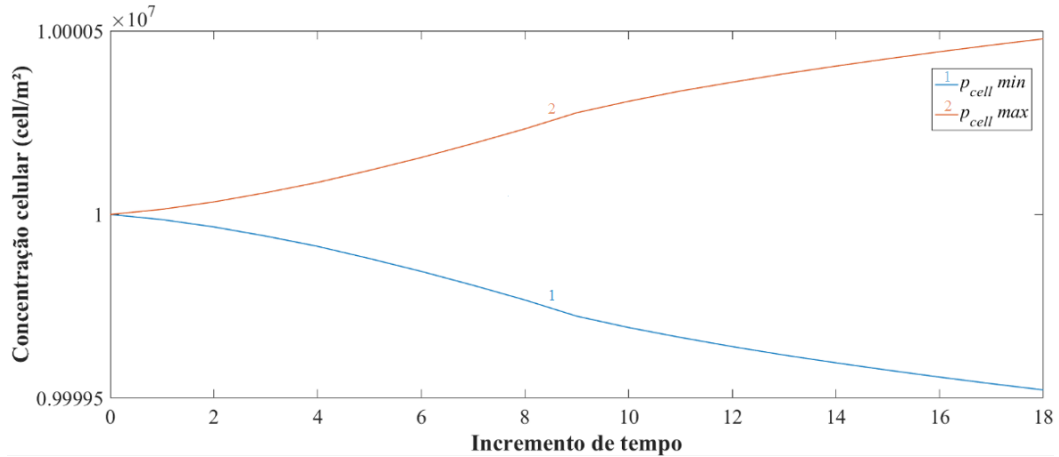


Figura 5.4 - Evolução temporal da concentração nos pontos de máximo e mínimo p_{cell} (9 horas).

É possível ver nas Figs. 5.2 e 5.3 que as regiões em que a concentração celular se manteve constante são as mesmas em que a tensão celular efetiva apresenta uma variação muito pequena, ou seja, é representada por um gradiente de p_{cell} suficientemente pequeno para não contribuir com a migração celular.

As Figs. 5.5 e 5.6 apresentam os resultados para o comportamento das variáveis p_{cell} e n quando considerados substratos com diferentes módulos de elasticidade.

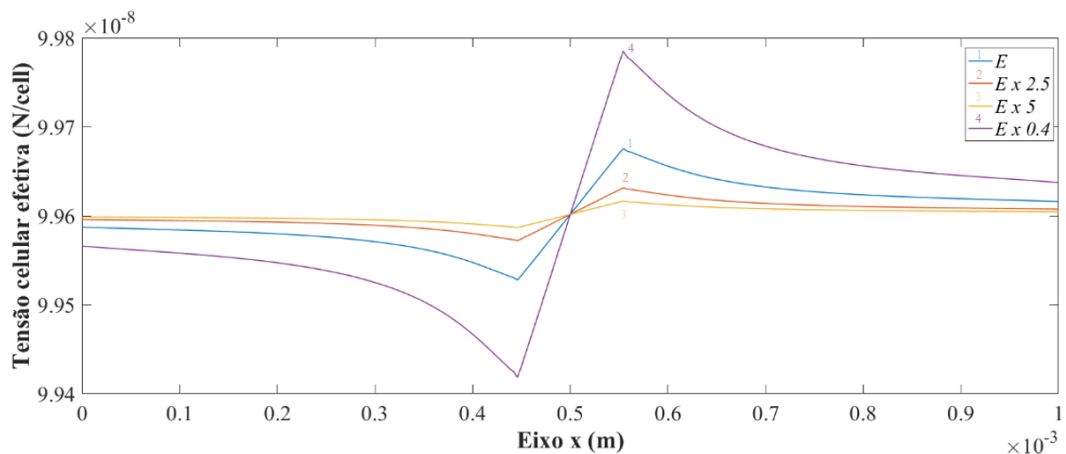


Figura 5.5 - Comportamento da tensão celular para diferentes módulos de Young (9 horas).

Os maiores valores para a tensão celular e a maior variação desses valores nos nós foram obtidos para os menores módulos de Young (Fig. 5.5), o que significa que, quanto menor a rigidez E , maior o gradiente de p_{cell} .

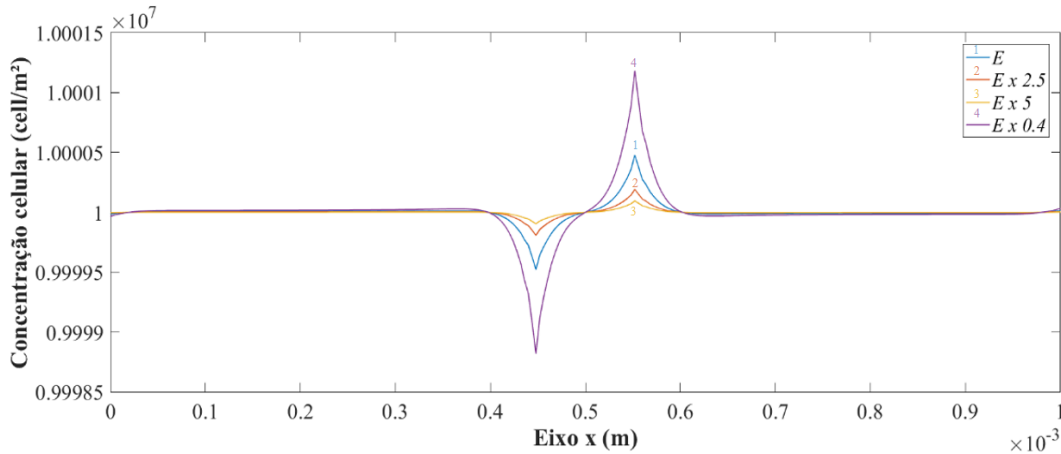


Figura 5.6 - Distribuição da concentração celular para diferentes módulos de Young (9 horas).

De acordo com a Fig. 5.6, a distribuição da concentração celular nos nós variou para cada valor do módulo de elasticidade. A relação observada foi de que as maiores variações de concentrações aconteceram para os menores valores de E . É importante notar também que nas Figs. 5.5 e 5.6, o ponto de máximo e mínimo para a tensão celular e a concentração não foi afetado pelo valor do módulo E do substrato.

Finalizando o estudo do modelo elástico, a Fig. 5.7 ilustra os resultados das simulações considerando diferentes valores para o parâmetro M .

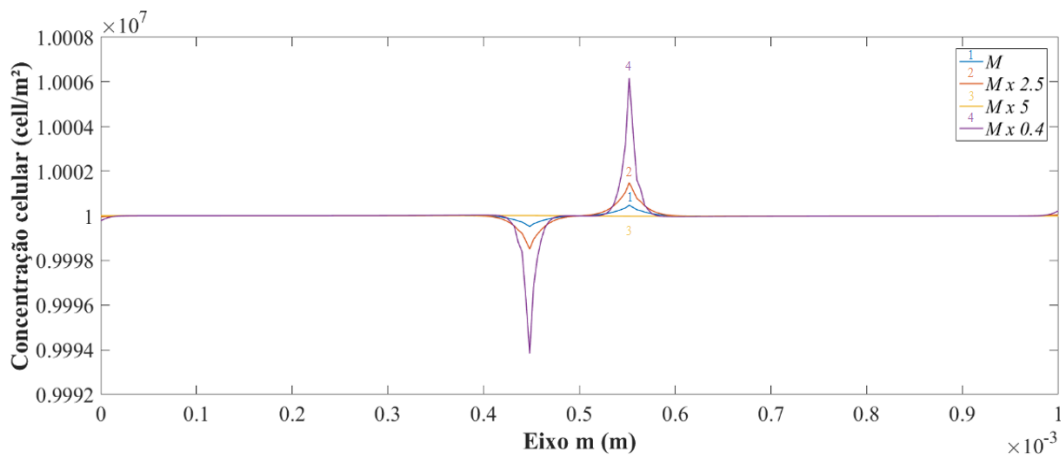


Figura 5.7 - Distribuição da concentração celular para diferentes valores de M (9 horas).

De acordo com as curvas apresentadas, um aumento no valor do parâmetro que quantifica a tensotaxia aumenta também a contribuição desse fenômeno para o fluxo celular. A distribuição da concentração celular para os casos de $M \times 2,5$ e $M \times 5,0$ teve um aumento significativo nas regiões de maior influência da tensotaxia, enquanto que a máxima e mínima concentração calculada para $M \times 0,4$, $1,000042 \times 10^7$ (cell/m²) e $9,99958 \times 10^6$ (cell/m²) respectivamente, foram, quando comparadas com a curva definida por M , menores para a máxima, $1,0000478 \times 10^7$ (cell/m²), e maiores para a mínima, $9,999522 \times 10^6$ (cell/m²).

Essa seção do trabalho descreve o modelo de migração celular de células aderentes por *mechanosensing* considerando apenas o fenômeno de tensotaxia, que é capaz de explicar importantes observações experimentais sobre a interação entre as células e substratos deformados. No primeiro resultado foi considerado um gradiente de deformação induzido pela aplicação de uma força externa, como está representando pela Fig. 5.1. Os resultados mostraram que quanto maior a deformação, maior é o valor em módulo de p_{cell} . Os resultados nas Figs. 5.2, 5.3 e 5.4, mostram que as células preferem migrar de regiões menos deformadas para as mais deformadas do substrato, resultado verificado nos trabalhos de Belousov et al. (2000), Mandeville et al. (1997), Moreo et al. (2008) e Zamora (2013).

As duas últimas simulações avaliaram a influência das propriedades da ECM e da tensotaxia na evolução da migração celular. A Fig. 5.5 apresenta o comportamento mecânico clássico de um sólido elástico: quanto maior o módulo de elasticidade, para um solicitação constante, menor será a deformação sofrida pela estrutura. As curvas mostram que os maiores valores da tensão celular efetiva, que representam as maiores deformações, ocorrem para os menores valores de E . O efeito dessas deformações é mostrado na Fig. 5.6 que apresenta a distribuição da concentração celular. A curva de coloração laranja, que apresentou as maiores concentrações, é equivalente a curva de maior deformação do substrato, ou menor módulo de elasticidade, enquanto a curva de coloração roxa, que apresentou as menores concentrações, é equivalente a curva de menor deformação, ou maior módulo de elasticidade. Essa característica do modelo era esperada considerando os trabalhos de Lo et al. (2000) e Schwarz and Bischofs (2005), que postularam que células do tipo aderentes migram para as regiões mais deformadas. A Fig. 5.7 apresenta quatro curvas de concentração celular para quatro valores do parâmetro M . A representação matemática dessas curvas se baseia na contribuição que o termo de tensotaxia tem para a evolução do fluxo celular definido pela Eq. (3.9). A curva governada por um M

menor apresentou um comportamento diferente. Nela, pelo fato de termo de tensotaxia ser pequeno, o termo convectivo governou o comportamento do fluxo celular, fazendo com que as células migrassem na direção da força e não para as regiões mais deformadas. De forma conclusiva, o que a Fig. 5.7 expõe é que quanto maior for o valor de M maior será a mobilidade celular influenciada pela tensotaxia e que a capacidade das células se moverem em um substrato depende efetivamente das interações entre a matriz extracelular e a célula, sendo isto considerado implicitamente na magnitude do valor de M .

5.2 Modelo poroelástico

Nesta seção analisaremos a migração celular utilizando o modelo de meio poroso na geometria representada pelo caso **2**, o que significa incluir que a sinalização de entrada necessária para desencadear uma resposta biológica é devida ao deslocamento da matriz extracelular causado pela pressão e pela deformação que o fluido intersticial gera nas células. Para esse modelo, foi introduzido um gradiente de pressão, representado no último passo de tempo na Fig. 5.8.

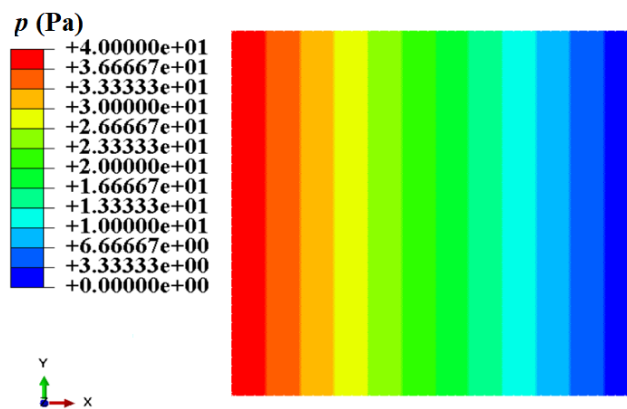


Figura 5.8 - Gradiente de pressão introduzido no domínio para um tempo de 9 horas.

A primeira análise será em condições semelhantes às do modelo elástico desenvolvido na seção anterior, porém agora com a inclusão do gradiente de pressão e o escoamento do fluido intersticial. As Figs. 5.9, 5.10 e 5.11 mostram, respectivamente, a distribuição de concentrações em todo o domínio, os valores nodais de concentração e da variável p_{cell} nos nós que compõem uma reta horizontal que secciona o domínio simetricamente, que é representada pelo eixo x .

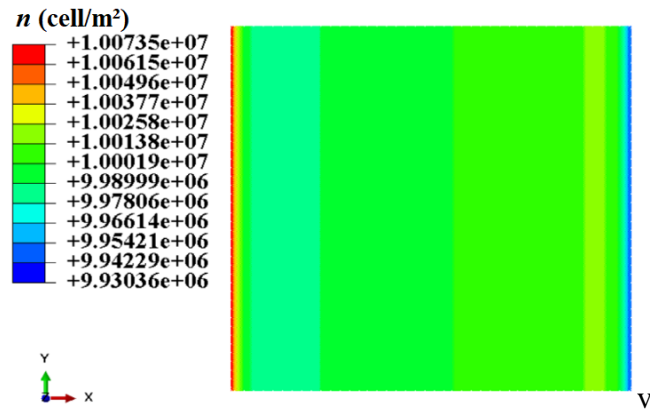


Figura 5.9 - Distribuição da concentração celular no domínio gerada por um gradiente de pressão para um tempo de 9 horas.

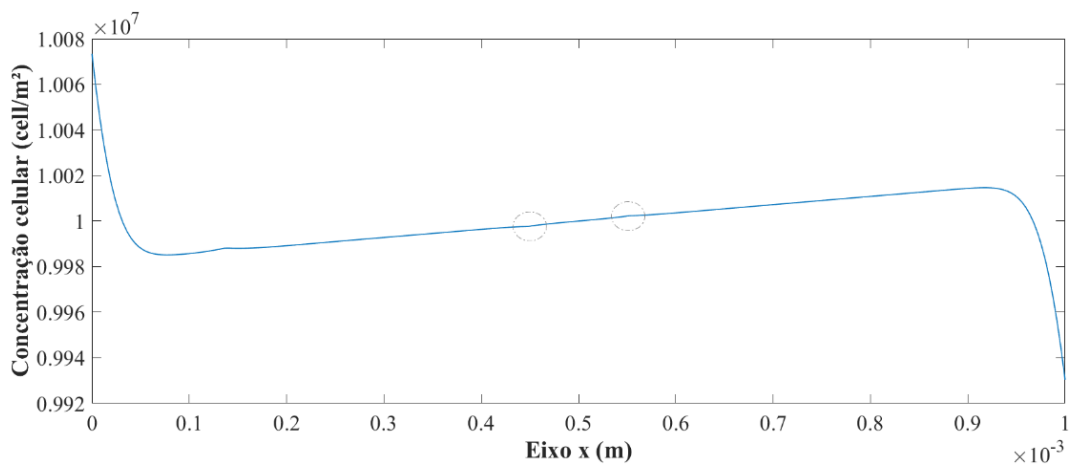


Figura 5.10 - Valores nodais de concentração celular gerados por um gradiente de pressão (9 horas).

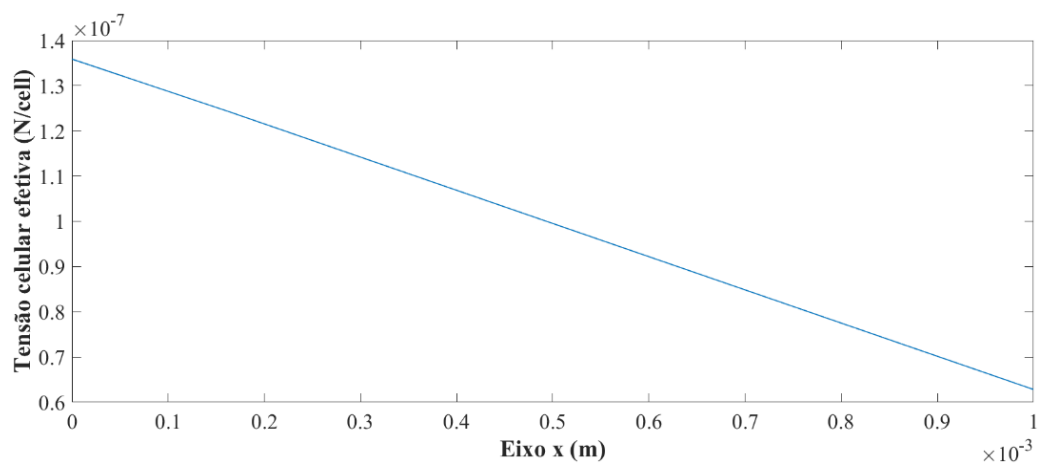


Figura 5.11 - Valores nodais da tensão celular efetiva gerados por um gradiente de pressão (9 horas).

Como pode ser visto nas Figs. 5.10 e 5.11, igual ao modelo elástico, os pontos de máximos e mínimos valores para as variáveis n e p_{cell} coincidiram. Para um valor máximo de p_{cell} igual a $1,359 \times 10^{-7}$ (N/cell) temos a concentração celular com valor de $1,0073 \times 10^7$ (cell/m²), enquanto que, para o p_{cell} mínimo, $6,282 \times 10^{-8}$ (N/cell), têm-se a menor concentração para esse problema, $9,9303 \times 10^6$ (cell/m²). Somado a isso, a Fig. 5.10 apresenta a curva representada na Fig. 5.2 e os pontos nos quais ela contribuiu para o fluxo celular. Quando comparamos os resultados para as concentrações encontradas para o modelo elástico e poroelástico, observamos uma diferença considerável: a concentração para o modelo elástico apresentou um valor máximo de $1,0000478 \times 10^7$ (cell/m²), enquanto para o modelo poroelástico o maior valor foi de $1,0073 \times 10^7$ (cell/m²). A Fig. 5.12 mostra como ocorreu a evolução temporal dessa distribuição para alguns passos de tempo.

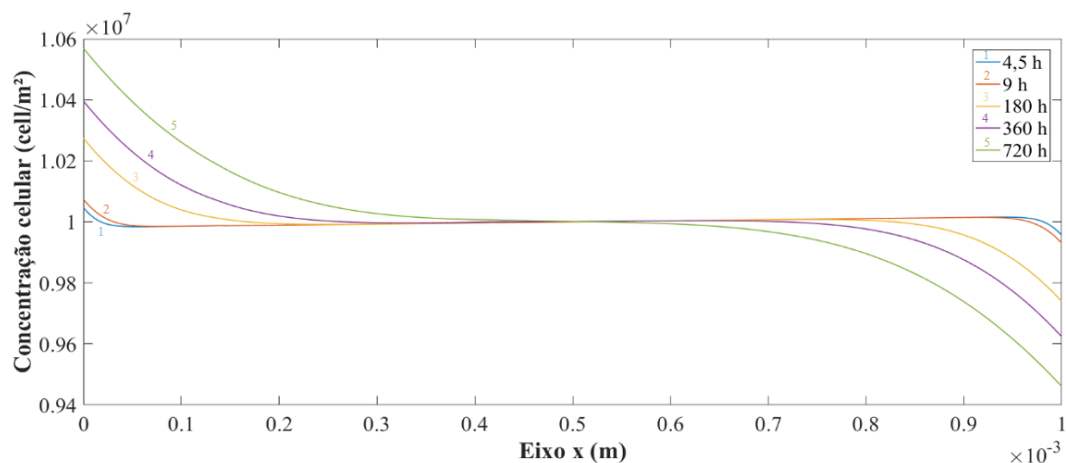


Figura 5.12 – Evolução temporal da concentração celular.

Com o aumento do tempo de simulação percebe-se a tendência da curva de concentração ter um comportamento parecido ao da curva da tensão celular efetiva gerada pela deformação da matriz extracelular.

Os próximos resultados desse trabalho são referentes à influência da mudança nas propriedades do fluxo e da matriz extracelular. A Fig. 5.13 mostra a evolução da concentração celular para três tipos de gradientes de pressão, enquanto que a Fig. 5.14 expõe a influência da pressão no comportamento da variável de tensão celular efetiva.

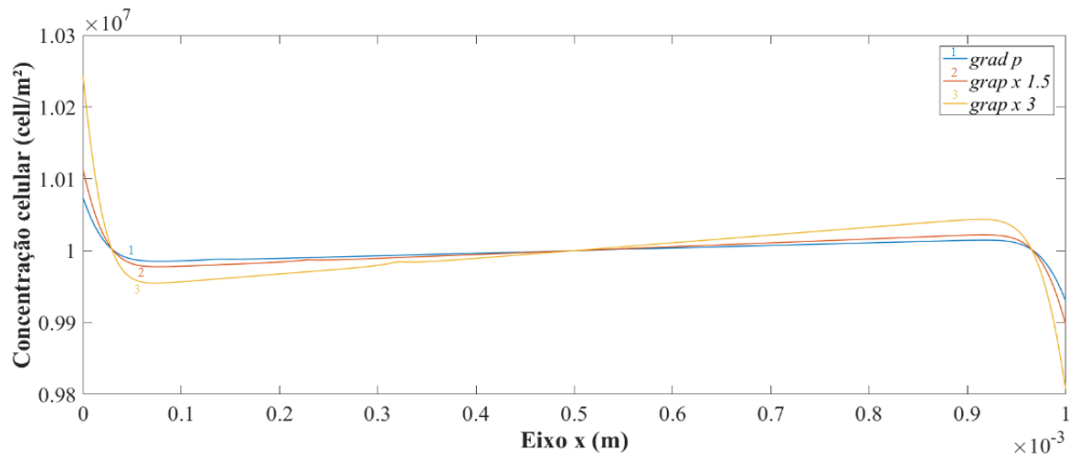


Figura 5.13 - Distribuição celular para diferentes gradiente de pressão (9 horas).

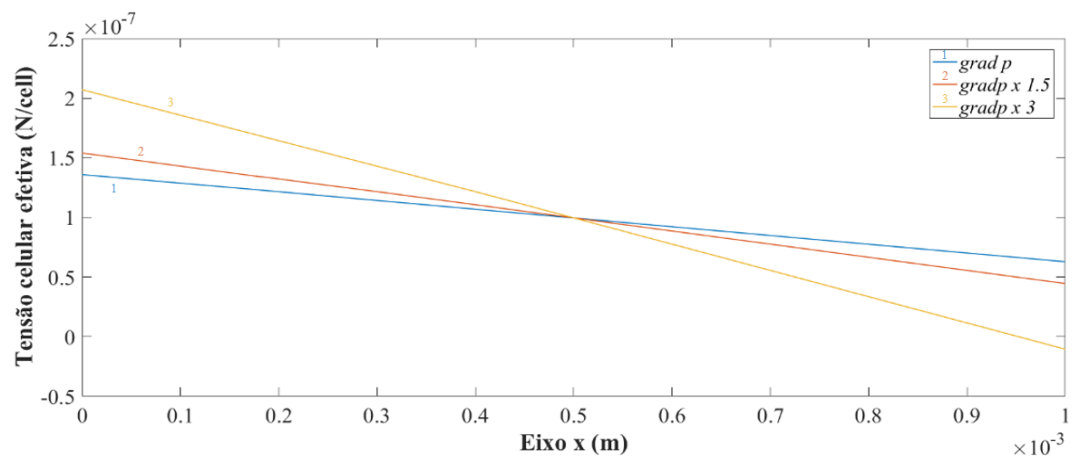


Figura 5.14 - Tensão celular efetiva para diferentes gradiente de pressão (9 horas).

De acordo com a Fig. 5.14 um aumento no gradiente de pressão gera um aumento no p_{cell} , o que consequentemente causa um aumento na variável n nas regiões mais influenciadas pela tensão celular.

Finalizando a seção, os últimos resultados são baseados na influência de uma propriedade da matriz extracelular, nesse caso a permeabilidade, na migração das células. As Figs. 5.15, 5.16 e 5.17 mostram, respectivamente, as curvas de pressão, tensão efetiva e concentração celular.

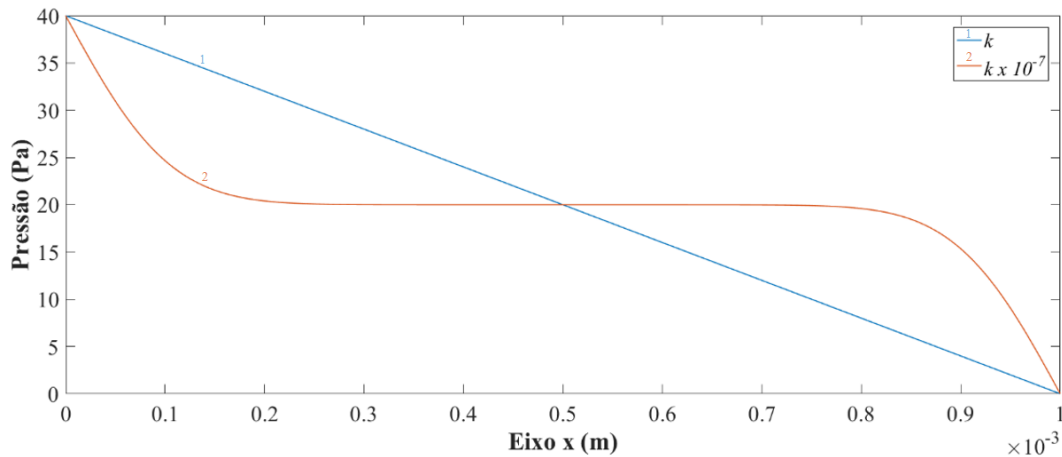


Figura 5.15 - Curvas de pressão para diferentes valores de permeabilidade (9 horas).

A dependência da distribuição da pressão no domínio se mostrou ativa para a magnitude do coeficiente de permeabilidade: quanto menor esse parâmetro, menos a pressão evolui espacialmente no domínio. Esse fenômeno refletiu diretamente nas deformações geradas no substrato, como pode ser visto pela resposta de p_{cell} , e, conseqüentemente, na distribuição da concentração celular.

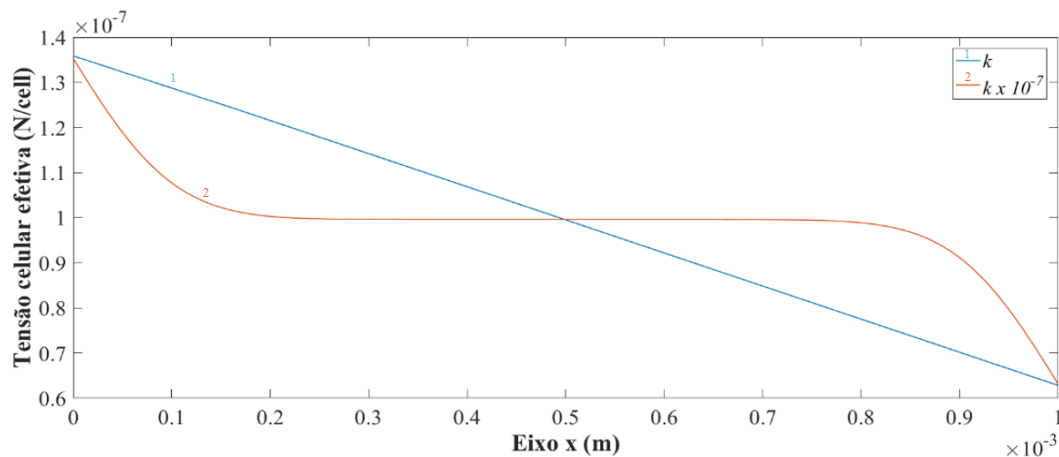


Figura 5.16 - Curvas de p_{cell} para diferentes valores de permeabilidade (9 horas).

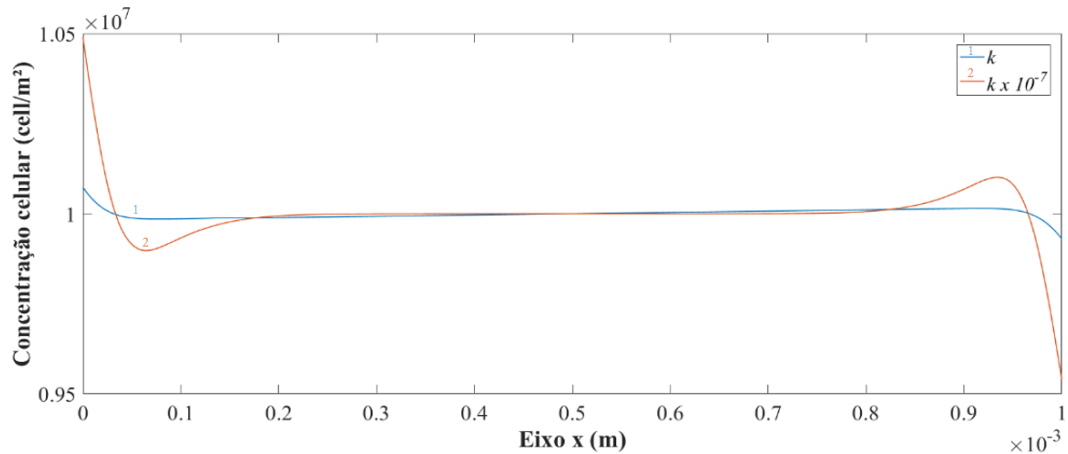


Figura 5.17 - Curvas de n para diferentes valores de permeabilidade (9 horas).

O primeiro caso de estudo foi baseado nos resultados obtidos para o modelo comparativo entre um substrato elástico e poroelástico. Considerando as mesmas condições de carregamento para o modelo elástico, que geraram uma curva de tensão celular efetiva representada pela Fig. 5.3, a introdução de uma pressão, de acordo com Eq. (3.15), contribui para o aumento dos deslocamentos da matriz, e conseqüentemente, das deformações, refletindo no aumento dos valores de p_{cell} representados na Fig. 5.11. Além da influência da pressão nos deslocamentos do substrato, foi introduzido, através do modelo mecanobiológico que define p_{cell} , um termo de deformação celular que depende da interação do fluido com a célula e é transmitido para o substrato através da relação definida pela Eq. (3.2). Devido à magnitude da deformação do substrato, a contribuição desse termo de deformação foi pequena, mas modificou o valor da tensão celular. O que se observou nos resultados é que, devido à magnitude da força aplicada e do gradiente da pressão introduzido no modelo, o perfil da curva de concentração celular, representado pela Fig. 5.10 foi governado pela pressão do fluido, tendo apenas uma pequena variação na concentração, nos pontos destacados na figura, no qual a força aplicada contribuiu para o fluxo celular. A causa desse fenômeno foi a diferença nos valores das deformações que cada carregamento impôs no substrato, o que fica evidente analisando-se os gráficos de tensão celular efetiva para cada caso (Fig 5.5 e 5.11).

Analisando agora a distribuição celular no modelo poroelástico dada pela Fig. 5.10, observa-se um fenômeno que foi detectado nos resultados do modelo elástico. Pelo fato de o gradiente de pressão gerar grandes deslocamentos, o termo de transporte convectivo, definido na Eq. (3.9), contribui significativamente no fluxo celular ao ponto da curva, longe das extremidades, representando um transporte de células na direção do fluxo. O fenômeno visto nas extremidades

do domínio é explicado analisando a equação de fluxo celular: na extremidade esquerda, onde o valor de p_{cell} é maior e o termo convectivo é menor, as células migram, sendo guiadas pela tensotaxia. Já na direção da maior tensão celular, na extremidade direita, onde está presente o menor valor de p_{cell} , as células migram para fora dessa região até um ponto espacial onde o termo convectivo se equilibra com o da tensotaxia e se forma um máximo de concentração local na curva. Esse resultado é observado para o tempo de simulação utilizado nesse trabalho, entretanto, se considerarmos um tempo suficientemente grande, a curva de concentração se comporta como se dependesse apenas do termo de tensotaxia, como está mostrado na Fig. 5.12.

A próxima discussão será pautada no comportamento das variáveis do modelo sob a influência de algumas mudanças nas solicitações e propriedades da matriz. O primeiro resultado obtido foi a resposta celular para uma variação no gradiente de pressão. Analisando conjuntamente as Figs. 5.13 e 5.14, é confirmado o que foi discutido no parágrafo anterior: um aumento no gradiente de pressão gera maiores deformações, que conseqüentemente geram maiores valores para a tensão celular efetiva, o que por sua vez resulta numa maior migração celular para as regiões governadas pelo termo de tensotaxia, ficando a região central sujeita ao transporte convectivo.

Por fim, o último estudo foi feito com base na modificação do parâmetro de permeabilidade. A permeabilidade se define como sendo a capacidade de um material para transmitir fluidos, de modo que, para pequenos valores, um fluido encontre mais resistência e, para valores grandes, flua mais facilmente. A Fig. 5.15, mostrando graficamente como a pressão se distribuiu durante o intervalo da simulação, ilustra a influência da permeabilidade da distribuição da pressão através do domínio. As características da resposta celular apresentadas nas Figs. 5.16 e 5.17 são análogas ao que foi discutido para a influência da pressão nas variáveis de concentração e tensão celular. De modo geral, o modelo de migração celular no meio poroso desenvolvido, mesmo apresentando uma resposta celular diferente, representou os mesmos fenômenos corroborados pelo modelo elástico.

5.3 Modelo de dispositivo de microfluídica

Essa seção será dividida em três partes. A primeira será um resumo dos resultados obtidos da simulação do dispositivo de microfluídica, mostrando a velocidade do fluido e o gradiente de

pressão no gel. Na segunda parte serão mostrados os resultados numéricos do modelo de *mechanosensing*. Por fim, na terceira parte, os resultados serão focados na migração celular, descrevendo a velocidade estimadas das células e a direção de migração.

5.3.1 Simulação de microfluídica

Um modelo 2D de microfluídica, com a geometria da câmara central do dispositivo experimental, foi implementado de acordo com as condições descritas no capítulo 4. Um gradiente de pressão foi introduzido no dispositivo, com entrada de 60 Pa e saída de 0 Pa apresentando uma queda linear através do gel (Fig 5.18a). Como resultado desse gradiente, foi gerado um fluxo de fluido nos canais do meio poroso (gel de colágeno tipo I) com uma velocidade constante aproximadamente de $4,58 \times 10^{-6}$ (m/s) (Fig. 5.18b).

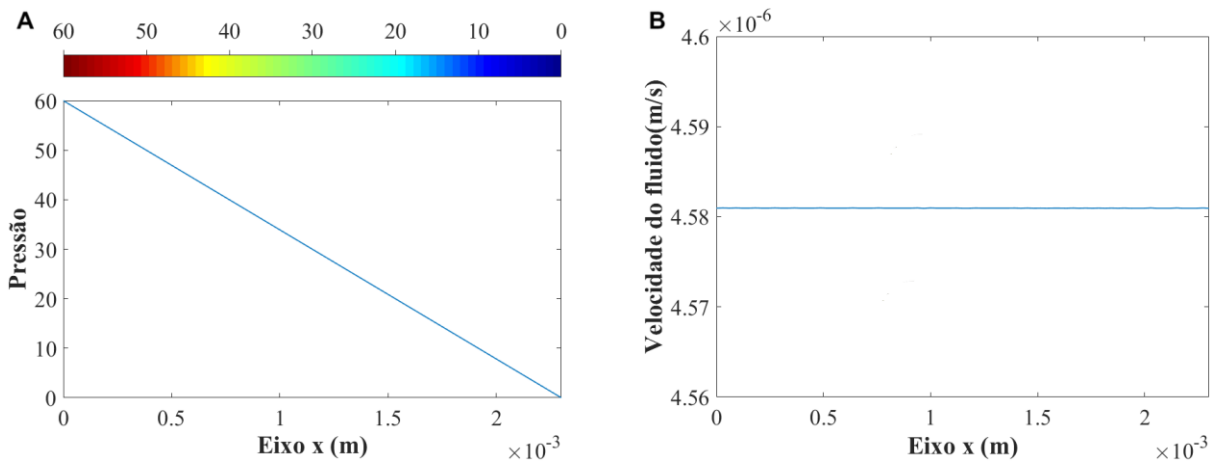


Figura 5.18 – Curvas geradas pela simulação de microfluídica para uma simulação de 15 minutos. (a) Gradiente de pressão gerado no domínio em Pa. (b) Curva da velocidade do fluido.

A curva de velocidade representada pela Fig. 5.18b é resultado da estabilização da curva de pressão através do meio poroso, definida pela Fig. 5.18a. Confirmando a velocidade de fluido constante no interior do dispositivo, a análise seguinte será baseada na deformação gerada pelo fluxo, que é diretamente dependente da velocidade do mesmo. Na Eq. (3.2) foi definida a deformação causada pelo fluxo como dependente da força de arrasto. Essa força é equacionada pelo produto da velocidade de Darcy, definida pela Eq. (3.13), e o coeficiente de arrasto, representado por c_a , parâmetro escolhido para que a força de arrasto coincidisse com o valor da força fornecida no trabalho experimental. O resultado obtido para a força de arrasto, com a

adequação dos parâmetros, foi de aproximadamente 250×10^{-12} N, comparado com os 252×10^{-12} N relatados no trabalho experimental. Dessa maneira, a estimativa da deformação causada pelo fluxo é de $1,9 \times 10^{-4}$, contraindo o substrato. Comparando esse resultado com a deformação volumétrica causada pelo gradiente de pressão, pela ação celular e pela força externa, representada pela Fig. 5.20a e na ordem de 10^{-6} , constata-se que a deformação gerada pela ação direta do fluido intersticial é maior que a deformação volumétrica, sendo ela então a responsável, em maior escala, por governar a resposta da tensão celular efetiva.

5.3.2 Resultados numéricos do modelo de *mechanosensing*

Para o cálculo da tensão celular efetiva e da distribuição celular foi necessário um teste de convergência da malha. Foram considerados elementos com tamanho de 3×10^{-5} m, 4×10^{-5} m e 5×10^{-5} m. A utilização de cada elemento resultou em malhas com 43659, 24225 e 15640 elementos respectivamente. A grandeza utilizada para análise foi o deslocamento em um mesmo ponto, em específico o ponto de deslocamento máximo, que coincidiu para as três malhas, pelo fato do modelo de *mechanosensing* ser regido especialmente pelo termo de tensotaxia, que depende da deformação, grandeza derivada dos deslocamentos (Fig. 5.19).

O resultado do teste de convergência apresentou o mesmo valor de deslocamento máximo para três tamanhos de malha. Esse resultado justifica a escolha do tamanho utilizado de 5×10^{-5} m, como foi definida na seção 4.1.3.

A influência do gradiente de pressão e do fluido intersticial no comportamento da migração celular, também foi analisada. As Figs. 5.19a e 5.19b mostram os resultados para a deformação do substrato e a respectiva resposta da variável p_{cell} .

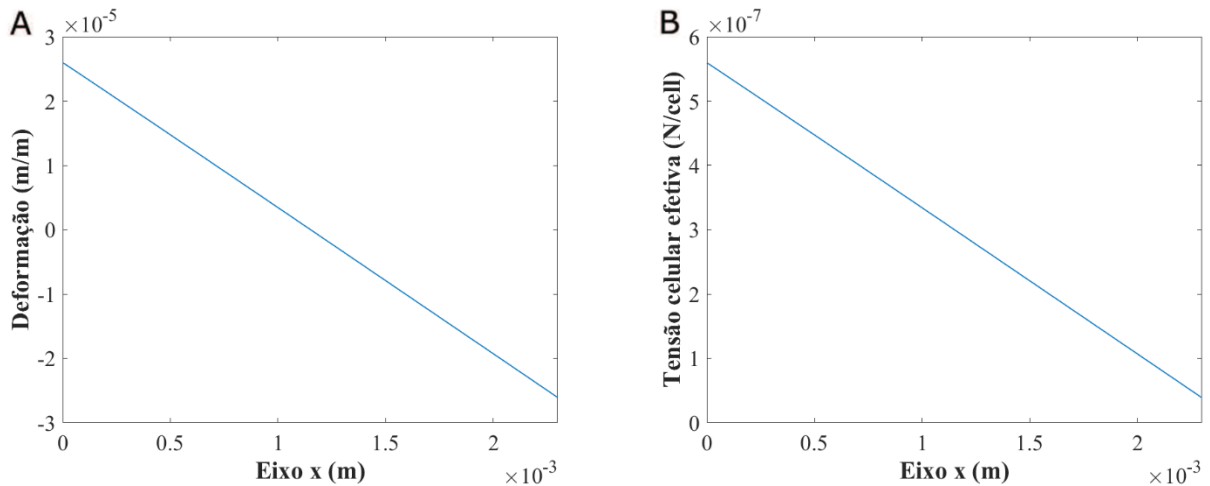


Figura 5.19 – Curvas da resposta do substrato e das células para 15 minutos de simulação. (a) Curva de deformação do substrato. (b) Curva da tensão celular efetiva.

As curvas de deformação e tensão celular efetiva mostraram um comportamento semelhante, tendo como diferença a magnitude de cada variável decorrente da relação definida pela Eq. (3.2). Os valores de deformação encontrados e a magnitude dos valores de máxima tração e máxima contração são características do deslocamento antissimétrico que o gradiente de pressão impõe no substrato do modelo poroelástico. Além da relação equacionada entre a deformação e a variável p_{cell} , foi calculado o gradiente da tensão celular efetiva, como mostrado na Fig. 5.19. O gradiente de tensão celular efetiva ∇p_{cell} é uma das grandezas que governam o fluxo celular, especificamente o termo de tensotaxia. Analisando a Fig. 5.20, tendo como base a direção do gradiente da tensão celular, o sinal negativo desse termo significa que o p_{cell} está diminuindo quando no sentido do fluxo. Isto significa que os maiores valores da tensão celular foram obtidos mais próximo da região de maiores pressões, enquanto os menores valores foram calculados para as regiões de menores pressões. Com isso, o ∇p_{cell} é negativo e, em módulo, apresenta os maiores valores para as regiões mais distantes das maiores pressões.

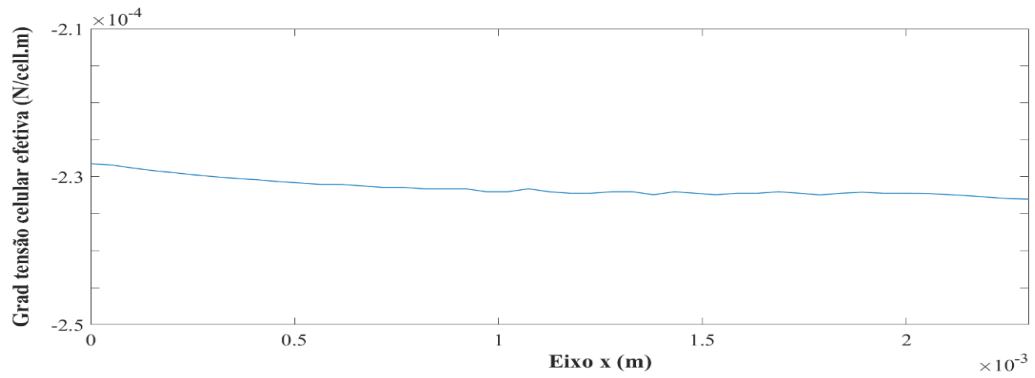


Figura 5.20 - Distribuição do gradiente de pressão ao longo do eixo de simetria do modelo (15 minutos).

Concluindo a análise para o modelo de *mechanosensing*, os próximos resultados mostram, qualitativamente, as respostas para a distribuição celular do domínio (Fig. 5.21).

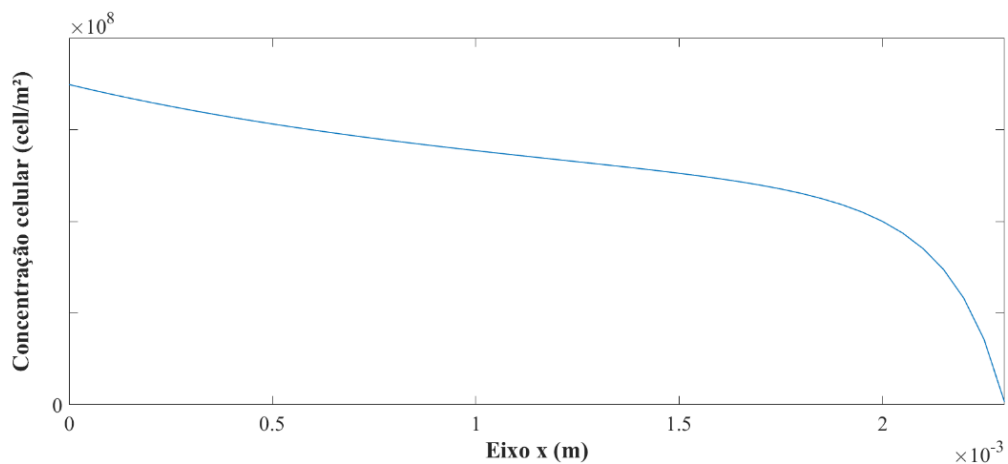


Figura 5.21 - Distribuição da concentração celular ao longo do eixo de simetria (15 minutos).

Os maiores valores de concentração celular foram obtidos para a região de maiores pressões, que consequentemente coincidem com as regiões mais influenciadas pelo p_{cell} .

Por fim, as Figs. 5.22a, 5.22b e 5.22c mostram, respectivamente, as curvas do fluxo difusivo, convectivo e por tensotaxia.

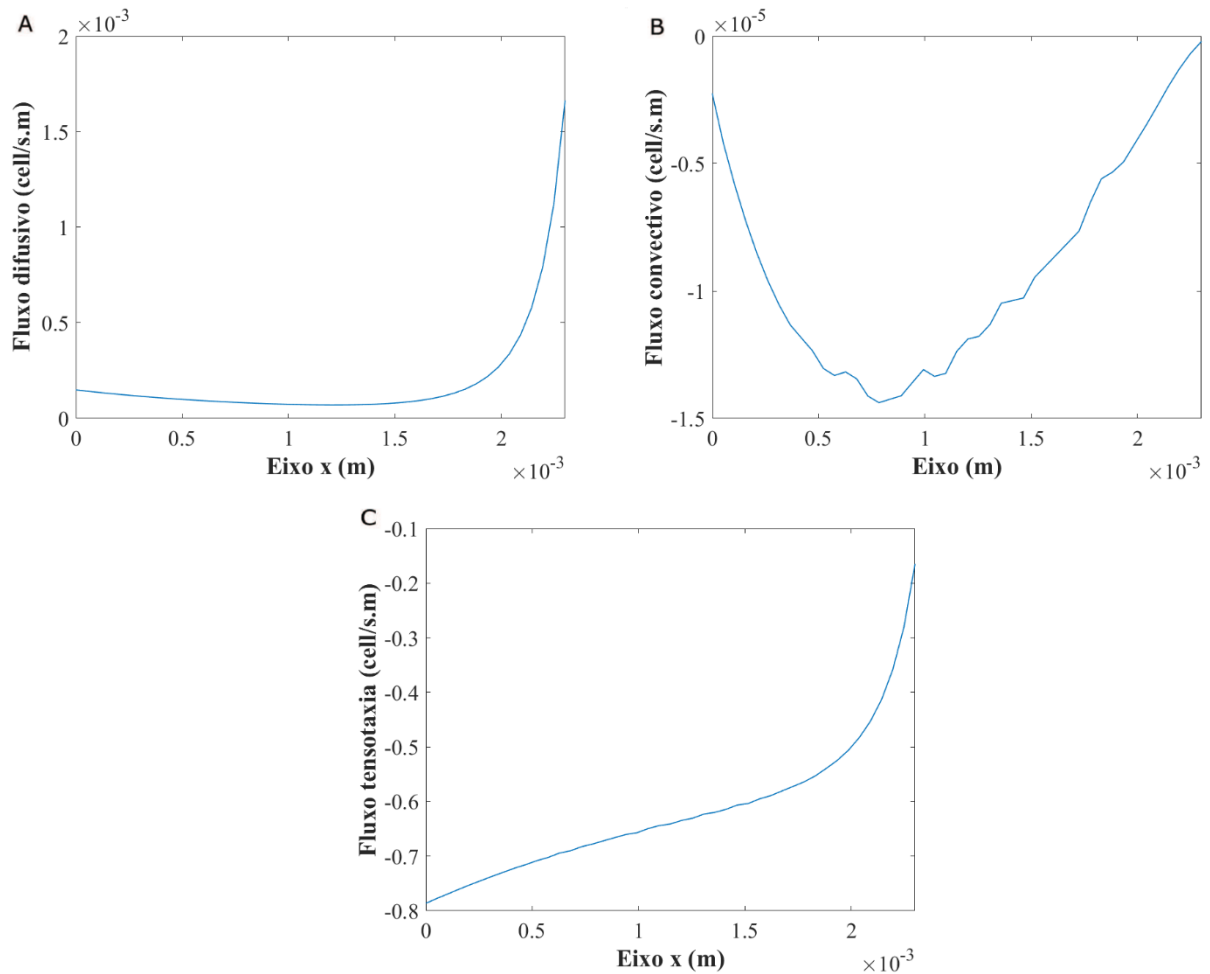


Figura 5.22 – Resposta dos fluxos (15 minutos). (a) Fluxo causado pela difusão. (b) Fluxo causado pela convecção. (c) Fluxo causado pela tensotaxia.

As curvas representadas pela Fig. 5.22 apresentaram características diversas: o fluxo difusivo se manteve aproximadamente constante por quase todo o domínio, apresentando um pico de crescimento ao final; a convecção causada pelos deslocamentos da matriz extracelular gerou um fluxo celular negativo, sendo isso entendido quando se analisa as componentes que influem nos deslocamentos do modelo. A equação de equilíbrio é uma combinação dos deslocamentos gerados pelo gradiente de pressão, pelo termo de tensão gerado pela população celular e por uma força externa que atua na matriz Eq. (3.14). Durante a estabilização dos deslocamentos, que ocorre simultaneamente à da pressão, existe uma tensão volumétrica Eq. (3.7), que atua no substrato e induz o mesmo a se contrair. Portanto, como o fluxo convectivo é uma relação da concentração celular e da derivada temporal dos deslocamentos (Eq. 3.5), e a velocidade dos deslocamentos negativa porque, para um para um tempo $t+1$, o módulo do deslocamento sempre será menor que para um tempo t , é gerado assim um fluxo convectivo negativo, contra o sentido do fluido. O último termo do fluxo, governado pela tensotaxia, que é expressado em

termos do gradiente de tensão celular efetiva e de uma função da concentração celular (Eqs. 3.6 e 3.10), apresentou uma diminuição no módulo do seu valor para cada ponto do domínio e manteve o mesmo sentido de ∇p_{cell} . Quando se compara a curva de concentração celular (Fig. 5.21) e a curva representada pela Fig. 5.22c, é possível identificar uma relação entre estas, para maior concentração celular aparece também o maior valor em módulo do fluxo por tensotaxia, sendo isso válido também para a menor concentração e o menor valor em módulo do fluxo. Portanto, as três curvas representadas na Fig. 5.22 e verificando que existe um comportamento muito parecido, porém invertido, das curvas de concentração celular e do fluxo por tensotaxia, conclui-se que a evolução espaço-temporal da concentração é governada pelas deformações do substrato e pela variável de tensão celular efetiva.

5.3.3 Migração celular: velocidade da célula e direção de migração.

Como o modelo mecanobiológico utilizado não considera uma célula isolada, mas sim um conjunto de células, o cálculo da velocidade foi estimado através da relação do fluxo celular líquido, representado pela Eq. 3.10, com média do número de células presente em cada elemento. Essa relação pode ser escrita da forma:

$$\mathbf{v}_{cell} = \frac{\mathbf{J}}{n_m} \quad (3.60)$$

onde n_m é a média do número de células em cada elemento. A Fig. 5.23 mostra a curva de velocidade celular.

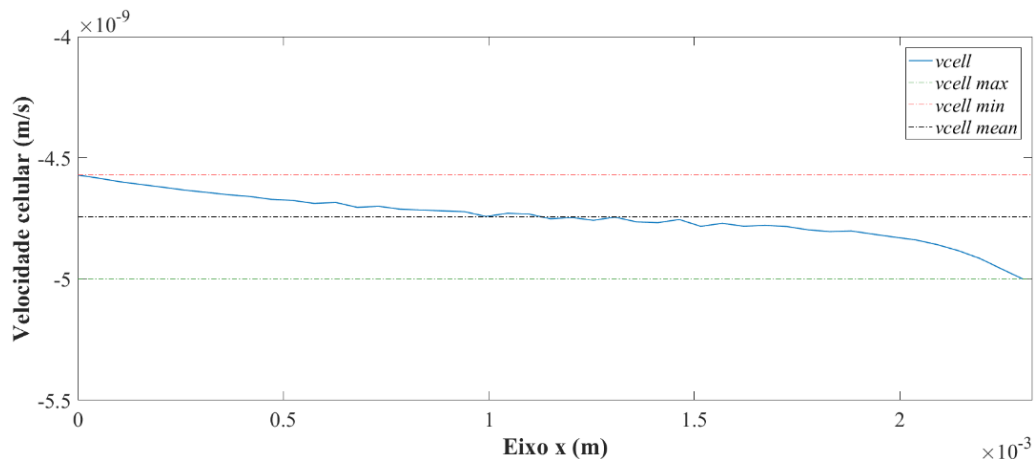


Figura 5.23 - Velocidade celular (15 minutos). O eixo x denota a posição na linha de simetria do substrato.

A Fig. 5.23 apresenta a velocidade máxima, mínima e média da migração celular, sendo os valores em módulo $5,05 \times 10^{-9}$ (m/s), $4,571 \times 10^{-9}$ (m/s) e $4,743 \times 10^{-9}$ (m/s). A velocidade obtida experimentalmente foi de $4,8 \times 10^{-9}$ (m/s). A Tab. 2 apresenta o erro em relação a velocidade obtida experimentalmente.

Tabela 2 - Erros para as velocidades simuladas em relação à velocidade experimental

Velocidade	Valor	Erro
$v_{cell} \text{ max}$	$5,05 \times 10^{-9} \text{ m/s}$	-5,208%
$v_{cell} \text{ mean}$	$4,743 \times 10^{-9} \text{ m/s}$	1,1875%
$v_{cell} \text{ min}$	$4,571 \times 10^{-9} \text{ m/s}$	4,7708%

Analisando as velocidades tomando como base as curvas do gradiente de tensão celular (Fig. 5.20) e da distribuição de concentrações (Fig. 5.21), constata-se que as menores velocidades estão na região de menor gradiente de tensão celular, coincidindo com as maiores concentrações, e as maiores velocidades se encontram na região dos maiores gradientes e menores concentrações celulares. Considerando que a velocidade celular foi tratada como sendo um vetor, e que a componente vertical é nula para essa simulação, o sinal negativo que acompanha os valores de v_{cell} representa a migração no sentido contrário ao fluxo gerado pelo gradiente de pressão.

5.3.4 Discussão dos resultados obtidos para o dispositivo de microfluídica

Neste capítulo, para estudar o ambiente e as interações fluido-mecânicas, foi simulado um dispositivo de microfluídica 3D com todas as geometrias e condições baseadas no estudo realizado por Polacheck et al. (2014), onde um fluido passa através de canais de entrada do dispositivo, fluindo pelo meio poroso.

A geometria definida para o modelo do dispositivo de microfluídica, foi baseada no experimento, e os parâmetros retirados na literatura (POLACHECK et al., 2014) ou estimados,

especificamente o parâmetro M associado à tensotaxia, fornecendo um resultado para a velocidade do fluido de $4,58 \times 10^{-6}$ (m/s), semelhante à velocidade de $4,6 \times 10^{-6}$ (m/s) obtida no trabalho experimental. O fluido intersticial é considerado como um fator muito importante em estudos de migração celular que envolvem processos de *mechanotransduction* desencadeados por uma tensão de cisalhamento (POLACHECK et al., 2011; POLACHECK et al., 2013; POLACHECK et al., 2014; DOYLE e YAMADA, 2016) e também outros estudos que envolvem a resposta celular a estímulos mecânicos (SONG et al., 2005; ZAMORA, 2013). A fim de se considerar essa relação de dependência entre o fluido e a resposta da célula, foi considerada a influência mecânica desse fluido sobre a célula no desenvolvimento e implementação do modelo mecanobiológico proposto. A hipótese feita foi de que a presença do fluido intersticial gera uma resposta dos filamentos de actina, principais constituintes ativos da célula, adicional à gerada pela deformação do substrato por outras forças mecânicas. Essa influência foi representada no modelo por uma deformação adicional do substrato. Para células com propriedades aderentes (WALCOTT e SUN, 2010; MOREO et al., 2008), o que foi identificado para a MDA-MB-231 (ATTC – The Essentials of Life Science Research / Global Delivered), essa hipótese é válida.

O novo modelo mecanobiológico proposto, foi útil para a simulação da resposta celular em um dispositivo de microfluídica e permitiu prever a migração celular no sentido das regiões mais deformadas e no sentido contrário a um fluxo, conhecido como reotaxia. O fenômeno de reotaxia foi observado no trabalho de Polacheck et al. (2014) sob as seguintes condições: uma célula do tipo MDA-MB-231 foi sujeita a influência de um gradiente químico e um fluido intersticial à velocidade constante. Na presença do fluido, a célula respondeu migrando no sentido contrário ao fluxo. Quando uma célula está sujeita a um gradiente de pressão, o fluxo de fluido gerado induz tensões de cisalhamento distribuídas assimetricamente pela superfície celular, como representando pela Fig. 2.8 (POLACHECK et al., 2014; HAEGGER et al., 2015). A presença de uma assimetria das tensões na superfície desencadeia na célula uma resposta biológica de também assimetria no sítio de adesão, aumentando a força e a estabilidade das adesões nessas regiões (POLACHECK et al., 2013), e induzindo um processo de migração celular mediada pelas adesões focais (RIVELINE et al., 2001; PARKER et al., 2002; SONG et al., 2005; ZAMAN et al., 2005; POLACHECK et al., 2014). Esse mesmo fenômeno de migração celular foi identificado nos trabalhos de Lo et al. (2000) e Riveline et al. (2001) para a durotaxia em 2D: a célula exerce uma maior força em substratos mais rígidos, gerando dessa forma adesões focais mais fortes, desencadeando um processo de migração para essas regiões

(LO et al., 2000). Como já comentado para o modelo elástico, Moreo et al. (2008) demonstraram que o mesmo fenômeno ocorre para a migração por tensotaxia, porém nesse caso o agente de sinalização é o gradiente de deformação, e as células respondem migrando para as regiões mais deformadas do substrato (CALVO, 2008; ZAMORA, 2013). No modelo mecanobiológico utilizado no presente trabalho, a expressão da tensão celular efetiva, definida como p_{cell} , é o referente mecânico ao maquinário biológico de miosina-II (VALERO et al., 2014) que, juntamente às integrinas e proteínas transmembrânicas, governa a resposta das células aderentes. Analisando os resultados da simulação do modelo de microfluídica, o fenômeno de tensotaxia foi perfeitamente representado pelo modelo, como já foi discutido e exposto nas Figs. 5.22 e 5.23. Entretanto, acompanhado desse fenômeno, foi possível verificar a reotaxia. O gradiente de pressão, que desloca o substrato positivamente na direção do movimento, gerou maiores deformações, devido às condições de contorno definidas, nas regiões dos maiores valores de pressão, induzindo às células a migrarem na direção das maiores pressões, ou seja, no sentido contra o fluxo. Mas, essa resposta, além de ser influenciada pela deformação do substrato causada pela pressão, também é resultado da ação do fluido intersticial nas células, que aumentam a fixação das mesmas na matriz. Essa direção de migração é conhecida como contrafluxo e foi estudada nos trabalhos de Polacheck et al. (2011) e (2014), sendo avaliada para diversas condições químicas, físicas e biológicas.

Outro objetivo que foi desenvolvido no trabalho foi uma comparação de alguns resultados do modelo com resultados experimentais de velocidade celular e direção de migração obtidos no trabalho do Polacheck et al. (2014). No estudo em questão, que na presença de um gradiente químico e com um gradiente de pressão no meio poroso que induziu o movimento contra fluxo, um experimento de 8 horas, com imagens tomadas em intervalos de 15 minutos, reportou uma velocidade controle média para a migração das células de $4,8 \times 10^{-9}$ (m/s). Várias considerações foram feitas para poder simular esta situação. A primeira foi relativa à adaptação da geometria, considerando simetria em relação a um plano médio na espessura. Assim a análise foi realizada para uma seção plana cultivada, correspondente ao plano de simetria. Essa adaptação do modelo negligencia a inclusão explícita de alguns fatores como: interações 3D entre célula-ECM, o efeito do confinamento e do modo de migração da célula, as formações das adesões focais na terceira direção, a microestrutura e anisotropia da ECM (HAKKINEN et al., 2011; WU et al., 2014; DRISCOLL e DANUSER, 2015; DOYLE et al., 2016). Entretanto, considerando o comportamento homogêneo da distribuição das velocidades obtidas no trabalho de Polacheck

et al. (2014), e se baseando nos estudos de migração celular em 2D desenvolvido por Tranquilo et al. (1988) e das propriedades anisotrópicas da migração em 3D estudadas por Wu et al. (2014), com os devidos ajustes o modelo com 2D foi capaz de apresentar resultados semelhantes aos observados em experimentos para a resposta celular. A partir da definição da dimensão da migração celular, foram introduzidos parâmetros que, em sua maioria, representavam estimativas dos valores reais. A difusividade para a célula MDA-MB-231 foi estimada com base nos valores obtidos do artigo em que se baseia o presente trabalho. Porém não foi considerada a quimiotaxia devida à existência de gradientes químicos. Para o cálculo do parâmetro de saturação λ , além de se estimar uma área celular espalhada pela ECM, que se encontra no raio da ordem de grandeza obtidas em trabalhos experimentais (KAPOOR e SEN, 2012; SYED et al., 2017), considerou-se o comportamento de fibroblasto e não das células específicas do estudo experimental, por não dispor de valores reportados na literatura. O que justifica essa hipótese é que ambas as células apresentam propriedades aderentes e que trabalhos computacionais para a migração celular de fibroblastos em 2D (MANOUSSAKI, 2003; MOREO et al., 2008;), obtiveram resultados que estão de acordo o que se é esperado biologicamente para esses fenômenos.

O último parâmetro, e mais relevante para esse trabalho, é o que quantifica a influência da tensotaxia na direção e magnitude do movimento celular, denotado por M . Biologicamente, para um experimento onde a migração celular é induzida apenas por efeitos de tensotaxia ou durotaxia, o ajuste desse parâmetro é realizado com base na locomoção celular sobre um substrato com flexibilidade específica, ou seja, apenas são consideradas as interações mecânicas entre a célula e a ECM. Entretanto, para o nosso modelo, a magnitude de M , além de fatores mecânicos envolvidos na *mechanosensing*, contém os efeitos de quimiotaxia, da interação célula-célula e célula-ECM em 3D, já que as condições do experimento base envolvem esses fatores em um meio poroso 3D. Com base nos parâmetros estimados, o resultado para a velocidade de migração celular (Fig. 5.24), apresentou uma dependência com o gradiente de p_{cell} . Ao longo do eixo de simetria do domínio, o gradiente da tensão celular efetiva (Fig. 5.21) apresentou um aumento, em módulo, decorrente das condições já citadas, com as velocidades das células também aumentando ao longo do eixo. Outra característica obtida no modelo, foi que as menores velocidades se encontram nas regiões de maiores concentrações, e as maiores velocidades nas de menores concentrações, entretanto, considerando a especificidade do estudo

em questão, é necessário o desenvolvimento de modelos mais complexos para a descrição adequada desse fenômeno.

6

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Foi apresentado um modelo de *mechanosensing* capaz de explicar diversas observações experimentais que envolvem as interações entre as células e as propriedades mecânicas do substrato. Uma das previsões do modelo foi a de representar a tendência das células de migrarem para as regiões mais deformadas do substrato, onde a tensão celular apresentava maior valor. Essa previsão é uma proposta do modelo definida pela variável p_{cell} que simula matematicamente a interação mecanobiológica da célula com o substrato. Os resultados obtidos foram corroborados pelas observações experimentais realizadas para a tensotaxia.

A segunda proposta foi a de desenvolver um modelo de *mechanosensing* para um substrato poroelástico, modificando a equação constitutiva da ECM e introduzindo termos referentes à influência do fluido intersticial, da pressão nas equações de equilíbrio e da resposta celular. O objetivo foi o de representar um meio com uma pressão bem distribuída e estável, afim de mensurar a influência dos deslocamentos causados pela mesma e a manutenção do comportamento celular frente a esses deslocamentos. Os resultados obtidos estiveram de acordo com a teoria definida para a tensotaxia, apresentando a mesma tendência das células migrarem para as regiões mais deformadas, influenciada também pelo fluido intersticial.

A conclusão do estudo foi uma adaptação do modelo desenvolvido para a simulação da migração celular em um dispositivo de microfluídica com escoamento controlado de um fluido intersticial. A previsão do modelo foi de representar um movimento contrafluxo das células obtidos no dispositivo, na mesma ordem de grandeza da velocidade, considerando apenas as influências mecânicas. A primeira adaptação ocorreu no desenvolvimento de um modelo 2D que representasse a geometria e as condições iniciais definidas no experimento. Para isso foi necessária uma análise qualitativa e de sensibilidade dos parâmetros do modelo. A segunda adaptação foi a inclusão de um novo termo na equação da tensão celular efetiva para considerar

a influência mecânica do fluido intersticial. A análise dos resultados de migração concordou qualitativamente e quantitativamente com os fenômenos representados pelo modelo.

No modelo desenvolvido não foi incluída a polarização celular, e, portanto, a anisotropia das forças ativas nas células. As interações célula-célula não são consideradas explicitamente. No entanto, apesar das simplificações o modelo foi capaz de prever vários comportamentos observados nos experimentos. A resposta mecânica das células é constituída por interações dinâmicas e não lineares dependentes do tipo celular não consideradas completamente no modelo proposto, assim, requerem-se modelos mais complexos para se realizar as simulações mais realistas.

Concluindo, a *mechanosensing* e a migração, são importantes fenômenos mecânicos do comportamento celular, e tiveram suas características representadas no modelo proposto. O modelo foi capaz de prever o comportamento de células aderentes em substratos elásticos, e poroelásticos, sobre condições diversas de carregamento. Além disso, o modelo foi capaz de representar quantitativa e qualitativamente a resposta celular experimental sem considerar explicitamente a influência das interações mecânicas célula-célula. Em trabalhos futuros, é proposto o desenvolvimento de um modelo, incluindo explicitamente fatores importantes, como as interações célula-célula, polarização celular, forças e propriedades anisotrópicas e a aplicação do modelo para o estudo de patologias em que o comportamento normal das células é afetado por mudanças nas propriedades mecânicas do substrato.

7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHAKRISHNAN, R.; EHRLICHER, A. The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci*, v. 3, p. 303–317, 2007.

BELOUSSOV, L. V.; LOUCHINSKAIA, N. N.; STEIN, A. A. Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Genes Evol*, v. 210, p. 92-104, 2000.

BERSHADSKY, A. D.; BALABAN, N. Q.; GEIGER, B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 19, p. 677–695, 2003.

BISCHOFFS, I. B.; SCHWARZ, U. S. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 9274-9279, 2003.

BORAU, C.; KAMM, R. D.; GARCÍA-AZNAR, J. M. Mechano-sensing and cell migration: a 3D model approach. *Physical Biology*, v. 8, p. 1-13, 2011.

CALVO, P. M. *Mathematical modelling and computational simulation of the mechanobiological behaviour of bone implants interfaces*. 2008. 340 p. Tese (Mecânica Computacional) – Instituto de Pesquisa em Engenharia de Aragão, Universidade de Zaragoza, Zaragoza.

CHARRAS, G.; SAHAI, E. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Review Molecular Cell Biology*, v. 15, p. 813-824, 2014.

CONDEELIS, J.; SINGER, R. H.; SEGALL, J. E. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 21, p. 695–718, 2005.

DANUSER, G.; ALLARD, J.; MOGILNER, A. Mathematical modeling of eukaryotic cell migration: insights beyond experiments. *Annu Rev Cell Dev Biology*, v. 29, p. 501-528, 2013.

DIMILLA, P. A.; BARBEE, K.; LAUFFENBURGER, D. A. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J*, v. 60, 1991.

DISCHER, D. E.; JANMEY, P.; AND WANG, Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, v. 310, p. 1139-1143, 2005.

- DOYLE, A. D.; YAMADA, K. M. Mechanosensing via cell-matrix adhesions in 3D microenvironments. *Experimental Cell Research*, v. 343, p. 60-66, 2016.
- DRISCOLL, M. K.; DANUSER, G. Quantifying modes of 3D cell migration. *Trends Cell Biol*, v. 25 p. 749-759, 2015.
- FINE, R. A.; MILLERO, F. J. Compressibility of water as a function of temperature and pressure. *The Journal of Chemical Physics*, v. 59, pp. 5529-5536, 1973.
- FRIEDL, P.; SAHAI, E.; WEISS, S.; YAMADA, K. M. New dimensions in cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 13, p. 743-7, 2012.
- GUYTON, A. C. 1991. *Textbook of Medical Physiology*. 11^a ed. Philadelphia: Saunders, 2006. 1116 p.
- HAEGER, A.; WOLF, K.; ZEGERS, M. M.; FRIEDL, P. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends in Cell Biology*, v. 25, p. 556-566, 2015.
- HAKKINEN, K. M.; HARUNAGA, J. S.; DOYLE, A. D.; YAMADA, K. M. Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices. *Tissue Engineering: Part A*, v. 17, p. 713-724, 2011.
- HILL, A. V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc Royal Soc London B*, v. 126, p. 1157-1173, 1938.
- HORWITZ, R.; WEBB, D. Cell migration. *Current Biology*, v. 13, p. 756-759, 2003.
- JACOBS, C. R.; HUANG, H.; KWON, R. Y. *Introduction to Cell Mechanics and Mechanobiology*. 1^a ed. New York: Garland Science, 2013. 351 p.
- KALCHMAN, J.; FUJIOKA, S.; CHUNG, S.; KIKKAWA, Y.; MITAKA, T.; KAMM, R. D.; TANISHITA, K.; SUDO, R. A three-dimensional microfluidic tumor cell migration assay to screen the effect of anti-migratory drugs and interstitial flow. *Microfluidics and Nanofluidics*, v. 14, p. 969-981, 2013.
- KURNIAWAN, N. A.; CHAUDHURI, P. K.; LIM, C. T. Mechanobiology of cell migration in the context of dynamic two-way cell-matrix interactions. *Journal of Biomechanics*, v. 49, p. 1355-1368, 2016.
- LANGE, J. R.; FABRY, B. Cell and tissue mechanics in cell migration. *Exp Cell Res*, v. 319, p. 2418-2423, 2013.
- LAUFFENBURGER D. A.; HORWITZ A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* v. 84, p. 359-369, 1996.
- LEE, D. A.; KNIGHT, M. M.; CAMPBELL, J. J.; BADER, D. L. Stem Cell Mechanobiology. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 112, p. 1-9, 2011.

- LEVICK, J. R. Flow through interstitium and other fibrous matrices. *Q J Exp Phys*, v. 72, p. 409-437, 1987.
- LIM, C. T.; ZHOU, E. H.; QUEK, S. T. Mechanical models for living cells—a review. *J Biomech*, v. 39, p. 195–216, 2006.
- LO, C. M.; WANG, H. B.; DEMBO, M.; WANG, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, v. 79, p. 144-152, 2000.
- MANDEVILLE, J. T. H., LAWSON, M. A. AND MAXFELD, F. R. Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol*, v. 61, p. 188-200, 1997.
- MANOUSSAKI, D. A mechanochemical model of angiogenesis and vasculogenesis. *ESAIM Math Model Num Anal*, v. 37, p. 581-599, 2003.
- MARTÍNEZ, S. M. *Modeling of hydrogel deformation due to cell exerted forces, migration and proliferation*. 2011. 54 p. Dissertação (Engenharia Biomecânica) – Escola de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Zaragoza, Zaragoza.
- MIYAMOTO, S.; TERAMOTO, H.; COSO, O. A.; GUTKIND, J. S.; BURBELO, P. D.; AKIYAMA, S. K.; YAMADA, K. M. Integrin function: Molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol*, v. 131, p. 791-805, 1995.
- MOREO, P.; GARCÍA-AZNAR, J. M.; DOBLARÉ, M. Modeling mechanosensing and its effects on the migration and proliferation of adherent cells. *Acta Biomaterialia*, v. 4, p. 613-621, 2008.
- NETO, E. S.; PERIC, D.; OWEN, D. R. J. *Computational Methods for Plasticity: Theory and Applications*. 1^a ed. Swansea: Wiley, 2008. 791 p.
- NIKKHAH, M.; STROBL, J. S.; DE VITA R., A. M. The cytoskeletal organization of breast carcinoma and fibroblast cells inside three dimensional (3-D) isotropic silicon microstructures. *Biomaterials*, v. 31, p. 4552-4561, 2010.
- PARKER, K. K.; BROCK, A. L.; BRANGWYNNE, C.; MANNIX, R. J.; WANG, N.; OSTUNI, E.; GEISSE, N. A.; ADAMS, J. C.; WHITESIDES, G. M.; INGBER, D. E. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J*, v. 16, p. 1195–1204, 2002.
- PELHAM, R. J.; WANG, J. L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, p. 13661-13665, 1997.
- POLACHECK, W. J.; CHAREST, J. L.; KAMM, R. D. Interstitial flow influences direction of tumor cell migration through competing mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 108, p. 11115-11120, 2011.
- POLACHECK, W. J.; LI, R.; UZEL, S. G. M.; KAMM, R. G. Microfluidic platforms for Mechanobiology. *Lab Chip*, v. 13, p. 2252-2267, 2013.

POLACHECK, W. J.; ZERVANTONAKIS, I. K.; KAMM, R. D. Tumor cell migration in complex microenvironments. *Cell Mol Life Sci*, v. 70, p. 1335-1356, 2013.

POLACHECK, W. J.; GERMAN, A. E.; MAMMOTO, A.; INGBER, D., E.; KAMM, R. D. Mechanotransduction of fluid stress governs 3D cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 111, p. 2447-2452, 2014.

RAPPEL, W. J.; THOMAS, P. J.; LEVINE, H.; LOOMIS, W. F. Establishing direction during chemotaxis in eukaryotic cells. *Biophys J*, v. 83, p. 1361-1367, 2002.

RIBEIRO, F. O.; GÓMEZ-BENITO, M. J.; FOLGADO, J.; FERNANDES, P. R.; GARCÍA-AZNAR, J. M. Computational model of mesenchymal migration in 3D under chemotaxis. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, v. 20, p. 59-74, 2016.

RIDLEY, A. J.; SCHWARTZ, M. A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R. A.; GINSBERG, M. H.; BORISY, G.; PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, v. 302, p. 1704-1709, 2003.

RIVELINE, D.; ZAMIR, E.; BALABAN, N. Q.; SCHWARZ, U. S.; ISHIZAKI, T.; NARUMIYA, S.; KAM, Z.; GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. D. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*, v. 153, p. 1175-1186, 2001.

SAWADA, Y.; TAMADA, M.; DUBIN-THALER, B. J.; CHERNIAVSKAYA, O.; SAKAI, R.; TANAKA, S.; SHEETZ, M. P. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, v. 127, p. 1015-1026, 2006.

SCHÄFER, A.; RADMACHER, M. Influence of myosin II activity on stiffness of fibroblast cells. *Acta Biomater*, v. 1, p. 273-280, 2005.

SCHWARZ, U. S.; BISCHOFFS, I. B. Physical determinants of cell organization in soft media. *Med Eng Phys*, v. 27, p. 763-772, 2005.

SHREIBER, D. I., BAROCAS, V. H. AND TRANQUILLO, R. T. Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. *Biophys J*, v. 84, p. 4102-4114, 2003.

SONG, L.; HUANG, N. F.; HSU, S. Mechanotransduction in endothelial cell migration. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 96, p. 1110-1126, 2005.

SWARTZ, M. A.; FLEURY, M. E. Interstitial flow and its effects in Soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng*, v. 9, p. 229-256, 2007.

SYED, S.; SCHOBER, J.; BLANCO, A.; ZUSTIAK, S. P. Morphological adaptations in breast cancer cell as function of prolonged passaging on compliant substrates. *PLoS ONE*, v. 12, p. 1-26, 2017.

TIMOSHENKO, S.; GOODIER, J. N. *Theory of Elasticity*. 3^a ed. Mc Graw-Hill Publishing Co., 1970. 519 p.

VALERO, C.; JAVIERRE, E.; GARCÍA-AZNAR, J. M.; GÓMEZ-BENITO, M. J. A cell-regulatory mechanism involving feedback between contraction and tissue formation guides wound healing progression. *Plos One*, v. 9, p. 1-10, 2014.

VARGAS, D. A.; ZAMAN, M. H. Computational model for migration of a cell cluster in three-dimensional matrices. *Annals of Biomed Eng*, v. 39, p. 2068-2079, 2011.

VUONG, A. T.; RAUCH, A. D.; WALL, W. A. A biochemo-mechano coupled, computational model combining membrane transport and pericellular proteolysis in tissue mechanics. *Proc Math Phys Eng Sci*, v. 473, p. 1-16, 2017.

WALCOTT, S.; SUN, S. X. A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. *PNAS*, v. 107, p. 7757-7762.

WHITELEY, J. *Finite Element Methods: A Practical Guide*. 1^a ed. Oxford: Springer, 2017. 232 p.

WU, P.-H.; GIRI, A.; SUN, S. X.; WIRTZ, D. Three-dimensional cell migration does not follow a random walk. *PNAS*, v. 11, p. 3949-3954, 2014.

XIONG, B.; REN, K.; SHU, Y.; CHEN, Y.; SHEN, B.; WU, H. Recent developments in microfluidics for cell studies. *Adv. Mater.*, v. 26, p. 5525-5532, 2014.

ZAMAN, M. H.; KAMM, R. D.; MATSUDAIRA, P.; LAUFFENBURGER, D. A. Computational model for cell migration in three-dimensional matrices. *Biophys J*, v. 89, p. 1389-1397, 2005.

ZAMAN, M. H.; TRAPANI, L. M.; SIEMESKI, A.; MACKELLAR, D.; GONG, H.; KAMM, R. D.; WELLS, A.; LAUFFENBURGER, D. A.; MATSUDAIRA, P. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *PNAS*, v. 13, p. 10889-10894, 2006.

ZAMIR, E.; GEIGER, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, v. 114, p. 3583–3590, 2001.

ZAMORA, C. B. *Multiscale computational modeling of single in cell migration 3D*. 2013. 259 p. Tese (Mecânica Computacional-Multiescala em mecânica e engenharia biológica) – Instituto de Pesquisa em Engenharia de Aragón, Universidade de Zaragoza, Zaragoza.

ZHELEV, D. V.; ALTERAIFI, A. M.; CHODNIEWICZ, D. Controlled pseudopod extension of human neutrophils stimulated with different chemoattractants. *Biophys J*, v. 87, p. 688-695, 2004.