

**Modelos de Reação Difusão para
o Crescimento de Tumores**
Silvio da Costa Ferreira Junior

Modelos de Reação Difusão para o Crescimento de Tumores

Silvio da Costa Ferreira Junior

Orientador: Prof. Marcelo Lobato Martins

Co-orientadores: Prof. José Guilherme Moreira

Prof. Marcelo José Vilela

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em Física.

Maio 2003

in memoriam

Dedico esta tese à minha mãe Ana Maria,
a quem devo tudo o que alcancei.

Agradecimentos

À minha família. O meu doutorado nunca seria possível sem o apoio da minha família. Especialmente à minha mãe, que sempre me incentivou e o faz até hoje, mesmo estando ausente. Ao meu pai, amigo e xará Silvio com quem sempre busco apoio nas horas difíceis. Aos meus irmãos Silvana e Victor pela amizade e companheirismos.

À Zélia. Pelo seu amor e compreensão.

Aos amigos. Pelo companheirismo nos bons e maus momentos. Dentre eles destaco: Jander e Toninho, grandes amigos desde antes da graduação, e Ismael, Sidiney, Holokx e Rodrigo, com quem compartilhei residência durante a pós-graduação.

Aos orientadores. Ao meu orientador Prof. Marcelo Lobato por tudo o que me ensinou. Ao Prof. José Guilherme pela paciência e presteza em todos os momentos que precisei da sua valiosa ajuda, principalmente, durante a elaboração desta tese. Ao Prof. Marcelo Vilela pelo ensinamentos sobre a biologia do câncer.

Aos professores do DF/UFMG. Por todos os ensinamentos que recebi. Em especial, agradeço ao Prof. Ronald Dickman, com quem tive o privilégio de cursar várias disciplinas sendo que uma delas gerou um trabalho incluído como parte desta tese. Agradeço ao Prof. Jafferson e ao Prof. Paulo Sérgio pelo excelente trabalho na coordenação da pós-graduação. Em especial, sou grato ao Prof. Paulo Sérgio pelo apoio e compreensão durante momentos difíceis que atravessei.

Aos colegas. Agradeço a todos os colegas da pós-graduação com quem compartilhei disciplinas e a sala de computação da Mecânica Estatística.

Aos funcionários. Por todos os serviços prestados. Em especial, agradeço à Marluce pela eficiência e prontidão do atendimento na secretaria de pós-graduação.

Ao DPF/UFV. Agradeço à hospitalidade dos professores, alunos e funcionários do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa onde passei boa parte do doutorado.

Ao CNPq. Pelos quatro anos de bolsa.

Resumo

Nesta tese de doutoramento, apresentamos uma nova proposta para simular o crescimento de tumores. Essa proposta, consiste em associar regras microscópicas estocásticas, que descrevem a dinâmica celular, com equações de reação-difusão macroscópicas, que descrevem as concentrações das diversas substâncias (nutrientes, fatores de crescimento, drogas quimioterápicas) no tecido. Aplicamos esse método para simular a dinâmica e, principalmente, a morfologia de tumores *in situ*. Especificamente, usamos modelos cinéticos efetivos para simular a divisão, morte e movimento celular dependentes das concentrações citadas acima. Primeiramente, um modelo no qual interações entre células cancerosas são mediadas por fatores de crescimento que determinam as ações celulares foi estudado. Esse modelo exibe uma grande diversidade de morfologias para os tumores que evoluem no tempo seguindo leis de Gompertz. Em seguida, um novo modelo, no qual a competição por nutrientes determina as ações celulares, foi estudado com intuito de gerar morfologias papilares e ramificadas observadas em tumores reais e que não foram obtidas considerando-se somente os fatores de crescimento. Por fim, os efeitos de diferentes estratégias quimioterápicas, usando drogas citotóxicas ou antimitóticas, no modelo com competição por nutrientes foram estudados. Vários resultados interessantes foram encontrados nesses modelos, como, por exemplo, uma ampla diversidade de padrões, transições morfológicas, leis de escala e de crescimento, reprodução qualitativa de comportamentos e morfologias de tumores reais, etc. e, além disso, o modelo sugere novos experimentos para determinar comportamentos ainda não observados em tumores reais. Para complementar a tese, estudamos um modelo puramente estocástico que é uma generalização do modelo clássico de crescimento de tumores proposto por Williams & Bjercknes, usando tanto simulações quanto métodos analíticos.

Abstract

In this doctoral thesis, we present a new approach for the simulation of tumor growth. This approach consists in associate stochastic microscopic rules, which describe the cell dynamics, with macroscopic reaction-diffusion equations, describing the concentration of several chemicals (nutrients, growth factors, drugs, etc.) in the tissue. We applied this method for simulate the dynamics and, mainly, the morphology of tumors *in situ*. Specifically, we use effective kinetic models in order to simulate cell division, death, and motility depending on the above-cited concentrations. Firstly, a model in which the interactions among cancer cells are mediated by growth factors and controls the cell actions was studied. This model exhibits a wide morphology diversity for tumors, which evolve in time as Gompertz laws. Secondly, a new model, in which the nutrient competition determines the cell actions, was studied in order to generate the ramified and papillary morphologies commonly observed in real tumors, but not obtained in the model that just considers the growth factors. Finally, the effects of distinct chemotherapeutic strategies, using cytotoxic or antimitotic drugs, in the nutrient limited model were studied. Several interesting results emerge from these models such as wide pattern diversity, morphology transitions, scaling and growth laws, qualitative reproduction of tumor behaviors and morphologies, suggestions for new experiments in order to determine possible behaviors not yet observed in real tumors, etc. In order to complement the thesis, we studied, through simulations and analytical methods, a stochastic model that is a generalization of the classical model for the growth of tumors proposed by Williams & Bjercknes.

Sumário

1	Introdução	1
2	Biologia do câncer	4
2.1	O início do câncer	4
2.1.1	Auto-suficiência dos sinais de crescimento	7
2.1.2	Insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento	8
2.1.3	Evasão da morte celular programada (apoptose)	11
2.1.4	Potencial de replicação ilimitado (telomerasas)	12
2.2	Aspectos fundamentais do câncer	13
2.2.1	Invasão e metástases	13
2.2.2	Angiogênese tumoral auto-sustentada	18
2.3	Considerações finais	20
3	Modelos de crescimento de tumores	22
3.1	Modelos discretos	22
3.1.1	A classe de modelos de Eden	22
3.1.2	O modelo de Smolle & Stettner	25
3.1.3	Modelos discretos de autômatos celulares	27
3.2	Modelos contínuos de crescimento de tumores	28
3.2.1	Modelos de equações diferenciais clássicos	28
3.2.2	Modelos com condições de contorno livres	31
3.3	Modelos para a formação de padrões fractais em tumores	34
3.3.1	Um modelo para o crescimento de tumores malignos do cérebro	34
3.3.2	Papel da adesão celular na morfologia dos tumores	37
4	Um modelo para o crescimento de de tumores: o papel dos fatores de crescimento na morfologia tumoral.	42

4.1	O modelo	43
4.2	Resultados	47
4.3	Conclusões	51
5	Um modelo de reação-difusão para o crescimento de tumores <i>in situ</i>.	54
5.1	O modelo de crescimento	55
5.1.1	O tecido	55
5.1.2	Os nutrientes	55
5.1.3	Dinâmica celular	58
5.1.4	Algoritmo de simulação	60
5.1.5	Estimativa do valor de alguns parâmetros	62
5.2	Resultados	63
5.3	Fatores de Crescimento	70
5.3.1	O modelo	70
5.3.2	Resultados	73
5.4	Conclusões	74
6	Simulando quimioterapias para para tumores <i>in situ</i>	76
6.1	Introdução	76
6.2	Tratamento com drogas citotóxicas	77
6.2.1	O modelo	77
6.2.2	Resultados	79
6.3	Drogas quimioterápicas antimitóticas	84
6.4	Conclusões	89
7	Modelo de Williams e Bjerknes com limitação de crescimento	92
7.1	Introdução	92
7.2	O modelo de WB estendido	94
7.3	Análise de modelos WB através de métodos estocásticos	95
7.4	O modelo WB modificado	98
7.4.1	Resultados exatos do modelo WB estendido	99
7.4.2	A equação macroscópica	100
7.4.3	A expansão Ω	104
7.4.4	Correções assintóticas para $\alpha = 1/2$	107
7.5	Padrões geométricos	108
7.6	Conclusões	112

8	Conclusões e perspectivas	114
A	Glossário	118
	Referências	124

Capítulo 1

Introdução

O **câncer**¹ é uma doença derivada, com exceção das células germinativas, de mutações em **células somáticas** individuais que desobedecem o controle normal de proliferação, alteram o microambiente ao seu redor, invadem tecidos normais adjacentes, e geram tumores secundários (**metástases**) em sítios diferentes da sua origem primária [1]. Mesmo sendo extremamente diversos e heterogêneos, um pequeno número de passos básicos, associados com proliferação celular desregulada, supressão da morte celular e replicação ilimitada, é necessário para o desenvolvimento de todo e qualquer tumor. De fato, todo **neoplasia** se desenvolve de acordo com um esquema universal [2, 3]. Células neoplásicas acumulam uma série de **mutações genéticas** e **transformações epigenéticas** ao longo da progressão tumoral em resposta à seleção natural e a um programa de defesa, similares aos observados em colônias de bactérias em condições de estresse [4]. Mas, ao contrário do crescimento de bactérias, a progressão tumoral envolve uma rede complexa de interações entre células cancerosas e seu microambiente hospedeiro [5]. Por outro lado, é um fato conhecido que colônias de bactérias em situações severas de competição podem formar uma grande diversidade de padrões [6, 7] que vão de compactos, como no modelo de Eden [8], a ramificados, como os padrões de agregação limitada por difusão (DLA) [9]. Vários trabalhos mostram que modelos de equações de reação-difusão são capazes de reproduzir qualitativa e quantitativamente as morfologias observadas em colônias de bactérias [6, 7]. Recentemente, padrões de células tumorais *in vivo* e *in vitro* foram caracterizados por suas dimensões fractais e distribuições de tamanho de agregados [10, 11, 12], reforçando o grande interesse atual pela procura dos princípios básicos de crescimento em organismos vivos, que são

¹Termos em negrito tem significado descrito no glossário do apêndice A.

os mais complexos e desafiadores sistemas auto-organizados.

Em particular, para o crescimento do câncer, um dos fenômenos mais agressivos em biologia, numerosos modelos matemáticos focando diversos aspectos do crescimento neoplásico foram recentemente propostos. Em especial, modelos baseados em equações diferenciais clássicas têm recebido grande atenção da comunidade científica. Entre muitos, podemos destacar o estudo do crescimento de esferóides tumorais [13], da evolução do câncer e sua interação com o sistema imunológico [14], de terapias recentes para o câncer [15], e do problema fundamental de **angiogênese tumoral** [16, 17]. Em geral, todos estes trabalhos pressupõem uma simetria, normalmente esférica, e restringem-se ao estudo das curvas de crescimento e de distribuição das populações cancerosas. Contudo, tumores podem exibir uma grande variedade de padrões complexos (compactos, desconexos, **papilares**, etc.) que não são considerados nos modelos anteriores. Modelos nos quais as morfologias emergem naturalmente também foram estudados e alguns deles serão discutidos nas seções 3.1 e 3.2. Mais especificamente, modelos referentes à formação de morfologias complexas em tumores foram recentemente propostos na literatura de Física e dois deles [18, 19] serão apresentados separadamente na seção 3.3.

O principal objetivo desta tese é estudar a influência de diversos aspectos do crescimento de tumores *in situ* por meio de modelos matemáticos e computacionais, nos quais as ações celulares são controladas por regras microscópicas locais que dependem das concentrações das diversas substâncias presentes nos tecidos como, por exemplo, fatores de crescimento, nutrientes e drogas quimioterápicas. O formalismo da simulação do crescimento de tumores introduzido nesta tese é inovador e os resultados são muito promissores. No entanto, não é o nosso objetivo, e nem seria possível, esgotar todas as possibilidades de modelos para o crescimento de tumores usando a proposta desta tese. Resta ainda uma imensa gama de problemas a serem estudados, o que torna este trabalho ainda mais relevante, pois ele abre uma nova porta para a modelagem do crescimento dos tumores.

Embora os tumores sejam essencialmente tridimensionais, ficamos limitados ao estudo de modelos bidimensionais para o crescimento de tumores. Os principais fatores para estas limitações são: (1) as simulações envolvem diversas soluções estacionárias de equações de difusão o que gera um custo computacional muito elevado, mesmo em duas dimensões; (2) existem alguns tipos de tumores epiteliais cujo crescimento é quase bidimensional como, por exemplo, alguns tipos de melanomas; (3) a grande maioria dos modelos que estudam a formação de padrões em tumores publicados

é bidimensional, por exemplo, os trabalhos de Scalerandi *et. al.* [21], Sander & Deisboeck [18], Reis *et. al* [19], Tohya *et. al.* [20] e Williams & Bjercknes [22].

Os dois capítulos seguintes são dedicados à revisão de literatura, enquanto os capítulos restantes referem-se aos trabalhos da tese propriamente dito. No capítulo 2, é apresentada uma revisão geral sobre a biologia do câncer com o objetivo de familiarizar os físicos com o tema do trabalho. No capítulo 3, alguns modelos de crescimento de tumores, que consideramos importantes para a tese, são revisados e discutidos e, para cada um desses modelos, procuramos mostrar um análise crítica destacando suas virtudes e limitações. Basicamente, cada um dos capítulos, que não são de revisão, referem-se a um trabalho publicado e portanto são escritos no formato de artigo. No capítulo 4, é apresentada a primeira parte da tese, referente aos artigos [23, 24] nos quais estudamos a formação de padrões em um modelo que tem como principal característica a interação entre células cancerosas mediada por **fatores de crescimento**. No capítulo 5, é apresentado o segundo trabalho [25] da tese que estuda a competição por nutrientes na formação de tumores avasculares através de um modelo de reação-difusão que inclui proliferação, mobilidade e morte celular. Este último artigo foi selecionado pela página *Virtual Journal of Biological Physics Research* [26], que reúne publicações consideradas de destaque na área de física biológica. Também é incluída uma rápida discussão sobre efeitos de fatores de crescimento no modelo. O capítulo 6, que corresponde ao artigo [27], apresenta uma continuação natural do modelo discutido no capítulo 5, na qual o efeito de diversas estratégias quimioterápicas sobre os padrões tumorais é estudado. No capítulo 7, fugimos dos modelos de reação-difusão analisados apenas com simulações e estudamos, tanto por métodos analíticos quanto numéricos, uma generalização do modelo de Williams e Bjercknes [22] que inclui a saturação do crescimento dos tumores. Consideramos este capítulo, que mostra os resultados do artigo [28], importante para complementar uma tese em Física, pois nele, resultados de simulações são reproduzidos por cálculos e aproximações analíticas. No capítulo 8 os resultados obtidos até agora e as perspectivas futuras são discutidos. A apêndice A contem um glossário com termos técnicos em biologia que estão destacados em negrito ao longo do texto. Finalmente, todas as referências bibliográficas encontram-se no final da tese.

Capítulo 2

Biologia do câncer

Neste capítulo é apresentada uma revisão dos principais aspectos biológicos envolvidos no crescimento do câncer. A seção 2.1 explica a origem do câncer com base, principalmente, nos trabalhos de Weinberg e Hanahan [1, 29, 30], que são excelentes referências para a revisão dos aspectos fundamentais do comportamento das células cancerosas. Estes autores propõem que as células de um tumor completamente desenvolvido precisam adquirir, entre outras, seis propriedades: (1) auto-suficiência nos sinais de crescimento, (2) insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, (3) evasão da morte celular programada (**apoptose**), (4) potencial de replicação ilimitado, (5) angiogênese auto-sustentada e (6) capacidade de invadir tecidos adjacentes e produzir tumores secundários ou metástases. A seção 2.2 trata separadamente os dois últimos aspectos citados e usa, além das referências anteriores, os artigos de revisão de Liotta & Kohn [5], Ruoslahti [31] e Liotta [32], como referências sobre invasão e metástases, e os artigos de Folkman [33, 34] e Carmeliet & Jain [35], como referências para angiogênese tumoral. Além das referências anteriores, os capítulos 9 do livro de Brasileiro Filho [36] e o capítulo 10 do livro de Cotran *et. al.* [37] foram usados como referências básicas auxiliares. Por isso, as citações serão omitidas no decorrer deste capítulo.

2.1 O início do câncer

O termo câncer refere-se a mais de 100 formas de doenças que podem se manifestar em quase todos os tecidos do corpo humano, sendo que alguns tecidos podem desenvolver vários tipos distintos. O câncer é diferente da maioria das outras doenças. Ele não é um agente externo que invade o nosso corpo atacando tecidos e órgãos, mas

ao contrário, o câncer é composto pelo mesmo material que nos constitui: células humanas. Um adulto possui cerca de 30 trilhões de células individuais que vivem em uma sociedade complexa onde as células controlam mutuamente o crescimento umas das outras. Esse comportamento coletivo permite que células mortas sejam repostas ao mesmo tempo em que crescimentos inapropriados são inibidos, mantendo, portanto, a integridade e funcionalidade do órgão. Os principais mecanismos reguladores desse controle mútuo estão relacionados com a produção e processamento de fatores de crescimento: proteínas produzidas por diferentes células que têm a capacidade de estimular ou inibir a multiplicação celular. Logo, quando os mecanismos de regulação de crescimento funcionam corretamente e as células têm comportamento coletivo harmônico, o resultado é o funcionamento normal do organismo. Mas, se por acaso, uma célula desenvolver mecanismos autônomos de sobrevivência, as consequências para o organismo poderão ser fatais.

Experimentos recentes mostraram que todas as células de um tumor descendem de uma célula ancestral comum que, em algum momento, em geral décadas antes do tumor tornar-se detectável, iniciou um programa de reprodução inapropriado. Na verdade, as células cancerosas sofrem sucessivas transformações antes de tornarem-se completamente malignas. Estas transformações tornam possível que o tumor supere as barreiras impostas pelo organismo que inibem o crescimento neoplásico. Um modelo de progressão de um tumor epitelial maligno, carcinoma, o tipo mais comum de tumor, é mostrado esquematicamente na figura 2.1. O tumor da figura 2.1 resulta de quatro transformações, mas este número poder ser maior. Estas transformações são causadas por mutações em classes específicas de genes que estão presentes no DNA das células.

Genes são pacotes de informação contidos em cada célula do corpo que determinam todas as características do indivíduo. Os genes são carregados nas moléculas de DNA contidas no núcleo celular. Um determinado gene é especificado por uma seqüência de bases nucleotídicas no DNA, e cada gene que pode estar ativo ou não, determina a seqüência de aminoácidos que devem ser ligados para compor uma proteína específica. Cada célula possui todos os genes do indivíduo, mas nem todos estão ativos. Quando um gene está ativo, a célula responde sintetizando a sua respectiva proteína: as proteínas determinam as características e ações celulares. Mutações em genes específicos podem perturbar a célula mudando as quantidades ou as atividades das proteínas produzidas e conseqüentemente as propriedades celulares fundamentais.

Dois tipos de genes desempenham papéis fundamentais no surgimento do câncer: os **protooncogenes** e os **genes supressores de tumor**. Quando modificadas, estas

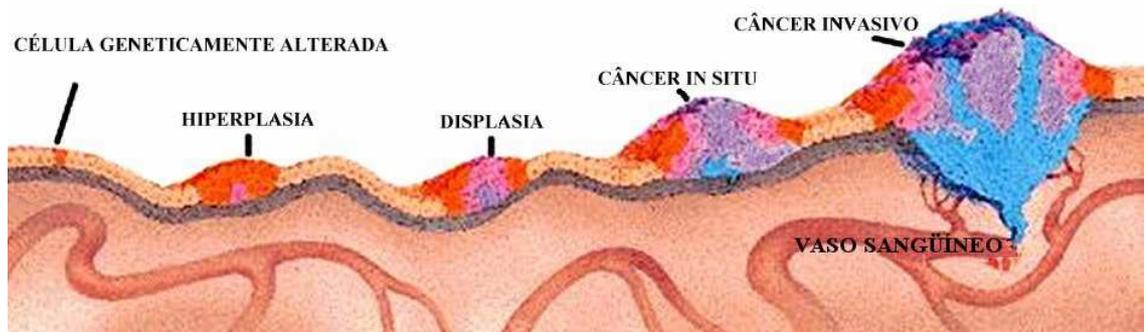


Figura 2.1: Múltiplos estágios da carcinogênese. (a) Uma célula geneticamente alterada (laranja) surge na população de células normais (bege) e começa a proliferar-se quando normalmente não o faria. (b) A célula alterada e suas descendentes continuam aparentemente normais, mas proliferando excessivamente gerando uma **hiperplasia**. Após anos, uma destas células (rosa) em um milhão sofre novas mutações e o seu crescimento fica ainda mais descontrolado. (c) Agora, além da proliferação acelerada, a prole da célula que sofreu uma nova série de mutações começa a mostrar anormalidades na sua forma e orientação no tecido; este tipo de crescimento é chamado de **displasia**. Novamente, após um tempo, outras mutações vão se somando e alteram o comportamento de uma célula (roxa). (d) O acúmulo progressivo de mutações aumenta ainda mais a anormalidade no crescimento e na aparência da célula. O tumor ainda está confinado numa região limitada do tecido e pode permanecer neste estado por muito tempo (período de latência). Neste caso, o tumor é chamado de câncer *in situ*. Contudo, com a instabilidade genética células adquirem novas mutações progressivamente (azul). (e) Se as mudanças genéticas permitem ao câncer invadir o tecido adjacente, possibilitando que células entrem na corrente sanguínea o tumor é considerado maligno. As células que caem no sistema vascular poderão formar novos tumores (metástases) através do corpo, o que na maioria das vezes é letal. *Figura adaptada da referência [29].*

duas classes de genes são as principais responsáveis pelo crescimento celular desregulado da maioria dos cânceres. Protooncogenes modificados podem tornarem-se **oncogenes** que provocam a proliferação excessiva promovendo a produção anormal de proteínas estimuladoras de crescimento, processando sinais de crescimento inexistentes e levando à diminuição de **diferenciação celular** no tecido tumoral. Por outro lado, genes supressores de tumor, quando inativos devido à mutações, contribuem para o câncer por eliminar o controle de divisão das células cancerosas e suprimir apoptose. Para compreender como protooncogenes e genes supressores de tumor modificados contribuem para o câncer, é necessário estudar os papéis desempenhados por suas versões normais.

2.1.1 Auto-suficiência dos sinais de crescimento

Numerosas evidências indicam que as funções de muitos protooncogenes estão relacionadas com processos de transmissão de sinais do exterior da célula para o seu núcleo. Esta sinalização começa quando moléculas do meio extracelular (fatores de crescimento liberados por outras células, moléculas de adesão e interação intercelular, etc.) se prendem a receptores específicos presentes na superfície celular. Estes receptores atravessam a membrana celular de modo que uma extremidade permaneça no espaço extracelular e a outra se projeta no interior da célula, no citoplasma. Quando uma destas moléculas ligantes se prende a um receptor, este receptor emite sinais, por meio de proteínas, que propagam no citoplasma até alcançar o núcleo celular onde vão desencadear diferentes respostas, entre elas o crescimento e a diferenciação celular. Dentro do núcleo, proteínas conhecidas por **fatores de transcrição** respondem a estes sinais, ativando os protooncogenes que conduzem a célula ao longo do seu ciclo celular. Estas seqüências de reações envolvendo proteínas são chamadas de rotas estimuladoras de crescimento.

O crescimento da célula torna-se desregulado quando mutações nos protooncogenes (que se transforma em oncogene) mantém as rotas estimuladoras constantemente ativas mesmo quando deveriam estar inativas. Estas mutações podem levar a vários tipos de comportamento aberrantes nas células. Alguns oncogenes forçam as células a produzirem quantidades excessivas de fatores de crescimento como, por exemplo, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) que são liberados em grandes quantidades por **sarcomas** e **gliomas** e fatores de crescimento transformante alfa (TGF- α) liberados por muitos outros cânceres. Esses fatores geralmente atuam em células da vizinhança da célula que os produziu (**estimulação parácrina**) e, o que é mais importante, também podem atuar na própria célula que os gerou (**estimulação autócrina**). Também foram identificadas versões oncogênicas dos genes que codificam os receptores das células. Os receptores anormais liberam sinais proliferativos para o citoplasma mesmo na ausência de fatores de crescimento externos. Por exemplo, células cancerosas da mama, de glândulas salivares e do ovário freqüentemente exibem receptores moleculares codificados pelo gene *Erb-B2*¹ que se comportam desta maneira anômala. Outra classe importante de oncogenes, os genes da família *ras*, perturbam parte da cascata de sinais que se propaga no citoplasma, mantendo a transcrição de sinais estimuladores constantemente ativa, mesmo quando

¹Genes são escritos em itálico e seus produtos, as proteínas, são escritos em formato normal.

nenhum dos receptores está ativo. Proteínas ligadas ao gene *ras* são encontradas na maioria dos tumores humanos, incluindo carcinomas de cólon, pâncreas e pulmão. Existem ainda oncogenes, tais como os da família *myc*, que alteram as atividades dos fatores de transcrição dentro do núcleo. As células normalmente só produzem os fatores de transcrição Myc quando estimuladas por fatores de crescimento externos. Uma vez produzidas, as proteínas Myc ativam genes que fazem as células seguir em seu processo de crescimento. Altas concentrações da proteína Myc são encontradas em vários tumores malignos mesmo quando nenhum fator de crescimento está presente.

2.1.2 Insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento

No entanto, para tornarem-se malignas, as células devem, além de estimular sua maquinaria promotora de crescimento, evadir ou ignorar sinais para cessar o crescimento emitidos por suas vizinhas normais, entre outros vários tipos de resposta adaptativa. Os processos envolvidos nas mensagens de inibição de crescimento em células normais são iguais aos descritos para os sinais estimuladores, e são chamados de rotas inibidoras de crescimento. Sinais inibidores de crescimento podem bloquear a proliferação de maneiras distintas. As células podem ser mantidas fora do ciclo ativo de proliferação em um estado quiescente do qual ela pode emergir novamente quando os sinais extracelulares permitirem ou aí permanecerem por toda a vida. Alternativamente, as células podem ser induzidas a entrar em estados pós-mitóticos geralmente associados com a aquisição de propriedades específicas associadas com diferenciação ou ainda serem eliminadas por apoptose.

Nas células cancerosas, alguns genes supressores de tumor importantes estão inativos ou ausentes, de modo que a célula não responde aos sinais de interrupção do processo de divisão. Um dos mais bem estudado destes sinais é o gerado pelo fator de crescimento transformantes beta (TGF- β) que pode interromper o crescimento de células normais. Contudo, vários tipos de tumores são indiferentes a esta substância como, por exemplo, cânceres de cólon e de pâncreas. Proteínas supressoras de tumor podem coibir a proliferação de muitas outras maneiras. Algumas, por exemplo, bloqueiam o fluxo de sinais ao longo das rotas estimuladoras de crescimento. Um destes supressores é a proteína NF-1 que pode anular a proteína Ras antes que ela emita sinais estimuladores de crescimento. A ausência dos genes supressores de tumor é importante no surgimento do câncer é comprovada por vários estudos que mostram que a introdução destes genes em células cancerosas pode restaurar o grau de normalidade

da célula. Uma esquema dos processos de sinalização é mostrado na figura 2.2.

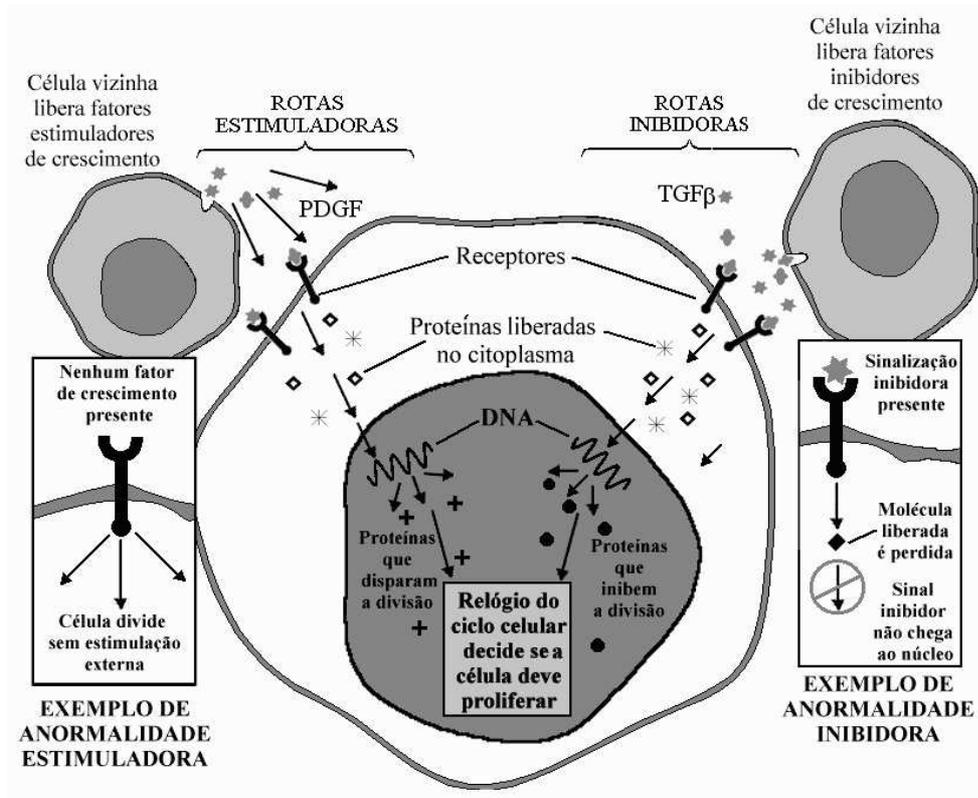


Figura 2.2: Rotas sinalizadoras em células normais levam sinais externos estimuladores ou inibidores de crescimento até o núcleo da célula. Na figura são esquematizados dois tipos de rotas: estimuladoras (esquerda) e inibidoras (direita). Estas rotas constituem uma cascata de reações moleculares, produzindo proteínas e outras substâncias que chegam até o núcleo onde existe um mecanismo molecular, conhecido por relógio do ciclo celular, que coleta esses sinais e decide se a célula deve ou não se dividir. Células cancerosas proliferam excessivamente quando mutações genéticas perturbam estas rotas fazendo que as rotas estimuladoras estejam constantemente ativas (*caixa à esquerda*) ao mesmo tempo em que as rotas inibidoras estão inativas (*caixa à direita*).

Ao atingir o núcleo da célula, as rotas sinalizadoras atuam no **ciclo celular**, um mecanismo molecular complexo que regula as várias etapas do desenvolvimento da célula. Tal ciclo é desregulado em todos os tipos de câncer conhecidos. Assim, antes de prosseguirmos, é importante entendermos o funcionamento básico do ciclo celular. O ciclo é composto por quatro estágios durante os quais ocorre uma série de reações envolvendo proteínas. Na fase G_1 ('gap' 1), a célula aumenta de tamanho e produz as proteínas necessárias para copiar o seu DNA. Essa cópia é feita no próximo estágio, chamado S (síntese de DNA), quando a célula duplica precisamente seus

cromossomos. Após a fase S , ocorre um segundo período, chamado G_2 , no qual a célula se prepara para a **mitose**, a fase M , na qual ela divide-se para gerar duas cópias idênticas de si mesma. As duas células filhas entram imediatamente na fase G_1 e poderão seguir todo o ciclo novamente ou, alternativamente, interromper o ciclo temporária ou permanentemente, entrando numa fase denominada G_0 (figura 2.3), estado no qual encontra-se a maioria das células no nosso corpo. Existem ainda vários pontos de restrição no ciclo celular, nos quais determina-se se a célula deve prosseguir o ciclo ou interrompe-lo para que erros sejam corrigidos. Na figura 2.3, ilustramos dois pontos de restrição, G_1/S e G_2/M , que controlam as passagens da fase inicial G_1 para a fase S e da fase G_2 para a fase M , respectivamente. No primeiro ponto de restrição verifica-se, por exemplo, se a célula atingiu tamanho suficiente e no segundo verifica-se, por exemplo, se a cópia do DNA foi feita corretamente. O controle do ciclo celular é feito principalmente por duas classes de proteínas: as cdk (**cinases dependentes de ciclina**) e as ciclinas, que se ligam às cdk e juntas controlam a taxa de ativação das proteínas responsáveis por inúmeros fenômenos que ocorrem na divisão celular, como por exemplo a replicação de DNA.

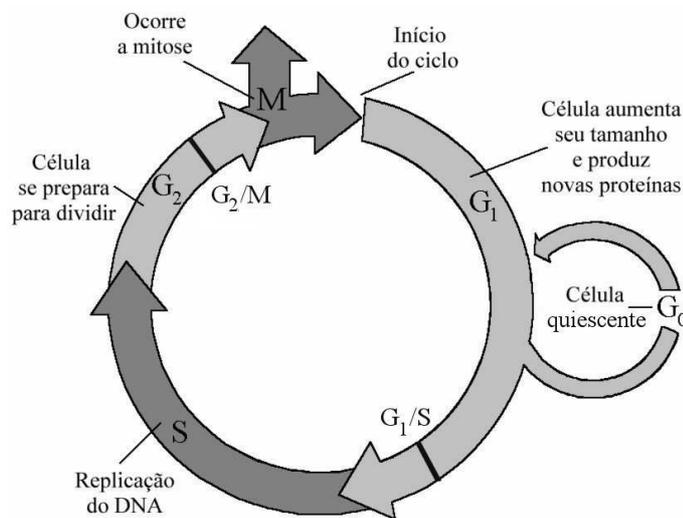


Figura 2.3: Etapas do ciclo celular: na fase G_1 a célula aumenta seu tamanho e produz as proteínas necessárias para a duplicação do DNA, que ocorre na fase S ; na fase seguinte, G_2 , a célula prepara-se para a fase M na qual ela divide-se em duas (mitose). A célula pode ainda entrar num estado quiescente denominado G_0 . Existem vários pontos de restrição no ciclo celular, dois dos quais são o G_1/S e o G_2/M .

Dois genes supressores de tumor têm papel fundamental na controle da divisão durante o ciclo celular, especialmente nos pontos de restrição. São eles os genes *Rb* e

p53. A pRb ativa, presente nas células quiescentes, se liga aos fatores de transcrição impedindo a ação destes na divisão celular. Quando a célula recebe sinais mitogênicos, as cdk promovem a inatividade da pRb, tornando os fatores de transcrição livres para se ligar ao DNA e estimular a divisão. Após a mitose, a pRb retorna ao seu estado ativo. A pRb atua na progressão da fase G_1 para a fase S do ciclo celular e, portanto, constitui um freio da divisão celular. Agora, fica claro como a perda de função do gene pRb leva à proliferação descontrolada, fato observado frequentemente em muitos cânceres, como carcinomas da mama, pulmão, bexiga e próstata. A segunda proteína citada (p53) está envolvida em diversos processos do ciclo celular. Sua função mais conhecida está relacionada com a fidelidade da replicação do DNA. Quando as células são agredidas por agentes mutagênicos (substâncias químicas, radiações, etc.), a p53 induz a síntese da proteína p21, uma inibidora do complexo cdk-ciclina; a inibição de cdk mantém a pRb ativa e não permite a liberação de fatores de transcrição, bloqueando a célula na fase G_1 do ciclo celular. Esta parada permite que os sistemas de reparo de DNA corrijam o defeito provocado, impedindo a sua propagação para as gerações seguintes. Quando os danos do DNA não podem ser reparados, a p53 induz a morte celular programada (apoptose), que será discutida a seguir. Devido à esta função de preservar a integridade do DNA, o gene *p53* é conhecido como o “guardião do genoma”. Embora uma única mutação não seja suficiente para gerar uma célula transformada, a privação da rota de sinalização p53 predispõe células à mutações adicionais gerando instabilidade no genoma e, conseqüentemente, à transformação em uma célula maligna.

2.1.3 Evasão da morte celular programada (apoptose)

Até aqui, foi discutido como falhas no sistema de estimulação e inibição de proliferação podem levar a divisões que não deveriam ocorrer. Contudo, as células do corpo humano são dotadas de um sistema programado de segurança gravado no seu genoma que leva à morte celular programada (apoptose) se alguns dos seus componentes essenciais são danificados ou seus respectivos controladores são desregulados. Por exemplo, danos no DNA, criação de oncogenes, desativação de genes supressores de tumor e falhas na transcrição durante a fase S do ciclo celular podem levar à apoptose. O programa de apoptose está presente de forma latente em virtualmente todos os tipos celulares do nosso corpo. Quando disparado por uma grande variedade de sinais fisiológicos, os respectivos genes do programa apoptótico são ativados e resul-

tam em uma seqüência precisa de eventos após os quais a célula morta é **fagocitada** pelas vizinhas no tecido e desaparece dentro de 24 horas.

Embora a destruição da célula danificada seja ruim para a própria célula, é boa para o organismo como um todo, pois o risco pertinente às mutações carcinogênicas é muito maior que o pequeno preço pago pela perda de uma única célula. A importância da apoptose no surgimento dos tumores torna-se evidente em experimentos com camundongos transgênicos nos quais o gene pRb foi inativado. Observou-se que os tumores cresciam lentamente, exibindo uma alta taxa apoptótica; a inativação adicional da proteína p53 (essencial na sinalização de apoptose) gera tumores que crescem rapidamente e com baixas taxas de apoptose. Células cancerosas desenvolvem várias maneiras de superar os mecanismos de apoptose, como a desativação das proteínas que disparam o suicídio celular, entre elas a p53, e a produção excessiva de outras proteínas, destacando-se a Bcl-2, que diminuem a eficiência da apoptose. No entanto, a fonte mais comum de evasão de apoptose envolve mutações no gene supressor de tumor *p53*. De fato, a proteína p53 é inativa em mais de 50% dos cânceres humanos. Uma conseqüência da deficiência dos mecanismos de apoptose em células cancerosas é o aumento da sua resistência à radiação e/ou à quimioterapia: tratamentos convencionais que visam destruir células cancerosas através de danos no seu DNA. Na verdade, os danos provocados por estes tratamentos são, na maioria das vezes, apenas capazes de induzir a apoptose e não de destruir a célula diretamente.

2.1.4 Potencial de replicação ilimitado (telomerasas)

Existe ainda um segundo mecanismo fundamental de defesa contra proliferação acelerada bastante distinto do programa de apoptose. Este mecanismo limita o número total de vezes que uma célula pode se reproduzir. O aparato molecular que limita o número de divisões está relacionado com segmentos de DNA nas extremidades dos cromossomos conhecidos **telômeros**. A função dos telômeros é proteger as extremidades dos cromossomos impedindo a fusão entre eles, o que levaria a uma desordem genética certamente fatal para a célula. A cada divisão, os telômeros são encurtados um pouco durante a replicação dos cromossomos que ocorre na fase *S* do ciclo celular. Quando o comprimento dos telômeros fica menor do que um determinado limiar, é disparado um sinal que instrui a célula para entrar em um estado denominado **senescência**, onde ela cessa suas proliferações. Quando as células conseguem evitar a senescência e continuam se dividindo e conseqüentemente diminuindo o comprimento dos telômeros,

elas entram num estado chamado **crise**, no qual os cromossomos começam a se fundir provocando a morte da célula. Seria de se esperar que células com crescimento desregulado deveriam interromper seus ciclos de divisão antes do tumor tornar-se muito grande, já que experimentos com células embrionárias humanas em cultura mostram que as células podem se dividir no máximo de 50 a 60 vezes antes de entrar na senescência ou crise. Mas esses mecanismos de defesa são inativados durante o desenvolvimento da maioria dos cânceres, em razão da ativação de um gene que codifica a enzima **telomerase**. Esta enzima, ausente na maioria das células saudáveis, repõe os segmentos de DNA dos telômeros que foram perdidos durante cada ciclo de divisão celular. Assim, células cancerosas mantêm a integridade dos seus telômeros e por isso são capazes de replicar-se indefinidamente.

Nesta seção foram discutidos alguns dos aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares, que explicam a proliferação desregulada e a capacidade de sobrepujar as defesas impostas pelo organismo contra este crescimento excessivo que é característico dos estágios iniciais de progressão do câncer. Contudo, duas outras características são determinantes para definir o grau de agressividade da doença. São elas: as *metástases* e a *angiogênese tumoral auto-sustentada* discutidas separadamente na próxima seção.

2.2 Aspectos fundamentais do câncer

2.2.1 Invasão e metástases

Células cancerosas tornam-se completamente malignas quando desenvolvem mecanismos que lhes permitem superar todas as barreiras fisiológicas impostas pelo organismo contra o seu desenvolvimento. Uma das características mais importantes para se determinar o grau de malignidade de um tumor é a invasividade e capacidade de produzir metástases, nome dado à disseminação de células cancerosas em várias partes do corpo, formando tumores secundários em tecidos e órgãos distantes do sítio de origem do tumor. Se um **tumor primário** é identificado precocemente e removido antes que ocorram metástases, o câncer será erradicado completamente. Contudo, se metástases microscópicas, ou tumores secundários, já estiverem presentes na época do diagnóstico o prognóstico é grave e essas metástases provavelmente irão desenvolver-se e tornar-se fatais. De fato, metástases são a causa de 90% das mortes causadas por câncer em humanos.

A produção de metástases é um processo ativo e não uma consequência aciden-

tal do crescimento do tumor. Para metastatizar com sucesso, as células cancerosas precisam superar uma série de barreiras fisiológicas que dividimos em três etapas. As células cancerosas precisam (1) modificar suas propriedades de perder adesão e coesão, (2) promover invasão local e (3) invadir o sistema circulatório (sangüíneo ou linfático) e posteriormente sair dele. Esta divisão é meramente ilustrativa pois todas estas etapas estão fortemente correlacionadas e envolvem aspectos genéticos e bioquímicos que ainda não são completamente compreendidos.

Em tecidos normais, as células aderem-se umas às outras e também à matriz extracelular (MEC). A MEC, ou **interstício**, é constituída principalmente por **colágeno** que fica misturado com outras substâncias entre elas a fibronectina e a lamina, as principais moléculas de adesão entre células e a MEC. A adesão entre células depende de vários fatores, entre eles, de uma categoria de proteínas chamadas de **caderinas**, das quais a caderina E (de epitélio) é das mais estudadas em relação às células malignas. Ambas as interações de adesão levam sinais reguladores que influenciam as atividades celulares para o interior da célula. Por exemplo, a ausência de adesão com a MEC inibe a proliferação celular ao mesmo tempo que a privação de adesão com o interstício de origem pode disparar a apoptose (fenômeno conhecido por **dependência de ancoragem**). Nas células cancerosas ambos os mecanismos de adesão são desregulados. Por exemplo, vários tipos de câncer perdem parte ou todas as moléculas caderina E. A importância da caderina E é demonstrada por experimentos *in vitro* em que o seu bloqueio transforma uma linhagem de células não invasivas em invasivas. Por outro lado, em experimentos *in vivo* com camundongos, a restauração de caderina E em células cancerosas que não a expressam pode remover sua habilidade de produzir tumores secundários. Células cancerosas também mostram-se capazes de ignorar a dependência de ancoragem devido à aquisição de oncogenes cujos produtos emitem mensagens falsas para o núcleo, indicando que a célula está devidamente ancorada ou que lhe permitem multiplicar sem depender da ancoragem.

Dependência de ancoragem é apenas uma das barreiras que a célula cancerosa deve superar para se disseminar pelo corpo. Por exemplo, **células epiteliais**, a fonte mais comum de câncer, são separadas do restante do corpo por uma **membrana basal**, uma camada fina e resistente de colágeno tipo IV (veja figura 2.1), que forma uma barreira impenetrável para a maioria das células normais, mas que pode ser rompida por células cancerosas. Além disso, para gerar tumores secundários, células cancerosas precisam invadir uma segunda camada de MEC (o interstício conjuntivo) até atingir os vasos sanguíneos (ou linfáticos), onde encontram outra membrana basal revestindo

o vaso. Esta membrana separa as **células endoteliais**, que formam a parede interna dos vasos do restante do **estroma**. Penetrando esta segunda membrana basal e a camada de células endoteliais, a célula cancerosa tem acesso à corrente sanguínea e pode ser levada para outras partes do corpo. No esquema dos tecidos epiteliais mostrado na figura 2.1, o estroma representa todo tecido abaixo da membrana basal.

O processo de invasão da MEC, que precede as metástases, envolve a produção e ativação de uma série de enzimas e também a reestruturação do **citoesqueleto** para a formação de pseudópodes nas células cancerosas. Estas enzimas são responsáveis pela degradação da MEC. Entre as principais substâncias que participam do processo de invasão, destacam-se as **metaloproteinases da matriz** (MMP), enzimas que degradam a MEC; os **inibidores teciduais de metaloproteinases** (TIMP), substâncias que inibem metaloproteinases; uPAs, enzimas inertes produzidas por células endoteliais e **fibroblastos** do estroma normal; entre outras. Ao invadir a MEC, a célula cancerosa forma pseudópodes. A ponta deste pseudópode contém a MMP ativa chamada MT1 (MT1-MMP) que, na presença de um determinado TIMP, conhecido por TIMP-2, torna-se um receptor e ativador de uma outra metaloproteinase (MMP-2) produzida por fibroblastos e células endoteliais do estroma. Algo semelhante acontece com a **proteínase** uPA que torna-se ativa devido à uma cooperação entre o seu receptor (uPAR) e integrinas localizados na superfície do pseudópode. Por outro lado, a proteólise (degradação) da MEC libera fatores de crescimento e outras proteínas que alteram a adesão, a ancoragem e a arquitetura do citoesqueleto, e liberam moléculas sinalizadoras tais como as cinases de adesão local (FAKs). Este complexo confina o campo enzimático à parte da frente da célula invasora, mantendo intacta o restante da célula e preservando as moléculas de adesão necessárias para tração celular. Enquanto a célula invasora migra através da MEC, o complexo de enzimas, moléculas inibidoras e receptoras da frente de invasão alternam entre adesão, liberação e proteólise. Além disso, a direção de invasão pode ser influenciada por quimio-atratores e pela construção de rotas preferenciais de adesão. Atratores locais incluem fatores de crescimento de **hepatócitos** (HGF), que estimulam a mobilidade celular quando se prendem ao receptor Met; fragmentos de matriz degradados, que são reconhecidos pelas integrinas; ou **citocinas** e fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidérmico (EGF) e TGF- β , liberados pela matriz degradada (figura 2.4). Este último parágrafo demonstra a grande complexidade envolvida nos processos de invasão das células cancerosas, nos quais tanto células cancerosas quanto as normais (induzidas pelas cancerosas) participam. Além dos produtos da degradação,

células cancerosas produzem um **fator de motilidade autócrino** que auxilia a sua locomoção. Estes fator se liga a receptores específicos na superfície celular e estimula a movimentação dessas mesmas células. A principal propriedade desta substância, observada apenas em células neoplásicas, é a capacidade de estimular movimento nas próprias células que a produz, ao contrário do que ocorre na migração de células normais como linfócitos do sistema imunológico que precisam ser estimuladas por outros tipos celulares.

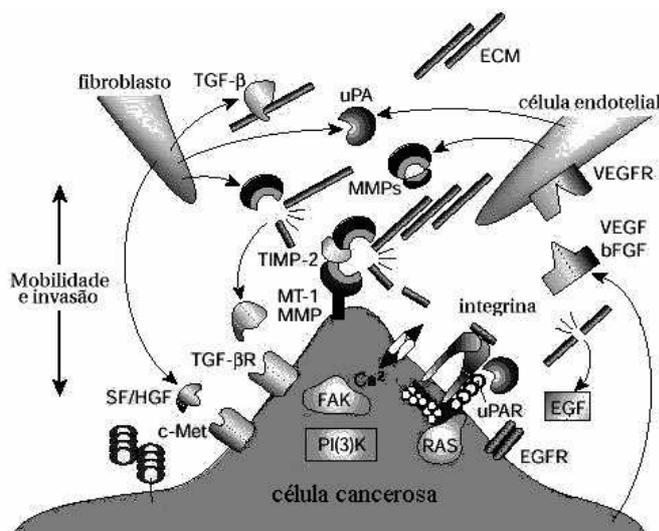


Figura 2.4: Exemplos de mediadores presentes nas interações entre o tumor e o estroma hospedeiro. Fibroblastos produzem quimio-atratores tais como SF/HGF, que estimulam a mobilidade de células cancerosas ao se ligarem ao receptor Met. Células cancerosas produzem fatores de angiogênese como VEGF e bFGF, que se ligam aos receptores das células vasculares do estroma e causam aumento na permeabilidade vascular, proliferação, migração e invasão endotelial. Fibroblastos e células endoteliais elaboram enzimas latentes, incluindo MMP e uPAs, que se ligam na superfície do pseudópode invasor e tornam-se ativas degradando, portanto, a MEC. A degradação da MEC libera fatores de crescimento como TGF- β e EGF, que se ligam aos respectivos receptores (TGF- β R e EGFR) na célula cancerosa. *Figura adaptada da referência [5].*

Após invadir o interstício conjuntivo e ganhar uma via de disseminação, as células neoplásicas podem ser transportadas para outros sítios do tecido ou órgãos. A última etapa na formação das metástases consiste na chegada das células neoplásicas a um setor do organismo e sua proliferação, o que implica que as células devem deixar o vaso e penetrar nos tecidos. Este processo inicia-se pela adesão das células tumorais a moléculas específicas no endotélio vascular (tecido que reveste as paredes internas

dos vasos sanguíneos) e tem grande semelhança com a exsudação de leucócitos que ocorre durante a reação inflamatória. Então, as células devem penetrar novamente a parede do vaso, escapando do sistema circulatório com a possibilidade de produzir um novo tumor secundário. No entanto, menos que uma em 10^4 células que deixam o tumor primário e entram no sistema circulatório conseguem sobreviver para originar uma nova massa tumoral em outro tecido. Dentro do sistema circulatório, células cancerosas são particularmente vulneráveis à destruição pelo sistema imunológico.

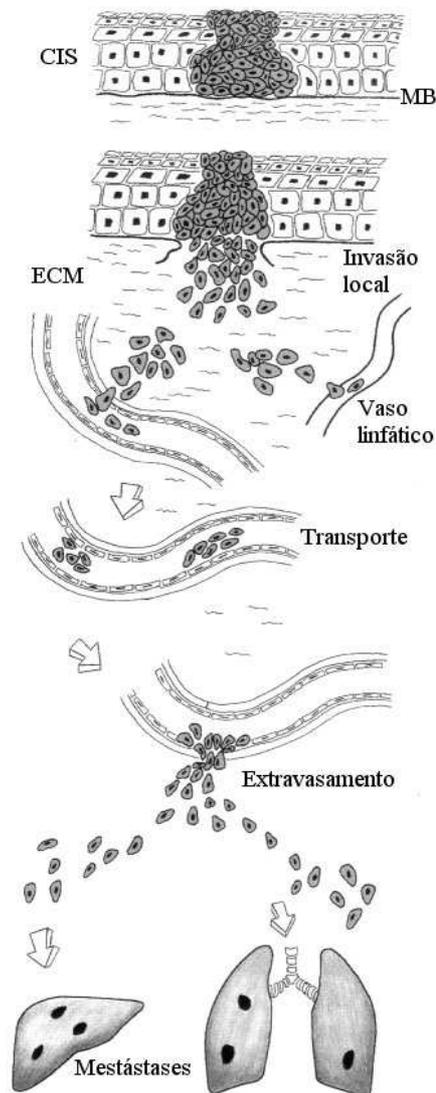


Figura 2.5: Formação de metástases por via sanguínea ou linfática. MB=membrana basal; CIS=carcinoma *in situ*; MEC=matriz extracelular. *Figura retirada da referência [36].*

Os fatores que determinam onde as células malignas devem deixar o vaso e se implantar em um certo órgão não são totalmente conhecidos. Parte destes fatores

estão relacionados à localização anatômica do tumor primário e outra parte são fatores inerentes à célula neoplásica. Por exemplo, subpopulações celulares que geram metástases pulmonares parecem ser capazes de reconhecer componentes específicos desse órgão. Quando injetadas na circulação, estas células dão metástases no pulmão e em enxertos de **parênquima** pulmonar implantados em diferentes locais, mas não originam metástases em enxertos de outros órgãos. A figura 2.5 ilustra a processo de formação de metástases a partir de um carcinoma.

2.2.2 Angiogênese tumoral auto-sustentada

Outra característica fundamental das células cancerosas é sua capacidade de induzir o crescimento de capilares para suprir a escassez de nutrientes dentro do tumor e aumentar os níveis de fatores de crescimento estimuladores de divisão trazidos pelos capilares. Esta proliferação de novos capilares é chamada de angiogênese ou neovascularização. Tumores que medem até 1 – 2 mm podem receber nutrientes somente por difusão. A partir deste tamanho, os tumores dependem de vasos sanguíneos próprios, pois sem eles suas células entram em degeneração e **necrose**. Ao lado disso, as metástases são facilitadas pela grande abundância de vasos próximos às células cancerosas aumentando em muito a chance delas penetrarem no sistema circulatório. Por tudo isso, a angiogênese assume papel de grande importância no desenvolvimento e disseminação do câncer.

Em condições normais, o tamanho ou número de capilares nos tecidos não aumenta pois as células endoteliais que os revestem não se dividem. Mas em alguns casos - por exemplo, durante a menstruação ou cicatrização de feridas - estes vasos proliferam rapidamente. Estes processos são de curta duração e desativados após um determinado tempo. Células cancerosas também podem promover angiogênese. De fato, a neovascularização é um passo crucial na transição do tumor de um aglomerado pequeno e inofensivo de células modificadas para a **neoplasia** maligna, capaz de se espalhar para outros órgãos do corpo. A figura 2.6 ilustra o crescimento do tumor à medida que ele se torna vascularizado.

Tumores induzem o crescimento de novos vasos, a partir de vasos pré-existentes, por meio de um mecanismo molecular no qual as células tumorais liberam fatores angiogênicos de tumor (TAFs), e paralelamente reduzem os níveis de **inibidores de angiogênese**, proporcionando a divisão das células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. De fato, a neovascularização em tumores resulta das diferenças

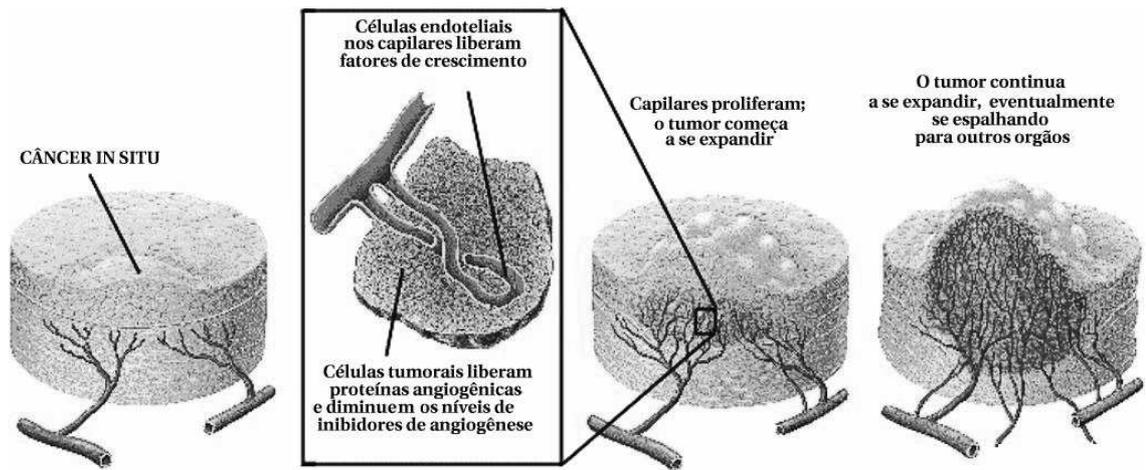


Figura 2.6: Angiogênese tumoral: tumores que não induzem neovascularização atingem apenas tamanhos pequenos que não oferecem riscos ao paciente. Ao liberar fatores de angiogênese tumoral e suprimir os inibidores angiogênicos, um tumor induz o crescimento de novos capilares que lhe fornecerão nutrientes e fatores de crescimento necessários para o seu crescimento. Com grande disponibilidade de capilares próximos às células cancerosas, as metástases tornam-se iminentes. *Figura adaptada da referência [34].*

entre as concentrações de moléculas pró e antiangiogênicas que podem ser produzidas por células cancerosas, células endoteliais, células do estroma, sangue e pela matriz extracelular. Como na invasão de células cancerosas, a angiogênese tumoral envolve contribuições tanto das células neoplásicas quanto de células do estroma hospedeiro.

Os mensageiros angiogênicos mais estudados são o fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFb) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O FGFb é quimiotático e mitogênico para células endoteliais, além de induzir enzimas que favorecem a penetração de brotamentos endoteliais no estroma. O VEGF estimula o crescimento de células endoteliais, sendo produzido por diversos estímulos como **hipóxia**, deficiência de glicose e citocinas. Essas moléculas ligam-se a receptores específicos nas células endoteliais dos capilares e as informam que elas devem reproduzir-se e mover-se em direção ao tumor. Seguindo essas instruções, células endoteliais se combinam para formar um broto, que cresce e se re-arranja para levar ao tumor às estruturas de nutrição necessárias. Assim, a distribuição temporal e espacial de nutrientes é fortemente afetada pela neovascularização dos tumores. Existem inúmeros fatores antiangiogênicos, entre os quais destacam-se a **trombospondina**, **endostatina** e a **angiostatina**.

Quanto à sua arquitetura, os vasos tumorais são estrutural e funcionalmente

anormais. Ao contrário dos vasos normais, a vasculatura do tumor é altamente desorganizada, os vasos são tortuosos e dilatados, sem diâmetro definido, com excesso de ramificações. Conseqüentemente, o fluxo nestes capilares é desordenado e variável levando à formação de regiões ácidas e hipóxicas no tumor. Essas condições diminuem a eficiência terapêutica, modulam a produção de estimuladores e inibidores angiogênicos e selecionam células cancerosas mais agressivas e aptas para metastatizar.

2.3 Considerações finais

Neste capítulo descrevemos seis propriedades que devem ser adquiridas ao longo da progressão de um tumor maligno. As evidências disponíveis sugerem que a maioria destas propriedades é adquirida, direta ou indiretamente, por meio de mudanças no genoma das células. Embora sejam muito freqüentes, mutações de genes específicos tornam-se processos pouco eficientes devido à constante manutenção da integridade do genoma por meio do monitoramento e reparo de DNA que corrige ou elimina células modificadas. No entanto, cânceres aparecem com freqüência considerável na população humana, o que leva a crer em uma componente adicional, além da agressão repetida e o desgaste do sistema imunológico com o tempo, que provoca o aumento das mutações que resultam em uma célula cancerosa. O mau funcionamento de componentes específicos do sistema de vigilância do genoma pode ser usado para explicar este aumento na mutabilidade. O membro mais proeminente deste sistema é a proteína supressora de tumor p53 que, em resposta a danos no DNA, determina se o ciclo celular é suspenso para o reparo do DNA ou se a célula sofre apoptose quando o dano é excessivo. De fato, o funcionamento da sinalização de danos no DNA pela proteína p53 está ausente na maioria, se não em todos, os cânceres humanos. Mesmo assim um tumor levaria algumas décadas para sofrer todas as mutações necessárias para ele tornar-se completamente desenvolvido. No entanto, alguns indivíduos desenvolvem câncer precocemente. Em muitos casos, este aparecimento precoce é explicado por genes mutantes envolvidos com câncer herdado do seu pai ou da sua mãe. Quando o óvulo fertilizado começa a dividir-se, esse gene mutante será transmitido para todas as outras células do corpo. Assim, um evento tipicamente raro torna-se ubíquo, pois a mutação é implantada em todas as células do corpo e não meramente em uma célula ao acaso.

Esperamos que os principais mecanismos da progressão do câncer descritos até aqui estejam claros, principalmente para pessoas pouco familiarizadas com o tema, e

que estes conhecimentos auxiliem a compreensão do restante da tese, que é dedicada ao estudo de modelos matemáticos e/ou computacionais relacionados com a formação, crescimento e desenvolvimento de tumores.

Capítulo 3

Modelos de crescimento de tumores

Modelos que descrevem o crescimento de tumores sempre despertaram o interesse dos cientistas. Os primeiros modelos são equações diferenciais ordinárias (EDOs) que descrevem a evolução temporal do tamanho do tumor. Um dos mais simples é a equação diferencial de Gompertz [38] que descreve qualitativa e quantitativamente o crescimento de muitos tumores. Modelos mais completos de equações diferenciais parciais (EDPs) e/ou equações integro-diferenciais são atualmente os tipos mais estudados pelos matemáticos [14]. Com o aparecimento e aperfeiçoamento dos computadores, as simulações computacionais tornaram-se uma ferramenta muito usada no estudo desses modelos e, além disso, proporcionaram o estudo de modelos discretos de grande interesse na Física, tais como os modelos de Eden [8] e de Willians & Bjerknes [22]. Neste capítulo, dividido em três seções, serão apresentados alguns modelos de crescimento de tumores que consideramos importantes para a tese. Na seção 3.1, modelos discretos são apresentados enquanto os modelos contínuos são apresentados na seção 3.2. Na seção 3.3, dois modelos recentes da literatura de Física, que estudam a formação de morfologias fractais em tumores, são descritos e seus resultados discutidos.

3.1 Modelos discretos

3.1.1 A classe de modelos de Eden

O primeiro modelo discreto para descrever o crescimento de tumores foi proposto por Eden em 1961 [8]. O modelo é definido numa rede de dimensão d onde sítios ocupados representam as células cancerosas e sítios vazios representam as células normais. Todos os sítios estão inicialmente vazios, exceto o centro da rede, simulando o crescimento a

partir de uma única célula maligna. Os sítios de interface são definidos como aqueles que possuem pelo menos um vizinho de tipo oposto. Existem três variações básicas nas regras de crescimento do modelo de Eden. Na versão Eden A, sítios da periferia do tumor (sítios de interface pertencentes ao tumor) são escolhidos ao acaso, com igual probabilidade, e um dos seus vizinhos vazios, também escolhido ao acaso, é ocupado. Na versão original, conhecida por Eden B, células normais da interface são escolhidas com igual probabilidade e substituídas por células cancerosas. Finalmente, na versão Eden C, um sítio da periferia do tumor é escolhido com igual probabilidade e todos os seus vizinhos vazios são ocupados. O procedimento de adicionar sítios ao aglomerado é repetido até se atingir o número de células desejado. Todas as versões geram padrões esféricos com borda rugosa que possuem buracos e reentrâncias (figura 3.1(a)). Verifica-se que as propriedades de escala das superfícies independem da versão particular usada mas que a taxa de aproximação do comportamento assintótico depende [39].

As quantidades importantes para esse modelo são o número de células cancerosas na borda do tumor (S), o raio de giração (R_g) e a espessura da superfície (W). R_g é definido por

$$R_g = \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\vec{r}_i - \vec{r}_{cm})^2 \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (3.1)$$

onde a soma se estende sobre todas as n células cancerosas, \vec{r}_i a posição da i -ésima célula cancerosa e \vec{r}_{cm} é o centro de massa do tumor (conjunto de sítios ocupados). Espera-se uma relação de escala $R_g \sim n^\nu$, onde ν é o inverso da dimensão fractal d_f [39]. Por outro lado, W é definido por

$$W = \left[\frac{1}{S} \sum_{i=1}^S (r_i - \bar{r})^2 \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (3.2)$$

onde a soma é feita sobre todos os S sítios de periferia, r_i é a distância do i -ésimo sítio de periferia ao centro de massa e \bar{r} é o raio médio do padrão

$$\bar{r} = \frac{1}{S} \sum_{i=1}^S r_i. \quad (3.3)$$

Novamente, são esperadas leis de escala $W \sim n^\delta$ e $S \sim n^\sigma$. A simetria esférica dos padrões de Eden leva aos expoentes triviais $\nu = \sigma = 1/2$. Contudo, o valor

do expoente δ indica a existência de várias escalas relevantes [40]. Por exemplo, simulações de aglomerados com $n < 10^6$ gerados com o modelo Eden B na rede quadrada indicam o valor $\delta \approx 0.18$ [41] enquanto simulações com grandes aglomerados ($n = 5 \times 10^9$) [40] mostram que W escala assintoticamente com a raiz quadrada de n , ou seja, $\delta = 1/2$.

Outros modelos de crescimento de tumores foram construídos a partir de generalizações da proposta de Eden. Willians & Bjerknes construíram um modelo [22] (modelo WB) para descrever o crescimento de tumores na camada basal de um epitélio. Nele, as células da borda do tumor, além de dividir-se (ocupar um sítio vizinho normal), também podem ser substituídas por células normais. As células cancerosas dividem-se mais frequentemente que as normais por um fator κ , que representa a vantagem carcinogênica. A regra de crescimento, como no modelo de Eden, é muito simples: uma das ligações entre dois tipos opostos é escolhida aleatoriamente com igual probabilidade; a célula normal dessa ligação é substituída por uma célula cancerosa, com probabilidade g , ou a célula cancerosa é substituída por uma normal com a probabilidade complementar $r = 1 - g$. Em termos da vantagem carcinogênica κ , estas probabilidades podem ser escritas como

$$g = \frac{\kappa}{\kappa + 1} \quad (3.4)$$

e

$$r = \frac{1}{\kappa + 1}, \quad (3.5)$$

onde usamos $g = \kappa r$. O limite $k = \infty$ corresponde ao modelo de Eden B, quando $g = 1$ e $r = 0$.

Nós estudamos uma outra generalização do modelo Eden na rede quadrada que inclui, além de morte e divisão celular, a migração das células cancerosas para os sítios vizinhos [23]. Nesse modelo uma célula da periferia é escolhida com igual probabilidade e poderá morrer, dividir ou mover-se com probabilidades p_{del} , p_{div} ou p_{mov} , respectivamente, que obedecem à condição de normalização $p_{del} + p_{div} + p_{mov} = 1$. Na morte celular, a célula cancerosa é substituída por uma normal. Na divisão, a célula cancerosa gera um clone de si mesma que invade um sítio vizinho ocupado por célula normal escolhido ao acaso. Por fim, quando a célula se move ela troca de posição com uma vizinha normal escolhida ao acaso.

Tanto o modelo WB quanto o modelo com movimento celular fornecem os

mesmos expoentes ν e σ encontrados para modelo de Eden. O valor assintótico $\delta = 1/2$ não foi obtido nas simulações desses modelos, mas as comparações com os valores obtidos para δ no modelo de Eden em várias escalas mostram um comportamento semelhante, de onde espera-se que o valor assintótico de δ também deva ser $1/2$ [23]. Na figura 3.1 são mostrados padrões de crescimento para os três modelos descritos até aqui. Note a diferença nas estruturas das bordas de cada padrão, e que a inclusão de morte e/ou movimento aumenta a fração de células de periferia.

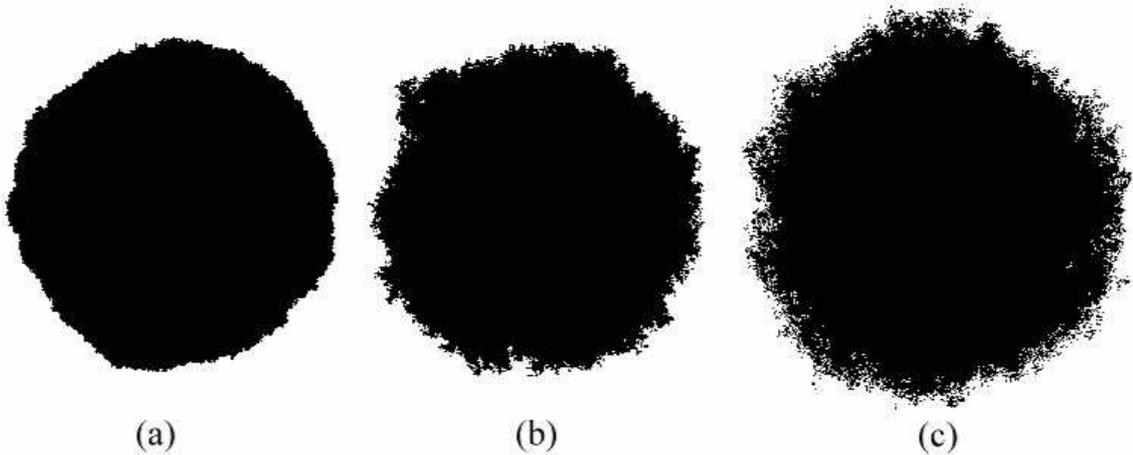


Figura 3.1: Modelos estocásticos discretos de crescimento de tumores. Padrões com 10^5 células gerados pelos modelos de (a) Eden A, (b) Willians & Bjercknes com $k = 0.53$ e (c) Ferreira & Martins com $p_{del} = 0.24$, $p_{div} = 0.26$ e $p_{mov} = 0.50$.

Esses modelos explicam a formação de tumores em condições favoráveis de crescimento (por exemplo, abundância de nutrientes), nas quais os tumores formam estruturas compactas aproximadamente esféricas que crescem exponencialmente com o tempo. Contudo, limitações de recursos (nutrientes, oxigênio, etc.), interação de células cancerosas com outras células (normais e cancerosas), entre outros fatores, levam à formação de estruturas não esféricas que, em geral, não podem crescer indefinidamente. Para suprir esta deficiência, outros modelos discretos modelando mais aspectos biológicos foram propostos.

3.1.2 O modelo de Smolle & Stettner

Smolle & Stettner [42] propuseram um modelo estocástico na rede quadrada onde células também podem executar três ações: divisão, morte e movimento com probabilidades p_{div} , p_{del} e p_{mov} , respectivamente, onde $p_{div} + p_{del} + p_{mov} = 1$. Contudo, a implementação das ações é diferente do modelo de Ferreira *et.al.* [23]. Todas as

células podem se dividir: quando as células da periferia dividem-se, as células filhas ocupam um dos vizinhos vazios com igual probabilidade (vizinhos correspondem aos oito sítios mais próximos); quando as células não são da periferia, as células filhas ocupam um dos vizinhos e empurram todas as demais células tumorais na direção desse vizinho até um sítio da borda do tumor ser encontrado. Na morte, a célula é excluída e todas as células numa direção escolhida ao acaso são puxadas no sentido do sítio que foi excluído até o primeiro sítio da borda ser encontrado. Este procedimento impede a formação de buracos dentro do tumor. Por fim, se a ação escolhida é o movimento, as células de periferia (apenas as células periféricas podem se mover) se movem x sítios, no intervalo $1 \leq x \leq DIST$, em uma direção aleatória.

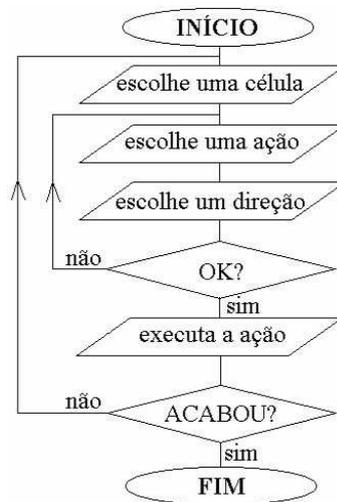


Figura 3.2: Simulação computacional do crescimento de um tumor. O termo “OK?” está perguntando se todas as condições foram satisfeitas.

Outro aspecto biológico desse modelo é a inclusão de fatores de crescimento influenciando as ações celulares. Como foi dito no capítulo 2, fatores de crescimento (GFs) são substâncias produzidas pelas células e responsáveis pela comunicação entre elas. Para cada uma das três ações, um fator de crescimento, derivado das próprias células tumorais (estimulação autócrina) ou do estroma (estimulação parácrina), é considerado. A concentração local de fatores de crescimento c , pertencente ao intervalo $0 \leq c \leq 1$, é definida como a razão entre o número de sítios fontes de GFs (isto é, de células tumorais para fatores autócrinos e de sítios do estroma para fatores parácrinos) e o número total de sítios dentro de uma distância DI (distância de influência). Quando uma ação é escolhida ela será executada ou não com probabilidade local dada por

$$P_{act} = c^{PI}, \quad (3.6)$$

onde PI é um parâmetro chamado de poder de influência e c é a concentração de GFs no sítio da célula escolhida para realizar a ação. A figura 3.2 mostra o esquema da simulação.

As simulações mostram uma diversidade de padrões que variam de estruturas compactas a padrões com células disseminadas, dependendo dos conjuntos de parâmetros usados (figura 3.3). Por exemplo, simulações com alta mobilidade e $DIST$ grande geram padrões desconexos enquanto simulações com alta probabilidade de divisão geram padrões compactos com interface rugosa. Os parâmetros que controlam a influência dos GFs levam a uma diversidade de padrões semelhante.

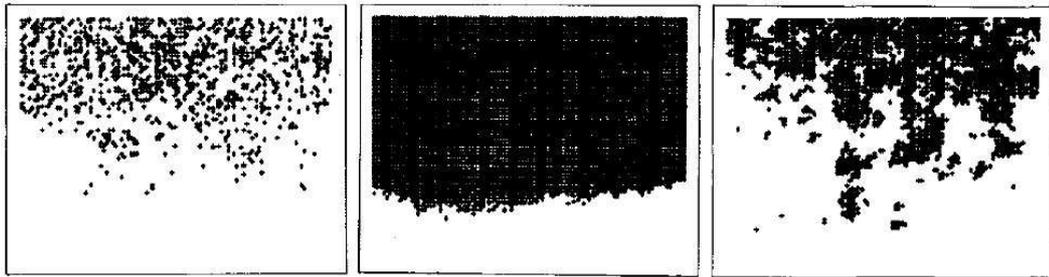


Figura 3.3: Padrões gerados pelo modelo de Smolle & Sttener. *Figuras retiradas da referência original [42].*

A diversidade dos padrões desse modelo é interessante já que morfologias desconexas e compactas são observadas em tumores reais. Contudo, o modelo possui um número grande de parâmetros (12) dificultando o seu controle. No artigo de Smolle & Stettner nenhuma caracterização dos padrões é mostrada. Além disso, existem outras morfologias observadas em tumores que não são reproduzidas por esse modelo como, por exemplo, padrões papilíferos.

3.1.3 Modelos discretos de autômatos celulares

Recentemente, muitos trabalhos têm usado autômatos celulares [43] para modelar o crescimento de tumores. Qi *et al.* [44] consideraram um modelo bidimensional de autômatos celulares que reproduz a lei crescimento de Gompertz, na qual o número de células do tumor N depende do tempo t de acordo com a expressão

$$N(t) = N_0 \exp \left\{ \frac{A}{B} [1 - \exp(-Bt)] \right\}, \quad (3.7)$$

onde N_0 é o volume em $t = 0$ e A e B são parâmetros. Qualitativamente, esta equação é um crescimento exponencial para tempos curtos e satura para tempos longos.

Como nos três primeiros modelos descritos nesta seção, Qi *et al.* assumem que as células podem dividir-se somente se pertencerem à periferia do tumor levando a uma situação não realista em que apenas uma pequena fração das células do tumor podem dividir-se. Além disso, assume-se que as células mortas são simplesmente dissolvidas em lugar de se acumularem em um núcleo necrótico. Outro ponto contra esse modelo é que a transição do estado de proliferação para a quiescência celular é implementado de maneira puramente estocástica, sem considerar hipóteses biologicamente mais razoáveis como, por exemplo, a limitação por nutrientes.

Mais recentemente, Kansal *et al.* [45] propuseram um autômato celular tridimensional para descrever a dinâmica de crescimento de tumores no cérebro. As células no tecido são representadas por mosaicos de Voronoi. Este formalismo elegante permite a preservação da natureza discreta das células e remove a anisotropia das redes regulares. Resultados interessantes emergem desse modelo, tais como, leis de Gompertz para a evolução do tamanho do tumor e a formação de três regiões distintas dentro do tumor: uma estreita camada externa de células proliferativas, uma segunda camada interna de células quiescentes e um núcleo necrótico central.

3.2 Modelos contínuos de crescimento de tumores

3.2.1 Modelos de equações diferenciais clássicos

A maioria dos modelos de crescimento de tumores é constituída de conjuntos de equações diferenciais parciais (EDPs) e/ou equações integro-diferenciais acopladas que descrevem a evolução das populações de células do tumor como variáveis contínuas, excluindo, portanto, o caráter discreto das células. Em geral, esses modelos envolvem um número grande de parâmetros que se torna maior à medida que novos aspectos biológicos são incluídos. Por outro lado, modelos simples de equações diferenciais ordinárias para o crescimento e tratamento de tumores podem ser úteis na captura da essência de interações complexas [46]. O exemplo de EDO mais comum incluindo a limitação do crescimento dos tumores é a equação logística generalizada

$$\frac{dN}{dt} = f(N) = \left(\frac{\mu N}{\nu}\right) \left[1 - \left(\frac{N}{K}\right)^\nu\right], \quad \mu, K > 0, \quad (3.8)$$

onde N é o número de células do tumor e μ , ν e K são parâmetros reais. Esta equação possui um atrator global, para a região $N > 0$, no ponto $N = K$. O caso particular $\nu = 0$ fornece a equação de Gompertz

$$f(N) = -\mu N \ln \left(\frac{N}{K} \right), \quad (3.9)$$

cujas soluções são dadas pela equação (3.7) com os parâmetros A e B re-escritos em termos de K e μ . Modelos de uma EDO são frequentemente usados para descrever o crescimento de tumores experimentais, clínicos e em cultura [46].

Para modelar o tratamento de tumores, uma hipótese muito comum é adicionar um termo extra à equação (3.8)

$$\frac{dN}{dt} = -\alpha c(t)N + f(N). \quad (3.10)$$

Aqui, α é uma constante positiva, a eficiência do agente quimioterápico, e $c(t)$ é a dose de drogas administrada ao tumor.

Os modelos de EDOs não incluem um fator determinante no desenvolvimento dos tumores: a distribuição espacial das células. Na verdade, a quantidade de nutrientes, fatores de crescimento, drogas, etc., que chega até a célula depende da sua posição. Por isso, modelos mais realistas são formulados com EDPs. Nesses modelos, normalmente define-se uma geometria, geralmente esférica, para os tumores. Então, a evolução e distribuição das diversas subpopulações de células cancerosas dentro deste tumor é estudada. Os tumores avasculares são geralmente divididos em três partes [14]: um núcleo necrótico central, uma camada intermediária de células quiescentes e uma camada estreita de células proliferativas (figura 3.4).

A literatura devotada a esses modelos é muito vasta, contudo, alguns trabalhos recentes merecem destaque. Um deles é o artigo de Bellomo & Presiosi [14] que descreve um formalismo geral para a construção de modelos de EDPs para a dinâmica de tumores e suas interações com o sistema imunológico. Neste trabalho são consideradas todas as escalas envolvidas no aparecimento e desenvolvimento de tumores - os níveis sub-celular, celular e macroscópico - bem como a conexão entre cada uma destas escalas com base na chamada teoria cinética celular que fornece uma descrição estatística da evolução de grandes populações celulares. Por sua vez, Levine *et al.* [16] propuseram um modelo de EDPs para descrever os efeitos da angiogênese tumoral no desenvolvimento do câncer e Pettet *et al.* [13] estudaram a migração celular em

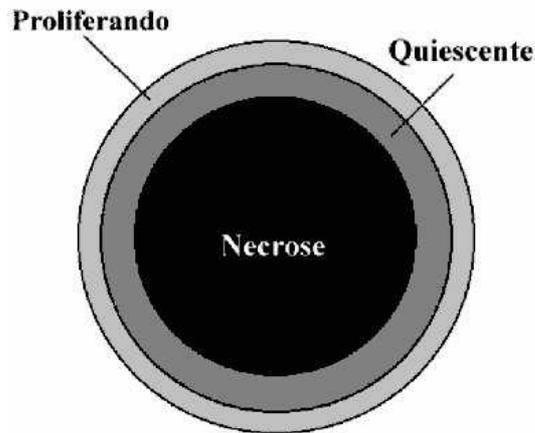


Figura 3.4: Exemplo de uma geometria usual das simulações de modelos de EDPs para o crescimento de tumores. O tumor é dividido em três regiões esféricas: um núcleo necrótico central, uma camada de células quiescentes e uma camada externa de células proliferativas.

tumores esferóides.

Wu *et al.* [15] analisaram o tratamento de tumores com vírus que replicam seletivamente em células cancerosas usando um modelo de EDPs. Os vírus se prendem a receptores específicos na superfície das células cancerosas, invadem-nas e passam a proliferar-se exponencialmente causando, posteriormente, a morte celular (lise). Quando ocorre a lise, as novas partículas de vírus são liberadas e tornam-se disponíveis para infectar novas células cancerosas adjacentes. Nesse modelo o tumor é representado por um esferóide radialmente simétrico contendo células cancerosas infectadas e não infectadas por vírus, células necróticas e vírus livres. As equações do modelo consideram crescimento exponencial para o tumor na ausência de vírus, infecção de células cancerosas e a morte de células infectadas que se transformam em células necróticas. Os vírus são administrados em doses únicas e a sua difusão ocorre apenas durante a lise quando as partículas de vírus liberadas são uniformemente distribuídas na vizinhança da célula recém destruída. O modelo prediz curvas de evolução que dependem das condições iniciais e principalmente do método de injeção usado. Por exemplo, no caso de injeção uniforme, na qual todo o tumor recebe uma certa quantidade de vírus, o tumor cresce inicialmente e, em seguida, decresce exponencialmente. Além disso, a distribuição de células cancerosas (infectadas e não infectadas) e de vírus permanecem constantes ao longo do tumor. No entanto, quando apenas uma fração central ou na borda externa do tumor recebe vírus, comportamentos complexos, tanto na dinâmica quanto na distribuição espacial de células, emergem. Agora, a evolução depende sensivelmente das condições iniciais usadas, que podem levar ao

crescimento exponencial, desaparecimento ou latência do tumor. Um dos resultados mais relevantes deste modelo é a observação de duas ondas de infecção: uma partindo do centro do tumor em direção à borda e outra no sentido oposto. Essas ondas secundárias, que surgem espontaneamente no modelo, são muitas vezes as responsáveis pelo controle do tumor.

3.2.2 Modelos com condições de contorno livres

Modelos de EDPs onde a geometria dos tumores é obtida espontaneamente são mais interessantes do ponto de vista dos físicos. Um bom exemplo é o modelo proposto por Tohya *et al.* [20] para estudar o crescimento de tumores que formam padrões papilíferos (ramificados). Esse modelo se destaca pela simplicidade envolvendo apenas 4 parâmetros após as mudanças de variáveis adequadas. O principal aspecto biológico do modelo é a competição por nutrientes como o fator determinante na divisão celular. O tecido é representado por uma região retangular toda ocupada por células normais exceto em uma linha de espessura y_0 localizada na parte superior do retângulo, onde há uma concentração c_0 de células cancerosas. Os nutrientes são fornecidos por um capilar localizado na parte inferior do retângulo que possui uma concentração constante n_0 . Os nutrientes se difundem pelo tecido até as células cancerosas. A concentração de nutrientes n obedece a equação de difusão

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_n \nabla^2 n - f(n, c). \quad (3.11)$$

Aqui, o laplaciano é o termo clássico de difusão e $f(n, c)$, o consumo das células cancerosas é dado por $f(n, c) = knc$ onde k é uma constante e c a concentração de células cancerosas.

As células cancerosas consomem nutrientes para realizar mitose. Assim, a equação proposta para descrever a concentração das células cancerosas é

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla(D_c \nabla c) + \theta f(n, c), \quad (3.12)$$

na qual o primeiro termo do lado direito é um termo de difusão não linear com coeficiente de difusão $D_c = \sigma nc$ e o outro termo é taxa de produção de células cancerosas proporcional à quantidade de nutrientes consumida. θ e σ são parâmetros do modelo que controlam a reprodução e difusão das células cancerosas, respectivamente.

As simulações geram padrões ramificados observados em tumores epiteliais (fi-

gura 3.5(b)). A quantidade e a espessura dos ramos nestes padrões dependem somente da concentração de nutrientes. O resultado mais interessante é a existência de uma transição morfológica que depende de n_0 : para altas concentrações iniciais de nutrientes o tumor fica localizado formando uma interface sem ramificações, por outro lado, quando o valor de n_0 é baixo o tumor forma estruturas ramificadas (figuras 3.5(a) e (b)). Embora o modelo mostre resultados interessantes, indicando que a competição por nutrientes é um fator fundamental na formação dos padrões tumorais, ele não considera dois fatores fundamentais: a morte das células cancerosas e o consumo de nutrientes pelas células normais.

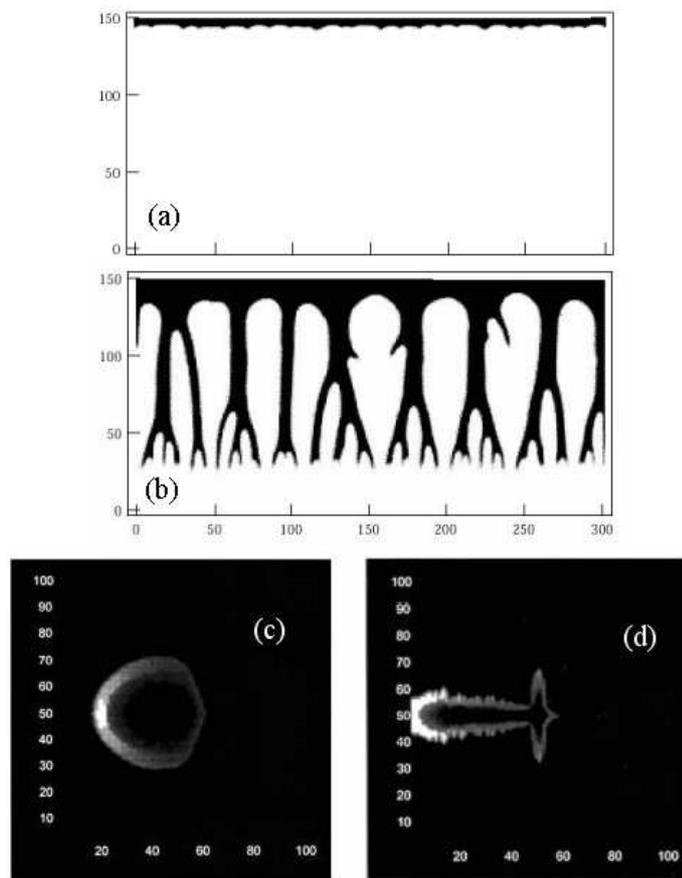


Figura 3.5: Resultados dos modelos de (a), (b) Tohya *et al.* e de (c), (d) Scalerandi *et al.*. Na figuras (a) e (b) o capilar está localizado na parte de baixo e as regiões escuras representam maiores densidades de células cancerosas. Nas figuras (c) e (d) o capilar está no lado esquerdo e as regiões mais claras representam concentrações de células cancerosas mais altas. Os casos com alta ((a) e (c)) e baixa ((b) e (d)) disponibilidade de nutrientes em ambos os modelos são mostrados. *Figuras retiradas das referências [20] e [21]*

Modelos de tumores tem aparecido com frequência na literatura recente de

Física. Particularmente, Scarelandi *et al.* propuseram uma série de modelos contínuos usando o método de simulação de interações locais para simular o crescimento de neoplasias [21, 47, 48, 49, 50, 51]. Este método, conhecido pela sigla LISA (*local interaction simulation approach*), consiste em dividir o espaço em uma rede regular e o tempo em intervalos discretos. O valor de uma grandeza Φ , no sítio i , no instante $t + \tau$, representada por $\Phi_i(t + \tau)$, dependerá somente do seu próprio valor e dos valores dos seus primeiros vizinhos no instante t . Matematicamente tem-se

$$\Phi_i(t + \tau) = \Phi_i(t) + \tau \Lambda \{ \Phi_i(t) \}, \quad (3.13)$$

onde Λ é um operador espacial que atua nos sítios da rede e depende somente do próprio sítio e dos primeiros vizinhos. Por exemplo, se Λ é o operador Laplaciano na rede quadrada temos a seguinte regra para a evolução de Φ

$$\Phi_i(t + \tau) = \Phi_i(t) + \frac{\tau}{4} \sum_{\langle i, i' \rangle} [\Phi_{i'}(t) - \Phi_i(t)], \quad (3.14)$$

onde a soma é feita sobre os quatro primeiros vizinhos do sítio i . Este método permite usar condições iniciais e de contorno arbitrárias. O primeiro trabalho desta série [21] descreve um modelo onde a competição por nutrientes é o fator determinante para o desenvolvimento do câncer. O modelo considera três tipos celulares, células normais, cancerosas e mortas, ocupando o tecido que é representado por uma rede quadrada. Células normais e cancerosas competem entre si pelos nutrientes fornecidos por um vaso capilar. As células mortas são inertes. Células cancerosas podem morrer, dividir-se e difundir-se pelo tecido. A regra de crescimento envolve um grande número de equações e parâmetros descritos em detalhes na referência [21]. O modelo gera tumores com morfologias, taxas de crescimento e estados finais (morte, metástase, latência e crescimento ilimitado) distintos, indicando que o crescimento de tumores depende sensivelmente das condições do microambiente celular. Em trabalhos subsequentes, Scarelandi *et al.* usaram o método LISA para estudar com detalhes a região no espaço de parâmetros do modelo descrito anteriormente na qual a latência do tumor é observada [48]; efeitos anatômicos no crescimento de tumores [49]; o desenvolvimento de angiogênese tumoral [50, 51]; e os efeitos de terapias antiangiogênicas no crescimento de tumores [52].

3.3 Modelos para a formação de padrões fractais em tumores

Padrões fractais são encontrados em diversos sistemas biológicos. Em particular, alguns tipos de tumores, tais como **glioblastomas** [53], **melanomas** [54] (tumores do cérebro e da pele, respectivamente) e tumores da mama [55], podem exibir formas complexas e, possivelmente, fractais. Por esta razão, esta seção destaca dois modelos recentes da literatura de Física que propõem novos mecanismos para explicar a morfologia complexa observada nestes tumores.

3.3.1 Um modelo para o crescimento de tumores malignos do cérebro

Sander & Deisboeck propuseram recentemente um modelo matemático para descrever o crescimento de glioblastomas em cultura [18]. O modelo foi estudado de duas maneiras. Na primeira, um conjunto de equações de reação-difusão foi usado para descrever as concentrações de células cancerosas, nutrientes e fatores de atração homotípica produzidos por células móveis do tumor. Os autores mostraram que estas equações possuem instabilidades que levam a formação de padrões ramificados na zona de invasão do tumor. Na segunda versão, descrita com detalhes nesta seção, um modelo discreto substituiu as equações de difusão para as células cancerosas e fatores homotípicos, possibilitando a visualização dos padrões simulados.

Em certas culturas de tecido tridimensionais, tumores humanos altamente malignos podem formar padrões de crescimento complexos que consistem em uma região central de proliferação e uma expansão invasiva na periferia. Em estágios iniciais o tumor cresce mais ou menos simetricamente até a fase invasiva ser disparada. Então, as células móveis, fornecidas continuamente pelo núcleo proliferativo central, iniciam uma invasão rápida da região que circunda o tumor formando cadeias de células isoladas que podem se ramificar. Na figura 3.6 dois glioblastomas em culturas com gel de matriz extracelular transparente são mostrados. O modelo de Sander & Deisboeck tenta explicar os mecanismos para a formação destas estruturas ramificadas.

O modelo é estudado em uma rede quadrada 128×128 com constante de rede igual ao diâmetro celular a . A concentração de nutrientes é tratada como uma variável contínua e as células cancerosas como variáveis discretas que assumem os valores $c = 1$, se o sítio é ocupado por uma célula cancerosa, ou $c = 0$, caso contrário.

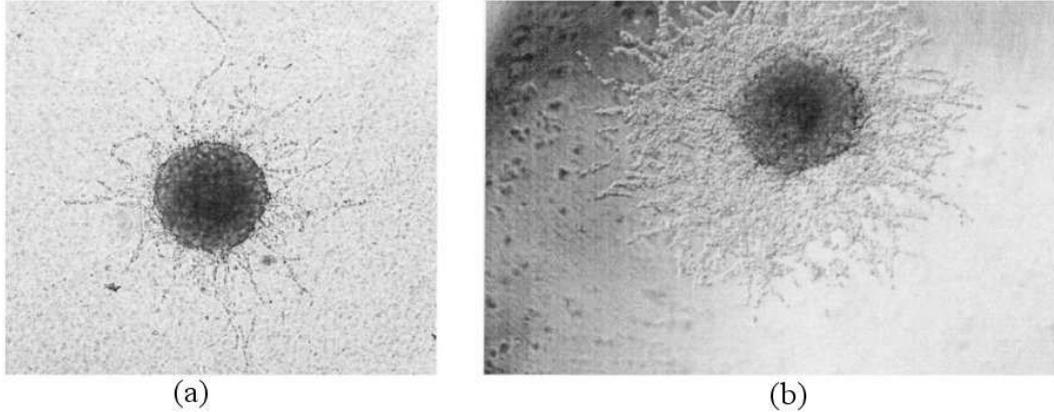


Figura 3.6: Duas imagens microscópicas de glioblastomas humanos com $t = 120$ h (após a inoculação em gel transparente 3D). O raio do núcleo central (a região mais escura) é aproximadamente 0.4 mm. A invasão em ambos os experimentos é predominantemente bidimensional devido ao tipo de ensaio usado nos experimentos. *Figura retirada da referência [18].*

Todos os nutrientes são substituídos por um único campo escalar n dado pela solução estacionária da seguinte equação de difusão

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D\nabla^2 n - \alpha(n)c, \quad (3.15)$$

na qual o último termo corresponde ao consumo de nutrientes por células cancerosas e $\alpha(n)$ é dado por

$$\alpha(n) = \begin{cases} \alpha_0 n/n_0, & n \leq n_0 \\ \alpha_0, & n > n_0 \end{cases}, \quad (3.16)$$

onde n_0 é uma concentração de saturação característica. Assume-se que o consumo no núcleo central é muito maior devido à presença de um grande número de células altamente proliferativas. Por simplicidade, a condição de contorno na superfície do núcleo central é $n = 0$ e longe do tumor $n = n_\infty$, onde n_∞ é a concentração de nutrientes introduzida no início do experimento. A concentração de nutrientes é normalizada por $N \equiv n/n_\infty$.

Os vários processos da dinâmica celular são representados por probabilidades de migração. Cada célula móvel pode migrar para qualquer sítio vazio adjacente com taxa $w(0) = 1$, exceto se ela está em um gradiente de N ou se ela é submetida à

atração homotípica. No primeiro caso, a taxa de transição é

$$w(N) = \gamma_3(3N + 1)^{-2}\Delta N, \quad (3.17)$$

se ΔN , o gradiente numérico de N em uma dada direção, é positivo. O parâmetro adimensional γ_3 é um agrupamento de outros parâmetros físicos e o seu valor é estimado na ordem de 100. O segundo fator vem da lei dos receptores. Para incluir a atração homotípica os rastros dos lugares previamente visitados por qualquer célula são mantidos e as taxas de migração nestes sítios são multiplicadas por um fator γ_1 . Este último parâmetro não é conhecido experimentalmente, nem mesmo em magnitude. À medida que a simulação é implementada os processos são escolhidos de acordo com suas taxas de migração relativas. O núcleo proliferativo é representado por um disco de células imóveis e as simulações começam com um grupo de 100 células móveis distribuídas em torno deste disco. Ao longo do crescimento, células imóveis próximas a sítios vazios podem se dividir e ocupá-los, com uma certa probabilidade relativa.

Os resultados apresentados no artigo original são mostrados na figura 3.7. Em todos os casos, as simulações começam com um raio de 20 células para o núcleo central mais 100 células liberadas para iniciar a invasão. Os parâmetros envolvidos na equação (3.15) podem ser agrupados e a concentração de nutrientes é controlada por um único parâmetro $\gamma_2 = \alpha_0 a^2 / D n_\infty$, estimado no artigo original [18] como sendo da ordem de 0.1. Em todas as simulações foi usado $\gamma_2 = 0.3$. As três imagens representam três regimes referentes aos outros dois parâmetros relevantes (γ_1 e γ_3). Na figura 3.7(a), ambos **quimiotaxia** e atração homotípica estão praticamente ausentes: $\gamma_1 = \gamma_3 = 5$. Neste caso, temos um resultado típico de difusão: movimentos aleatórios compactos em duas dimensões e a nuvem de células próxima ao disco central não representa os padrões invasivos da figura 3.6. Na figura 3.7(b), quimiotaxia intensa ($\gamma_3 = 100$) e atração homotípica forte ($\gamma_1 = 25$) foram implementadas. Neste padrão, similar ao tumor da figura 3.6(b), observamos uma zona dispersa de células invasoras que apenas sugere a formação de cadeias celulares. Para reproduzir as estruturas de cadeias bem definidas mostradas na figura 3.7(c), foi necessário introduzir atração homotípica muito forte ($\gamma_1 = 250$) e também quimiotaxia muito intensa (cerca de 10 vezes mais intensa do que o valor previamente estimado).

O trabalho apresentado nesta seção possui muitos aspectos interessantes, tais como a construção do modelo considerando apenas aspectos biológicos bem fundamentados e a utilização de parâmetros determinados experimentalmente. Entretanto,

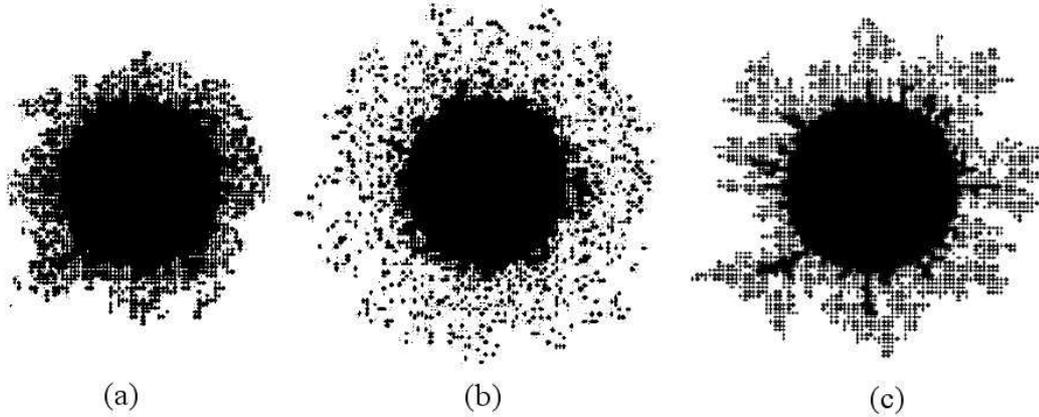


Figura 3.7: Três regimes observados nas simulações de Sander & Deisboeck. Os padrões são referentes aos casos onde ambos os efeitos da quimiotaxia e da atração homotípica (a) estão ausentes, (b) são intensos e (c) são muito intensos. *Figura retirada da referência [18].*

como os próprios autores mencionam [18], ainda faltam estudos mais detalhados dos parâmetros envolvidos, uma descrição mais realista da atração homotípica e a inclusão de aspectos importantes negligenciados no modelo, como, por exemplo, a produção de fatores de crescimento que degradam a matriz extracelular e os efeitos não-lineares da elasticidade do meio.

3.3.2 Papel da adesão celular na morfologia dos tumores

Reis *et. al.* propuseram recentemente um novo modelo para explicar a formação de morfologias complexas em tumores *in vivo* [19]. O modelo considera a adesão intercelular diferenciada e a rigidez do tecido normal como os fatores que determinam a morfologia dos tumores. O modelo possui dois tipos celulares: células normais (n) e tumorais (t), representadas por partículas interagentes distribuídas em uma região quadrada com condições de contorno periódicas. Não existe rede, as células são visualizadas através da construção de polígonos de Voronoi (vide Ref. [19] para maiores detalhes). O movimento celular resulta do equilíbrio das forças de interação entre células adjacentes. Esta força de interação repulsiva é modulada por um termo associado à adesão e definida por

$$f(r, \alpha_{\tau, \tau'}) = \begin{cases} (1 - r/r_0)(1 - \alpha_{\tau, \tau'}), & r \leq r_0 \\ 0, & r > r_0 \end{cases}, \quad (3.18)$$

onde r é a distância entre uma célula e uma de suas vizinhas e $r_0 \equiv 3.6 \times (A/N)^{1/2}$ (A é área total da simulação e N o número total de células). O termo $(1 - r/r_0)$ da equação (3.18), definida apenas no intervalo $0 \leq r \leq r_0$, representa a repulsão entre células vizinhas. Quando $r > r_0$, as células não são consideradas vizinhas e, portanto, não interagem. No segundo termo, $\alpha_{\tau,\tau'} \in [0, 1]$ é um parâmetro associado à adesão celular diferenciada e modula a força de interação, aumentando ou diminuindo a repulsão entre células dos tipos τ e τ' . Assim, $\alpha_{\tau,\tau'} \sim 1$ e $\alpha_{\tau,\tau'} \sim 0$ representam adesões alta e baixa, respectivamente. Os parâmetros relacionados à adesão celular são três: α_{nn} , α_{tt} (adesões homotípicas) e α_{nt} (adesão heterotípica).

A implementação do modelo é a seguinte. No início da simulação, as células normais são distribuídas aleatoriamente no tecido e uma única célula cancerosa é introduzida no centro desse tecido. A cada passo de tempo o sistema é atualizado simultaneamente: todas as células são deslocadas por uma distância proporcional e na direção das forças resultantes agindo sobre elas, de acordo com a equação (3.18). A cada $T_m = 30$ passos de tempo, as células do tumor dividem-se e suas descendentes são colocadas em uma posição aleatória bem próxima da célula progenitora a uma distância $r_d \ll r_0$. Este intervalo de tempo é necessário para o sistema relaxar antes que um novo ciclo de divisões ocorra. O modelo não considera morte celular e as células normais são quiescentes.

Outro aspecto do modelo é a resistência imposta pelo tecido normal ao crescimento do tumor que resulta da adesão de células normais à matriz extracelular, denominada rigidez. Assume-se que as células cancerosas perderam completamente a adesão à matriz extracelular- uma hipótese razoável, principalmente nos estágios avançados da doença (capítulo 2). A rigidez é implementada da seguinte maneira. Os deslocamentos ($\Delta x'$ e $\Delta y'$) que as células normais sofrem durante a atualização do sistema correspondem a uma fração dos deslocamentos correspondentes na ausência de rigidez (Δx e Δy), ou seja

$$\begin{aligned} \Delta x' &= (1 - R)\Delta x \\ \Delta y' &= (1 - R)\Delta y \end{aligned} \quad (3.19)$$

onde $R \in [0, 1]$ é o parâmetro que controla a rigidez. Em particular, $R = 0$ corresponde a ausência de rigidez e $R = 1$ implica que as células normais são totalmente imóveis.

Os resultados apresentados por Reis *et. al.* são mostrados nas figuras 3.8 e 3.9. Na figura 3.8, α_{nn} e α_{nt} foram fixados em 0.5, enquanto os parâmetros que

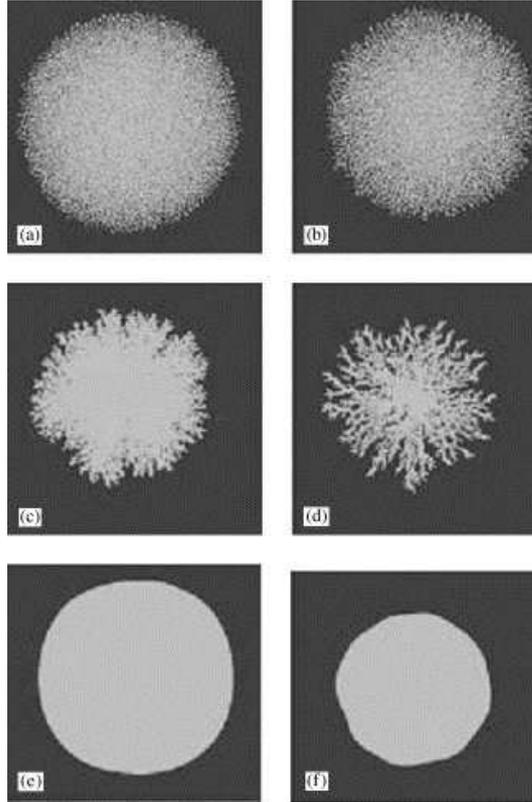


Figura 3.8: Padrões de crescimento de tumores gerados pelo modelo de Reis *et. al.* com aproximadamente 5000 células. Os parâmetros usados foram $\alpha_{tt} = 0.25, 0.5$ e 0.75 na primeira, segunda e terceira linhas, respectivamente, e $R = 0.6$ e 0.9 na primeira e na segunda coluna, respectivamente. *Figura retirada da referência [19].*

controlam a rigidez (R) e a adesão entre células cancerosas (α_{tt}) foram variados. O aumento da rigidez do tecido normal favorece a formação de padrões com contorno irregular que podem apresentar protuberâncias (figuras 3.8(c) e (d)). De fato, quando o tecido normal torna-se muito rígido, o tumor cresce principalmente por invasão, uma característica observada em muitos tumores malignos. Quando α_{tt} é variado, os padrões tumorais mudam de desconexos (baixa adesão celular) para compactos (alta adesão celular) passando por padrões ramificados quando $\alpha_{tt} \sim \alpha_{nn}$. Note que quanto menor a adesão entre células cancerosas mais invasivo é o tumor.

Na figura 3.9, são mostradas simulações onde ambos α_{tt} e α_{nt} são variados. Também leva-se em conta a perda de adesão intercelular das células cancerosas e, portanto, α_{tt} e α_{nt} são menores que $\alpha_{nn} = 0.5$. Na primeira linha, onde a adesão entre as células cancerosas é menor, os tumores mostram-se mais invasivos que os da segunda linha. Novamente observamos que o aumento da rigidez propicia a formação de padrões mais ramificados. Note a semelhança da figura 3.9(c) com o tumor da

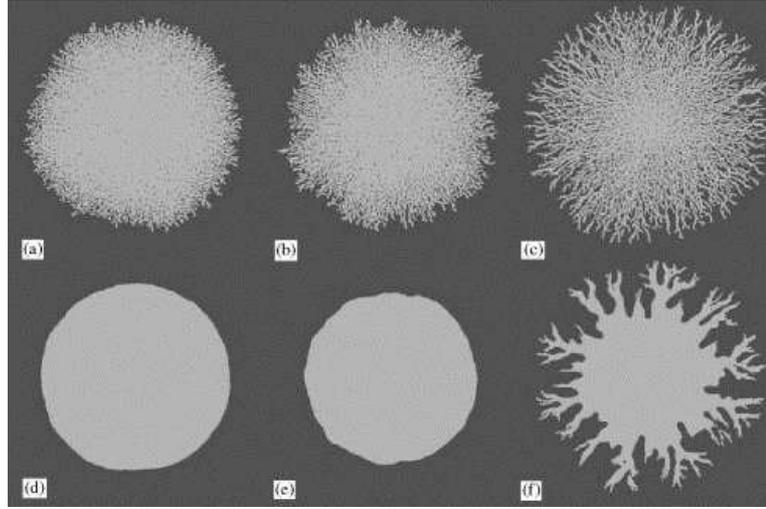


Figura 3.9: Padrões de crescimento de tumores gerados pelo modelo de Reis *et. al.* com aproximadamente 15000 células. Na primeira linha $\alpha_{nt} = 0.4$ e $\alpha_{tt} = 0.25$ e, na segunda linha $\alpha_{nt} = \alpha_{tt} = 0.4$ foram fixados. A rigidez do tecido normal também foi variada usando-se $R = 0.4, 0.6$ e 0.9 na primeira, segunda e terceira colunas, respectivamente. *Figura retirada da referência [19].*

figura 3.6(b), um glioblastoma altamente maligno e invasivo em uma cultura de gel de colágeno (neste caso o gel representa o tecido normal).

Mesmo sendo possuindo poucos ingredientes, o modelo de Reis *et. al.* é capaz de gerar diversas morfologias de tumores considerando apenas a adesão celular. No entanto, alguns pontos merecem ser discutidos. (1) A dinâmica do modelo não pode ser associada à evolução de tumores reais pois, de acordo com as regras usadas, a população de células cancerosas simplesmente dobra a cada $T_m = 30$ passos. (2) O tamanho do sistema é um parâmetro que determina a capacidade de suporte do tecido, que é finita devido às condições de contorno periódicas, e, certamente, influencia a morfologia dos padrões. Em outras palavras, para uma mesma densidade inicial de células normais, as tensões sobre um tumor localizado em um sistema maior são menores que as tensões sobre este mesmo tumor inserido em um sistema menor. Note que não se trata de um problema de tamanho finito freqüentemente estudado em Física Estatística, mas sim de um problema de acomodação das células no tecido. (3) A morte celular não é importante apenas para o estudo da formação de necroses como dizem os autores. Ela também pode reduzir a massa tumoral e, conseqüentemente, influenciar a distribuição de tensões no tecido. (4) Descartar os processos quimiotáticos é uma aproximação que parece contrariar os fundamentos biológicos

básicos envolvidos na invasão de células cancerosas discutidos no capítulo 2.

Capítulo 4

Um modelo para o crescimento de tumores: o papel dos fatores de crescimento na morfologia tumoral.

Neste capítulo é apresentado um modelo de crescimento de tumores primários [23, 24] no qual uma nova estratégia de simulação é proposta. Os principais aspectos biológicos incluídos são divisão, morte e mobilidade celular junto com interações entre células mediadas por fatores de crescimento. O modelo usa um esquema de simulação semelhante ao de Smolle & Sttener [42]. A diferença fundamental é que fatores de crescimento são produzidos somente por células cancerosas e obedecem a uma equação de difusão clássica com termos de fonte e de degradação natural. As funções de resposta à concentração de fatores de crescimento também são diferentes, e incorporam aspectos biológicos mais realistas que os usados no modelo de Smolle & Sttener.

O primeiro dos trabalhos citados anteriormente [23] pode ser dividido em duas partes. A primeira consiste na generalização do modelo de Williams e Bjercknes por meio da inclusão da mobilidade celular, o que já foi discutido na seção 3.1.1. Já na segunda parte, os fatores de crescimento e sua influência nas ações celulares são incluídos no modelo puramente estocástico. O segundo artigo [24] é uma continuação do primeiro e inclui novas regras e algumas generalizações, como a possibilidade de divisão e morte de células cancerosas em todos os sítios do tumor e não somente naqueles pertencentes à sua borda. Por esse motivo, apenas os resultados do artigo [24], que tem como casos particulares os modelos estudados em [23], serão apresentados.

4.1 O modelo

No capítulo 2, vimos que o desenvolvimento de tumores envolve diversas proteínas, sendo que muitas delas são produzidas pelas próprias células cancerosas. Entre outras proteínas, destacam-se os fatores de crescimento autócrinos que estimulam a divisão celular, os fatores de motilidade autócrinos que estimulam e direcionam a migração celular, as metaloproteínases que degradam a matriz extracelular e, conseqüentemente, facilitam a invasão de células cancerosas, etc. [1]. Nesse modelo, todas estas substâncias produzidas por células cancerosas são tratadas como um único campo escalar $c(\vec{x})$, denominado genericamente de concentração de fatores de crescimento (GF).

O tecido é representado por uma rede quadrada cujos sítios podem estar ocupados ($\sigma(\vec{x}) = 1$) ou vazios ($\sigma(\vec{x}) = 0$), designando células cancerosas e normais, respectivamente. Aqui, \vec{x} representa a posição do sítio na rede. A condição inicial são todos os sítios ocupados por células normais, exceto no centro da rede onde uma única célula cancerosa é inserida, de acordo com a teoria de origem clonal do câncer [57]. Cada célula do tumor pode realizar uma das três ações: divisão, morte e movimento celular com probabilidades p_{div}^0 , p_{del}^0 e p_{mov}^0 . Estes parâmetros representam o comportamento intrínseco de células isoladas e obedecem à condição de normalização

$$p_{div}^0 + p_{del}^0 + p_{mov}^0 = 1. \quad (4.1)$$

A implementação de uma ação dependerá ainda de uma probabilidade p_{act} (onde act pode ser div , del ou mov) que depende da concentração local de fatores de crescimento $c(\vec{x})$. Os dois tipos de curvas para p_{act} , sigmóide e sino, usadas no modelo são mostradas na figura 4.1. A expressão que descreve a curva sigmóide é

$$p_{act}(\vec{x}) = \begin{cases} p_{act}^0 & \text{se } c(\vec{x}) \leq c_{act}^*, \\ p_{act}^0 + [1 - p_{act}^0] \frac{c(\vec{x}) - c_{act}^*}{A_{act} + c(\vec{x}) - c_{act}^*} & \text{caso contrário.} \end{cases} \quad (4.2)$$

c_{act}^* é um limiar de concentração de fatores de crescimento acima do qual a probabilidade intrínseca p_{act}^0 é influenciada pelo microambiente celular, ou seja, a cooperação efetiva mútua, e A_{act} é o parâmetro que controla esta influência. A curva em “forma

sino” é descrita por

$$p_{act}(\vec{x}) = \begin{cases} p_{act}^0 & \text{se } c(\vec{x}) \leq c_{act}^* \text{ e } c(\vec{x}) \geq 5c_{act}^*, \\ \frac{1 - p_{act}^0}{2c_{act}^*} c(\vec{x}) + \frac{3p_{act}^0 - 1}{2} & \text{se } c_{act}^* < c(\vec{x}) < 3c_{act}^*, \\ \frac{p_{act}^0 - 1}{2c_{act}^*} c(\vec{x}) + \frac{5 - 3p_{act}^0}{2} & \text{se } 3c_{act}^* < c(\vec{x}) < 5c_{act}^*. \end{cases} \quad (4.3)$$

A curva em sino usada é uma aproximação de uma curva Gaussiana e sua largura foi fixada em $4c_{act}^*$.

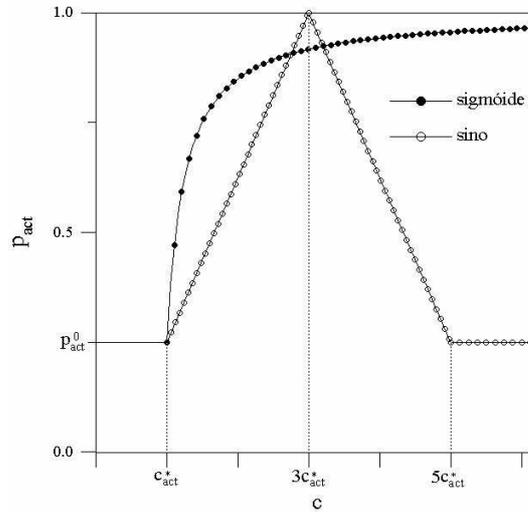


Figura 4.1: Probabilidades das ações celulares como funções da concentração local de fatores de crescimento. Dois tipos de funções são consideradas no modelo: funções sigmóides e em forma de sino.

Na regra sigmóide, as probabilidades para todas as ações (p_{div} , p_{del} e p_{mov}) são curvas sigmóides simulando que a divisão e migração celular são estimuladas por fatores de crescimento e que a taxa de morte celular aumenta com a concentração de fatores de crescimento. Nesta última hipótese assume-se que, quanto maior a concentração de fatores de crescimento, maior a densidade populacional de células cancerosas e, conseqüentemente, menor é a quantidade de recursos disponíveis para a célula. Na regra sino, a competição entre as células cancerosas é intensificada usando-se curvas tipo sino somente para p_{div} e mantendo as curvas sigmóides para p_{del} e p_{mov} . Isto representa a inibição da divisão em altas densidades populacionais como uma resposta à competição por recursos entre células cancerosas.

A concentração de GF em cada sítio da rede é determinada de acordo com o

seguinte procedimento. Todos os sítios da rede têm sua concentração de GF reduzida por uma fração Γ , simulando a degradação natural dos GF; paralelamente todos os sítios ocupados por células cancerosas recebem uma quantidade c_0 . Operacionalmente, tem-se que

$$c(\vec{x}) \rightarrow (1 - \Gamma)c(\vec{x}) + c_0\sigma(\vec{x}). \quad (4.4)$$

Após este passo, determina-se a solução quasi-estacionária da equação de difusão clássica para a concentração de GF

$$\frac{\partial c(\vec{x}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 c(\vec{x}, t), \quad (4.5)$$

onde o termo do lado direito representa uma difusão linear de GF com constante de difusão D . A condição de contorno satisfeita pelo campo de concentração é $c(\vec{r}, t) = 0$ em um círculo de raio R , muito maior que o raio do tumor, centrado no centro da rede. A equação (4.5) é resolvida através de métodos convencionais de relaxação usando a mesma rede que representa o tecido. Assim, a equação de diferenças finitas [60] referente à equação (4.5) é

$$c(\vec{x}, t + \delta t) = c(\vec{x}, t) + \frac{D\delta t}{(\delta x)^2} \sum_{\langle \vec{x}, \vec{x}' \rangle} [c(\vec{x}') - c(\vec{x})], \quad (4.6)$$

onde δt e δx são parâmetros de discretização do tempo e do espaço, respectivamente, que devem obedecer à condição de convergência $D\delta t/\delta x \leq 1/4$, e $\langle \vec{x}, \vec{x}' \rangle$ representa a soma sobre os primeiros vizinhos de \vec{x} . Em todas as simulações, a cota superior da razão (1/4) foi usada. Por fim, as soluções quasi-estacionárias são encontradas quando a maior diferença relativa entre duas iterações consecutivas da equação (4.6) é menor que um valor pré-determinado fixado em 10^{-2} .

A regra de crescimento é a seguinte. Em cada passo de tempo, as equações (4.4) e (4.6) são resolvidas numericamente para calcular a concentração de GF em cada sítio da rede. Então, $N(T)$ células cancerosas são selecionadas ao acaso com igual probabilidade, onde $N(T)$ é o número total de células do tumor no início do passo T . Note que qualquer célula pode ser selecionada mesmo as que se dividiram durante o passo T . Para cada uma das células selecionadas, uma ação (divisão, morte ou movimento) é escolhida com suas respectivas probabilidades intrínsecas (p_{div}^0 , p_{del}^0 e p_{mov}^0). Esta ação será implementada ou não com a correspondente probabilidade local p_{act} . Cada uma das ações será implementada da seguinte maneira:

1. *Divisão.* Se a célula selecionada divide-se, então o primeiro vizinho com menor concentração de fatores de crescimento será ocupado por sua célula-filha. Se nesse sítio existe uma célula cancerosa, então uma outra célula da periferia do tumor, que pertença ao mesmo aglomerado de células cancerosas do sítio invadido, ocupará uma vizinha normal escolhida ao acaso, simulando que todas as células foram empurradas até a borda do aglomerado.
2. *Migração.* As células cancerosa movem-se para o sítio vizinho normal (se ele existir) com menor concentração de fatores de crescimento e, simultaneamente, seu sítio de origem é ocupado por uma célula normal. Caso a célula não tenha uma vizinha normal ela não se move.
3. *Morte* Se a célula cancerosa morre então seu sítio será ocupado por uma célula normal.

Ao fim desta seqüência de $N(T)$ tentativas, um novo passo de tempo começa e o procedimento inteiro (solução da equação de difusão e aplicação das regras de crescimento) é realizado. O movimento celular contra o gradiente de GF na divisão e na migração é adotado para simular a propriedade das células cancerosas de invadir tecidos normais subjacentes, que é auxiliada pela destruição progressiva da matriz extracelular próxima à borda do tumor promovida por uma série de enzimas (também representadas pelo campo de GF nesse modelo) incluindo **colagenases**, metaloproteínases, entre outras, liberadas por células cancerosas [5, 32]. Portanto, supomos que a migração das células cancerosas para sítios distantes do tumor é uma resposta quimiotática à produção autócrina de várias substâncias.

Nesse modelo, as probabilidades p_{act}^0 representam as propriedades intrínsecas das células cancerosas, enquanto os parâmetros D , c_0 , Γ , c_{act}^* e A_{act} caracterizam a difusão de GF responsáveis pelas interações quimiotáticas entre as células cancerosas e as respostas celulares a estes fatores. Assim, a princípio, o modelo possui 12 parâmetros, mas este número pode ser reduzido por meio de mudança de variáveis e algumas simplificações. Fazendo as transformações $c \rightarrow c/c_0$, $t \rightarrow Dt/\delta x^2$ e $\vec{x} \rightarrow \vec{x}/\delta x$ obtemos um novo conjunto de variáveis adimensionais no qual os valores $c_0 = 1$ e $D = 1$ são definidos em todas as simulações. Fixando a relação $p_{del}^0 = 0.9p_{div}^0$ e usando a condição de normalização (4.1), apenas o valor de p_{mov}^0 precisa ser fornecido para determinarmos as demais probabilidades intrínsecas. Esta última relação é uma simplificação na qual fixamos a vantagem carcinogênica e é justificável pois no modelo sem GF as morfologias e relações de escala são independentes desta razão [23].

Além disso, a probabilidade de morte deve ser menor que a probabilidade de divisão pois, caso contrário, o tumor sempre morreria. A segunda hipótese é que o limiar de concentração a partir do qual os GF influenciam as ações celulares é independente da ação escolhida, isto é, $c_{act}^* = c^*$.

O modelo possui agora 6 parâmetros: a taxa de degradação de GF Γ , o limiar de concentração para os GF influenciarem as ações celulares c^* , os parâmetros A_{div} , A_{del} , A_{mov} que controlam as probabilidades de divisão, morte e movimento, respectivamente, e a probabilidade intrínseca de movimento p_{mov}^0 . Note que, A_{div} existe apenas na regra sigmóide. As simulações indicam que apenas três destes parâmetros são realmente relevantes: a razão $a \equiv A_{del}/A_{div}$, p_{mov}^0 e Γ , lembrando que a é definido apenas na regra sigmóide. Os demais parâmetros foram fixados em $c^* = 0.5$ e $A_{mov} = A_{del} = 5$ para todas as simulações mostradas na próxima seção.

4.2 Resultados

O modelo foi estudado em redes contendo 1400×1400 sítios. Este tamanho garante que a região onde a equação de difusão é resolvida (um círculo de raio $R \equiv 3 \times R_{tumor}$) está sempre confinada à rede. Os parâmetros p_{mov}^0 e Γ mostram-se fundamentais, e por isso, nos concentraremos aqui na análise detalhada de dois valores para cada um deles: baixa e alta mobilidade ($p_{mov}^0 = 0.10$ e $p_{mov}^0 = 0.50$, respectivamente) e baixa e alta degradação ($\Gamma = 0.1$ e $\Gamma = 0.3$, respectivamente). Para estes valores o modelo apresentou comportamentos bastante distintos. Por outro lado, o parâmetro a , definido apenas para a regra sigmóide, foi variado em uma ampla faixa de valores.

O modelo gera padrões tumorais diversificados que dependem dos detalhes funcionais e, também, do conjunto de parâmetros usados. Ambas as regras exibem transições morfológicas. No caso da regra sigmóide, esta transição depende da razão a , que determina a taxa com que as probabilidades p_{del} e p_{div} atingem o valor 1. Acima de uma razão crítica a_c , que é uma função crescente da probabilidade de movimento celular p_{mov}^0 , os padrões de crescimento são assintoticamente compactos, enquanto que abaixo de a_c , são desconexos (constituídos por células isoladas ou em pequenos aglomerados) como ilustra a figura 4.2.

Um estudo mais detalhado dessa transição pode ser feito através dos gráficos $S \times N$, onde S é o número de células cancerosas na borda do tumor. O caso $a > 1$ significa que $p_{div} > p_{del}$, independentemente de c , e o modelo deve produzir padrões compactos onde $S \sim N^{1/2}$ no limite assintótico. Logo, $a_c < 1$. Para $a < a_c$, os

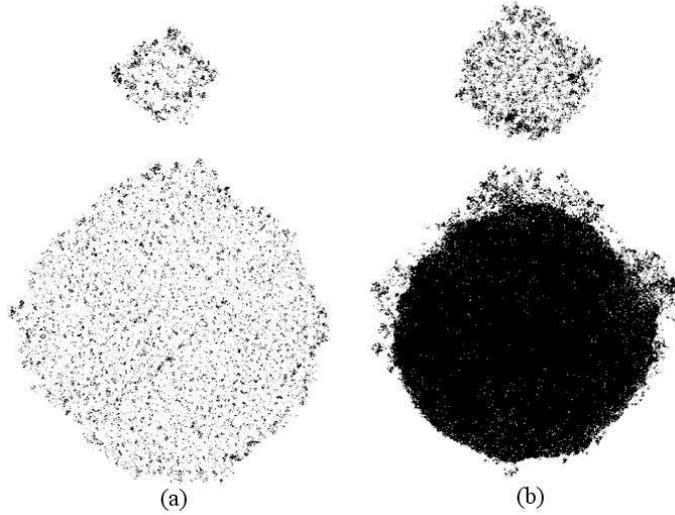


Figura 4.2: Padrões de crescimento de tumores gerados pela regra sigmóide com $p_{mov}^0 = 0.10$ (baixa mobilidade celular) e $\Gamma = 0.1$ (baixa degradação de GF). Tumores contendo 5×10^3 e 10^5 células cancerosas para (a) $a = 0.5 < a_c$ e (b) $a = 0.56 > a_c$ são mostrados. No primeiro caso ($a < a_c$), os padrões são sempre desconexos, enquanto no segundo caso ($a > a_c$), os padrões começam desconexos e tornam-se compactos à medida que o tumor cresce.

tumores são dispersos e, conseqüentemente, $S \sim N$. Já para $a > a_c$, o tumor é inicialmente disperso ($S \sim N$) e torna-se compacto à medida que a tumor cresce. De acordo com a figura 4.3(a), S atinge um pico seguido de um crescimento de lei em potência dado por $S \sim N^{1/2}$. Este pico pode ser associado com o tempo característico do comportamento transiente desses padrões. Sendo T_c o instante em que o pico ocorre, verifica-se que ele diverge no limite $\varepsilon = a - a_c \rightarrow 0^+$ como $T_c \sim \varepsilon^{-\gamma}$ (figura 4.3(b)). Os resultados fornecem $a_c \approx 0.51$ para baixa mobilidade e $a_c \approx 0.80$ para alta mobilidade, isto é, $p_{mov}^0 = 0.10$ e 0.50 , respectivamente, e sugerem $\gamma \approx 1.6$. O aumento na mobilidade promove um prolongamento do comportamento transiente, aumentando o tempo característico da compactação do tumor. Evidentemente, a taxa de degradação natural Γ também influencia a morfologia e a dinâmica dos padrões de crescimento, uma vez que esse parâmetro determina a concentração de GF no tecido. De fato, os valores de a_c , T_c e γ mudam com Γ mas, o comportamento é similar ao descrito acima tanto para alta quanto para baixa degradação.

Para a regra sino uma transição morfológica que depende principalmente da taxa de degradação natural dos fatores de crescimento Γ foi observada. No caso de altas taxas de degradação, os padrões tumorais resultantes são conexos com muitos buracos internos, e para baixas taxas de degradação os padrões gerados são descon-

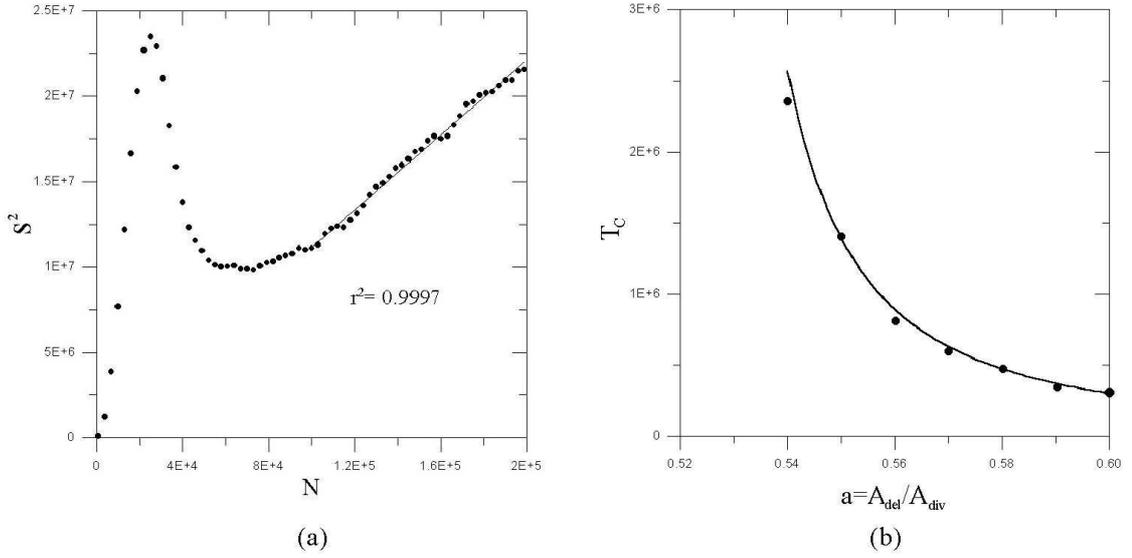


Figura 4.3: Transição morfológica em tumores gerados com a regra sigmóide. (a) Gráfico exibindo um pico característico no número de células cancerosas na periferia do tumor seguido de um crescimento em lei de potência $S \sim N^{1/2}$. (b) Divergência no tempo característico de saturação T_c quando $a \rightarrow a_c$. Estes gráficos são referentes aos padrões da figura 4.2(b).

xos, como mostra a figura 4.4. Os padrões conexos exibem uma interface compacta entre o tecido normal e o interior do tumor que torna-se mais estreita e definida quando a mobilidade celular p_{mov}^0 aumenta (figuras 4.4(a) e (b)). De fato, essa mobilidade influencia a quantidade e o tamanho dos buracos no interior do tumor. O tumor da figura 4.4(d) exibe uma região periférica bem definida na qual as ilhas de células são maiores que as do interior da lesão. Tal aspecto é observado em padrões histopatológicos de carcinomas de células basais [20]. Já o tumor da figura 4.4(c) sugere a formação de protuberâncias freqüentemente observadas em diversos tumores como melanomas [54] e tumores do ovário [56].

Os padrões de crescimento para alta mobilidade e alta degradação de GF mostram um comportamento transiente similar ao observado na regra sigmóide como mostra a figura 4.5. No início, um força repulsiva atua entre células cancerosas, pois os fatores de crescimento estão inicialmente mais concentrados em torno do centro do tumor e o movimento celular é contra o gradiente destas substâncias. Posteriormente, as células cancerosas (as fontes de fatores de crescimento) tornam-se disseminadas no tecido invadido, a concentração de GF torna-se mais homogênea e as células tendem a mover-se isotropicamente, o que favorece a formação de padrões mais compactos. No entanto, um ponto interessante é que para ambas as regras usadas, o fim destes tran-

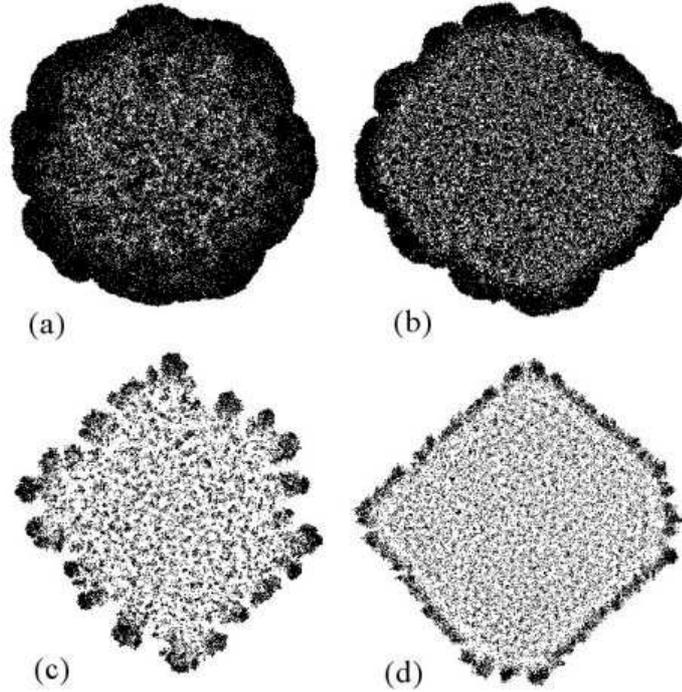


Figura 4.4: Padrões tumorais gerados com a regra sino na qual a divisão é governada pela equação (4.3). Na primeira linha, tumores com 10^5 células obtidos em simulações com alta degradação de GF ($\Gamma = 0.3$) para (a) baixa e (b) alta mobilidade ($p_{mov}^0 = 0.10$ e 0.5 , respectivamente) são mostrados. A segunda linha contém padrões com 5×10^4 células gerados com baixa degradação de GF ($\Gamma = 0.1$) para (c) baixa e (d) alta mobilidade.

sientes coincide com o fim da fase lenta e o início do crescimento rápido das curvas de crescimento $N(T)$. Neste estágio do crescimento, as simulações mostram a presença de picos para os valores do número de sítio na periferia S e para as flutuações (desvio padrão) σ_N de N e σ_S de S . Estes picos ocorrem quando a concentração média de GF nos sítios ocupados ultrapassa o limiar c^* . Assim, até as células cancerosas iniciarem a cooperação mútua efetiva, isto é $p_{act} > p_{act}^0$, o tumor cresce lentamente. Após este período transiente o câncer inicia um crescimento agressivo, previsto pela curva de progresso de Gompertz que descreve o crescimento dos tumores simulados.

Contudo, quando $a < a_c$ na regra sigmóide e $\Gamma = 0.1$ na regra sino, os padrões desconexos não são transientes. Isso ocorre porque a concentração média de GF no interior do tumor fica saturada em um nível alto o suficiente para que a probabilidade de morte se iguale à probabilidade de divisão enquanto as células na borda do tumor continuam se dividindo e migrando na direção contrária ao gradiente de GF. Por conseqüência, um nova classe de universalidade, diferente da observada nos modelos de Eden e Williams & Bjerckness, deve ser associada a estes padrões desconexos.

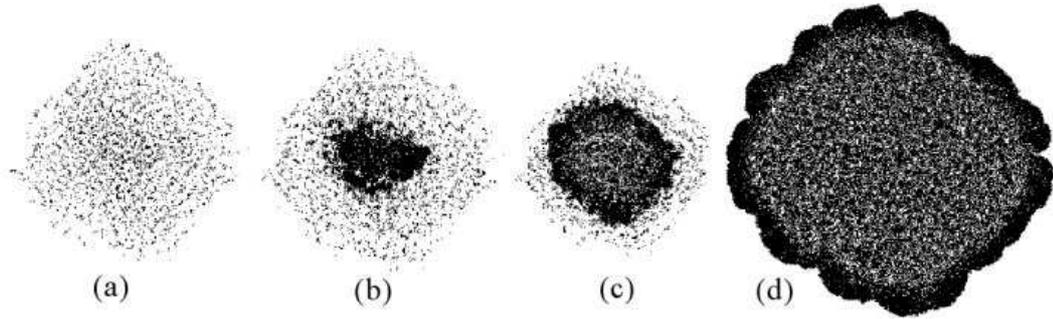


Figura 4.5: Comportamento transiente dos padrões tumorais gerados com a regra sino. Os padrões são gerados para alta mobilidade e alta degradação de fatores de crescimento e contêm (a) 5×10^3 , (b) 10^4 , (c) 2×10^4 e (d) 10^5 células cancerosas.

A evolução no tempo do número total de células cancerosas N , do raio de giração R_g e do número de células na periferia do tumor S , bem como os expoentes das leis de escala $R_g \sim N^\nu$ e $S \sim N^\sigma$ para o modelo são resumidos na tabela 4.1. R_g escala com N do mesmo modo que o modelo de Eden independentemente da regra usada. Por outro lado, S é proporcional a N para os padrões conexos e desconexos. Já os padrões compactos observados na regra sigmóide exibem leis de escala iguais às do modelo de Eden, ou seja, $\sigma = \nu = 0.5$. A progressão no tempo do número de células cancerosas N é descrita por curvas de Gompertz (equação (3.7)) para ambas as regras usadas. Portanto, os mecanismos microscópicos do crescimento dos tumores têm pouca influência nas curvas de crescimento. Além disso, o crescimento linear com o tempo do raio de giração do tumor é suportado por observações experimentais recentes de tumores do cérebro [58].

4.3 Conclusões

Neste capítulo, estudamos o crescimento de tumores primários usando um modelo no qual proliferação, morte e movimento celular são localmente regulados pela concentração de fatores de crescimento produzidos pelas células cancerosas. Duas regras microscópicas distintas, sigmóide e sino, foram usadas. Os resultados das simulações mostram que os comportamentos de certas quantidades, tais como o número de células cancerosas e o raio de giração do tumor, são independentes dos detalhes das funções que definem as probabilidades locais e regulam as ações celulares. O progresso no tempo do número de células cancerosas é descrito por curvas de crescimento de Gompertz e o raio de giração do tumor escala como no modelo de Eden para um número

Regra	Morfologia	Crescimento no tempo			Expoentes	
		N	R_g	S	ν	σ
Sigmóide	Compacto ($A_{del}/A_{div} > a_c$)	Gompertz	Linear	Linear	0.5	0.5
	Desconexo ($A_{del}/A_{div} < a_c$)	Gompertz	Linear	Gompertz	0.5	1
Sino	Desconexo (Γ baixo)	Gompertz	Linear	Gompertz	0.5	1
	Conexo (Γ alto)	Gompertz	Linear	Gompertz	0.5	1

Tabela 4.1: Resultados para o crescimento no tempo da população de células cancerosas, do raio de giração, do número de células da periferia e para os expoentes que caracterizam os padrões gerados pelas duas regras usadas.

assintoticamente grande de células. Assim, a lei de Gompertz, que descreve com êxito a cinética do crescimento de muitos tumores, pode ser uma consequência robusta de regras microscópicas distintas que modelam as interações quimiotáticas entre células cancerosas.

Padrões gerados por diferentes regras microscópicas podem exibir morfologias similares, como mostram os padrões desconexos observados tanto para a regra sigmóide quanto para a regra sino, suportando as contradições observadas na relação entre os detalhes do comportamento maligno e o crescimento de tumores. Além disso, o modelo exibe transições morfológicas entre padrões de crescimento compacto e desconexos quando parâmetros biológicos, tais como a taxa de degradação de GF ou suscetibilidade celular à divisão ou morte, são variados em ambas as regras usadas. Assim, provavelmente não há uma relação simples entre dimensão fractal e a malignidade das lesões sugerindo que dimensão fractal pode ser uma ferramenta útil mas incompleta em histopatologia.

As morfologias compacta, conexa e desconexa observadas são caracterizadas por diferentes leis de escala para o número de células da periferia do tumor. Em padrões compactos S escala como no modelo de Eden ($S \sim N^{1/2}$) e é proporcional a N para os padrões conexos e desconexos. Portanto, alguns aspectos biológicos parecem influenciar particularmente a estrutura da borda do tumor, enquanto o raio de giração e curvas de progresso são descritos por funções mais robustas. A diversidade biológica originada das regras microscópicas é o aspecto mais interessante do mo-

delo. Contudo, a competição por nutrientes, um aspecto biológico fundamental do crescimento de tumores, não é considerada. Motivados por este trabalho, propusemos um novo modelo de equações de reação-difusão acopladas com regras microscópicas estocásticas para estudar o crescimento de tumores considerando a competição por nutrientes entre células cancerosas e normais. Este trabalho é o tema do próximo capítulo.

Capítulo 5

Um modelo de reação-difusão para o crescimento de tumores *in situ*.

Do ponto de vista da biologia, os fatores de crescimento autócrinos estudados no capítulo anterior desempenham papel fundamental no desenvolvimento dos tumores. Contudo, nutrientes e outras substâncias (**hormônios**, GF, etc.) trazidas pelo sistema vascular são tão ou mais essenciais para a proliferação de células cancerosas quanto a própria estimulação autócrina, tanto que tumores precisam promover angiogênese para desenvolver-se com sucesso [33, 35]. De fato, a taxa de proliferação de células com escassez de nutrientes essenciais para a síntese das proteínas necessárias para a mitose depende da sua capacidade de competir por esses nutrientes. Tais pontos, negligenciados no modelo do capítulo anterior, são os aspectos principais do modelo descrito neste capítulo [25].

Limitar-nos-emos ao estudo de tumores confinados ao tecido de origem, ou seja, que não romperam a membrana basal e não tiveram acesso ao sistema vascular, denominados **carcinomas *in situ*** (figuras 2.1 e 2.5). Carcinomas *in situ* são caracterizados por atipia citológica, necrose, mitose freqüente e descontrolada, e morfologias tumorais nas quais as células são organizadas em diversos padrões distintos [61]. A geometria do tecido usada no modelo é particularmente adequada para tumores epiteliais (figura 2.1), de onde originam-se 90% dos cânceres, pois esse modelo considera que as células recebem nutrientes somente por difusão. Contudo, a essência do modelo pode ser estendida a outros cânceres.

5.1 O modelo de crescimento

Os princípios biológicos básicos incluídos no modelo são a proliferação, o movimento e a morte celular junto com a competição por nutrientes entre células normais e cancerosas. Os nutrientes (oxigênio, aminoácidos, glicose, metais iônicos, etc.) difundem de um vaso capilar através do tecido em direção às células (normais e cancerosas). Em condições de escassez de nutrientes, a taxa de crescimento das células cancerosas é limitada pela sua habilidade de competir por nutrientes com as células normais. Nesse modelo a divisão, migração e morte de cada célula cancerosa são controladas pela concentração de nutrientes existentes no seu microambiente local.

5.1.1 O tecido

O sistema estudado consiste de um tecido alimentado por um vaso capilar (figura 5.1). O tecido é representado por uma rede quadrada de tamanho $(L+1) \times (L+1)$ e constante de rede Δ . O vaso capilar, localizado no topo da rede em $x = 0$, é a única fonte de nutrientes para as células do tecido. Embora uma massa tumoral contenha diferentes subpopulações [2], nós iremos considerar apenas três tipos: células normais, cancerosas e necróticas. Qualquer sítio com coordenadas $\vec{x} = (i\Delta, j\Delta)$, $i, j = 0, 1, 2, \dots, L$, é ocupado por somente um destes tipos celulares. Ao contrário das células normais, uma ou mais células cancerosas podem empilhar-se em um mesmo sítio. Por outro lado, células necróticas são inertes e, por simplicidade, serão sempre consideradas como uma única célula morta. Assim, cada sítio da rede pode ser visto como um grupo de células no qual as populações de células normais, necróticas e cancerosas assumem um dos possíveis valores $\sigma_n(\vec{x}, t) = \sigma_d(\vec{x}, t) = 0, 1$ e $\sigma_c(\vec{x}, t) = 0, 1, 2, \dots$, respectivamente.

Como “semente” inicial uma célula cancerosa localizada no meio da rede ($y = L\Delta/2$) a uma distância X do vaso capilar é introduzida no tecido normal, de acordo com a teoria de origem clonal do câncer [57]. Condições de contorno periódicas ao longo do eixo horizontal são usadas. A linha $x = 0$ representa o vaso capilar e os sítios com $x = (L + 1)\Delta$ constituem a borda externa do tecido.

5.1.2 Os nutrientes

Como considerado no modelo de Scalerandi *et al.* [21], nós assumimos que as células cancerosas são especialmente vulneráveis a alguns nutrientes críticos, tais como o

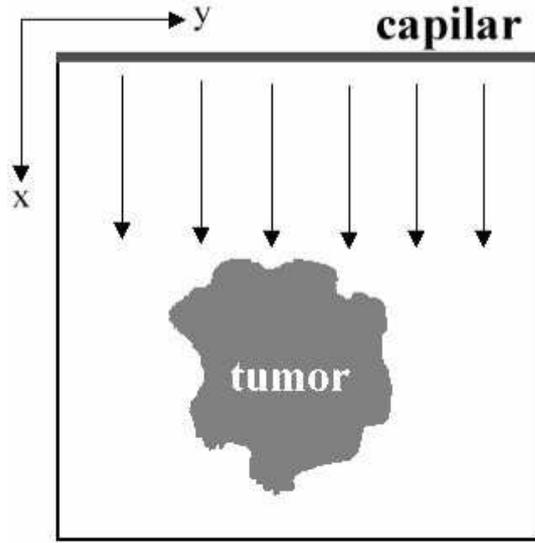


Figura 5.1: Representação esquemática do tecido.

ferro, essenciais para a síntese de DNA e, portanto, para a divisão celular. É suposto que muitos outros nutrientes necessários para as células afetam principalmente a mobilidade e morte das células cancerosas. Portanto, os nutrientes são divididos em dois grupos: essenciais e não-essenciais para a proliferação celular, descritos pelos campos de concentração $N(\vec{x}, t)$ e $M(\vec{x}, t)$, respectivamente. Contudo, é assumido que os dois tipos de nutrientes tem os mesmos coeficientes de difusão e taxas de consumo por células normais. Estes campos de concentração obedecem às equações de difusão

$$\frac{\partial N(\vec{x}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 N(\vec{x}, t) - \gamma N(\vec{x}, t)\sigma_n(\vec{x}, t) - \lambda_N \gamma N(\vec{x}, t)\sigma_c(\vec{x}, t) \quad (5.1)$$

e

$$\frac{\partial M(\vec{x}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 M(\vec{x}, t) - \gamma M(\vec{x}, t)\sigma_n(\vec{x}, t) - \lambda_M \gamma M(\vec{x}, t)\sigma_c(\vec{x}, t), \quad (5.2)$$

nas quais os termos de absorção de nutrientes são proporcionais às populações de células presentes em cada sítio e as taxas de consumo das células cancerosas diferem das normais por fatores λ_N e λ_M . É importante notar que esse modelo assume a forma mais simples para os fenômenos de difusão de nutrientes, isto é, equações lineares com coeficientes constantes. Esta suposição é uma primeira aproximação pois somente os estágios avasculares iniciais do crescimento do tumores, envolvendo um número relativamente pequeno de células, são considerados. Assim, espera-se que efeitos não lineares no processo de difusão sejam mínimos. Além disso, $\lambda_N > \lambda_M$ é usado, refletindo a maior afinidade das células cancerosas pelos nutrientes essenciais.

As condições de contorno satisfeitas pelos campos de concentração de nutrientes são $N(x = 0) = M(x = 0) = K_0$, representando o fornecimento contínuo e fixo de nutrientes trazidos pelo vaso capilar; $N(y = 0) = N(y = L\Delta)$ e $M(y = 0) = M(y = L\Delta)$, correspondendo a condições de contorno periódicas ao longo do eixo y ; por fim, condições de contorno de Neumann, $\partial N(x = L\Delta)/\partial x = \partial M(x = L\Delta)/\partial x = 0$, são impostas à borda do tecido, o que significa que os nutrientes não podem atravessar a borda externa (parte inferior da figura 5.1) do tecido. A hipótese de que o vaso sanguíneo proporciona um fornecimento constante de nutrientes às células cancerosas é uma simplificação que negligencia as respostas complexas do sistema vascular às mudanças metabólicas que ocorrem no comportamento celular [47].

Para reduzir o número de parâmetros nas equações 5.1 e 5.2, as seguintes variáveis adimensionais são definidas

$$t' = \frac{Dt}{\Delta^2}, \quad \vec{x}' = \frac{\vec{x}}{\Delta}, \quad N' = \frac{N}{K_0}, \quad M' = \frac{M}{K_0} \quad \text{e} \quad \alpha = \Delta \sqrt{\frac{\gamma}{D}}. \quad (5.3)$$

Usando estas novas variáveis nas equações 5.1 e 5.2 e omitindo as plicas, obtemos

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \nabla^2 N - \alpha^2 N \sigma_n - \lambda_N \alpha^2 N \sigma_c \quad (5.4)$$

e

$$\frac{\partial M}{\partial t} = \nabla^2 M - \alpha^2 M \sigma_n - \lambda_M \alpha^2 M \sigma_c \quad (5.5)$$

para as equações de difusão que descrevem os campos de concentração de nutrientes. Temos ainda que a condição de contorno no vaso capilar torna-se $N(x = 0) = M(x = 0) = 1$ e o valor $\Delta = 1$ é definido.

A concentração estacionária de nutrientes na ausência de células cancerosas pode ser calculada exatamente usando-se $\sigma_c(\vec{x}) = 0$, $\sigma_n(\vec{x}) = 1$ e a simetria ao longo do eixo y que garante que N e M são funções apenas de x . Resolvendo as equações 5.4 e 5.5 com estas restrições teremos $N(\vec{x}) = M(\vec{x}) = \phi(x)$, figura 5.2, onde

$$\phi(x) = \frac{e^{\alpha x}}{1 + e^{2\alpha L}} + \frac{e^{-\alpha x}}{1 + e^{-2\alpha L}}. \quad (5.6)$$

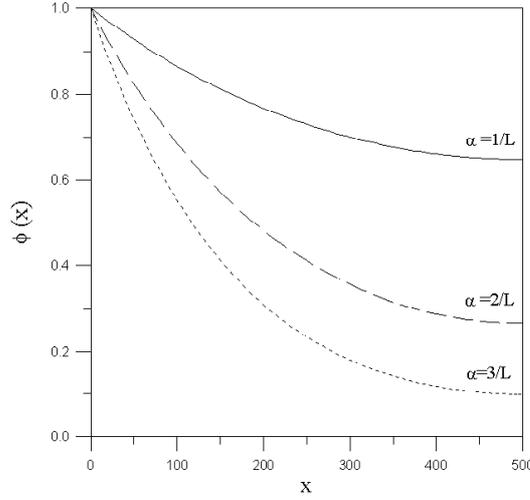


Figura 5.2: Concentração de nutrientes na ausência de células cancerosas para um tecido de tamanho $L = 500$. Note que o parâmetro α determina a quantidade inicial de nutrientes no tecido.

5.1.3 Dinâmica celular

Cada célula cancerosa do tumor pode ser selecionada ao acaso, com igual probabilidade, e executar uma das três ações:

1. *Divisão.* As células cancerosas dividem-se por mitose com probabilidade P_{div} . Se a célula escolhida está dentro do tumor, seu clone irá empilhar neste mesmo sítio, e $\sigma_c(\vec{x}) \rightarrow \sigma_c(\vec{x}) + 1$. Mas se a célula selecionada pertencer à borda do tumor, seu clone ocupará ao acaso um dos seus sítios primeiros vizinhos \vec{x}' contendo uma célula normal ou necrótica e, portanto, $\sigma_c(\vec{x}') = 1$ e $\sigma_{n,d}(\vec{x}') = 0$. A probabilidade de mitose é determinada pela concentração de nutrientes essenciais N presentes no microambiente da célula selecionada

$$P_{div}(\vec{x}) = 1 - \exp \left[- \left(\frac{N(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x})\theta_{div}} \right)^2 \right]. \quad (5.7)$$

O termo gaussiano é incluído para produzir uma curva sigmóide que satura na unidade, e o parâmetro θ_{div} controla a forma desta sigmóide (figura 5.3(a)).

2. *Migração.* Células cancerosas migram com probabilidade P_{mov} . Uma célula selecionada dentro do tumor, no sítio \vec{x} , mover-se-á para o sítio vizinho mais próximo \vec{x}' escolhido ao acaso. Portanto, $\sigma_c(\vec{x}') \rightarrow \sigma_c(\vec{x}') + 1$ e, obviamente, $\sigma_c(\vec{x}) \rightarrow \sigma_c(\vec{x}) - 1$. Por outro lado, se a célula selecionada está na borda do

tumor, a invasão do sítio vizinho normal ou necrótico dependerá do número de células cancerosas presentes no sítio da célula selecionada. Se neste sítio existe uma única célula cancerosa, ela migra trocando sua posição com a célula do sítio invadido. Se existem outras células cancerosas no mesmo sítio da célula selecionada para o movimento, esta célula ocupará o sítio de uma das suas primeiras vizinhas normais ou necróticas, que, por sua vez, desaparece. Em termos da população celular a migração de uma célula na borda do tumor corresponde às seguintes operações: $\sigma_c(\vec{x}') = 1$, $\sigma_c(\vec{x}) \rightarrow \sigma_c(\vec{x}) - 1$, $\sigma_{n,d}(\vec{x}') = 0$ e $\sigma_{n,d}(\vec{x}) = 1$ se $\sigma_c(\vec{x}) = 1$. A probabilidade de migração P_{mov} tem a mesma forma funcional de P_{div} , mas depende da concentração dos nutrientes não-essenciais M presentes no microambiente da célula selecionada e aumenta com a população local de células cancerosas. Assim,

$$P_{mov}(\vec{x}) = 1 - \exp \left[-\sigma_c(\vec{x}) \left(\frac{M(\vec{x})}{\theta_{mov}} \right)^2 \right] \quad (5.8)$$

com o parâmetro θ_{mov} controlando a forma desta sigmóide. $\sigma_c(\vec{x})$ no numerador indica que a probabilidade de uma célula migrar daquele sítio cresce com o número de células cancerosas presente nele.

3. *Morte celular.* Células cancerosas morrem se transformando em células necróticas com probabilidade P_{del} . Assim, $\sigma_c(\vec{x}) \rightarrow \sigma_c(\vec{x}) - 1$ e, quando $\sigma_c = 1$, $\sigma_d(\vec{x}) = 1$. A probabilidade de morte celular P_{del} é determinada pela concentração de nutrientes não-essenciais M presentes no microambiente da célula selecionada

$$P_{del}(\vec{x}) = \exp \left[- \left(\frac{M(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x}) \theta_{del}} \right)^2 \right], \quad (5.9)$$

uma distribuição Gaussiana cuja variância depende do parâmetro θ_{del} (figura 5.3(b)).

As regras da dinâmica celular usadas nesse modelo levam em conta que, com o progresso do crescimento do câncer, a migração celular aumenta próxima da borda do tumor devido à alta disponibilidade de nutrientes e ao aumento no número de células cancerosas que liberam uma série de enzimas (colagenases, metaloproteinasas, etc.) responsáveis pela destruição da matriz extracelular (seção 2.2). Além disso, nas regiões onde há uma alta densidade populacional e um fornecimento ineficiente

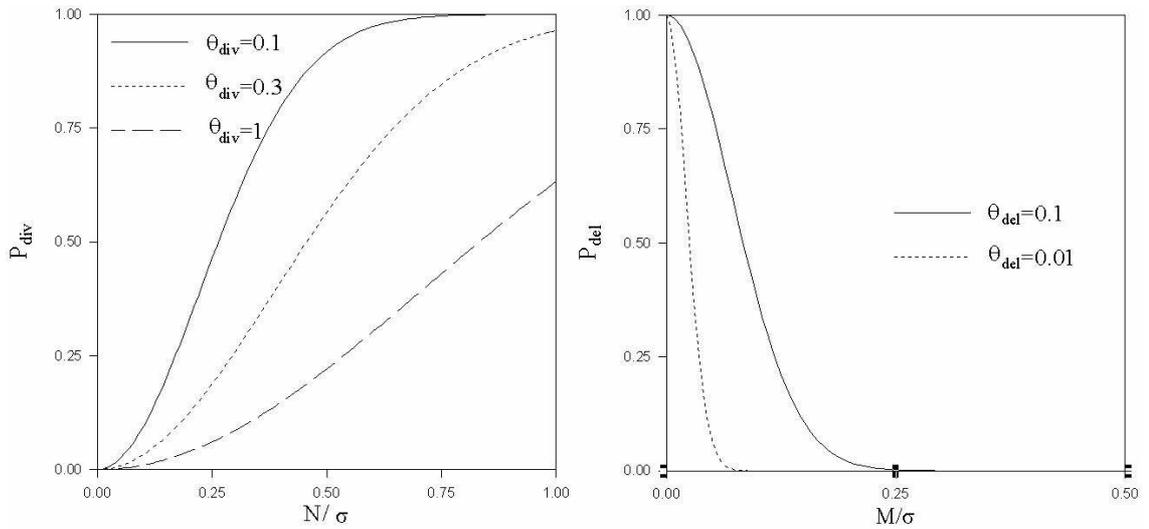


Figura 5.3: Probabilidades de divisão e morte.

de nutrientes via processo de difusão, a divisão celular é inibida e, ao mesmo tempo, a probabilidade de morte celular aumenta. Contudo, nestas regras o crescimento e migração celular são possíveis mesmo dentro do tumor. Finalmente, os parâmetros θ_{div} , θ_{mov} e θ_{del} , que caracterizam a resposta das células cancerosas à concentração de nutrientes e incorporam processos genéticos e metabólicos, devem ser interpretados em termos da bioquímica e da biologia molecular. Este problema ainda está aberto. Os outros três parâmetros do modelo α , λ_N e λ_M , associados com o consumo de nutrientes por células normais e cancerosas, podem ser mais facilmente determinados em experimentos biológicos (veja, por exemplo, [59]).

É importante notar que do ponto de vista da chamada *teoria cinética celular*, que fornece uma estrutura geral para a descrição estatística da dinâmica de células interagentes [14], as probabilidades locais P_{div} , P_{mov} e P_{del} podem ser interpretadas como um modelo celular cinético efetivo.

5.1.4 Algoritmo de simulação

As simulações do modelo foram implementadas usando-se o seguinte procedimento. Em cada passo de tempo T , as equações de difusão (5.4) e (5.5) são resolvidas numericamente no estado estacionário ($\partial N/\partial t = \partial M/\partial t = 0$) através do método de relaxação de Gauss-Siedel [60], fornecendo a concentração de nutrientes em todos os sítios da rede. Então, $N_C(T)$ células cancerosas, o número total dessas células no início do passo T , são selecionadas ao acaso com igual probabilidade. Para cada célula

selecionada, uma ação (divisão, morte ou movimento) é escolhida com igual probabilidade. A ação selecionada será implementada ou não de acordo com as correspondentes probabilidades locais dadas pelas equações (5.7), (5.8) e (5.9). Se a célula selecionada divide ou morre, mudando, portanto, o número de células cancerosas que consomem nutrientes, as equações de difusão são resolvidas numa pequena rede de tamanho linear $l = 20$ centrada nos sítios alterados. Isto é feito para considerar as perturbações locais e acelerar o algoritmo computacional, desde que o número de iterações necessárias para encontrar a solução estacionária das equações de difusão é proporcional a L^2 [60]. No fim desta seqüência de $N_C(T)$ tentativas, um novo passo começa e todo o procedimento (solução das equações de difusão e aplicação da dinâmica celular) é iterado. As simulações terminam quando um célula cancerosa atinge o vaso capilar. A concentração de nutrientes no início da simulação ($T = 0$) é dada pela solução das equações de difusão na ausência de células cancerosas, ou seja, pela equação (5.6). A figura 5.4 mostra um fluxograma com o algoritmo do modelo de crescimento.

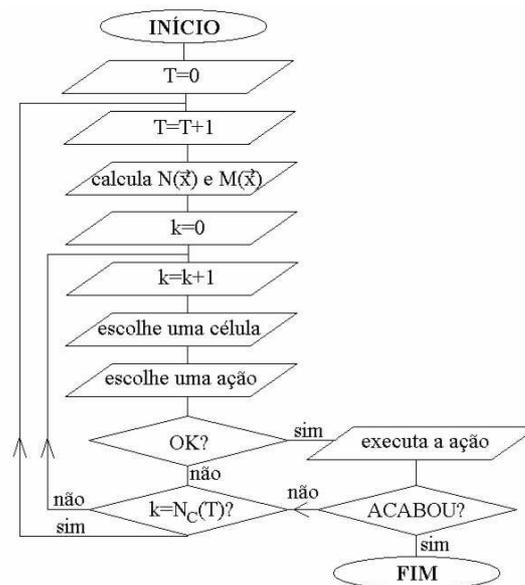


Figura 5.4: Algoritmo do modelo de crescimento. k é um contador do número de tentativas de executar um ação. Após $N_C(T)$ tentativas, o tempo é incrementado em um passo, as equações de difusão são resolvidas e o contador k é reiniciado. O termo ‘OK?’ está perguntado se a célula executará a ação escolhida.

5.1.5 Estimativa do valor de alguns parâmetros

As simulações envolvem passos de tempo com unidades arbitrárias. No entanto, para uma comparação com dados reais é necessário associar o passo a uma escala de tempo real. De acordo com a dinâmica celular do modelo, em média, todas as células do tumor podem dividir-se durante um passo. Por isso, é adequado relacionar o passo de tempo do modelo com o **tempo de duplicação** (“doubling time”) do tumor, que é da ordem de 10^2 h ou 4 dias. Como nem todas as células dividem-se durante um passo, este corresponderá a uma fração do tempo de duplicação e foi definido em 1 dia. Note que o tempo de duplicação pode ser variado através do parâmetro θ_{div} que controla a taxa de divisão celular. O parâmetro de rede Δ é definido como um tamanho celular típico da ordem de $5 - 20 \mu\text{m}$. Em todas as simulações usamos redes 500×500 e a “semente cancerosa” inicial localizada a 300 sítios de distância do vaso capilar. Assim, a distância do vaso à borda inferior do tecido e à semente inicial seriam da ordem de 1 mm, ou seja, o limite da distância que células podem sobreviver com nutrientes recebidos apenas por difusão ($0.1 - 1$ mm).

Quantidade	Valor estimado	Referência
tempo de duplicação	$\sim 10^2$ h	Rew & Wilson (2000) em [59]
tempo de difusão	~ 10 s	Rew & Wilson (2000) em [59]
comprimento de difusão	$0.1 - 1$ mm	Carmeliet & Jain [35]
tamanho celular	$5 - 20 \mu\text{m}$	Cross <i>et. al.</i> [54], Brasileiro [36]
constante de difusão	$9.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$	Crone & Leviit (1984) em [59]
constante de difusão	$\sim 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	Jain (1987) em [18]
consumo cel. normal	$10^{-6} - 5 \times 10^{-4}/\text{s}$	Casciari <i>et. al.</i> (1992) em [59]
consumo cel. cancerosa	$10^{-5} - 10^{-3}/\text{s}$	Casciari <i>et. al.</i> (1992) em [59]

Tabela 5.1: Dados usados para estimar a ordem de grandeza de parte dos parâmetros do modelo. Os dados referem-se à difusão e ao consumo de glicose. As referências completas não citadas na tese podem ser encontradas nos artigos mencionados.

Adotamos o valor da constante de difusão de glicose como um valor característico para D . Patel *et. al.* [59] usaram $D = 9.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Por outro lado, a taxa de consumo das células normais e cancerosas são estimadas em $10^{-6}/\text{s} < \gamma < 5 \times 10^{-4}/\text{s}$ e $10^{-5}/\text{s} < \lambda\gamma < 10^{-3}/\text{s}$ [59], respectivamente. Portanto, podemos assumir que $\lambda_{M,N}$ estão na ordem de 10 à 100. Usando as constantes fornecidas por Patel *et. al.* [59] estabelecemos duas cotas para o parâmetro $\alpha = \Delta\sqrt{\gamma/D}$

dadas por $\alpha_{inf} \sim 10^{-4}$ e $\alpha_{sup} \sim 10^{-3}$. Medidas mais recentes usadas por Sander & Deisboeck [18] ($D \sim 10^{-6}$ cm²/s) fornecem um cota maior ($\alpha_{sup} \sim 10^{-2}$). Portanto, em todas as simulações, α está no intervalo $[10^{-3}, 10^{-2}]$. Os parâmetros citados anteriormente fornecem um tempo de difusão na ordem de 10 s, justificando a aproximação com soluções estacionárias das equações de reação-difusão. Estes dados e os parâmetros estimados são resumidos nas tabelas 5.1 e 5.2.

Parâmetros adimensionais	Valores usados nas simulações	Interpretação biológica
passo de tempo	1	1 dia
Δ	1	5 μ m
L	500	2.5 mm
Y	300	1.5 mm
α	0.002 – 0.008	consumo cel. normal
λ_M	10 – 25	metabolismo acelerado
$\lambda_N(> \lambda_M)$	25 – 200	metabolismo acelerado

Tabela 5.2: Parâmetros usados no modelo e o seu significado biológico com base na tabela 5.1

Como foi mencionado anteriormente, as parâmetros da dinâmica celular θ_{div} , θ_{del} e θ_{mov} não podem ser estimados experimentalmente e, portanto, precisam ser ajustados a partir das próprias simulações.

5.2 Resultados

Na figura 5.5, as morfologias mais comuns observadas em tumores como papilares, compactas e desconexas são mostradas. Padrões desconexos, típicos de neoplasias de células redondas tais como **linfomas**, mastocitomas e plasmocitomas, correspondem aos padrões de crescimento transientes nos quais as células cancerosas tem alta mobilidade mas uma taxa mitótica baixa. Por outro lado, se a migração celular é muito pequena e a taxa de consumo dos nutrientes essenciais é alta, então os padrões formam dedos similares às morfologias papilares encontradas em tumores epiteliais, tais como carcinomas basal e de pele, e hepatomas. Se a disponibilidade de nutrientes no tecido é reduzida ainda mais pelo aumento no consumo celular, os padrões papilares tornam-se progressivamente finos formando filamentos de células que constituem

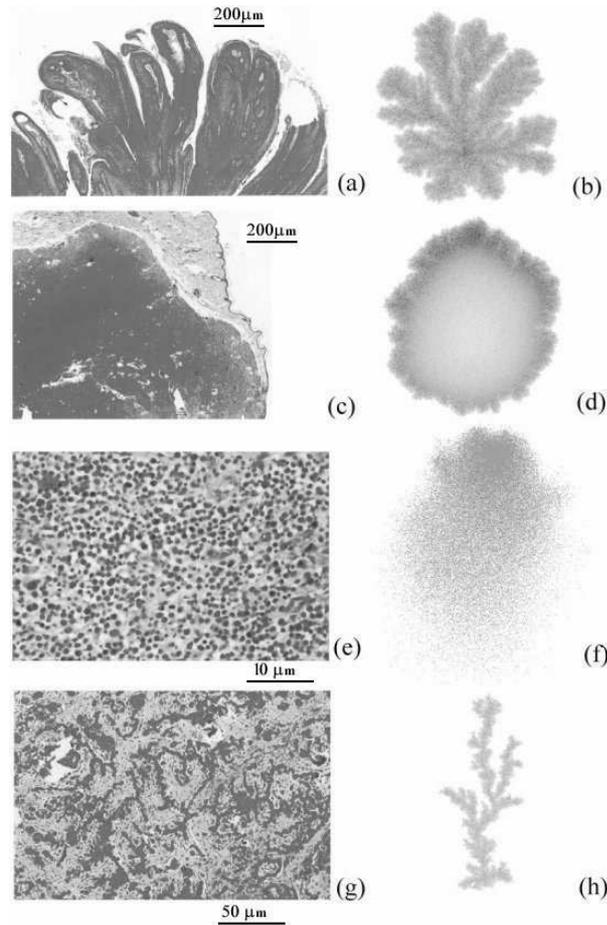


Figura 5.5: Morfologias comuns observadas no crescimento de tumores. (a) Padrões papilares de um **papiloma escamoso**, (c) um carcinoma basocelular sólido e compacto, (e) um padrão disseminado de um plasmocitoma e (g) filamentos característicos de um tricloblastoma. Todos estes padrões histológicos foram retirados de cães. Os padrões simulados correspondentes são mostrados em (b), (d), (f) e (h), respectivamente.

uma das principais características da morfologia dos tricloblastomas. Finalmente, em altas disponibilidades de nutrientes, que no modelo significa baixo consumo celular de ambos os tipos de nutrientes, os padrões simulados são compactos como os observados para tumores sólidos.

Como o modelo possui 6 parâmetros (α , λ_N , λ_M , θ_{div} , θ_{del} e θ_{mov}), a influência de cada parâmetro nos padrões de crescimento foi estudada cuidadosamente, dentro das faixas definidas na tabela 5.2. O consumo de nutrientes por células normais e cancerosas, controlados pelos parâmetros α , λ_N e λ_M , desempenham um papel central na formação de morfologias fractais. Padrões de crescimento típicos gerados pelo modelo são mostrados na figura 5.6. Nesta figura pode-se ver morfologias não-esféricas

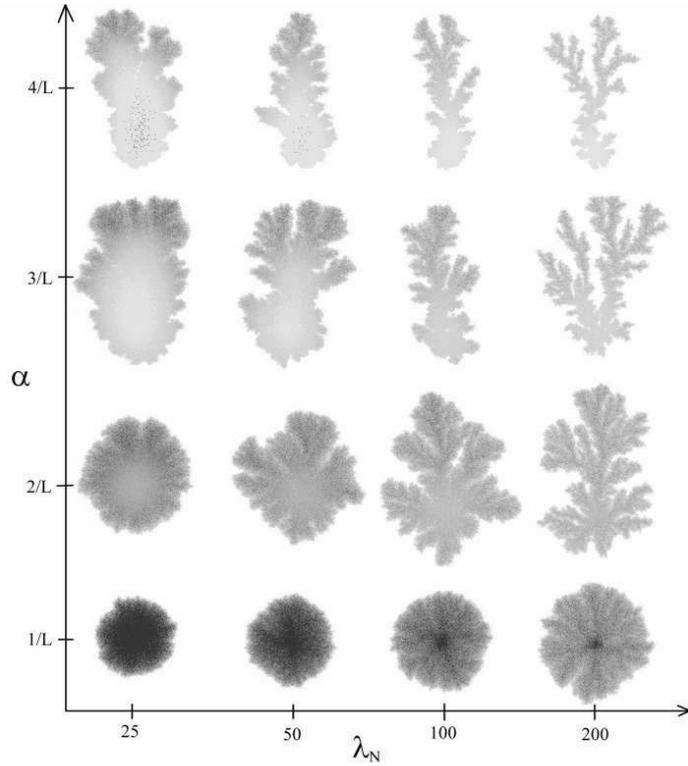


Figura 5.6: Resultados do modelo de crescimento de câncer limitado por nutrientes. Os padrões são organizados como função da taxa de consumo de nutrientes α para células normais e o fator multiplicativo λ_N para a taxa de consumo pelas células cancerosas dos nutrientes essenciais para mitose. Os quatro parâmetros restantes foram fixados em $\lambda_M = 10$, $\theta_{div} = 0.3$, $\theta_{mov} = \infty$ (ausência de migração celular) e $\theta_{del} = 0.01$. Os padrões são mostrados em escala de cinza onde as regiões mais escuras representam populações celulares mais altas. O número total de células cancerosas depende da morfologia do tumor e atinge até 2×10^5 para padrões compactos.

crescendo em direção ao vaso capilar, em concordância com resultados rigorosos de problemas de contorno móveis para o crescimento de tumores [62] e resultados experimentais para tumores do cérebro [63]. Para valores pequenos destes parâmetros, correspondendo a condições de crescimento nas quais células individuais precisam de menos nutrientes que o disponível no tecido, os padrões tendem a ser compactos e circulares. Contudo, se a taxa de reprodução é baixa devido à necessidade de uma quantidade de nutrientes para a divisão maior que a presente no tecido, gerando, portanto, uma competição por nutrientes significativa, os padrões compactos assumem progressivamente morfologias papilares. Quando os nutrientes tornam-se ainda mais escassos devido à maiores taxas de consumo, os padrões papilares tornam-se mais ramificados, transformando-se continuamente em filamentos ou cadeias de células.

O aumento da mobilidade celular, controlada pelo parâmetro θ_{mov} , homogeneiza os padrões destruindo as morfologias fractais como as observadas na figura 5.6. Como o movimento é feito ao acaso, em condições de alta mobilidade celular as células estão em constante caminhada aleatória ocupando com igual probabilidade os sítios da sua vizinhança. De fato, em tecidos moles, onde as células tem grande liberdade de movimento, os padrões tumorais são sempre homogêneos ou desconexos como no caso dos linfomas e plasmocitomas. Além disso, tumores muito invasivos são estruturalmente desorganizados e não possuem bordas bem definidas [32]. A homogeneização de um tumor papilar é mostrada na figura 5.7.

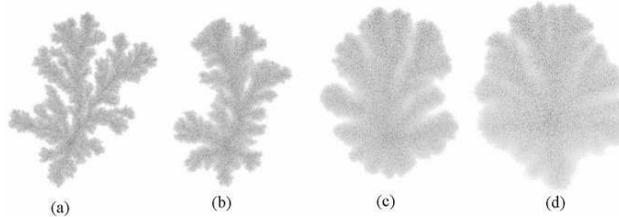


Figura 5.7: Influência da mobilidade celular nas morfologias dos tumores. O aumento da taxa de movimento celular destrói gradativamente os dedos e ramificações dos padrões. No tumor (a) as células não podem mover-se ($\theta_{mov} = \infty$), no tumor (b) a mobilidade existe mas é muito baixa ($\theta_{mov} = 2$), no tumor (c) a mobilidade é baixa ($\theta_{mov} = 0.5$) e no tumor (d) a taxa de movimento é alta ($\theta_{mov} = 0.05$). Os demais parâmetros foram fixados em $\lambda_N = 200$, $\lambda_M = 10$, $\alpha = 2/L$, $\theta_{div} = 0.3$ e $\theta_{del} = 0$.

Os padrões tumorais gerados pelo modelo foram caracterizados por seu raio de giração R_g , número total de células cancerosas N_C e número de sítios da periferia do tumor S (incluindo a superfície dos buracos internos). O raio de giração é definido pela equação (3.1), na qual n é o número de sítios ocupado pelo padrão (sítios necróticos e ocupados por células cancerosas). De modo semelhante, sítios da periferia do tumor são definidos como sítios necróticos ou ocupados por células cancerosas que possuem pelo menos um sítio vizinho ocupado por célula normal. Estas quantidades podem ser relacionadas a critérios clinicamente importantes tais como curvas de progresso, taxa de crescimento (tempo de duplicação do volume) para um certo raio, frações proliferativas, quiescentes e necróticas do tumor. Em medicina, estes dados são usados para determinar a malignidade do tumor e o seu prognóstico. Os resultados obtidos são resumidos na tabela 5.3.

Quanto aos mecanismos microscópicos de crescimento, para todos os padrões simulados a evolução no tempo da população de células cancerosas segue curvas de

Morfologia	Características	Crescimento no tempo			Expoentes	
		N	R_g	S	ν	σ
Compacto	Baixo consumo de nutrientes;	Gompertz	Gompertz	Gompertz	0.5	0.5
	Baixa mobilidade					
Papilar	Alto consumo de nutrientes;	Gompertz	Gompertz	Gompertz	0.5-0.6	0.6-1
	Baixa mobilidade					
Disseminado	Pouca divisão; Alta mobilidade;	Gompertz	Gompertz	Gompertz	0.5	1
	Transiente					

Tabela 5.3: Morfologias, curvas de progresso e leis de escala para os padrões gerados pelo modelo com competição por nutrientes.

Gompertz, equação (3.7), como ilustra a figura 5.8. Além disso, o raio de giração do tumor R_g e o número de células cancerosas na periferia do tumor S também exibem um crescimento de Gompertz, ao contrário dos regimes lineares observados para R_g e mesmo S em nosso modelo anterior sem limitação por nutrientes (capítulo 4). Assim, o modelo atual indica que a lei de crescimento de Gompertz para a população de células cancerosas é um aspecto robusto que emerge da dinâmica cancerosa com competição por nutrientes. É importante notar que ajustes lineares ou de lei de potência para o crescimento no tempo de R_g e S também podem ser muito satisfatórios ($r^2 > 0.999$) para vários padrões simulados explicando, portanto, os resultados do nosso modelo com fatores de crescimento e observações experimentais recentes de tumores do cérebro crescendo *in vitro* [58]. Contudo, somente a lei de Gompertz fornece bons ajustes para todas as três quantidades N_C , R_g e S .

O modelo reproduz uma observação biológica conhecida na qual cânceres que crescem rapidamente, tais como tumores do fígado, tendem a formar padrões circulares, em contraste com a morfologia ramificada de muitos tumores epiteliais caracterizados por crescimentos lentos. Por exemplo, o tumor compacto da figura 5.6 onde $\alpha = 2/L$ e $\lambda_N = 25$ levaria cerca de 170 passos de tempo (em torno de 7 meses) para atingir um tamanho equivalente a 1 mm, enquanto o tumor ramificado, para o qual $\alpha = 4/L$ e $\lambda_N = 200$, levaria em torno de 1700 passos (quase cinco anos) para atingir o mesmo tamanho.

Por outro lado, como função do número total de sítios ocupados pelo padrão,

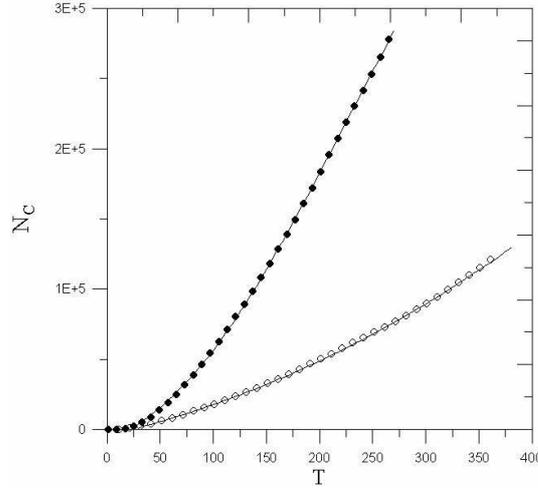


Figura 5.8: Crescimento de Gompertz da população de células cancerosas. Os parâmetros foram fixados em $\lambda_N = 25$ (200), $\alpha = 2/L$, $\lambda_M = 10$, $\theta_{div} = 0.3$, $\theta_{mov} = 2$ e $\theta_{del} = 0.03$ para a curva com círculos preenchidos (vazios). As linhas sólidas correspondem aos ajustes não-lineares com $r^2 > 0.9995$.

ambos R_g e S obedecem leis de escala dadas por $R_g \sim n^\nu$ e $S \sim n^\sigma$, respectivamente. Para padrões sólidos estes expoentes são os mesmos encontrados para o modelo de Eden, $\nu \sim 0.5$ e $\sigma \sim 0.5$, correspondendo a padrões circulares e não-fractais (figura 5.9(a)). Quando o consumo de nutrientes aumenta os padrões tendem a formas papilares e as leis de escalas para R_g e S mudam. Quando o tumor ainda é pequeno os nutrientes são abundantes e os tumores crescem como o modelo de Eden. Contudo, à medida que o tumor torna-se maior e os níveis de nutrientes nos tecidos tornam-se mais baixos, a morfologia papilar emerge junto com uma mudança nas leis de escala. Assim os gráficos $R_g \times n$ e $S \times n$ possuem um ‘crossover’ separando duas leis de potência: abaixo do tamanho crítico $\nu = \sigma = 0.5$ e acima deste tamanho $\sigma \in [0.6, 1]$ e $\nu \in [0.5, 0.6]$, indicando uma morfologia fractal para o tumor pois a dimensão fractal é o inverso do expoente do raio de giração, isto é, $d_f = 1/\nu$ [39] (figura 5.9(b)).

Um resultado interessante, mostrado na figura 5.10, é a existência de um núcleo necrótico no centro dos padrões simulados para alto consumo de nutrientes ou taxas de divisão celular. Como observado em tumores reais e esferóides multicelulares *in vitro* [13], os padrões simulados são constituídos de três regiões distintas: um núcleo necrótico central, uma faixa interna de células cancerosas quiescentes e uma camada externa estreita de células proliferativas. Estas regiões diferentes são evidentes na figura 5.11 na qual a densidade de células cancerosas e a taxa de divisão média são traçadas para um corte longitudinal através do padrão de crescimento. Como pode-

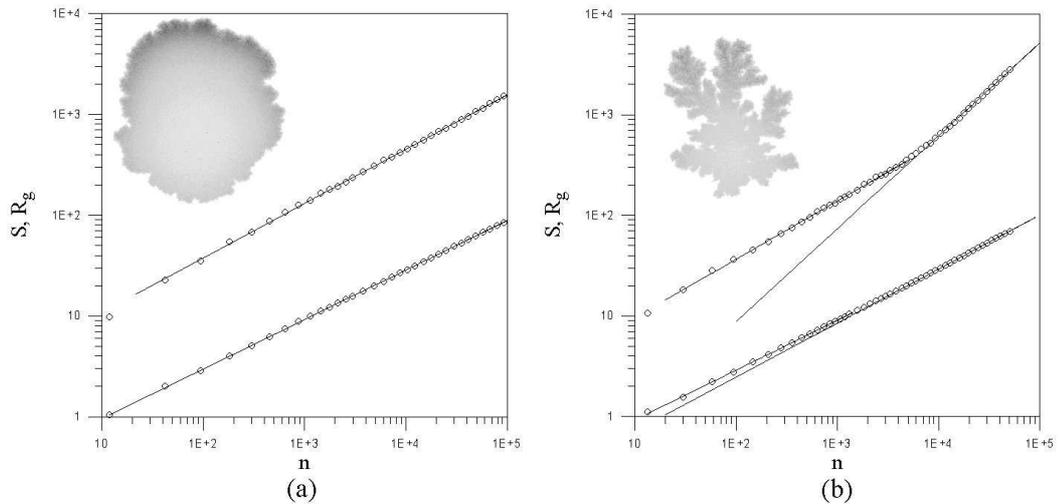


Figura 5.9: Leis de escala para R_g (curvas de baixo) e S (curvas de cima) para tumores (a) compactos e (b) papilares. Nos padrões compactos, R_g e S sempre escalam com a raiz quadrada do número de sítios ocupados enquanto nos padrões papilares esta lei muda acima de um tamanho crítico. Os expoentes na região acima do crossover do gráfico (b) são $\nu = 0.54$ e $\sigma = 0.93$.

se ver, ambas, a densidade de células cancerosas e a taxa de divisão, têm máximos nítidos nas bordas do tumor, à frente e oposto ao vaso capilar. Note que os picos na taxa de divisão são significativamente mais estreitos que os picos na densidade de células cancerosas, demonstrando que a fração proliferativa compreende apenas uma pequena parte das células cancerosas localizadas na borda do tumor. Além disso, quanto menor os valores de α e λ_N , maior é a fração de sítios necróticos para uma resposta à morte celular (controlada por θ_{del}) fixa. Em particular, esta fração é menor para os padrões papilares que para os padrões compactos (figura 5.10), sugerindo que a morfologia mais eficiente para o crescimento sob forte limitação de nutrientes é fractal. Finalmente, quanto maior é a migração celular, mais homogêneos são os padrões, mais rápido é o crescimento do tumor e menor é a fração de células necróticas.

Contudo, nesse modelo limitado por nutrientes, os padrões desconexos comuns em cânceres de células redondas (figura 5.5(e)) correspondem a comportamentos transientes do modelo para baixas taxas de divisão e alta mobilidade das células cancerosas. Além disso, a morfologia ramificada de um triclobastoma visto na figura 5.12(d) não pode ser qualitativamente reproduzida pelo modelo. Um aspecto interessante deste padrão é a presença de “folhas”, com o crescimento de cada uma claramente influenciando as outras. A simples introdução de mobilidade celular sensível aos gra-

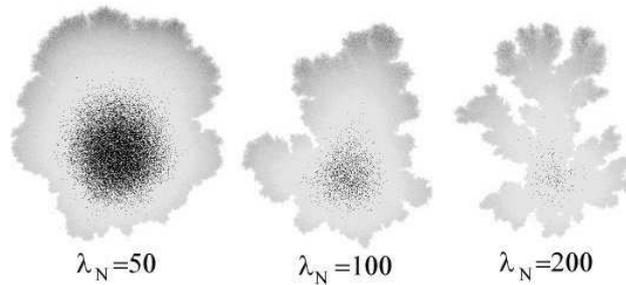


Figura 5.10: Padrões de crescimento exibindo um núcleo necrótico (em preto). Os parâmetros do modelo são $\alpha = 2/L$, $\lambda_M = 25$, $\theta_{div} = 0.3$, $\theta_{mov} = \infty$ (sem mobilidade celular) e $\theta_{del} = 0.03$. A fração de células necróticas é menor nos padrões papilares que nos padrões compactos, sugerindo que a morfologia mais eficiente sob forte limitação de nutrientes é fractal.

dientes de nutrientes não é capaz de gerar padrões estacionários desconexos ou ramificados. Portanto, além do campo de nutrientes, parece que interações quimiotáticas entre as células guiando sua migração devem ser consideradas. A natureza destas interações biológicas e seus resultados serão discutidos na próxima seção.

5.3 Fatores de Crescimento

Do ponto de vista biológico a resposta quimiotática a fatores de crescimento liberados por células cancerosas parece ser, juntamente com a disponibilidade de nutrientes, outro aspecto central no desenvolvimento do câncer. A influência recíproca entre células cancerosas mediada por fatores de crescimento autócrinos e parácrinos, fatores de mobilidade, etc., bem como a produção de enzimas que degradam a matriz extracelular alteram o microambiente das células cancerosas e portanto seu comportamento. Assim, ambos campos difusivos (nutrientes e fatores de crescimento) determinam as probabilidades locais para a divisão, movimento e morte das células cancerosas. Como no capítulo 4, o termo fatores de crescimento refere-se genericamente a todos os produtos liberados pelas células cancerosas.

5.3.1 O modelo

Para investigar o papel dos fatores de crescimento no crescimento limitado por nutrientes, simplificamos nosso modelo considerando um único campo de nutrientes descrito

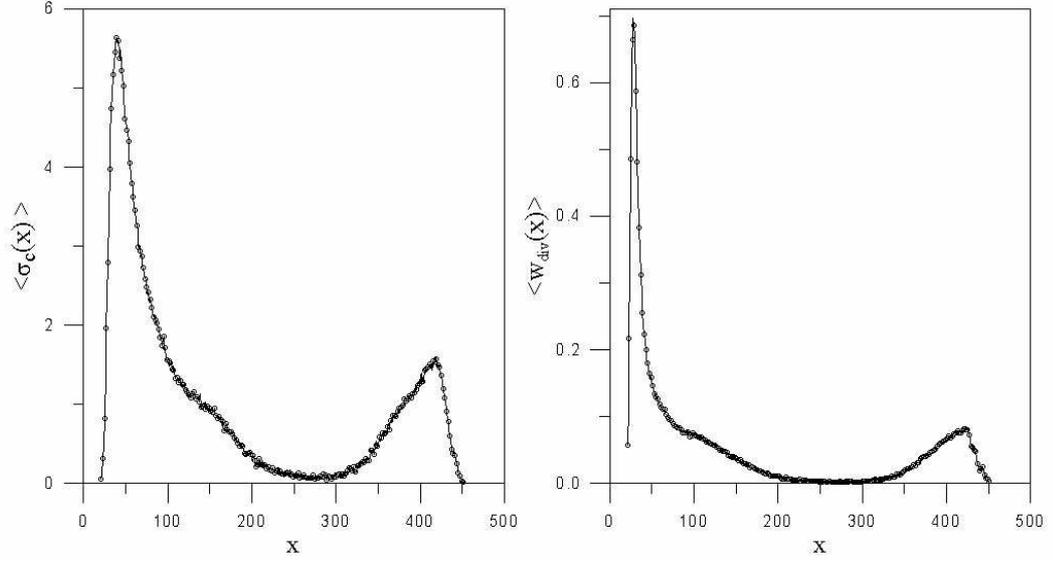


Figura 5.11: (a) Densidade de células cancerosas σ_c e (b) taxa de divisão w_{div} como funções da distância ao vaso capilar através de um corte longitudinal no tumor. Os parâmetros do modelo são $\alpha = 2/L$, $\lambda_M = 25$, $\lambda_N = 50$, $\theta_{div} = 0.3$, $\theta_{mov} = \infty$ (sem mobilidade celular) e $\theta_{del} = 0.03$. Os máximos na borda do tumor, próximo e oposto ao vaso capilar em $x = 0$, são evidentes. Portanto, a fração proliferativa de células cancerosas está distribuída em uma camada fina na borda do tumor.

pela equação de difusão

$$\frac{\partial N}{\partial t} = D_N \nabla^2 N - \gamma N \sigma_n - \lambda \gamma N \sigma_c, \quad (5.10)$$

na qual γ e $\lambda \gamma$ são as taxas de consumo de nutrientes de células normais e cancerosas, respectivamente. As condições de contorno são as mesmas descritas na seção 5. Por outro lado, a concentração de fatores de crescimento (GF) produzidos pelas células cancerosas obedece à equação de difusão

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_G \nabla^2 G - k^2 G + \Gamma \sigma_c N (G_M - G), \quad (5.11)$$

que inclui a degradação natural de GF, impondo um comprimento característico $\sim 1/k$ para a difusão de GF, e um termo que cresce linearmente com a concentração local de nutrientes até um valor de saturação G_M . Portanto, nós assumimos que a liberação de GF envolve processos metabólicos complexos mantidos pelo consumo de nutrientes. As condições de contorno satisfeitas pela concentração de GF é $G(\vec{x}, t) = 0$ a uma grande distância ($d > 2/k$) da borda do tumor.

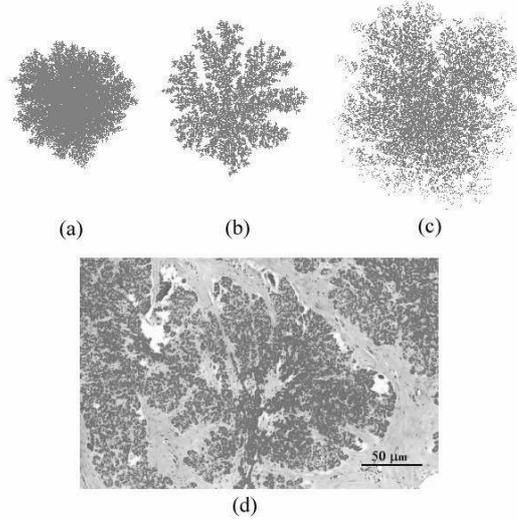


Figura 5.12: Padrões de crescimento de câncer limitado por nutrientes incluindo a influência entre células cancerosas mediada por fatores de crescimento. Morfologias (a) compacta ($k = 0.1$ e $\theta_{mov} = 1$), (b) ramificada ($k = 0.025$ e $\theta_{mov} = 1$) e (c) disseminada ($k = 0.025$ e $\theta_{mov} = 0.1$). Os demais parâmetros do modelo foram fixados em $\alpha = 3/L$, $\theta_{div} = 0.5$, $N^* = \theta_{del} = 0.01$, $\lambda = 5$ e $\Gamma = 10$. O número total de células cancerosas de cada padrão é 5×10^4 . Para uma comparação, um padrão ramificado real observado em um tricloblastoma é mostrado em (d).

Novamente, o número de parâmetros nas equações 5.10 e 5.11 pode ser reduzido usando novas variáveis adimensionais

$$t' = \frac{D_N t}{\Delta^2}, \quad \vec{x}' = \frac{\vec{x}}{\Delta}, \quad N' = \frac{N}{K_0}, \quad G' = \frac{G}{G_M}, \quad \alpha = \sqrt{\frac{\gamma \Delta^2}{D_N}},$$

$$k' = k \sqrt{\frac{\Delta^2}{D_N}}, \quad \Gamma' = \frac{\Gamma \Delta^2}{D_N}, \quad D = \frac{D_G}{D_N}. \quad (5.12)$$

Usando essas novas variáveis nas equações 5.10 e 5.11 e omitindo as plicas obtemos

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \nabla^2 N - \alpha^2 N \sigma_n - \lambda \alpha^2 N \sigma_c \quad (5.13)$$

e

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D \nabla^2 G - k^2 G + \Gamma \sigma_c N (1 - G) \quad (5.14)$$

para as equações de difusão. A condição de contorno para os nutrientes no capilar torna-se $N(x = 0) = 1$ e o valor $\Delta = 1$ é definido. Temos ainda que no estado estacionário o parâmetro D na equação (5.14) pode ser feito igual à unidade re-

escalando os parâmetros k e Γ . Assim, as equações de difusão para nutrientes e GF envolvem quatro parâmetros: α , λ , k e Γ .

Por outro lado, a dinâmica celular tem essencialmente as mesmas regras usadas na subseção 5.1.3, mas com as probabilidades das ações diferentes. A primeira mudança introduzida é que, após a divisão celular, a célula-filha permanece no mesmo sítio ocupado pela sua mãe, independentemente da célula estar na borda do tumor ou não. Essa mudança foi adotada para que o movimento celular fique restrito à quimiotaxia guiada pelo gradiente de GF que introduziremos no movimento celular e, portanto, acentuar o efeito da quimiotaxia. Desde que os nutrientes são essenciais para a síntese de grandes proteínas e DNA necessários para a mitose e GF são indutores de divisão, a forma proposta para P_{div} é

$$P_{div}(\vec{x}) = 1 - \exp \left[- \left(\frac{N(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x})} - N^* \right) \frac{G(\vec{x})^2}{\theta_{div}^2} \right]. \quad (5.15)$$

O parâmetro N^* determina o nível de escassez de nutrientes abaixo do qual a reprodução das células cancerosas é inibida.

A migração celular envolve grandes reorganizações do citoesqueleto que consomem energia e são facilitadas por enzimas que destroem a matriz extracelular e as estruturas de adesão entre células normais, além da estimulação da migração pelos fatores de motilidade autócrinos. Assim, P_{mov} é dado por

$$P_{mov}(\vec{x}, \vec{x}') = 1 - \exp \left[\frac{N(\vec{x})G(\vec{x})[G(\vec{x}') - G(\vec{x})]}{\theta_{mov}} \right], \quad (5.16)$$

implicando que uma célula migra guiada pelo gradiente e em direção aos sítios nos quais a concentração de GF é menor que a do sítio de partida. Obviamente, se $G(\vec{x}') > G(\vec{x})$ então $P_{mov} \equiv 0$.

Finalmente, a morte celular continua sendo causada pela falta de nutrientes

$$P_{del}(\vec{x}) = \exp \left[- \left(\frac{N(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x}) \theta_{del}} \right)^2 \right]. \quad (5.17)$$

5.3.2 Resultados

Na figura 5.12 padrões simulados compactos, ramificados e desconexos são mostrados. A estrutura ramificada mostrada na figura 5.12(b) pode ser comparada com o padrão de um triclobastoma exibido na figura 5.12(d). Em contraste aos dedos compactos

dos padrões papilares da seção anterior, nestas morfologias ramificadas o tumor tem fiordes e pontas similares às aquelas observadas em padrões DLA. Nós enfatizamos que sem interações quimiotáticas entre células cancerosas o modelo limitado por nutrientes não pode gerar padrões desconexos estacionários. Já a presença de quimiotaxia GF guia, na média, a migração celular para fora do tumor, promovendo sua expansão e, conseqüentemente, gerando padrões desconexos para alta mobilidade celular. Novamente, os padrões foram caracterizados por seus raios de giração R_g , número total de células cancerosas e número de sítios na periferia do tumor. Essencialmente os mesmos resultados foram obtidos para progresso no tempo do câncer, relações de escala e estruturas espaciais exibindo um núcleo necrótico, uma faixa interna de células quiescentes e uma camada externa de células proliferativas.

5.4 Conclusões

Um modelo com limitação por nutrientes para o crescimento de tumores avasculares foi investigado através de simulações numéricas. Na sua versão original a proliferação, migração e morte celular são localmente controladas pela concentração de nutrientes fornecidos por um vaso capilar. Estes nutrientes são divididos em dois grupos, o primeiro associado às necessidades metabólicas usuais das células e o segundo essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos envolvidos na divisão celular. Os campos de concentração de nutrientes são determinados resolvendo-se as respectivas equações de difusão numa rede quadrada que modela o tecido primário. Nossas simulações mostram que o progresso no tempo do número total de células cancerosas, raio de giração do tumor e número de sítios na periferia do tumor é descrito por curvas de Gompertz. As morfologias compactas e papilares geradas obedecem diferentes leis de escala para o número de sítios de periferia. Para padrões compactos $S \sim n^{1/2}$ como no modelo de Eden, enquanto para padrões papilares o expoente na lei de potência cresce em direção à unidade quando o consumo de nutrientes aumenta, indicando uma morfologia fractal para o tumor. Nesta versão do modelo a migração não é guiada por sinais quimiotáticos secretados pelas células cancerosas e, como conseqüência, a mobilidade celular contribui para arredondar e homogeneizar os padrões de crescimento. Além disso, os tumores simulados incorporam uma estrutura espacial composta de um núcleo necrótico central, uma faixa interna de células quiescentes e uma camada externa de células proliferativas de acordo com dados biológicos.

Para simular padrões desconexos e ramificados, típicos de tumores de células

redondas e tricloblastomas, uma interação quimiotática entre células cancerosas mediadas por fatores de crescimento foi adicionada ao modelo com competição por nutrientes. Novamente, resultados similares foram obtidos para o progresso no tempo do câncer e relações de escala. Assim, a lei de Gompertz emerge como um aspecto robusto do modelo de crescimento de câncer com limitação por nutrientes.

Além dos resultados encorajadores para as curvas de progresso, leis de escala e padrões de crescimento, incluindo simetrias não-esféricas, o principal aspecto deste trabalho é a tentativa de conectar as equações de difusão macroscópicas para nutrientes e/ou fatores de crescimento às respostas celulares e interações na escala microscópica através de um modelo cinético celular efetivo. Na verdade, as probabilidades locais P_{div} , P_{mov} e P_{del} descrevem de um modo estocástico os processos dinâmicos que ocorrem nas populações celulares como uma resposta a campos difusivos de nutrientes e fatores de crescimento.

Por fim, um ponto que precisa ser discutido é o problema da dimensão do modelo. Embora na literatura recente a maioria dos modelos para descrever as morfologias de tumores seja em duas dimensões [18, 19, 20, 21, 59], tumores reais são essencialmente tridimensionais. No entanto, como aquele aqui proposto, esses modelos envolvem soluções numéricas de equações de reação-difusão através de métodos de relaxação. Em geral, estas equações precisam ser resolvidas até dezenas de milhares de vezes (como é o caso desse modelo) o que torna o problema em 3d computacionalmente impraticável, desde que o número de interações para a convergência é proporcional a L^d [60], onde L é o tamanho do sistema e d a sua dimensão. No entanto, tais modelos permitem estudar qualitativamente diversos aspectos físicos e biológicos importantes, mesmo que as comparações quantitativas sejam limitadas.

Capítulo 6

Simulando quimioterapias para para tumores *in situ*

Neste capítulo, analisamos os efeitos de estratégias quimioterápicas distintas nos padrões, leis de escalas e de crescimento obtidas para o modelo do capítulo anterior. O objetivo aqui não é construir modelos de terapia que incluam numerosos detalhes, mas sim modelos efetivos que sejam os mais simples possíveis e que permitam estudar a sensibilidade das várias morfologias encontradas no modelo com limitação de nutrientes aos diversos tratamentos. Dois tipos de quimioterapias foram considerados, aquelas que matam células cancerosas e aquelas que bloqueiam a mitose celular, mas permitem à célula sobreviver por algum tempo. O conteúdo deste capítulo refere-se aos resultados do artigo [27], que é uma evolução natural do artigo anterior [25] descrito no capítulo 5.

6.1 Introdução

No combate contra o câncer, remoção cirúrgica, quimioterapia e/ou radioterapia são os tratamentos mais comuns para a erradicação completa da massa tumoral. No entanto, atualmente, novos tratamentos, tais como terapias imunotóxicas [64], genéticas [65], antiangiogênicas [34] e com vírus [66] estão sendo desenvolvidas e usadas com sucesso em diversos tipos de tumores experimentais e humanos. Embora exista uma grande perspectiva de que estas novas estratégias de tratamento substituam os tratamentos convencionais, que provocam muitos efeitos colaterais, quimioterapia é ainda um método amplamente usado. Além disso, do ponto de vista da ciência básica, com-

prender como os diversos tratamentos podem alterar as propriedades de tumores é um problema fundamental. Assim, ao lado da vasta literatura devotada ao crescimento de tumores, muitos artigos científicos relativos a modelos de terapia do câncer foram recentemente publicados. Particularmente, a dinâmica de células cancerosas sob tratamento com agentes antimitóticos [67, 68]; radioterapia [46, 69]; vírus que replicam seletivamente em células cancerosas [15]; drogas antiangiogênicas [52]; bem como os efeitos da resistência de tumores às drogas e da vasculatura dos tumores na quimioterapias [70]; foram estudados usando modelos matemáticos. Neste trabalho, estudamos explicitamente os efeitos de um modelo de quimioterapia sobre as morfologias geradas pelo modelo do capítulo 5. A principal idéia aqui não é apenas determinar as condições em que o tratamento terá ou não sucesso, mas também estudar o comportamento destes tumores sob tratamentos brandos que permitam que eles cresçam, mesmo que lentamente. Estas análises são facilmente implementadas no modelo com difusão de nutrientes e, como veremos, sugerem comportamentos complexos descritos nas seções seguintes, que tratam de quimioterapia com drogas citotóxicas (seção 6.2) e drogas antimitóticas (seção 6.3).

6.2 Tratamento com drogas citotóxicas

O principal objetivo dos tratamentos antitumorais com drogas quimioterápicas é matar ou ao menos parar a proliferação de células cancerosas. Em geral, as drogas deveriam agir somente nas células proliferativas, principalmente as cancerosas. Contudo, drogas citotóxicas também destroem células normais proliferativas, provocando vários efeitos colaterais [71]. De fato, células epiteliais dos sistemas respiratório e gastro-intestinal, as quais reproduzem-se freqüentemente para repor suas contrapartidas mortas, são fortemente afetadas. Nesta seção, analisamos um modelo quimioterápico simples no qual os detalhes complexos das respostas de células cancerosas em fases diferentes do ciclo celular às drogas são substituídos por um modelo cinético efetivo.

6.2.1 O modelo

Como usado em outros modelos [72], a quimioterapia é modelada por uma liberação periódica de drogas citotóxicas. As drogas são fornecidas através do mesmo vaso capilar que fornece nutrientes ao tecido. Várias drogas citotóxicas e suas propriedades

foram exaustivamente estudadas, tais como amsacrina, cisplatina, ciclofosfamida, citarabina, mustina, e antraclicina [73]. Aqui, as numerosas barreiras envolvidas na liberação de drogas aos tumores [74] não foram consideradas, e o tratamento começa quando a massa tumoral contém N_0 células cancerosas. Quando uma dose é aplicada, a concentração de drogas no capilar assume um valor máximo \tilde{Q}_0 , que decresce progressivamente devido à eliminação gradual das drogas pelo organismo. Por isso, novas doses são periodicamente administradas em intervalos de tempo τ na maioria das estratégias quimioterápicas [73]. Várias formas funcionais para a evolução da concentração foram consideradas em modelos de terapia [72]. No entanto, adotamos um modelo realista no qual a concentração de drogas no capilar, $\tilde{Q}(T)$, é uma função do tempo dada por

$$\tilde{Q}(T) = \begin{cases} 0, & T < T_0 \\ \tilde{Q}_0 \exp [-(T - l\tau)/T_\times], & T_0 + l\tau \leq T < T_0 + (l + 1)\tau \end{cases}, \quad (6.1)$$

onde $l = 0, 1, 2, \dots$, T_\times é o tempo característico de eliminação das drogas pelo organismo, e T_0 é o instante em que o tratamento começa. A forma funcional de $\tilde{Q}(T)$ é mostrada na figura 6.1.

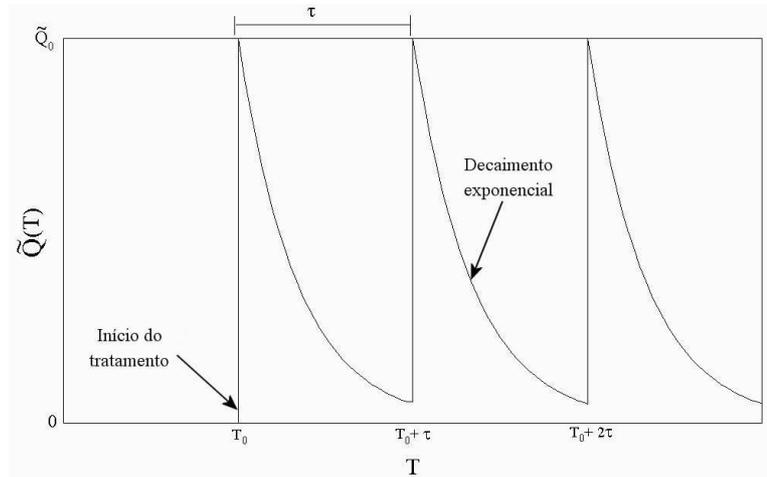


Figura 6.1: Evolução temporal da concentração de drogas no vaso capilar.

Do mesmo modo que os nutrientes, as drogas difundem do vaso capilar em direção às células no tecido, e a concentração de drogas $Q(\vec{x}, t)$ em cada sítio da rede em cada passo de tempo é dada pela solução estacionária da equação de difusão

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = D_Q \nabla^2 Q - \Gamma^2 Q - \lambda_Q \Gamma^2 Q \sigma_c, \quad (6.2)$$

que é análoga às equações usadas para a difusão de nutrientes. O primeiro, segundo e terceiro termos do lado direito representam para as drogas a difusão, degradação natural e a absorção por células cancerosas, respectivamente. Como as equações que descrevem a concentração de nutrientes, esta equação é a mais simples que descreve o fenômeno de difusão. A equação (6.2) é escrita com as mesmas variáveis adimensionais de (5.4) e (5.5). Além disso, usando a transformação $Q \rightarrow Q/\tilde{Q}_0$ e lembrando que a equação (6.2) sempre é resolvida no estado estacionário, os parâmetros \tilde{Q}_0 e D_Q podem assumir o valor unitário sem qualquer perda de generalidade. As condições de contorno são as mesmas usadas para os campos de nutrientes, exceto no vaso capilar onde a concentração em cada passo de tempo é dada pela equação (6.1).

Finalmente, um única mudança é introduzida na dinâmica celular descrita na subseção 5.1.3: uma probabilidade adicional de morte ocorre sempre que uma célula cancerosa sofrer mitose. Assim, cada vez que uma célula cancerosa divide-se, cada uma das células geradas pode morrer com probabilidade

$$P_{del}^{(Q)}(\vec{x}) = 1 - \exp \left[- \left(\frac{Q(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x}) \theta_{del}^{(Q)}} \right)^2 \right]. \quad (6.3)$$

O parâmetro $\theta_{del}^{(Q)}$ controla a sensibilidade da célula às drogas. Além disso, desde que no modelo original as células normais não fazem parte da dinâmica celular, isto é, elas não se dividem e nem morrem, desconsideramos os efeitos quimioterápicos sobre o tecido normal.

6.2.2 Resultados

Morfologia	λ_N	λ_M	λ_Q	α	Γ	θ_{div}	θ_{del}	T_x
Compacta	25	10	10	$2/L$	$2/L$	0.3	0.03	4
Papilar	200	10	10	$2/L$	$2/L$	0.3	0.03	4
Ramificada	200	10	10	$3/L$	$2/L$	0.3	0.01	4
Necrótica	50	25	10	$3/L$	$2/L$	0.3	0.03	4

Tabela 6.1: Parâmetros fixos usados na simulações do crescimento dos tumores sob tratamento quimioterápico para cada tipo morfológico.

O principal objetivo deste trabalho é investigar os efeitos de tratamentos nas

várias morfologias, leis de escala e de crescimento observadas no modelo original. Assim, para cada morfologia, determinada pelos parâmetros fixos descritos na tabela 6.1, os parâmetros do tratamento, mais precisamente τ (o período da dose), $\theta_{del}^{(Q)}$ (eficiência da droga) e N_0 (tamanho do tumor no início do tratamento) foram variados. Tais parâmetros podem ser diretamente testados no laboratório. Os demais parâmetros (λ_Q , Γ e T_x) associados com a difusão de drogas também foram fixados em todas as simulações.

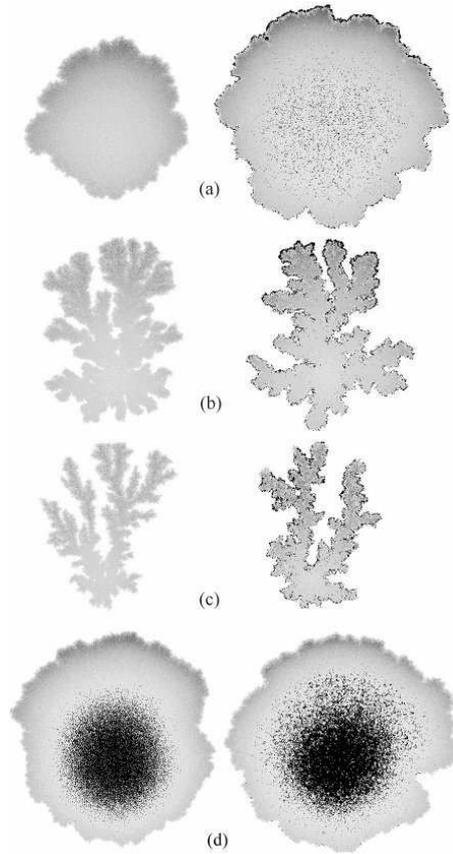


Figura 6.2: Padrões de crescimento de tumores gerados pelo modelo limitado por nutrientes. Dois padrões típicos, sem (esquerda) e com tratamento leve (direita) são indicados, para morfologias (a) compactas, (b) papilar, (c) ramificada, e (d) padrões com um núcleo necrótico central. Os parâmetros fixos usados para gerar estas morfologias são listados na tabela 6.1. Tratamento leve significa que o período entre as doses é grande ($\tau = 20$) e, portanto, os tumores crescem continuamente. Os outros parâmetros são $\theta_{del}^{(Q)} = 0.1$ e $N_0 = 10^4$. A interpretação das escalas cinza e o tamanho do tecido são os mesmos indicados na figura 5.6.

Na figura 6.2, os padrões correspondentes às morfologias compacta, papilar e ramificada com e sem quimioterapia são mostrados. Os parâmetros usados para obter

os padrões mostrados nessa figura são os de um tratamento leve, ou seja, o tratamento não é capaz de cessar o desenvolvimento do tumor. Como pode-se ver, as morfologias dos padrões tumorais não mudam significativamente sob tratamento brando. Contudo, as regiões ocupadas pelos tumores tratados são maiores que as ocupadas por tumores sem tratamento. Estes resultados sugerem que o ataque direto ao tumor pode ser uma estratégia inadequada de tratamento. De fato, quanto mais invasivo é o tumor, maior é a possibilidade das células cancerosas atingirem o vaso capilar e, portanto, metastatizarem com sucesso. Tal resultado está de acordo com a teoria de Israel [4], segundo a qual cânceres disparam mecanismos de adaptação em situações adversas similares aos observados em colônias de bactérias. Além disso, nesse modelo nenhuma mudança genética ou epigenética é necessária para explicar o aumento da agressividade do tumor. Ela emerge naturalmente das regras de crescimento do modelo. Um tumor submetido a sucessivos tratamentos quimioterápicos que não levam à sua completa erradicação, pode progressivamente tornar-se mais resistente, agressivo e maligno.

Foram observadas leis de escala $R_g \sim n^\nu$ e $S \sim n^\sigma$ muito similares para tumores tratados e sem tratamento (valores de ν e σ são mostrados na tabela 5.3). As pequenas diferenças nos valores dos expoentes para o número de sítios na periferia do tumor desaparecem no limite assintótico do tamanho do tumor (figura 6.3). Esta invariância de expoentes sugere que a morfologia fractal é um aspecto robusto destes tumores e não pode ser mudada por pequenas perturbações no microambiente celular. Obviamente, as leis de escala para R_g e S não são definidas para os tumores que cessam seu crescimento.

Também estudamos a influência dos parâmetros do tratamento (τ , $\theta_{del}^{(Q)}$, N_0) nas curvas de crescimento dos tumores. Na figura 6.4, a evolução no tempo do número de células cancerosas de padrões compactos é mostrada. Dependendo do período da dose τ , os tumores podem desaparecer, saturar seu crescimento ou progredir seguindo uma lei de potência. Na verdade, o intervalo de tempo entre duas doses consecutivas é um aspecto clínico fundamental que determina o sucesso do tratamento. O regime de lei de potência observado quando τ é grande significa um crescimento lento, contrastando nitidamente com o crescimento exponencial presente na lei de Gompertz que descreve o progresso dos tumores sem quimioterapia.

O tamanho do tumor no início do tratamento é outro fator importante. De fato, os expoentes das leis de potências do crescimento dos tumores são menores quando o tamanho inicial do tumor é maior, ou seja, a taxa de eliminação das células cancerosas

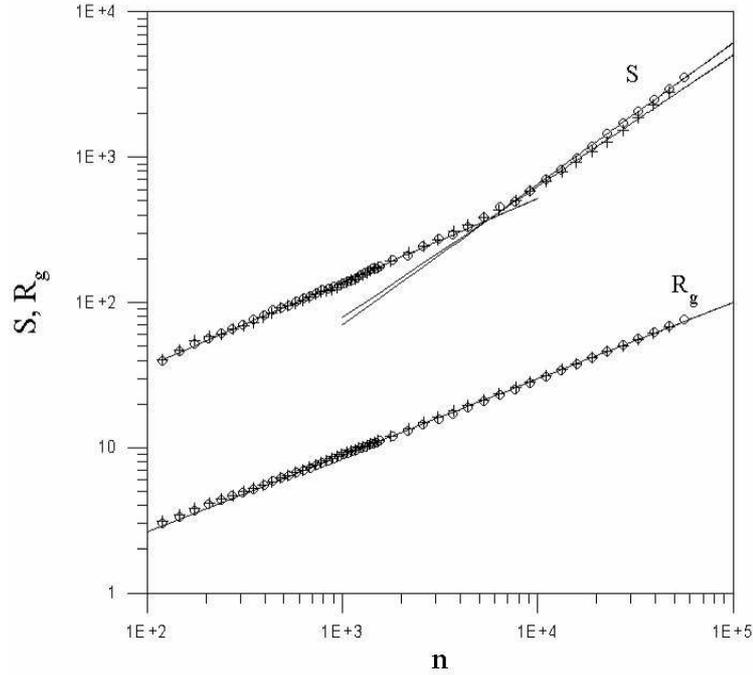


Figura 6.3: Comparação entre as leis de escala para tumores papilares com (círculos) e sem (cruzes) tratamento. Os parâmetros do tratamento usados são $\tau = 20$, $\theta_{del}^{(Q)} = 0.1$ e $N_0 = 10^4$. Os expoentes das curvas $S \times n$ são $\sigma \simeq 0.97$ e $\sigma \simeq 0.92$ para os padrões com e sem tratamento, respectivamente, enquanto os expoentes de raio de giração têm o mesmo valor $\nu \simeq 0.53$.

crece com o aumento tamanho inicial do tumor. Esse cenário parece ser universal.

Às vezes, como ilustra o destaque da figura 6.4, tumores compactos que começaram a receber drogas em intervalos regulares $\tau = 5$ quando continham $N_0 = 10^4$ células podem ser eliminados mais lentamente que outros tumores que começaram a ser tratados com $N_0 = 5 \times 10^4$ células cancerosas. Contudo, isto não é uma regra. Por exemplo, simulações de tumores papilares indicam que os tumores menores são eliminados mais rapidamente, embora os expoentes das leis de potência continuem sendo menores para os tumores maiores. Finalmente, como os expoentes das leis de crescimento dependem do conjunto de parâmetros usado, eles não são universais. Quanto ao parâmetro $\theta_{del}^{(Q)}$, ele apenas modifica a eficiência do tratamento, ou seja, quanto maior o seu valor menor a taxa de eliminação do tumor.

Padrões de crescimento de tumores compactos sob tratamentos mais agressivos são mostrados na figura 6.5. Nesses padrões, os tratamentos não foram capazes de eliminar completamente o tumor, mas impediram que eles continuassem a crescer. O tratamento citotóxico pode levar à formação de necrose nos padrões simulados, prin-

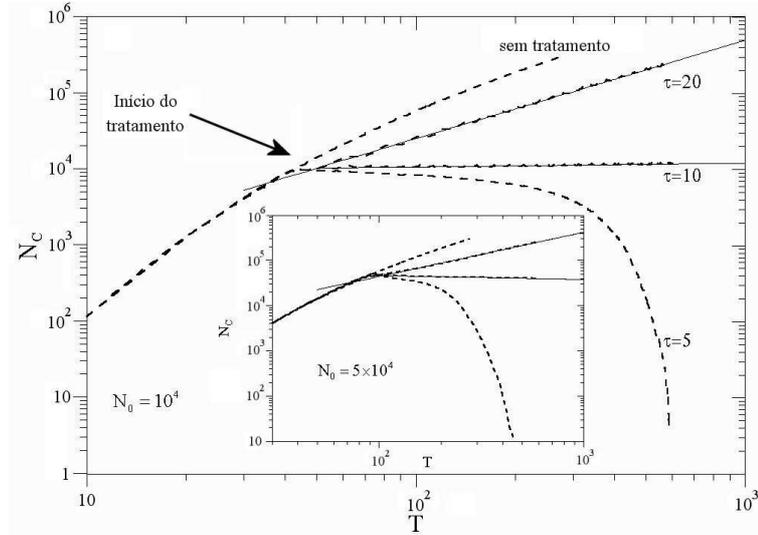


Figura 6.4: Curvas de crescimento para padrões compactos (linhas pontilhadas). Três intervalos entre as doses foram testados ($\tau = 5, 10, 20$) em tumores com dois tamanhos iniciais distintos: $N_0 = 10^4$ e $N_0 = 5 \times 10^4$ (destaque). Os expoentes das leis de potência (inclinação das retas no gráfico $\log \times \log$) são 1.3 (0.98) para tumores com $N_0 = 10^4$ ($N_0 = 5 \times 10^4$) quando $\tau = 20$, e 0.05 (-0.09) quando $\tau = 10$.

principalmente nos tumores em que os tratamentos iniciaram-se quando eles continham 5×10^4 células cancerosas.

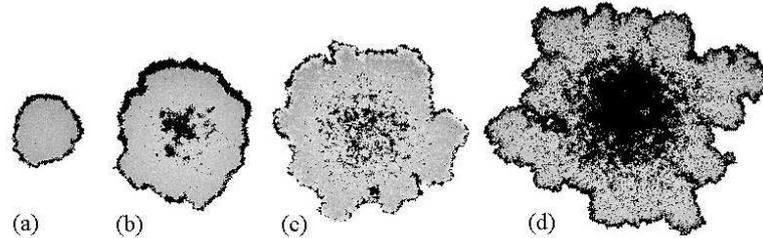


Figura 6.5: Padrões de crescimento de tumores compactos tratados com estratégias quimioterápicas distintas. O tratamento foi capaz de cessar o crescimento destes tumores sem eliminá-los. Os parâmetros do tratamento usados foram (a) $N_0 = 10^4$, $\tau = 10$ e $\theta_{del}^{(Q)} = 0.1$; (b) $N_0 = 5 \times 10^4$, $\tau = 10$ e $\theta_{del}^{(Q)} = 0.1$; (c) $N_0 = 10^4$, $\tau = 20$ e $\theta_{del}^{(Q)} = 0.03$; e (d) $N_0 = 5 \times 10^4$, $\tau = 20$ e $\theta_{del}^{(Q)} = 0.03$;

Tumores com morfologias fractais são mais resistentes aos tratamentos. Na figura 6.6, as curvas $N_C \times T$ são mostradas para as morfologias compacta, papilar, ramificada e necrótica exibidas na figura 6.2 sob tratamentos intensos ($\tau = 5$ e $\theta_{del}^{(Q)} = 0.1$). Note que quanto mais fractal é o tumor, maior é o tempo necessário para eliminá-lo. Realmente, as taxas de crescimento mais lentas dos tumores fractais implicam

em uma fração maior de células cancerosas mantidas no estado quiescente. Assim, como as drogas quimioterápicas consideradas nesse modelo agem somente em célula que se dividem, o tratamento torna-se ineficiente quando a maior fração das células cancerosas é quiescente.

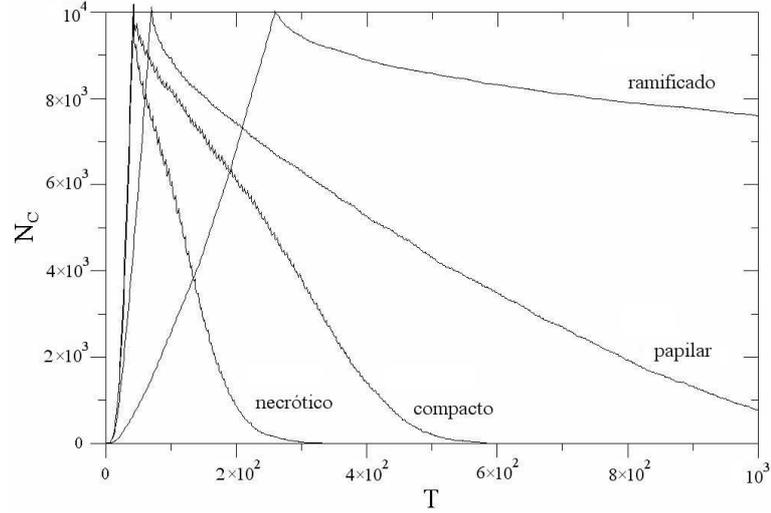


Figura 6.6: Curvas de crescimento para as diferentes morfologias tumorais. As doses foram aplicadas em intervalos $\tau = 5$ em tumores com tamanhos iniciais $N_0 = 10^4$, com $\theta_{del}^{(Q)} = 0.03$.

Para complementar, estudamos os padrões tumorais que exibem um núcleo necrótico central. Os resultados para o crescimento do câncer e as correspondentes leis de potência são similares aos encontrados para os padrões compactos. A densidade de células cancerosas e sua taxa de divisão média ao longo dos padrões de crescimento não são significativamente alteradas quando os tumores são submetidos a tratamentos brandos (intervalos de tempo longos entre doses consecutivas e baixa eficiência das drogas). Além disso, os padrões de crescimento são muito parecidos com os encontrados para tumores com núcleo necrótico sem tratamento. Finalmente, tumores que formam necrose central são mais facilmente eliminados quando os intervalos mais curtos entre a administração das doses são considerados (figura 6.6).

6.3 Drogas quimioterápicas antimitóticas

Diversas drogas usadas em quimioterapias para o câncer não visam matar as células cancerosas. Em vez disso, elas têm como objetivo parar o ciclo celular em pontos específicos. Como uma consequência, as células cancerosas cessam ou desaceleram suas taxas de crescimento. Exemplos destas drogas incluem o agente antimitótico

curacina A que bloqueia a ciclo celular na fase M, mitomicina C, doxorubicina, e aclarubicina entre outras [73]. Para analisar os efeitos das drogas que inibem a divisão celular nos padrões tumorais, introduzimos uma mudança muito simples na dinâmica celular do modelo descrito na seção anterior. Em vez de uma probabilidade adicional de morte dada pela equação (6.3), a probabilidade de divisão é modificada com a inclusão de um termo adicional na equação (5.7). Assim, a nova probabilidade de divisão torna-se

$$P_{div} = 1 - \exp \left[- \left(\frac{N}{\sigma_c \theta_{div}} \right)^2 + \left(\frac{Q}{\sigma_c \theta_{div}^{(Q)}} \right)^2 \right], \quad (6.4)$$

na qual o primeiro e o segundo termo no argumento da exponencial competem entre si estimulando e inibindo a mitose celular, respectivamente. O parâmetro $\theta_{div}^{(Q)}$ controla a influência das drogas na divisão celular. Obviamente, se o argumento da exponencial é maior que zero então $P_{div} \equiv 0$.

A interpretação biológica desse modelo é bastante diferente da considerada na última seção. Agora, as drogas alteram as características intrínsecas das células cancerosas e, conseqüentemente, os tumores devem comportar-se diferentemente daqueles tratados com agentes citotóxicos. De fato, como se pode ver na figura 6.7, uma transição morfológica para os padrões tumorais quando os períodos entre as doses diminuem é observada. Nessa figura, um padrão que é compacto quando intervalos longos são considerados ($\tau = 20$) torna-se progressivamente fractal, passando por morfologias papilares ($\tau = 4$) e ramificadas ($\tau = 2$). Se o período é suficientemente curto ($\tau = 1$), o tumor transforma-se em um pequeno aglomerado cujo tamanho permanece constante durante a terapia.

Obviamente, o período crítico depende de outros parâmetros do modelo, especialmente do parâmetro $\theta_{div}^{(Q)}$. Para ver esta dependência, o valor crítico de $\theta_{div}^{(Q)*}$ para o qual o tumor cessa seu crescimento com probabilidade 1 como uma função do intervalo τ foi avaliado. Uma análise de campo médio das equações (6.1) e (6.4) fornece

$$\theta_{div}^{(Q)} \sim \exp(-\tau/T_\times), \quad (6.5)$$

em concordância com as simulações, como indicado pela figura 6.8. Assim, foi encontrado um decaimento exponencial com o comprimento característico T_\times que é independente dos outros parâmetros do modelo. Esta lei, relacionando dois parâmetros clínicos importantes, é válida para um amplo conjunto de parâmetros. Além dos tu-

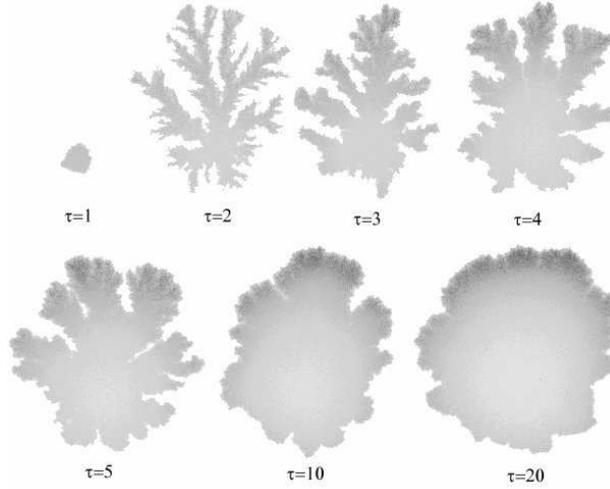


Figura 6.7: Padrões compactos sob tratamento com agentes antimetabólicos. O intervalo entre as doses τ foi variado e $\theta_{div}^{(Q)} = 0.3$ fixado. Os outros parâmetros do modelo são indicados na tabela 6.1. Tumores tornam-se cada vez mais fractais à medida que o intervalo entre as doses diminui. No período crítico os tumores atingem um estado quiescente no qual seus tamanhos permanecem constantes durante todo o tratamento.

mores compactos mostrados na figura 6.7, também foram simulados tumores papilares sob tratamento antimetabólico, e uma transição morfológica similar foi observada.

Para provar a relação (6.5) fazemos uma aproximação de campo médio na qual os nutrientes, as drogas e as células cancerosas estão uniformemente distribuídos ao longo dos tumores que cessam seu crescimento, isto é, independem da posição. A segunda hipótese é que o número de células cancerosas e a quantidade de nutrientes não variam no tempo. Sendo a concentração de drogas uniforme ao longo tumor, espera-se que ela seja proporcional à quantidade de drogas liberada no capilar, ou seja, $\tilde{Q}(T)$ (equação (6.1)). Desprezando a probabilidade de morte, a condição em que nenhum crescimento ocorre é $P_{div} = 0$ ou, segundo a equação 6.4,

$$\frac{Q(T)}{\theta_{div}^{(Q)}} \geq \frac{N}{\theta_{div}} \quad \forall \quad T. \quad (6.6)$$

Lembrando que a cota inferior para $Q(T)$ é proporcional ao valor mínimo da equação (6.1), isto é

$$\min Q(T) \sim \exp(-\tau/T_x),$$

e considerando a igualdade em (6.6) juntamente com as hipóteses anteriores, encontramos a relação 6.5.

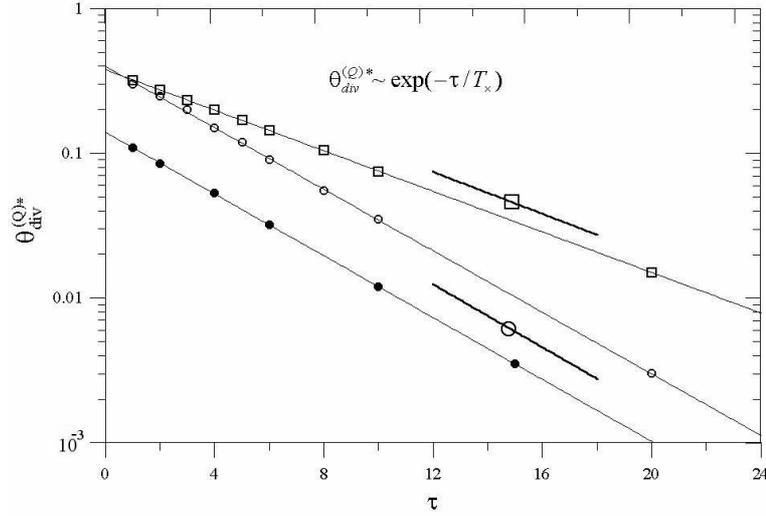


Figura 6.8: Valores críticos $\theta_{div}^{(Q)*}$ como uma função do período da dose τ em uma escala mono-log. Os símbolos representam os dados das simulações e as retas os respectivos ajustes exponenciais. Os círculos abertos referem-se às simulações que usam os parâmetros para os tumores compactos listados na tabela 6.1. Os quadrados (círculos preenchidos) representam as mesmas simulações exceto que $T_x = 6$ ($\theta_{div} = 0.1$). Além disso, as inclinações $1/4$ (círculo) e $1/6$ (quadrado) são indicadas. Para estimar $\theta_{div}^{(Q)*}$ realizamos 20 simulações independentes para cada valor de $\theta_{div}^{(Q)}$ e consideramos que a falha do crescimento em todas estas tentativas significa a latência do tumor.

A figura 6.9 mostra que estas transições morfológicas ocorrem em valores bem definidos de $\theta_{div}^{(Q)}$. Próximo do ponto crítico, instabilidades nas equações de reação-difusão levam a crescimentos ramificados, como foi discutido por Sander & Deisboek [18]. Abaixo deste limiar, a taxa de morte celular iguala-se à taxa de divisão celular e o crescimento do tumor efetivamente para. Este comportamento qualitativo próximo à transição provavelmente não será observado em tumores experimentais, já que uma determinação muito precisa de $\theta_{div}^{(Q)}$ é muito difícil. Por outro lado, experimentos exibindo ambos os regimes, acima e abaixo do valor crítico, são atualmente factíveis devido aos grandes avanços no controle de administração de drogas. Tais ensaios poderiam corroborar os comportamentos complexos previstos pelo nosso modelo.

O tratamento antimitótico afeta ambas as leis de crescimento e de escala. Os padrões compactos no modelo original, nos quais o raio de giração e número de sítios ocupados na borda do tumor escalam com a raiz quadrada do número total de sítios ocupados (i. e. $\nu = \sigma = 1/2$), tornam-se progressivamente mais fractais quando os intervalos entre as doses são reduzidos. Conseqüentemente, foram obtidos $\nu > 1/2$ e

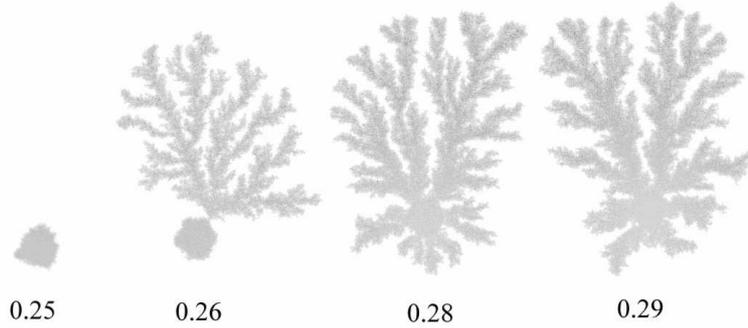


Figura 6.9: Transições morfológicas em $\theta_{div}^{(Q)*}$. Os padrões eram originalmente compactos e os parâmetros do modelo são listados na tabela 6.1. O período da dose foi fixado em $\tau = 2$ e $\theta_{div}^{(Q)}$ variado em torno do seu valor crítico e os valores usados são indicado abaixo de cada padrão.

$\sigma > 1/2$ indicando tumores fractais com dimensão fractal $d_f = 1/\nu$. Em geral, todos os tumores tornam-se mais fractais quando submetidos a tratamentos antimitóticos. Logo, existe um contraste nítido com a invariância da dimensão fractal dos tumores sob tratamentos brandos com drogas citotóxicas descrito na seção anterior. Na figura 6.10 o aumento do número de células cancerosas em relação ao início do tratamento ($N_C - N_0$) é mostrado, para intervalos entre doses distintos, como uma função do tempo após o início do tratamento ($T - T_0$). Estas curvas sugerem leis de potência para a evolução no tempo do número de células cancerosas com uma fraca dependência do parâmetro τ . De fato, temos que $(N_C - N_0) \sim (T - T_0)^\beta$ com $\beta \in [1.2, 1.4]$. Quando τ diminui, o número de células cancerosas inicialmente decai por um certo tempo, mas subsequenteemente retoma seu crescimento (destaque da figura 6.10). Abaixo de um dado intervalo entre as doses, N_C decresce monotonicamente até um valor constante.

Para analisar as taxas de divisão através do tumor, computamos a densidade média de células cancerosas ($\langle \sigma_c \rangle$) e a taxa de divisão celular (w_{div}) ao longo de um corte longitudinal no padrão de crescimento, como fizemos no capítulo 5 para os tumores com núcleo necrótico. Na figura 6.11 esses gráficos são mostrados para padrões compactos tratados com valores de τ distintos. Para valores de τ maiores (Fig. 6.11(a)) ambos, taxa de divisão e densidade de células cancerosas, têm máximos acentuados na borda do tumor, em frente e oposto ao vaso capilar. Note que os picos para a taxa de divisão são significativamente mais estreitos que os picos da densidade de células cancerosas, demonstrando que a fração proliferativa do tumor abrange apenas uma pequena faixa localizada na borda do tumor. À medida que o tratamento é intensificado (valores menores de τ são considerados) as densidades celulares ao longo

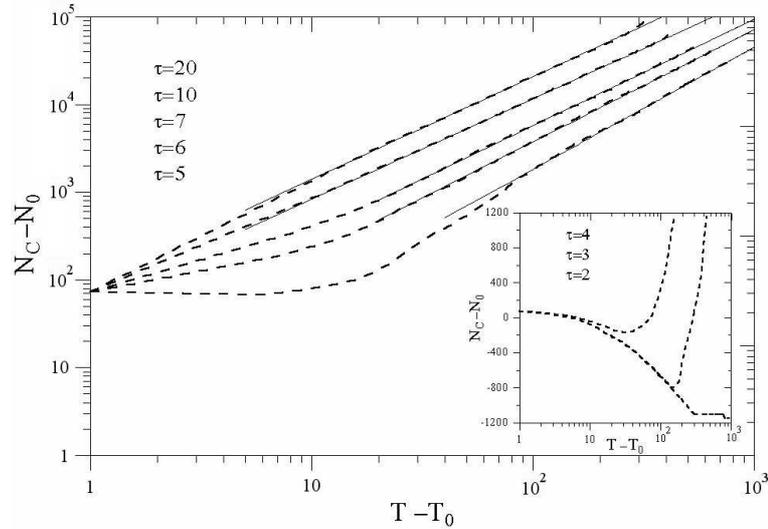


Figura 6.10: Curvas de crescimento (linhas pontilhadas) para padrões papilares sob terapia antimitótica. Os intervalos entre as doses usados foram $\tau = 20, 10, 7, 6, 5, 4, 3, 2$ e as curvas superiores representam intervalos maiores. Para os intervalos entre doses grandes ($\tau \geq 5$), o crescimento do tumor segue leis de potência com expoentes no intervalo $[1.2, 1.4]$. Para intervalos mais curtos ($\tau \leq 4$), as curvas são mostradas em um gráfico semi-log (destaque). Nestas simulações $\theta_{div}^{(Q)} = 0.3$ foi usado junto com os respectivos parâmetros da tabela 6.1.

do tumor tornam-se mais uniformes, enquanto as taxas de divisão continuam exibindo máximos acentuados nas bordas dos tumores (figuras 6.11(b) e (c)). Se τ é suficientemente pequeno para impedir o crescimento do tumor, a taxa de divisão e a densidade de células cancerosas tornam-se uniformes ao longo do tumor (figura 6.11(d)). Assim, neste último caso as taxas de divisão são contrabalançadas pelas taxas de morte, levando a uma taxa de crescimento líquida nula. Todos estes resultados mostram que os tumores são muito alterados quando as propriedades mitóticas das células cancerosas são modificadas por agentes externos.

6.4 Conclusões

Neste capítulo, o modelo de reação-difusão do capítulo 5 foi usado para estudar os efeitos de quimioterapias no crescimento de carcinomas *in situ*. O modelo inclui, além de divisão, movimento e morte celular, competição por nutrientes entre células cancerosas e normais e administração periódica de drogas. Dois tipos de quimioterapias, usando drogas citotóxicas e antimitóticas, foram modeladas.

No modelo com drogas citotóxicas os tumores podem ser completamente er-

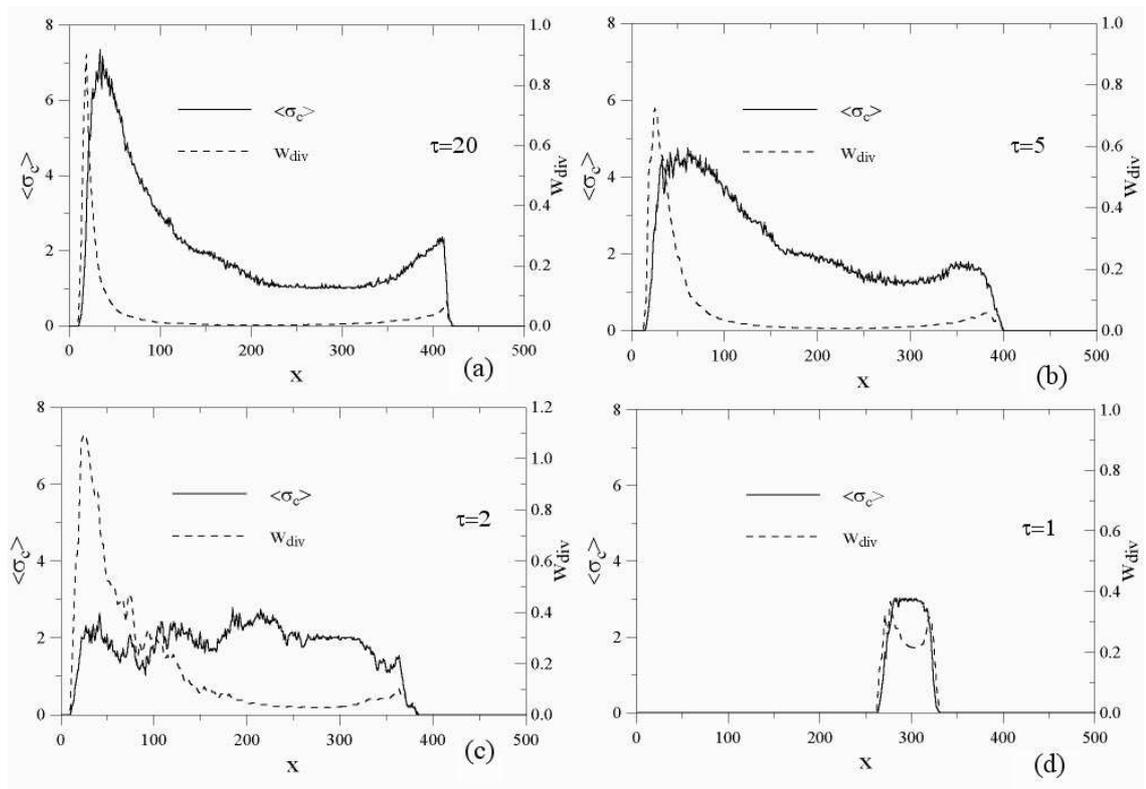


Figura 6.11: Densidade de células cancerosas σ_c (linhas contínuas) e taxas de divisão w_{div} (linhas pontilhadas) como uma função da distância ao vaso capilar ao longo de um corte longitudinal do tumor. Os parâmetros usados são aqueles referentes à morfologia compacta indicados na tabela 6.1 e $\theta_{div}^{(Q)} = 0.3$. Os gráficos correspondem aos intervalos (a) $\tau = 20$, (b) $\tau = 5$, (c) $\tau = 2$ e (d) $\tau = 1$. Os eixos verticais esquerdo e direito representam $\langle \sigma_c \rangle$ e w_{div} , respectivamente.

radicados, cessar seu crescimento ou crescer continuamente. O último caso ocorre quando o tratamento é pouco eficiente ou os intervalos consecutivos entre as doses de drogas são longos. Além disso, as morfologias e as leis de escala dos tumores que continuam crescendo mesmo sob tratamento são preservadas. Em contraste, para as terapias que usam agentes antimitóticos uma transição morfológica foi observada. Os padrões de crescimento tornam-se progressivamente mais fractais quando tratamentos mais efetivos (intervalos entre doses consecutivas e/ou drogas mais eficientes) são considerados.

Essas transições morfológicas são similares a estudos recentes mostrando que colônias de bactérias expostas a concentrações não letais de antibióticos exibem mudanças drásticas em seus padrões de crescimento [75]. Para bactérias, estas mudanças foram atribuídas às variações nas propriedades das bactérias, tais como taxas me-

tabólicas e quimiotaxia. Por outro lado, células normais e cancerosas cultivadas em monocamadas e gel de colágeno exibem uma transição dinâmica nos seus regimes de agregação como uma resposta adaptativa às restrições no crescimento impostas por alta densidade ou células ou longa permanência em cultura [12]. Os resultados obtidos neste capítulo estão de acordo com o ponto de vista que células cancerosas podem desenvolver um programa integrado de defesa contra situações de estresse similar à resposta de colônias de bactérias frente a situações adversas. Contudo, dentro do nosso conhecimento, não há relatos na literatura devotada ao câncer relativos a transições morfológicas no padrões histológicos de tumores submetidos à quimioterapia. Portanto, modelos formais como o proposto neste capítulo, geralmente não familiares para a maioria dos pesquisadores biomédicos [76], podem guiar e refinar novos experimentos direcionados para analisar tais transições morfológicas. Atualmente, experimentos *in vitro* com células cancerosas estão sendo projetados em nos laboratórios de estudo do câncer do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa para investigar estas transições morfológicas.

É importante mencionar que, usualmente, tratamentos reais efetivos empregam vários métodos simultaneamente [71]. Assim, um modelo quimioterápico mais realista poderia considerar tratamentos citotóxicos e antimitóticos combinados. No entanto, nesses casos, aspectos relevantes tais como a robustez da fractalidade dos tumores e as transições morfológicas podem ser mascaradas. Para finalizar, estamos modelando outras estratégias terapêuticas para o câncer usando modelos de reação-difusão como o considerado neste capítulo.

Capítulo 7

Modelo de Williams e Bjercknes com limitação de crescimento

Nos últimos capítulos da tese tratamos modelos de crescimento e de terapias para tumores primários que, excluindo raras exceções em algumas etapas do estudo, só puderam ser tratados numericamente devido ao alto grau de complexidade envolvido. No entanto, modelos mais simples que possam ser estudados por métodos analíticos junto com as simulações são de grande interesse em Física Estatística. Por esse motivo, achamos que a inclusão de um trabalho que use tanto métodos analíticos quanto computacionais para modelar o crescimento de tumores seria de grande importância para completar esta tese. Assim, neste capítulo apresentamos uma generalização do modelo de Williams & Bjercknes, apresentado sucintamente na seção 3.1.1, na qual a possibilidade do tumor cessar o seu crescimento é incluída para explicar a observação biológica de que tumores podem permanecer por um longo tempo em um estado quiescente, no qual o seu tamanho não aumenta. O conteúdo deste capítulo é uma versão ampliada do artigo [28] que trata da evolução no tempo do número de células cancerosas e suas flutuações para ambos os modelos original e estendido, estudados por métodos numéricos e analíticos.

7.1 Introdução

A dinâmica de populações, incluindo o crescimento de células normais e cancerosas, é um problema tradicional investigado em Física e Biologia [38]. No seu trabalho original, Williams e Bjercknes [22] formularam um modelo (modelo WB) para descrever o

crescimento de tumores na camada subjacente de um epitélio. Nesse modelo, as células cancerosas crescem mais intensamente que as normais por um fator κ , a vantagem carcinogênica. Esse modelo apresenta dois comportamentos distintos: crescimento ilimitado ($\kappa > 1$) e regressão completa do tumor ($\kappa \leq 1$). No caso especial $\kappa = 1$, o tumor sempre desaparece devido às flutuações. Como veremos adiante, definindo um passo de tempo adequado, o modelo WB pode ser interpretado com um *processo de de um passo* [77] com taxas de divisão e morte constantes. Portanto, todos o resultados conhecidos para este tipo de processo estocástico podem ser usados para compreender o modelo WB.

Em geral, a taxa de crescimento de tumores está relacionada com o nível de diferenciação das células que o constitui e, portanto tumores mais agressivos, em geral menos diferenciados, crescem mais rapidamente. Existe, contudo, uma ampla variedade de comportamentos. Alguns tumores crescem lentamente por anos e repentinamente disparam seu crescimento causando a morte em poucos meses após a sua detecção. Acredita-se que este comportamento resulta do surgimento de um subclone agressivo de células transformadas. No outro extremo estão os tumores que crescem mais lentamente que as neoplasias benignas e podem até entrar em períodos de dormência durante anos. Ocasionalmente, são observados cânceres que diminuem seu tamanho e até mesmo desaparecem [78]. Assim, tumores reais exibem, além dos dois comportamentos distintos do modelo WB, um estado quiescente no qual o tamanho do tumor permanece constante por um longo tempo.

Este problema foi estudado numericamente em um modelo limitado por nutrientes [47] que exhibe um espaço de diagramas é dividido em quatro regiões de acordo com o estado final do tumor: crescimento ilimitado, regressão total, latência ou metástases. De acordo com esse modelo, os aspectos básicos da diversidade da biodinâmica dos tumores envolvem um conjunto complexo de processos bioquímicos e limitações do microambiente celular tais como disponibilidade local de nutrientes, pressão mecânica, respostas imunes, etc., que podem ser controladas por um conjunto de parâmetros. Para realizar um estudo similar em modelo puramente estocástico mais simples, propomos uma generalização do modelo WB na qual as taxas de divisão e morte das células cancerosas dependem do seu número total. Especificamente, a probabilidade de divisão celular diminui ao passo que probabilidade de morte celular aumenta com o número de células cancerosas.

7.2 O modelo de WB estendido

Relembrando a seção 3.1.1, no trabalho original de WB o tecido é representado por uma rede bidimensional na qual sítios ocupados representam células cancerosas e sítios vazios células normais. Todos os sítios estão inicialmente vazios, exceto no centro da rede, onde uma única célula cancerosa é introduzida, de acordo com teoria de origem clonal do câncer [57]. As células da interface são definidas como aquelas que tem pelo menos um sítio vizinho mais próximo de tipo oposto. A regra de crescimento é muito simples: uma das ligações entre duas células de tipos opostos é escolhida com igual probabilidade; então a célula normal desta ligação é substituída por uma célula cancerosa com probabilidade g (de *growth*), ou a célula cancerosa é substituída por uma normal, com a probabilidade complementar $r = 1 - g$ (de *regression*). Em termos da vantagem carcinogênica κ , estas probabilidade são dadas pelas equações (3.4) e (3.5) do capítulo 3.

O limite $\kappa = \infty$ corresponde ao modelo de Eden [8], mais especificamente, o modelo de Eden tipo B de acordo com as definições dadas por Vicsek [39]. Além disso, $\kappa > 1$ ($\kappa < 1$) significa que a probabilidade de divisão (morte) de uma célula cancerosa supera de morte (divisão).

Existem muitas variações do modelo WB [79], mas nos concentraremos somente nos casos que excluem passos que não modificam a configuração do padrão. Portanto, a cada passo de tempo o número de células cancerosas aumenta ou diminui por uma unidade com probabilidades g ou r , respectivamente. Particularmente, estudaremos a seguinte variação do modelo original: em cada passo de tempo um tipo celular é escolhido, canceroso, com probabilidade r , ou normal, com probabilidade g . Então, uma célula de interface do tipo escolhido, selecionada ao acaso, será convertida para o seu tipo oposto. O resultado desta regra é que em cada passo de tempo, a divisão ou a morte de uma única célula cancerosa ocorre, com probabilidades g ou r , respectivamente.

Agora, introduzimos um novo modelo assumindo que as probabilidades de divisão e morte dependem do número total de células cancerosas do tumor n e seguem funções de *Michaelis-Mentem* [38]:

$$g(n) = 1 - \frac{\alpha n}{\Gamma + n} \quad (7.1)$$

e

$$r(n) = \frac{\alpha n}{\Gamma + n}. \quad (7.2)$$

Aqui, $0 < \alpha < 1$ e $\Gamma > 0$ são parâmetros que controlam a forma das curvas. Estas funções foram usadas por serem as mais simples que variam monotonicamente com n e satisfazem a condição de normalização $g(n) + r(n) = 1$. Estas curvas são ilustradas na figura 7.1. O parâmetro α é a probabilidade assintótica de morte e Γ controla as taxas com que as funções g e r atingem seus valores assintóticos. Do ponto de vista biológico, Γ pode ser interpretado como barreiras fisiológicas impostas pelo organismo ao desenvolvimento do câncer e α representa uma propriedade intrínseca das células cancerosas que descreve sua agressividade.

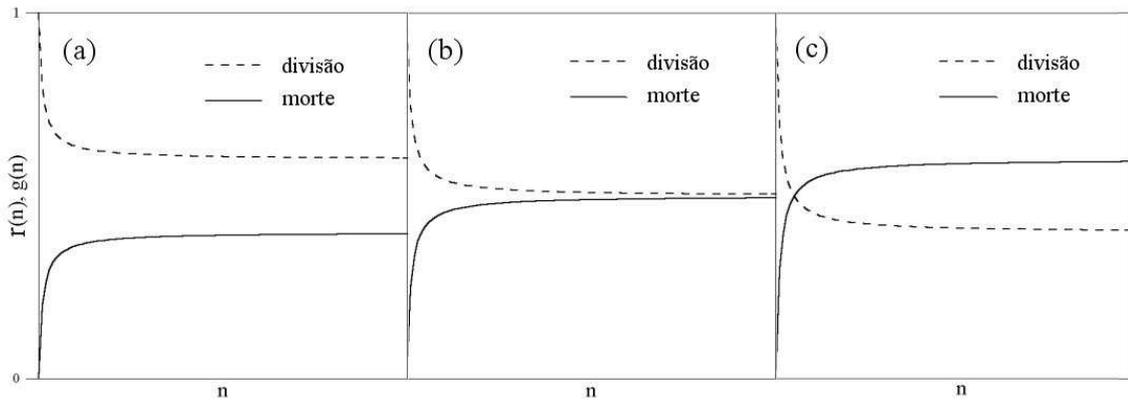


Figura 7.1: Probabilidades de divisão e morte no modelo WB estendido. (a) Quando $\alpha < 1/2$ a probabilidade de divisão é sempre maior que a probabilidade de morte. (b) Mas, se $\alpha = 1/2$, r se aproxima monotonicamente de g quando $n \rightarrow \infty$, embora $g > r$ independente de n . (c) Por fim, se $\alpha > 1/2$ existe um ponto a partir do qual r supera g .

7.3 Análise de modelos WB através de métodos estocásticos

As regras estocásticas usadas nos modelos WB envolvem probabilidades g e r que são explicitamente independentes do tempo. Conseqüentemente, como é o caso de cadeias de Markov, a possibilidade desses modelos gerar um dado padrão em um certo instante depende somente da sua configuração no instante imediatamente anterior. Assim, os processos de crescimento de WB podem ser descritos através da equação de *transição de probabilidades* [80] ou da *equação mestra* [77], dependendo do caráter discreto ou

contínuo do tempo.

A equação de probabilidades de transição [80] é dada por

$$P(n, t + 1) = \sum_m T_{n,m} P(m, t), \quad (7.3)$$

onde $T_{m,n}$ são os elementos da matriz de transição T . $T_{m,n}$ fornece a probabilidade de transição de um estado contendo m células cancerosas para um estado contendo n células cancerosas no passo seguinte. A versão contínua da equação (7.3) é dada pela *equação mestra* [77]

$$\frac{d}{dt} P(n, t) = \sum_{m \neq n} \{W_{n,m} P(m, t) - W_{m,n} P(n, t)\}, \quad (7.4)$$

na qual $W_{n,m}$ é interpretado como uma probabilidade por unidade de tempo ou uma taxa de transição.

Para começar, o modelo WB com tempo discreto será considerado. Na verdade os modelos WB são definidos para tempos discretos mas podem ser generalizados para tempos contínuos, o que muitas vezes facilita os cálculos algébricos. Um passo de tempo é definido como a seleção aleatória de um sítio da interface para implementar uma ação. Com esta definição, a matriz de transição para o modelo WB é

$$T_{n,m} = \begin{cases} g & \text{se } n = m + 1 \\ r & \text{se } n = m - 1 \\ 0 & \text{se } |n - m| > 1 \end{cases} . \quad (7.5)$$

Esta expressão é válida somente para $n \geq 2$, pois o modelo WB é um tipo especial de *processo de um passo* [77] com um estado absorvente em $n = 0$, isto é, quando todas as células do tumor desaparecem. Logo, para $n < 2$ teremos $T_{0,1} = r$ e $T_{1,0} = 0$. Substituindo a matriz de transição (7.5) na equação (7.3) temos

$$\begin{aligned} P(n, t + 1) &= gP(n - 1, t) + rP(n + 1, t) & \text{se } n \geq 2 \\ P(n, t + 1) &= rP(n + 1, t) & \text{se } n = 0, 1 \end{aligned} . \quad (7.6)$$

Nesta seção, estamos interessados em quantidades que dependem somente do número de células cancerosas e não da distribuição destas células no tecido. Assim, a dependência no tempo do número de células cancerosas $\langle n(t) \rangle$ e o seu desvio padrão

$\sigma(t)$, definidos como

$$\langle n(t) \rangle \equiv \sum_{n=0}^{\infty} nP(n, t) \quad (7.7)$$

e

$$\sigma^2(t) \equiv \langle n^2(t) \rangle - \langle n(t) \rangle^2, \quad (7.8)$$

são calculados. Obviamente,

$$\langle n^2(t) \rangle \equiv \sum_{n=0}^{\infty} n^2 P(n, t). \quad (7.9)$$

Usando a equação (7.6) e iterando as expressões para $\langle n(t) \rangle$ e $\langle n^2(t) \rangle$, encontramos

$$\langle n(t) \rangle = n_0 + \frac{\kappa - 1}{\kappa + 1} \left[t - \sum_{t'=0}^{t-1} P_0(t') \right] \quad (7.10)$$

e

$$\sigma^2(t) = \left[1 - \left(\frac{\kappa - 1}{\kappa + 1} \right)^2 \right] t - \sum_{t'=0}^{t-1} P_0(t') + \frac{\kappa - 1}{\kappa + 1} \sum_{t'=0}^{t-1} \left\{ 2\langle n(t') \rangle + \frac{\kappa - 1}{\kappa + 1} [2 - P_0(t')] \right\} P_0(t'), \quad (7.11)$$

onde n_0 é o número de células cancerosas em $t = 0$ e $P_0(t)$ é a probabilidade do sistema estar no estado absorvente ($n = 0$) no instante t . A equação (7.10) mostra que $\langle n(t) \rangle$ decresce com o tempo se $\kappa < 1$ e cresce se $\kappa > 1$, pois $P_0(t) \leq 1$ satura em um valor menor que a unidade e, conseqüentemente, a expressão entre colchetes da equação (7.10) é uma função positiva e crescente no tempo. Logo, se $\kappa > 1$ então $\langle n(t) \rangle$ cresce linearmente com t no limite assintótico. Entretanto, nesse limite, o desvio padrão (7.11) cresce com a raiz quadrada do tempo. Assim, para qualquer $\kappa > 1$ existe uma probabilidade não nula do tumor crescer indefinidamente já que $\sigma/\langle n(t) \rangle \rightarrow 0$ quando $t \rightarrow \infty$. Mas, se $\kappa = 1$, $\langle n(t) \rangle$ é constante, o desvio padrão cresce assintoticamente com a raiz quadrada do tempo e, portanto, independentemente da população inicial, o estado absorvente $n = 0$ será alcançado. Além do mais, pode-se mostrar que a variância (7.11) é máxima exatamente em $\kappa = 1$.

Para determinar as probabilidades $P_0(t)$ definimos a função geratriz

$$F(z, t) = \sum_{n=0}^{\infty} P(n, t) z^n, \quad (7.12)$$

cujos coeficientes da expansão em série de potências fornecem as probabilidades $P(n, t)$.

Particularmente, $F(0, t) = P(0, t) \equiv P_0(t)$. Multiplicando a equação (7.6) por z^n e somando sobre todos os valores de n encontramos, após alguma manipulação algébrica, a seguinte equação para a função geratriz

$$F(z, t + 1) = \frac{gz^2 + r}{z}[F(z, t) - P_0(t)]. \quad (7.13)$$

A equação (7.13) pode ser iterada a partir da condição inicial $P(n, 0) = \delta_{n, n_0}$, que leva a $F(z, 0) = z^{n_0}$ e $P_0(0) = 0$. Os polinômios e as respectivas probabilidades de atingir o estado absorvente obtidos para $n_0 = 1$ são mostrados na tabela 7.1.

t	$F(z, t)$	$P_0(t)$
0	z	0
1	$gz^2 + r$	r
2	$gz^3 + g zr$	0
3	$g^3 z^4 + 2g^2 z^2 r + r^2 g$	$r^2 g$
4	$z^5 g^4 + 3z^3 g^3 r + 2z g^2 r^2$	0
5	$z^6 g^5 + 4z^4 g^4 r + 5z^2 g^3 r^2 + 2r^3 g^2$	$2r^3 g^2$
6	$z^7 g^6 + 5z^5 g^5 r + 9z^3 g^4 r^2 + 5z g^3 r^3$	0
7	$z^8 g^7 + 6z^6 g^6 r + 14z^4 g^5 r^2 + 14z^2 g^4 r^3 + 5r^4 g^3$	$5r^4 g^3$
8	$z^9 g^8 + 7z^7 g^7 r + 20z^5 g^6 r^2 + 28z^3 g^5 r^3 + 14z g^4 r^4$	0
9	$z^{10} g^9 + 8z^8 g^8 r + 27z^6 g^7 r^2 + 48z^4 g^6 r^3 + 42z^2 g^5 r^4 + 14r^5 g^4$	$14r^5 g^4$
10	$z^{11} g^{10} + 9z^9 g^9 r + 35z^7 g^8 r^2 + 75z^5 g^7 r^3 + 90z^3 g^6 r^4 + 42z g^5 r^5$	0

Tabela 7.1: Os primeiros polinômios da função geratriz do modelo WB com $n_0 = 1$.

A dinâmica do modelo WB descrito nesta seção é idêntica à dinâmica do problema tradicional de uma caminhada aleatória em tempo discreto com uma fronteira absorvente na origem e, conseqüentemente, os diversos resultados conhecidos na literatura de caminhadas aleatórias (vide [77, 80], por exemplo) podem ser imediatamente aplicados ao modelo WB original.

7.4 O modelo WB modificado

Nesta seção, estudaremos o modelo WB generalizado previamente descrito (equações (7.1) e (7.2)), o qual inclui a possibilidade de saturação do crescimento. Na subseção 7.4.1 os resultados exatos obtidos para o modelo generalizado são mostrados, enquanto o restante da seção é dedicado aos resultados macroscópicos obtidos na aproximação

de tempo contínuo, baseados na equação mestra [77, 80]. Novamente, o passo de tempo é definido como o nascimento ou a morte de uma única célula cancerosa.

7.4.1 Resultados exatos do modelo WB estendido

Usando as definições (7.1) e (7.2), a equação de probabilidades de transição para modelo WB estendido é

$$\begin{aligned} P(n, t+1) &= g(n-1)P(n-1, t) + r(n+1)P(n+1, t) & \text{se } n \geq 2 \\ P(n, t+1) &= r(n+1)P(n+1, t) & \text{se } n = 0, 1 \end{aligned} \quad (7.14)$$

Usando (7.7), (7.9) e (7.14), temos que o primeiro e o segundo momento de n serão dados por

$$\langle n(t+1) \rangle = \langle n(t) \rangle + 1 - 2\alpha \left\langle \frac{n(t)}{\Gamma + n(t)} \right\rangle - P_0(t) \quad (7.15)$$

e

$$\langle n^2(t+1) \rangle = \langle n^2(t) \rangle + 1 + 2 \left\langle \frac{n(t)[\Gamma + (1-2\alpha)n(t)]}{\Gamma + n(t)} \right\rangle - P_0(t), \quad (7.16)$$

respectivamente. Note que as duas equações anteriores não são lineares e não podem ser resolvidas por métodos analíticos ou numéricos. Na próxima subseção, estas equações serão estudadas com uma aproximação de campo médio onde as flutuações são negligenciadas.

Como na seção anterior, a probabilidade $P_0(t)$ que aparece nas equações (7.15) e (7.16) pode ser determinada através da função geratriz $F(z, t)$. Usando (7.12) e (7.14), após alguma manipulação algébrica, encontramos

$$F(z, t+1) = z[F(z, t) - F(0, t)] + \frac{\alpha(1-z^2)}{z} \sum_{n=1}^{\infty} z^n r(n)P(n, t).$$

Usando

$$z^n r(n) = \frac{\alpha n z^n}{\Gamma + n} = \alpha z \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{z^n}{\Gamma + n} \right)$$

temos

$$F(z, t+1) = z[F(z, t) - F(0, t)] + \alpha(1-z^2) \frac{\partial}{\partial z} \left[z^{-\Gamma} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{z^{n+\Gamma}}{n+\Gamma} P(n, t) \right].$$

Finalmente, usando

$$\frac{z^{n+\Gamma}}{n+\Gamma} = \int_0^z x^{n+\Gamma-1} dx$$

encontramos

$$F(z, t+1) = z[F(z, t) - F(0, t)] + \frac{\alpha(1 - z^2)}{z} \left[F(z, t) - \frac{\Gamma}{z^\Gamma} \int_0^z x^{\Gamma-1} F(x, t) dx \right]. \quad (7.17)$$

A equação (7.17) poder ser resolvida recursivamente usando a condição inicial $F(z, 0) = z^{n_0}$, onde n_0 é o número inicial de células. Os primeiros polinômios gerados no caso $n_0 = 1$ são mostrados na tabela 7.2.

t	$F(z, t)$	$P_0(t)$
0	z	0
1	$r(1) + g(1)z^2$	$r(1)$
2	$g(1)r(2)z + g(1)g(2)z^3$	0
3	$g(1)r(2)r(1) + [g(1)r(2)g(1) + g(1)g(2)r(3)]z^2 + g(1)g(2)g(3)z^4$	$g(1)r(2)r(1)$

Tabela 7.2: Os primeiros polinômios da função geratriz do modelo WB estendido com $n_0 = 1$.

Embora todas as probabilidades possam ser determinadas através da equação (7.17), os resultados exatos do modelo WB estendido fornecem poucas informações sobre as propriedades dinâmicas do modelo, pois não encontramos uma forma fechada para as probabilidades. No entanto, tais resultados são úteis para determinar as probabilidades dos tumores progredirem ou serem extintos, um problema fundamental na carcinogênese. Para entender as propriedades dinâmicas do modelo, estudaremos o limite macroscópico e de tempo contínuo do modelo WB estendido.

7.4.2 A equação macroscópica

As versões em tempo contínuo das equações (7.15) e (7.16), obtidas a partir da respectiva equação mestra (7.4), são

$$\frac{d\langle n(t) \rangle}{dt} = 1 - 2\alpha \left\langle \frac{n(t)}{\Gamma + n(t)} \right\rangle - P_0(t) \quad (7.18)$$

e

$$\frac{d\langle n^2(t) \rangle}{dt} = 1 + 2 \left\langle \frac{n(t)[\Gamma + (1 - 2\alpha)n(t)]}{\Gamma + n(t)} \right\rangle - P_0(t). \quad (7.19)$$

Note que (7.18) e (7.19) são equações não lineares que não podem ser resolvidas por métodos analíticos ou numéricos. Consideraremos apenas o limite macroscópico destas equações no qual $P_0(t) \sim 0$. Em geral, esta aproximação não é válida para

tumores com poucas células, nos quais as probabilidades de regressão completa não são desprezíveis.

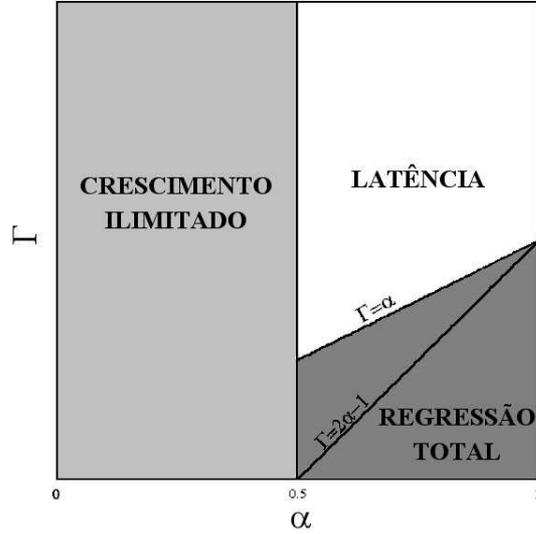


Figura 7.2: Diagrama de campo médio no espaço de parâmetros para o comportamento assintótico do número médio de células cancerosas. São encontradas três regiões distintas: crescimento ilimitado, latência e regressão total do tumor. O eixo vertical inclui qualquer valor positivo de Γ .

Usando uma aproximação de campo médio, a equação macroscópica para (7.18) é obtida substituindo $n(t)$ por uma função determinística $N(t)$. Assim, as equações correspondentes para o primeiro e segundo momentos são

$$\frac{dN(t)}{dt} \equiv \zeta(t) = 1 - 2\alpha \frac{N(t)}{\Gamma + N(t)}. \quad (7.20)$$

e

$$\frac{dN_*^2(t)}{dt} = 1 + 2 \frac{N(t)[\Gamma + (1 - 2\alpha)N(t)]}{\Gamma + N(t)}, \quad (7.21)$$

respectivamente. O asterisco é usado para distinguir entre N^2 e N_*^2 , o segundo momento.

A equação (7.20) exibe três comportamentos assintóticos distintos:

- $N(t)$ cresce sem limite se $\zeta(t) > 0 \quad \forall t$;
- $N(t) \rightarrow 0$ se $\zeta(t) < 0 \quad \forall t$;
- $N(t)$ atinge um valor não nulo se $\zeta(t) = 0$ em algum instante.

O diagrama de fases no espaço de parâmetros (Γ, α) é mostrado na figura 7.2. Esta análise revela a existência de uma transição de fase bem definida em $\alpha = 1/2$, isto é, para $\alpha < 1/2$, o número médio de células cancerosas cresce sem limite, enquanto que, para $\alpha > 1/2$, este número atinge um valor constante $\Omega \geq 0$. Além disso, o segundo regime acima define uma região no diagrama de parâmetros na qual $\Gamma < 2\alpha - 1$. Contudo, para determinar a região de regressão total devemos considerar as flutuações em torno do valor médio $N(t)$, pois o número de células cancerosas sempre atinge o estado absorvente $n = 0$ se as flutuações são maiores que o valor médio. Assim, usando o desvio padrão σ , calculado na próxima subseção (equação (7.35)) como uma estimativa para as flutuações, a região de regressão completa é, de fato, definida por $\Omega < \sigma$, resultando em $\Gamma < \alpha$. Ambas as linhas $\Gamma = 2\alpha - 1$ e $\Gamma = \alpha$ são traçadas no diagrama de fases. É importante mencionar que esta análise macroscópica é uma aproximação grosseira da verdadeira região de regressão total do tumor, já que o termo $P_0(t)$ foi desprezado. O terceiro comportamento acima requer uma solução estável [77], que sempre existe para $\alpha > 1/2$ como mostra a análise gráfica de estabilidade da figura 7.3.

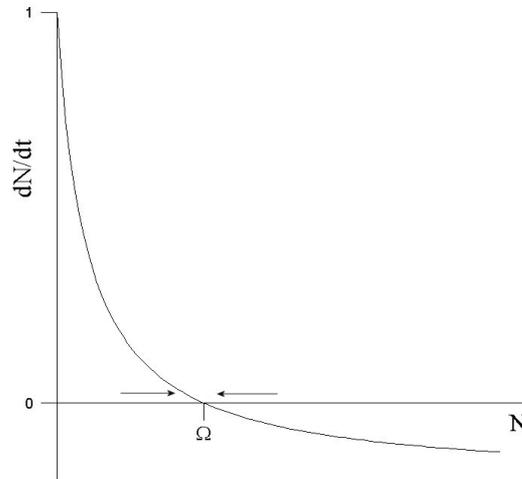


Figura 7.3: Análise de estabilidade da equação (7.20) para $\alpha > 1/2$. O ponto $N = \Omega$ é um ponto de equilíbrio estável pois dN/dt é decrescente e positiva para $N < \Omega$ e negativa para $N > \Omega$, mostrando que as soluções sempre tendem para o ponto de equilíbrio.

Na região de crescimento ilimitado ($\alpha < 1/2$), $N(t)$ cresce linearmente e a variância cresce com a raiz quadrada do tempo, de acordo com (7.20) e (7.21) no limite de N assintoticamente grande. Portanto, o modelo comporta-se assintoticamente como o modelo WB original. A linha de transição $\alpha = 1/2$ deve ser considerada

separadamente. Felizmente, a equação (7.20) tem uma solução fechada para $\alpha = 1/2$, $N_{\frac{1}{2}}(t)$, dada por

$$N_{\frac{1}{2}}(t) = \sqrt{(n_0 + \Gamma)^2 + 2\Gamma t} - \Gamma. \quad (7.22)$$

Nitidamente, $N_{\frac{1}{2}}$ tem o comportamento assintótico $N_{\frac{1}{2}}(t) \cong \sqrt{2\Gamma t}$. Substituindo (7.22) em (7.21), a aproximação macroscópica assintótica para N_*^2 é obtida e, usando este resultado, encontramos $\sigma = \sqrt{t}$, para $t \rightarrow \infty$. No entanto, simulações numéricas sugerem que $\sigma \cong \sqrt{t/2}$, e esta diferença será explicada na subseção 7.4.4, na qual levamos em conta correções para a equação macroscópica.

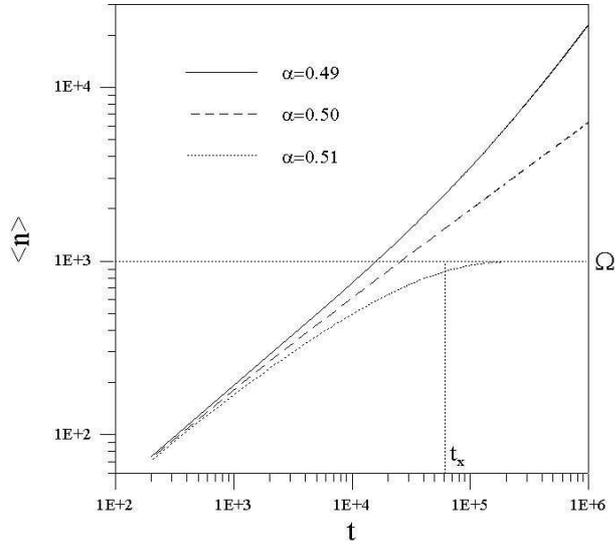


Figura 7.4: Soluções numéricas da equação macroscópica para o modelo WB estendido em torno do valor crítico $\alpha = 1/2$ e $\Gamma = 20$, fixado arbitrariamente. As formas qualitativas destas curvas são independentes de Γ . O valor de saturação e o seu tempo característico para estes parâmetros também são indicados. O método de integração numérica usado foi o Runge-Kutta de quarta ordem [60].

A solução da equação macroscópica (7.20) na região onde ocorre a saturação do crescimento, denotada por $N_s(t)$, atinge uma *valor de saturação* Ω para tempo longos. Este valor pode ser encontrado fazendo $\zeta(t) = 0$

$$\Omega = \frac{\Gamma}{2\alpha - 1}. \quad (7.23)$$

Além disso o *tempo característico de saturação*, (t_x), é avaliado por meio da expansão de $N_s(t)$ em torno de Ω em tempos longos. Substituindo $N_s(t) = \Omega + \mu(t)$, em que

$|\mu(t)| \ll \Omega$, em (7.20) e expandindo a equação resultante obtemos

$$\frac{d\mu}{dt} = -\frac{(2\alpha - 1)^2}{2\alpha\Gamma}\mu + O(\mu^2). \quad (7.24)$$

Mantendo o termo de primeira ordem em μ , a solução é um decaimento exponencial $\mu(t) \sim \exp(-t/t_\times)$, ou seja, a solução se aproxima exponencialmente do valor assintótico Ω . Assim, o tempo característico de saturação é dado por

$$t_\times = \frac{2\alpha\Gamma}{(2\alpha - 1)^2}. \quad (7.25)$$

Na figura 7.4 as integrações numéricas de (7.20) em torno do parâmetro crítico $\alpha = 1/2$ e $\Gamma = 20$ fixo são mostradas.

Para testar as previsões da aproximação da equação macroscópica, seus resultados foram comparados com os resultados de simulações de Monte Carlo. Foi observada uma boa concordância entre resultados analíticos e simulados para $\alpha < 1/2$. Contudo, quando $\alpha \geq 1/2$, pequenas diferenças, que se tornam significativas quando $\Gamma \lesssim 10^2$, emergem. Todas estas comparações são mostradas na figura 7.5. Como se pode ver, existe uma diferença constante entre as curvas analíticas e as simuladas na região de crescimento limitado. Esta diferença pode ser determinada usando uma *expansão da equação mestra* [77], também chamada de *expansão Ω* .

7.4.3 A expansão Ω

Sistemas estocásticos discretos são caracterizados por duas escalas distintas. A primeira é o tamanho das flutuações microscópicas e a segunda é a escala macroscópica, na qual as propriedades dos sistema são medidas. É esperado que os efeitos da primeira escala tornem-se pequenos quando o tamanho do sistema cresce, e as probabilidades de transição tornem-se dependentes de variáveis intensivas. Estas idéias são usadas para obter a expansão Ω [77]. A expansão Ω consiste em expandir a equação mestra em potências do tamanho característico (macroscópico) do sistema. No nosso caso, este tamanho característico é Ω em (7.23), pois ele representa um limite superior para o tamanho da população de células cancerosas. De fato, esta foi a razão para denotarmos o valor de saturação por Ω .

Assume-se que as probabilidades P_n têm um máximo pronunciado em torno da solução macroscópica com uma largura da ordem de $\Omega^{1/2}$. Esta hipótese é explíci-

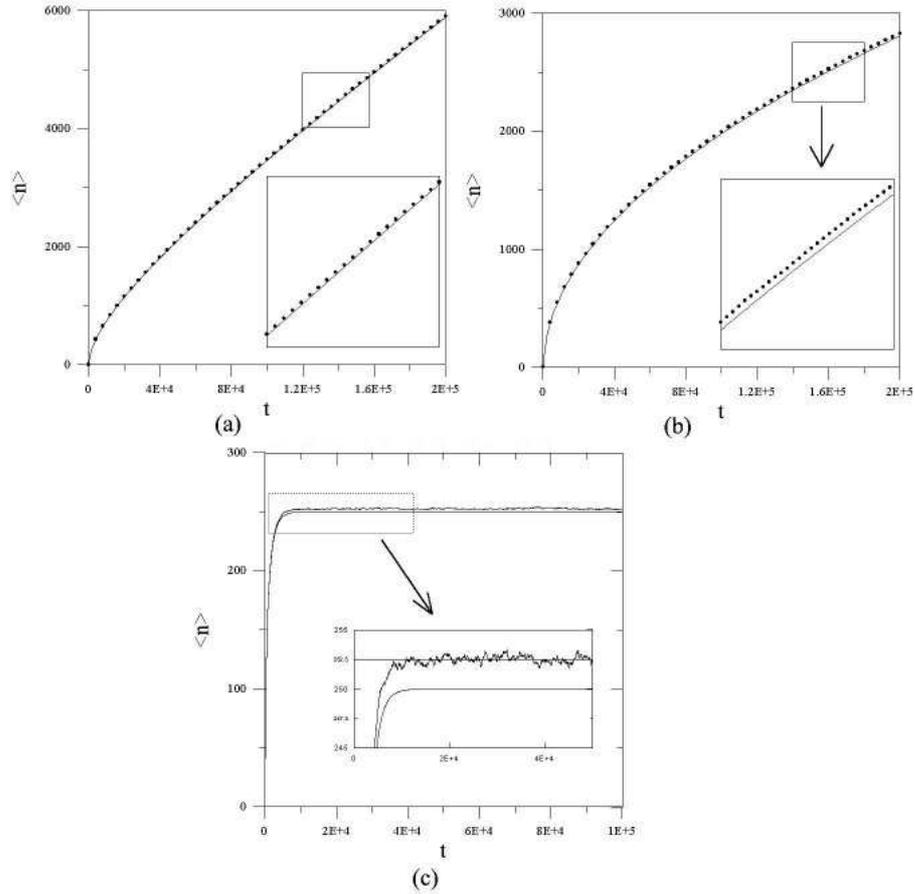


Figura 7.5: Comparação entre resultados analíticos e simulados. As curvas contínuas e suaves são obtidas por meio de integração numérica da equação macroscópica enquanto simulações forneceram as outras curvas. Duas mil amostras foram usadas nas simulações com os parâmetros (a) $\Gamma = 20$ e $\alpha = 0.49$, (b) $\Gamma = 20$ e $\alpha = 1/2$ e, (c) $\Gamma = 50$ e $\alpha = 0.60$.

tamente usada na mudança de variável

$$n = \Omega\phi(t) + \Omega^{1/2}\xi, \quad (7.26)$$

na qual ξ é uma nova variável aleatória e $\phi(t)$ é uma função determinística. Além disso, a expansão assume que as taxas $W(n|m) \equiv W_{n,m}$ podem ser escritas na seguinte forma

$$W_{\Omega}(n|m) = f(\Omega) \left\{ \Phi_0 \left(\frac{m}{\Omega}; s \right) + \Omega^{-1} \Phi_1 \left(\frac{m}{\Omega}; s \right) + \Omega^{-2} \Phi_2 \left(\frac{m}{\Omega}; s \right) + \dots \right\}, \quad (7.27)$$

na qual f e Φ_i são função arbitrárias e $s \equiv n - m$. Os detalhes técnicos envolvidos na expansão podem ser encontrados nas referências [77, 81].

Introduzindo a notação usada por Van Kampen [77]

$$\varphi_{\nu,\lambda}(x) = \int s^\nu \Phi_\lambda(x; s) ds, \quad (7.28)$$

a expansão até as ordens de $\Omega^{1/2}$ e Ω^0 resulta nas seguintes equações para ϕ , $\langle \xi \rangle$ e $\langle \xi^2 \rangle$

$$\frac{d\phi}{d\tau} = \varphi_{1,0}(\phi), \quad (7.29)$$

$$\frac{\partial \langle \xi \rangle}{\partial \tau} = \varphi'_{1,0}(\phi) \langle \xi \rangle \quad (7.30)$$

e

$$\frac{\partial \langle \xi^2 \rangle}{\partial \tau} = 2\varphi'_{1,0}(\phi) \langle \xi^2 \rangle + \varphi_{2,0}(\phi), \quad (7.31)$$

com $\tau \equiv f(\Omega)/\Omega$. A equação (7.29) é a equação macroscópica do sistema dividida por Ω , (7.30) dá a correção para $\langle n(t) \rangle$ na ordem $\Omega^{1/2}$ e (7.31) representa a primeira aproximação para as flutuações em torno da média. As condições iniciais para (7.30) e (7.31) são $\langle \xi(0) \rangle = \langle \xi^2(0) \rangle = 0$, pois $P(n, t=0) = \delta_{n,n_0}$, i. e., em $t=0$ a população é n_0 .

Para o modelo WB estendido, as taxas de transição podem ser escritas como

$$W_\Omega(\rho; s) = \left(1 - \frac{\alpha\rho}{2\alpha - 1 + \rho}\right) \delta(s-1) + \left(\frac{\alpha\rho}{2\alpha - 1 + \rho}\right) \delta(s+1), \quad (7.32)$$

em que $\rho \equiv m/\Omega$. De acordo com a notação de (7.27), encontramos $f(\Omega) = 1$, $\Phi_i = 0$ se $i \neq 0$ e Φ_0 é definido como o lado direito da equação (7.32).

Aqui, nosso objetivo é calcular as correções assintóticas no tempo e as diferenças mostradas na figura 7.5. Resolvendo (7.30) e (7.31), usando (7.32), encontramos

$$\langle \xi(\tau) \rangle \sim \exp\left(-\frac{2\alpha-1}{2\alpha}\tau\right) \xrightarrow{\tau \rightarrow \infty} 0 \quad (7.33)$$

e

$$\langle \xi^2(\tau) \rangle \xrightarrow{\tau \rightarrow \infty} \frac{\alpha}{2\alpha-1}. \quad (7.34)$$

Portanto, as correções para $\langle n(\infty) \rangle$, dadas por (7.33), anulam-se, pois $n = \Omega\phi(t) + \Omega^{1/2}\xi(t)$. No entanto, (7.34) mostra que a primeira correção para a variância atinge um valor constante

$$\sigma^2 = \Omega \langle \xi^2(\tau) \rangle \xrightarrow{\tau \rightarrow \infty} \frac{\Gamma\alpha}{(2\alpha-1)^2}. \quad (7.35)$$

Na figura 7.5(c) a variância medida foi $\sigma_{medido} \cong 27.5$, enquanto o valor analítico

calculado com (7.35) é $\sigma_{analítico} \cong 27.4$. Assim, há uma excelente concordância entre os resultados analíticos e os simulados para a variância. Como as flutuações atingem um valor constante menor que o valor de saturação, o tumor certamente não desaparecerá como no modelo WB original com $\kappa = 1$.

A diferença entre os valores de saturação obtidos pelas simulações e calculados pela equação macroscópica não pode ser explicada levando-se em conta apenas termos de ordem Ω^0 . A primeira correção não nula para $\langle \xi \rangle$ envolve termos da ordem $\Omega^{-1/2}$ [77]

$$\langle \xi \rangle = \frac{\Omega^{-1/2}}{2(2\alpha - 1)}. \quad (7.36)$$

Conseqüentemente, a primeira correção em $\langle n \rangle$ é

$$\Delta \equiv \Omega^{1/2} \xi = \frac{1}{2(2\alpha - 1)}. \quad (7.37)$$

Usando (7.37), a correção calculada é $\Delta_{analítico} = 2.5$ e o valor medido na figura 7.5(c) é $\Delta_{medido} \cong 2.51$, que estão em excelente concordância. Vários outros valores dos parâmetros do modelo foram testados e uma concordância muito boa entre resultados analíticos e simulados foi observada.

Resumindo, nesta subseção usamos a expansão Ω para corrigir as discrepâncias entre a análise de campo médio e simulações de Monte Carlo observadas e, calcular as flutuações para $\alpha > 0.5$ (quando o tamanho do tumor satura). Embora as correções sejam pequenas se comparadas com o tamanho dos tumores latentes clinicamente detectáveis, elas podem tornar-se significativas nos estágios iniciais da progressão tumoral, nos quais as flutuações no número de células pode representar a diferença entre o crescimento ou a regressão do tumor.

7.4.4 Correções assintóticas para $\alpha = 1/2$

A expansão Ω não pode ser aplicada a sistemas sem um tamanho característico. Este é o caso da equação (7.22) que fornece uma solução que cresce sem limites e, conseqüentemente, não se pode definir o tamanho característico do tumor. Contudo, é possível fazer uma expansão em torno da solução macroscópica (7.22). Definindo $n(t) = N_{\frac{1}{2}}(t) + \varepsilon(t)$, em que ε é a nova variável aleatória satisfazendo a condição $|\varepsilon(t)|/N_{\frac{1}{2}}(t) \ll 1$ e mantendo termos até segunda ordem em $\varepsilon/N_{\frac{1}{2}}$, encontramos a

seguinte equação para $\varepsilon(t)$

$$\frac{d \langle \varepsilon \rangle}{dt} = -\Gamma \frac{\langle \varepsilon \rangle}{g^2(t)} + \Gamma \frac{\langle \varepsilon^2 \rangle}{g^3(t)} + O(\varepsilon^3), \quad (7.38)$$

na qual $g(t) \equiv \sqrt{n_0 + 2\Gamma t}$. Para resolver (7.38) é necessário conhecer a relação entre o primeiro e o segundo momentos de ε . A equação (7.21) fornece $N_*^2(t) = N_{\frac{1}{2}}^2(t) + t$ e a expansão de $n^2 = (N_{\frac{1}{2}} + \varepsilon)^2$, com a aproximação $\langle n^2 \rangle \approx N_*^2$, resulta em

$$\langle \varepsilon^2 \rangle \approx t - 2N_{\frac{1}{2}} \langle \varepsilon \rangle. \quad (7.39)$$

Substituindo esta relação aproximada para $\langle \varepsilon^2 \rangle$ na equação (7.38) e tomando o limite assintótico para t , obtemos

$$\frac{d \langle \varepsilon \rangle}{dt} + \frac{3}{2t} \langle \varepsilon \rangle - \frac{1}{2\sqrt{2\Gamma t}} = 0. \quad (7.40)$$

Sua solução exata é

$$\langle \varepsilon(t) \rangle = \sqrt{\frac{t}{32\Gamma}}. \quad (7.41)$$

Considerando a correção dada por (7.41), as curvas analíticas e simuladas na figura 7.5(b) tornam-se indistinguíveis. Agora, podemos usar o resultado (7.41) para encontrar a correção para a variância. Usando as definições acima, é possível mostrar que $\sigma^2 \equiv \langle \varepsilon^2 \rangle - \langle \varepsilon \rangle^2$. Usando (7.41) e (7.39), encontramos que o valor assintótico da variância, consistente com as aproximações usadas acima, é dado por

$$\sigma^2 = \frac{t}{2} \left(1 - \frac{1}{16\Gamma} \right) \quad (7.42)$$

A equação (7.42) é capaz de explicar o fator 1/2 presente nas simulações mostradas na figura 7.5(b). Novamente, os resultados analíticos e simulados concordam muito bem para uma ampla faixa de parâmetros.

7.5 Padrões geométricos

As seções anteriores foram dedicadas ao estudo analítico do modelo WB e a sua versão estendida. Agora, nesta seção os resultados de simulações focando as propriedades geométricas dos padrões gerados pelo modelo WB estendido são apresentados. Os padrões associados com o modelo WB original são assintoticamente esféricos, com-

compactos e com bordas rugosas. Para o modelo estendido, os padrões exibem três morfologias distintas: compacta com uma borda rugosa, conexa com buracos internos e, desconexa com células isoladas umas das outras ou em pequenos aglomerados. Estas morfologias são mostradas na figura 7.6. Na região de crescimento ilimitado, i. e., $\alpha < 1/2$, os padrões tornam-se compactos. Esta compactação ocorre porque a probabilidade de divisão é sempre maior que a de morte (figura 7.1) e, como uma consequência, todos os sítios internos vazios serão ocupados em tempos suficientemente longos. Os padrões desconexos aparecem na região de crescimento limitado ($\alpha > 1/2$). A razão é que quando o crescimento satura, as probabilidades de divisão e morte oscilam em torno do mesmo valor $g = r = 1/2$ e as células cancerosas comportam-se qualitativamente como caminhantes aleatórios não direcionados, ou seja, o resultado líquido das divisões seguidas da ocupação de sítios vizinhos normais e mortes de células cancerosas é uma migração direcionada para fora do tumor. Finalmente, os padrões conexos são gerados apenas na linha de transição $\alpha = 1/2$. A diferença entre padrões compactos, desconexos e conexos é que no primeiro (fig 7.5(a)) existe uma percolação de sítios ocupados por células cancerosas, no segundo (fig 7.5(c)) uma percolação de sítios ocupados por células normais e no terceiro (fig 7.5(b)) não existe percolação. Aqui, observamos uma transição de fase similar àquela encontrada na percolação por ligações [9]. Neste problema as ligações entre dois sítios de uma rede são preenchidas com probabilidade p . Na rede quadrada, a probabilidade crítica $p_c = 1/2$ para a qual um aglomerado de percolação emerge é conhecida exatamente. Por outro lado, para a classe de modelos WB, as mudanças ocorrem somente nas ligações entre células normais e cancerosas e as probabilidades assintóticas de divisão e morte $1 - \alpha$ e α , respectivamente, mapeiam esses modelos dinâmicos no problema estático de percolação por ligações. Assim, a transição de padrões compactos para conexos observado em $\alpha = 1/2$ pode ser compreendida através do problema clássico de percolação por ligações.

Os padrões gerados pelo modelo WB estendido foram caracterizados pelo seu raio de giração R_g definido pela equação (3.1) e o número de células cancerosas na periferia do tumor S . Como vimos no capítulo 3.1, no modelo WB original R_g e S escalam assintoticamente com a raiz quadrada do número de células do tumor [23]. No entanto, apenas os padrões compactos ($\alpha < 0.5$) do modelo estendido mostram o mesmo comportamento assintótico para R_g e S . Para $\alpha \geq 0.5$ as leis de escala mudam e são dependentes do parâmetro Γ . De fato, $S \sim n$ e $R_g \sim n^\nu$, com $\nu(\Gamma) > 1/2$, indicando que os padrões são fractais com dimensão $d_f = 1/\nu$ [39]. Note que, na

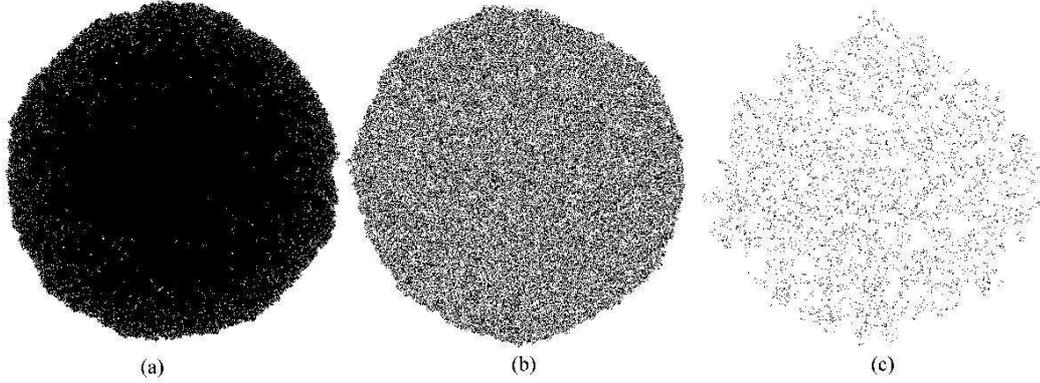


Figura 7.6: Padrões típicos gerados pelo modelo WB estendido: (a) compacto, (b) conexo e (c) desconexo. Para estes padrões $\Gamma = 1000$ foi usado. $\alpha = 0.45, 0.50$ e 0.51 em (a), (b) e (c), respectivamente. As simulações foram feitas em redes 1200×1200 e paradas quando uma célula cancerosa alcança a borda da rede.

região de crescimento limitado, n não cresce indefinidamente e as leis de potência são definidas antes da saturação do crescimento. Contudo, desde que as células cancerosas tornam-se progressivamente mais distantes umas das outras, R_g cresce continuamente com o tempo de acordo com uma lei de potência. Alguns resultados numéricos são resumidos na tabela 7.3.

Γ	$\alpha < 1/2$		$\alpha = 1/2$			$\alpha = 0.51$		
	ν	σ	ν	σ	γ	ν	σ	γ
10^2	0.50	0.50	0.64	1	0.18	0.62	1	0.64
10^3	0.50	0.50	0.60	1	0.18	0.60	1	0.64
10^4	0.50	0.50	0.54	1	0.25	0.52	1	0.63

Tabela 7.3: Resumo dos expoentes encontrados para o modelo WB estendido. Os expoentes ν, σ e γ são definidos por $R_g \sim n^\nu, S \sim n^\sigma$ e $\rho \sim t^\gamma$, respectivamente.

A transição de padrões compactos para desconexos foi estudada através da densidade ρ de buracos internos no padrão. ρ é definida como a razão entre o número de sítios vazios e ocupados limitados por um círculo de raio R_g . Esta definição foi usada com o intuito de descartar a contribuição da borda do tumor, onde a compactação nunca ocorre. Para $\alpha < 1/2$, ρ decresce, anulando-se para tempos suficientemente longos. Em contraste, para $\alpha \geq 1/2$, ρ cresce assintoticamente como uma lei de potência $\rho \sim t^\gamma$. Para testar como o expoente γ varia com o parâmetro Γ , simulações foram feitas usando-se três valores distintos de Γ ($10^2, 10^3, 10^4$). Para $\Gamma = 10^4$ e $\alpha = 1/2$ a

densidade é menor que para $\Gamma = 10^3$, mas a correspondente lei de potência é maior. Contudo, os gráficos $\log \times \log$ de $\rho \times t$ obtidos das simulações para $\Gamma = 10^4$ são lineares em apenas uma década, em contraste às três ou mais décadas observadas para os outros parâmetros na tabela 7.3. Portanto, acreditamos que a curva obtida para este caso deve ser um comportamento transiente, pois o número máximo de passos de tempo usados nas simulações não é suficiente para alcançar o limite assintótico. Conseqüentemente, supomos que, para $\alpha = 1/2$, o expoente $\gamma \simeq 0.18$ é independente de Γ . Além do mais, esta hipótese é reforçada pelas simulações para $\alpha > 0.5$. $\rho(t)$ é mostrado na figura 7.7 para $\Gamma = 10^3$ e diferentes valores de α .

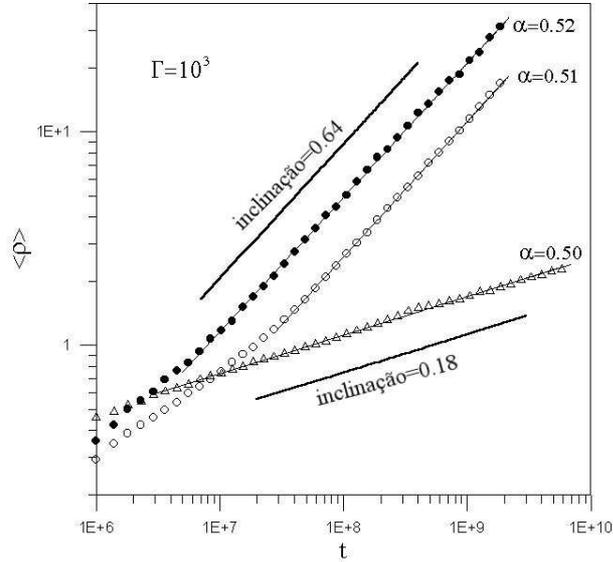


Figura 7.7: Evolução temporal da densidade de buracos internos. Claramente, $\rho(t)$ segue uma lei de potência. Três curvas são mostradas para $\alpha = 0.5, 0.51, 0.52$ e $\Gamma = 10^3$, bem como seus respectivos ajustes de lei por potência. As inclinações $\alpha = 1/2$ e $\alpha > 1/2$ são independentes de Γ e indicadas pelas duas linhas sólidas.

Os padrões observados no modelo estendido são similares às morfologias geradas pelo modelo de crescimento do capítulo 4. Esse modelo considera uma rede complexa de interações entre células cancerosas mediadas por fatores de crescimento e, em contraste a esse modelo, envolve vários parâmetros. Os resultados atuais são mais robustos que os observados no capítulo 4, pois os dois parâmetros usados no modelo WB estendido não são associados com propriedades do microambiente do tumor. Na verdade, eles são relacionados diretamente com quantidades macroscópicas tais como o tamanho de saturação do tumor. Contudo, o modelo WB estendido tem limitações. Todos os tumores compactos têm crescimento ilimitado e os padrões des-

conexos sempre cessam seu crescimento. A razão é que o crescimento ocorre somente na interface entre o tumor e o tecido normal, enquanto em tumores reais as células internas também dividem-se. Por outro lado, a ausência de mobilidade celular pode ser um fator determinante para as morfologias tumorais. Além disso, a dinâmica é definida *a priori* através das equações (7.1) e (7.2) e, obviamente, não emerge naturalmente de regras microscópicas. A obtenção das probabilidades de divisão e morte a partir de teorias mais fundamentais é um tema aberto, atualmente tratado pela teoria cinética celular [14].

7.6 Conclusões

Neste capítulo propomos uma versão estendida do modelo de Williams e Bjercknes (WB) inicialmente usado para descrever o crescimento de tumores. Nesse modelo estendido, as probabilidades de divisão e morte correspondem a funções monotonicamente crescentes e decrescentes do número total de células cancerosas n , respectivamente. Os valores médios de n para o modelo de WB original e estendido, bem como suas variâncias, foram analiticamente calculados usando métodos de processos estocásticos. O modelo original revela duas possibilidades para $\langle n \rangle$: crescimento ilimitado ou regressão total do tumor. Contudo, tumores reais exibem três comportamentos possíveis, os quais também são observados no modelo WB estendido: os previamente descritos e um estado quiescente no qual o tamanho do tumor permanece constante por tempos longos. As diferenças observadas entre resultados do limite macroscópico para o modelo estendido foram calculadas usando-se expansões das equações envolvidas. Entre estas expansões, mostramos uma aplicação muito interessante do formalismo elegante da expansão da equação mestra, também conhecida por expansão Ω . Além disso, a geometria dos padrões de crescimento gerados pelo modelo estendido foi analisada. Três morfologias distintas foram observadas: compacta, conexa e desconexa. Todos os padrões foram caracterizados pelo seu raio de giração R_g e pelo número de células na borda do tumor, S . Para os padrões compactos, $R_g \sim \sqrt{n}$ e $S \sim \sqrt{n}$. Para os padrões conexos e desconexos $R_g \sim n^\nu$ e $S \sim n$, com $\nu > 1/2$, indicando que estes padrões são fractais.

Vários estudos ainda devem ser realizados com o modelo deste capítulo. Com relação às propriedades dinâmicas do modelo WB estendido, primeiramente pretendemos estudar com mais cuidado o diagrama no espaço de parâmetros que define a região em que o tumor irá crescer sem limites, saturar o crescimento ou regredir totalmente.

Neste caso, adicionaremos à aproximação macroscópica uma análise numérica dos resultados exatos encontrados para a função geratriz do modelo bem como simulações intensivas de Monte Carlo. O passo seguinte é usar o modelo WB estendido para formular um modelo para carcinogênese, no qual o tumor é constituído por células em vários estágios de malignidade, em concordância com a teoria de múltiplos estágios de progressão do câncer [1, 29]. Com relação à geometria dos padrões, pretendemos incluir dois pontos: possibilidade de divisão para todas as células do tumor (e não somente na borda como no modelo WB original) e a inclusão da mobilidade celular.

Finalmente, falta mencionar que este capítulo foi fruto de um trabalho apresentado como requisito da disciplina *Processos estocásticos em Física* oferecido pelo professor Ronald Dickman do Departamento de Física da UFMG. Certamente, este trabalho não seria possível sem os conhecimentos obtidos nesta disciplina e, portanto, eu gostaria de fazer um agradecimento especial neste capítulo ao professor Ronald Dickman.

Capítulo 8

Conclusões e perspectivas

Nesta tese apresentamos uma nova proposta para a simulação do crescimento de tumores. O principal aspecto dessa proposta é a associação de regras microscópicas estocásticas para descrever a dinâmica de células individuais com equações macroscópicas de reação-difusão que descrevem as concentrações nos tecidos das diversas substâncias envolvidas (nutrientes, fatores de crescimento, drogas quimioterápicas, etc.). A dinâmica celular, que inclui divisão, movimento e morte de células cancerosas, é simulada através de probabilidades que dependem das concentrações das diversas substâncias no tecido. De acordo com a teoria cinética celular, que fornece uma estrutura geral para a descrição estatística de células interagentes [14], essas probabilidades podem ser interpretadas como modelos cinéticos efetivos. Contudo, nesta tese, a forma funcional das probabilidades é heurística e reproduz qualitativamente a resposta celular esperada a uma dada condição do microambiente. Nesses modelos, ao contrário do que acontece nos modelos de equações diferenciais parciais, a característica discreta das células é preservada e, além disso, as morfologias dos tumores emergem naturalmente.

Especificamente, os modelos de reação-difusão estudados nesta tese foram divididos em três trabalhos correspondendo, respectivamente, aos capítulos 4, 5 e 6. No primeiro desses trabalhos, estudamos um modelo bidimensional para o crescimento de tumores primários no qual as ações celulares (divisão, movimento e morte) são localmente controladas por fatores de crescimento produzidos pelas próprias células cancerosas do tumor. Analisamos a formação de padrões, curvas de crescimento, leis de escala e transições morfológicas para duas regras microscópicas distintas. O modelo fornece uma ampla diversidade morfológica, que inclui padrões compactos, conexos e desconexos, para os tumores que evoluem no tempo seguindo leis de Gompertz,

independentemente da regra microscópica considerada. O raio de giração R_g de todos os tumores escala com a raiz quadrada do número total de células cancerosas, enquanto as leis de escala para número de células cancerosas na superfície do tumor S depende dos parâmetros e da regra microscópica. No entanto, outras morfologias tumorais observadas em tumores epiteliais, tais como papilar e ramificada, não foram produzidas por esse modelo. Por isso, fomos levados a estudar um novo modelo que inclui a competição por nutrientes entre células cancerosas e normais.

Nesse modelo, que corresponde ao segundo trabalho da tese, as ações celulares passam a depender da concentração local de nutrientes fornecidos por um vaso capilar localizado no topo da rede. Os nutrientes são divididos em dois grupos, o primeiro associado às necessidades metabólicas usuais das células e o segundo essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos envolvidos na divisão celular. Nossas simulações mostram que o progresso no tempo do número total de células cancerosas, raio de giração do tumor e número de sítios na periferia do tumor é descrito por curvas de Gompertz. As morfologias compactas e papilares geradas obedecem a diferentes leis de escala para o número de sítios de periferia. Para padrões compactos $S \sim n^{1/2}$ como no modelo de Eden, enquanto para padrões papilares o expoente na lei de potência cresce em direção à unidade quando o consumo de nutrientes aumenta, indicando uma morfologia fractal para o tumor. Nessa versão do modelo a migração não é guiada por sinais quimiotáticos secretados pelas células cancerosas e, como consequência, a mobilidade celular contribui para arredondar e homogeneizar os padrões de crescimento. Por isso, estudamos também o modelo que considera simultaneamente nutrientes e fatores de crescimento. Além disso, os tumores simulados incorporam uma estrutura espacial composta de um núcleo necrótico central, uma faixa interna de células quiescentes e uma camada externa de células proliferativas de acordo com dados biológicos.

Por fim, usamos o modelo com competição por nutrientes para estudar os efeitos de quimioterapias no crescimento de carcinomas *in situ*. O modelo inclui, além de divisão, movimento e morte celular, competição por nutrientes entre células cancerosas e normais e administração periódica de drogas. Dois tipos de quimioterapias, usando drogas citotóxicas e antimitóticas, foram modelados. No modelo com drogas citotóxicas os tumores podem ser completamente erradicados, cessar seu crescimento ou crescer continuamente. O último caso ocorre quando o tratamento é pouco eficiente ou os intervalos entre doses consecutivas de drogas são longos. Além disso, as morfologias e as leis de escala dos tumores que continuam crescendo mesmo sob tratamento são preservadas. Em contraste, para as terapias que usam agentes antimitóticos

uma transição morfológica foi observada. Os padrões de crescimento tornam-se progressivamente mais fractais quando tratamentos mais efetivos (intervalos entre doses consecutivas e/ou drogas mais eficientes) são considerados.

Para complementar a tese, estudamos uma versão estendida do modelo de Williams e Bjercknes (WB) inicialmente usado para descrever o crescimento de tumores. Nesse modelo estendido, as probabilidades de divisão e morte correspondem a funções monotonicamente crescentes e decrescentes do número total de células cancerosas n , respectivamente. Os valores médios de n para o modelo de WB original e estendido, bem como suas variâncias, foram analiticamente calculados usando métodos de processos estocásticos. O modelo original revela duas possibilidades para $\langle n \rangle$: crescimento ilimitado ou regressão total do tumor. Contudo, tumores reais exibem três comportamentos possíveis, os quais também são observados no modelo WB estendido: os previamente descritos e um estado quiescente no qual o tamanho do tumor permanece constante por tempos longos. As diferenças observadas entre resultados do limite macroscópico para o modelo estendido foram calculadas usando-se expansões das equações envolvidas. Entre estas expansões, mostramos uma aplicação muito interessante do formalismo elegante da expansão da equação mestra, também conhecida por expansão Ω . Além disso, a geometria dos padrões de crescimento gerados pelo modelo estendido foi analisada. Três morfologias distintas foram observadas: compacta, conexa e desconexa. Todos os padrões foram caracterizados pelo seu raio de giração R_g e pelo número de células na borda do tumor, S . Para os padrões compactos, $R_g \sim \sqrt{n}$ e $S \sim \sqrt{n}$. Para os padrões conexos e desconexos $R_g \sim n^\nu$ e $S \sim n$, com $\nu > 1/2$, indicando que estes padrões são fractais.

Um último trabalho [82], que está em fase de redação e por isso não foi incluído na tese, consiste na simulação de tratamento de câncer com vírus que replicam seletivamente em células cancerosas usando o nosso modelo com competição por nutrientes [25]. Este tipo de tratamento é uma das terapias mais promissoras no combate contra o câncer [83] e configura um problema extremamente interessante do ponto de vista da Física. Este tipo de terapia foi estudada por Wu *et. al.* [15] usando um modelo de equações diferenciais parciais. Os vírus, manipulados geneticamente, prendem-se a receptores específicos na superfície das células cancerosas, invadem-as e passam a proliferar-se exponencialmente causando, posteriormente, a morte celular (lise). Quando ocorre a lise, as novas partículas de vírus são liberadas e tornam-se disponíveis para infectar novas células cancerosas adjacentes. Assim, teoricamente, ciclos sucessivos de infecção de células cancerosas e liberação de vírus levariam à con-

taminação do tumor inteiro. O nosso modelo inclui, além da infecção e liberação de vírus, a difusão dessas partículas pelo tecido. O modelo exhibe comportamentos complexos para a dinâmica de crescimento do tumor. O tratamento pode eliminar completamente o tumor, ou fracassar e, com isso, o tumor continuar crescendo de acordo com leis de Gompertz; ou provocar um comportamento oscilatório e não periódico que definimos como um comportamento complexo. Esta fase complexa é caracterizada por ondas de infecção que se propagam de dentro para fora do tumor. Os mecanismos que geram estas ondas estão relacionados com a difusão e a taxa de eliminação dos vírus, mas ainda não estão completamente compreendidos. Alguns pontos fundamentais estão sendo esclarecidos com simulações adicionais. Esse modelo, além de reproduzir qualitativa e quantitativamente experimentos com tumores reais, permite estudar algumas questões fundamentais sobre o tratamento com vírus, tais como o papel do sistema imunológico nesse tipo de terapia.

Além do tratamento com vírus, temos vários projetos para aplicar esse modelo no estudo de outros fenômenos do crescimento neoplásico. Especificamente, pretendemos incluir a produção de fatores de angiogênese pelo tumor quando este estiver com baixa disponibilidade de nutrientes. Assim, novos vasos sangüíneos cresceriam a partir do capilar localizado na borda do tecido. Outro trabalho seria estudar com detalhes o processo de degradação da matriz extracelular por enzimas produzidas por células cancerosas e, conseqüentemente, o processo de invasão das células cancerosas aos tecidos vizinhos. Ainda, o papel das interações entre o tumor e o estroma hospedeiro é outro processo complexo que abordaremos. Pretendemos também usar o modelo Williams & Bjerknes estendido para estudar um modelo teórico para descrever os múltiplos passos da carcinogênese.

Para finalizar, gostaria de destacar o caráter interdisciplinar desta tese. A cooperação científica entre pesquisadores de áreas que muitas vezes são separadas academicamente, como por exemplo as ciências biológicas e exatas, tem se mostrado um dos caminhos mais promissores na compreensão de fenômenos complexos como o câncer. Eu particularmente acredito que um sistema complexo como esse não será completamente entendido meramente catalogando-se suas partes e as normas que regem suas interações. Portanto, acredito que a participação de físicos, com sua visão de buscar os mecanismos mais relevantes que determinam a dinâmica e as características de um sistema, e biólogos, com sua capacidade descritiva minuciosa, é um caminho que poderá levar a compreensão mais profunda de diversos pontos obscuros no processo de crescimento de tumores.

Apêndice A

Glossário

Neste glossário apresentamos os termos destacados em negrito ao longo da tese de uma forma simplificada e organizados em ordem alfabética. A maior parte do conteúdo deste glossário foi retirado de dicionários [84, 85] e páginas da internet [86, 87].

Angiogênese tumoral: indução do crescimento de vasos sanguíneos pelos tumores para suprir a deficiência de nutrientes. Essa indução é promovida por substâncias produzidas pelas próprias células cancerosas denominadas fatores de angiogênese tumoral.

Angiostatina: forte agente anti-angiogênico que, na sua forma natural, é produzido por tumores primários e induz apoptose.

Apoptose: processo de morte celular programada que ocorre naturalmente como parte do desenvolvimento normal, manutenção e renovação de tecidos dentro do organismo. As instruções do programa de controle da apoptose estão presentes no próprio genoma celular. Também mecanismo também está presente em células cancerosas mas com funcionamento comprometido.

Caderina: proteínas de adesão intercelular presentes, principalmente, na membrana de células epiteliais.

Câncer: tumor maligno - qualquer crescimento que resulta na invasão e destruição de tecido saudável por células anormais. Células cancerosas surgem de células normais cujas propriedades foram alteradas por sucessivas mutações genéticas provocadas por agressões repetidas de agentes químicos, radiação, etc. Em geral, elas multiplicam-se mais frequentemente que as suas contrapartidas normais, não são sujeitas ao controle normal do organismo e mostram perda de diferenciação celular. Elas podem se disse-

minar via sistema sanguíneo ou linfático para outras partes do corpo, nas quais elas podem produzir tumores secundários. Tumor maligno é outro nome dado ao câncer.

Carcinoma: tumor maligno derivado de tecido epitelial.

Carcinoma de células basais: tipo de câncer de pele que origina-se de células basais (células redondas encontradas na parte inferior (ou base) da epiderme, a camada externa da pele).

Carcinoma *in situ*: câncer confinado ao seu tecido de origem e que não se espalhou pelos tecidos vizinhos.

Células endoteliais: células que revestem as paredes dos vasos sanguíneos.

Células epiteliais: células do tecidos de revestimento como, por exemplo, a pele. As células destes tecidos são constantemente agredidas e, por isso, dividem-se frequentemente para repor as suas contrapartidas mortas, o que leva a uma alta frequência de tumores neste tipo de tecido.

Células somáticas: todas as células do corpo, exceto os gametas (espermatozóides ou óvulos).

Ciclina: proteínas que controlam as várias fases do ciclo celular. Suas concentrações flutuam durante o ciclo, fornecendo as condições para que as distintas fases do ciclo sejam completadas. Elas atuam em conjunto com cinases dependentes de ciclina.

Cinase: enzimas que podem adicionar grupos de fosfato a outras moléculas. A adição de grupos de fosfato a uma proteína pode alterar suas atividades e é frequentemente usada como um mecanismo molecular de ativação-desativação de proteínas.

Citocinas: classe de substâncias produzidas por células do sistema imunológico que podem afetar a resposta imune.

Citoesqueleto rede de fibras presente em células eucariotas que fornece um estrutura de suporte para as organelas, ancora a membrana celular, facilita o movimento celular, entre outros fatores.

Citosol: parte solúvel do citoplasma celular que exclui as organelas celulares.

Colágeno: proteína fibrosa insolúvel encontrada extensivamente no tecido conectivo (responsável pela sustentação do órgão) da pele, tendões e ossos.

Colagenase: enzima que degrada colágeno.

Crise: estado celular caracterizado por desordem genética que leva a morte da célula provocada pelo encurtamento excessivo dos telômeros.

Cromossomo: estrutura do núcleo de células eucariotes composta de DNA e proteína. Cromossomos carregam a informação genética da célula em seu DNA organizado em arranjos lineares de genes. Cada espécie tem um número constante de cromossomos;

particularmente, humanos têm 23 pares de cromossomos.

Dependência de ancoragem: fenômeno no qual células animais necessitam estar presas a uma superfície para proliferarem.

Diferenciação celular: processo durante o qual células imaturas (não especializadas) adquirem características individuais e atingem sua forma e função maduras (especializadas).

Displasia: células anormais, tanto na forma quanto na organização do tecido, mas que ainda não são cancerosas, ou seja, não podem invadir tecidos adjacentes ou produzir metástases. Essas células podem ser pré-cancerosas.

Endostatina: droga que está sendo estudada pela sua habilidade de prevenir o crescimento de vasos sanguíneos em tumores sólidos. A endostatina pertence à família das drogas chamadas inibidores de angiogênese.

Epigenético: vide transformações epigenéticas.

Estimulação autócrina: quando as células produzem substâncias capazes de estimularem a si próprias.

Estimulação parácrina: estimulação celular gerada por sinais químicos secretados por outras células ou tecidos da vizinhança.

Estroma: tecidos constituídos por vários tipos celulares responsáveis pela sustentação do órgão; tipicamente tecido conjuntivo.

Fagocitar: realizar fagocitose, o processo pelo qual partículas estranhas ao organismo ou partículas minúsculas de alimento são ingeridas e quebradas por um certo tipo de célula denominada **fagócito**.

Fagócito: tipo de célula animal do sistema imunológico capaz de capturar e quebrar partículas estranhas, fragmentos celulares e microorganismos nocivos ao corpo.

Fator de crescimento: proteínas produzidas por células para controlar a reprodução celular estimulando a divisão celular ou, às vezes, a inibindo.

Fator de motilidade autócrino: proteína produzida por células cancerosas que estimula e auxilia o seu próprio movimento celular.

Fator de transcrição: proteínas que controlam a ligação de polimerases (enzimas que unem monômeros que constituem biomoléculas como o DNA e o RNA) do RNA às moléculas de DNA durante o processo de transcrição (cópia da informação genética para o RNA mensageiro).

Fibroblastos: tipo celular que libera as fibras presentes no tecido conectivo. Estas células são longas, achatadas e se localizam próximas às fibras de colágeno.

Genes supressores de tumor: genes responsáveis pela produção de sinais con-

troladores de crescimento e diferenciação celular. Estes genes previnem crescimentos inapropriados e o aparecimento de células anormais. A inativação desses genes (por mutação ou ausência) ocorre na maioria dos cânceres.

Glioma: câncer do cérebro que inicia-se em células gliais (células que cercam e suportam as células nervosas).

Glioblastoma: tumor do cérebro que origina-se de células gliais (de suporte) do tecido cerebral. Este tipo de tumor cresce muito rapidamente e suas células são muito diferente de suas contrapartidas normais.

Inibidores de angiogênese: substâncias que têm a capacidade de inibir a formação de vasos sanguíneos.

Inibidores teciduais de metaloproteinases: enzimas que neutralizam as metaloproteinases da matriz e, com isso, inibem a invasão de tecidos.

Integrinas: moléculas de adesão celular à matriz extracelular.

Interstício: espaço entre células preenchido por fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, células de defesa, etc.

In situ: na localização original (primário).

In vitro: no laboratório (fora do corpo).

In vivo: no corpo.

Hepatócito: célula epitelial especializada que é o tipo mais abundante de célula no fígado. Os hepatócitos são envolvidos com várias funções do fígado, incluindo metabolismo, desintoxicação e produção da bile.

Hepatoma: tumor benigno do fígado. A variante maligna é o hepatocarcinoma.

Hiperplasia: crescimento anormal no número de células em um órgão ou tecido mas, diferentemente da displasia, não exhibe alta desorganização do tecido.

Hipóxia: deficiência de oxigênio.

Hormônio: substância química produzida por células que alteram as atividades de outras células. Essas substâncias podem ser lipídios, tais como testosterona e estrogênio, ou proteínas como insulina. Hormônios podem agir em células distantes do seu sítio de origem. Estrogênio, por exemplo, é produzido por células do ovário mas age nas células da mama.

Linfoma: câncer com origem no sistema linfático. O sistema linfático é uma grande rede de vasos que levam fluidos e células do sistema imunológico através do corpo.

Lise: em biologia, refere-se à ruptura de uma célula causada por danos à sua membrana plasmática. A lise pode ser causada por agentes físicos, químicos ou por uma infecção.

Macrófago: tipo de fagócito.

Mastocitoma: tumor de mastócitos (um tipo de glóbulo branco), que podem se desenvolver na pele, em tecidos subcutâneos e, às vezes, em músculos.

Matriz extracelular: rede de proteínas fibrosas, principalmente colágeno, que fornece sustentação mecânica às células dos vários tecidos; o mesmo que interstício.

Melanoma: câncer de pele que surge em melanócitos (células que produzem pigmentação). Um melanoma começa normalmente em nevos.

Membrana basal: camada fina e resistente de matriz extracelular que separa tecidos de revestimento (epitelial, endotelial, etc.), constituída principalmente de colágeno.

Mesênquima: o mesmo que tecido conjuntivo ou conectivo; refere-se ao tecido que proporciona a sustentação mecânica e forma os vasos sanguíneos.

Metaloproteinases da matriz: enzimas que degradam componentes da matriz extracelular.

Metástase: aparecimento de focos cancerosos em partes do órgão ou do corpo distantes do local de origem do tumor. Células cancerosas entram nos vasos sanguíneos e viajam pelo corpo podendo se prender nos estreitamentos dos vasos, penetrá-lo e formar um novo tumor.

Mitose: tipo de divisão celular que resulta em duas células filhas, cada uma tendo um núcleo que contém o mesmo número e tipo de cromossomos que a célula mãe.

Mutação genética: qualquer mudança no DNA de uma célula. Mutações podem ser causadas por erros durante a divisão celular ou pela exposição a agentes danosos ao DNA.

Necrose: expressão morfológica da morte celular causada por uma grande variedade de substâncias, agentes tóxicos e hipóxia.

Neoplasia: formação e crescimento de um novo tecido.

Oncogene: protooncogenes modificados que levam à transformação de células normais em cancerosas.

Papilar: vide tumor papilar.

Papiloma escamoso: tumor benigno com origem no epitélio de mucosas.

Parênquima: a porção de um órgão que desempenha a função desse órgão; cada tecido é composto de parênquima e tecido que fornece suporte conhecido como estroma.

Plasmocitoma: câncer de plasmócitos (células derivadas de linfócitos B que produzem anticorpos).

Proteinase: enzima que catalisa a quebra de proteínas em peptídeos (seqüência de aminoácidos) menores ou aminoácidos, um processo também conhecido como proteólise.

Protooncogenes: genes normais que se modificados podem transformar uma célula normal em cancerosa.

Quimiotaxia: locomoção orientada das células em direção a um gradiente de concentração de uma substância.

Sarcoma: câncer de tecidos conjuntivos ou de sustentação.

Senescência: estado de quiescência celular causado pelo encurtamento dos telômeros.

Telomerase: enzima capaz de reconstruir os telômeros.

Telômeros: seqüências de DNA nas extremidades dos cromossomos que evitam a fusão entre eles e controlam o número máximo de divisões permitidas em células normais.

Tempo de duplicação: tempo necessário para o tumor dobrar o seu volume.

Transformação epigenética: transformação celular em que as expressões e produções de proteínas são alteradas sem a modificação do DNA.

Tricoblastoma: tumores epiteliais consistindo principalmente de células foliculares. O tumor é caracterizado por ninhos e cordas de células epiteliais em uma relação organizada com o estroma.

Trombospondina: agente inibidor de angiogênese em tumores.

Tumor papilar: tumor que forma protuberâncias semelhantes a dedos.

Tumor primário: tumor original.

Tumor secundário: vide metástases.

Referências Bibliográficas

- [1] D. Hanahan e R. A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*, Cell **100**, 57 (2000).
- [2] W. H. Clark, *Tumor progression and the nature of cancer*, J. Cancer **64**, 631 (1991).
- [3] G. I. Evan e K. H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*, Nature **411**, 342 (2001).
- [4] L. Israel, *Tumor progression: random mutations or an integrated survival response to cellular stress conserved from unicellular organisms*, J. Theor. Biol. **178**, 375 (1996).
- [5] L. A. Liotta e E. C. Kohn, *The microenvironment of the tumor-host interface*, Nature **411**, 375 (2001).
- [6] I. Golding, Y. Kozlovsky, I. Cohen e E. Ben-Jacob, *Studies of bacterial branching using reaction-diffusion models for colonial development*, Physica A **260**, 510 (1998).
- [7] Y. Kozlovsky, I. Cohen, I. Golding e E. Ben-Jacob, *Lubricating bacteria model for branching growth of bacterial colonies*, Phys. Rev. E **59**, 7025 (1999).
- [8] M. Eden, *A two-dimensional growth process*, in: J. Neyman (Ed.), Proceedings of fourth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability, Vol. IV: Biology and problems of health, University of California Press, Berkeley (1961) pp. 223.
- [9] P. Meakin, *Fractals, scaling and growth far from equilibrium*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
- [10] S. S. Cross, *Fractals in pathology*, J. Pathol. **182**, 1 (1997).

- [11] T. Sato, M. Matsuoka e H. Takayasu, *Fractal image analysis of natural scenes and medical images*, Fractals **4**, 463 (1996).
- [12] R. L. Mendes, A. A. Santos, M. L. Martins e M. J. Vilela, *Cluster size distribution of cell aggregates in culture*, Physica A **298**, 471 (2001).
- [13] G. J. Pettet, C. P. Please, M. J. Tindall e D. L. S. McElwain, *The migration of cells in multicell tumor spheroids*, Bull. Math. Biol. **63**, 231 (2001).
- [14] N. Bellomo e L. Preziosi, *Modelling and mathematical problems related to tumor evolution and its interactions with the immune system*, Math. Comp. Modelling **32**, 413 (2000).
- [15] J. T. Wu, H. M. Byrne, D. H. Kirn e L. M. Wein, *Modelling and analysis of a virus that replicates selectively in tumor cells*, Bull. Math. Biol. **63**, 731 (2001).
- [16] H. A. Levine, S. Pamuk, B. D. Sleeman e M. Nilsen-Hamilton, *Mathematical modeling of capillary formation and development in tumor angiogenesis: penetration into the stroma*, Bull. Math. Biol. **63**, 801 (2001).
- [17] E. De Angelis e L. Preziosi, *Advection-diffusion models for solid tumour evolution in vivo and related free boundary problem*, Math. Models Meth. in Appl. Sci. **10**, 379 (2000).
- [18] L. M. Sander e T. S. Deisboeck, *Growth patterns of microscopic brain tumors*, Phys. Rev. E **66**, 051901 (2002).
- [19] A. N. Reis, J. C. M. Mombach, M. Walter e L. F. Ávila, *The interplay between cell adhesion and environment rigidity in the morphology of tumors*, Physica A **322**, 546 (2003).
- [20] S. Tohya, A. Mochizuki, S. Imayama e Y. Iwasa, *On rugged shape of skin tumor (basal cell carcinoma)*, J. Theor. Biol. **194**, 65 (1998).
- [21] M. Scalerandi, A. Romano, G. P. Pescarmona, P. P. Delsanto e C. A. Condat, *Nutrient competition as a determinant for cancer growth*, Phys. Rev. E **59**, 2206 (1999).
- [22] T. Willians e R. Bjerknes, *Stochastic model for abnormal clone spread through epithelial basal layer*, Nature **236**, 19 (1972).

- [23] S. C. Ferreira Jr., M. L. Martins e M. J. Vilela, *A growth model for primary cancer*, Physica A **261**, 569 (1998).
- [24] S. C. Ferreira Jr., M. L. Martins e M. J. Vilela, *A growth model for primary cancer (II). New rules, progress curves and morphology transitions*, Physica A **272**, 245 (1999).
- [25] S. C. Ferreira Jr., M. L. Martins e M. J. Vilela, *Reaction-diffusion model for the growth of avascular tumor*, Phys. Rev. E **65**, 021907 (2002).
- [26] *Virtual Journal of Biological Physics Research*, "<http://www.vjbio.org>" no link "February 1, 2002" .
- [27] S. C. Ferreira Jr., M. L. Martins e M. J. Vilela, *Morphology transitions induced by chemotherapy in carcinomas in situ*, Phys. Rev. E **67**, 05914 (2003).
- [28] S. C. Ferreira Jr., *Williams and Bjercknes model with growth limitation*, Physica A **317**, 565 (2003).
- [29] R. A. Weinberg, *How cancer arises*, Sci. Am. **235** (3), 32 (1996).
- [30] R. A. Weinberg, *One renegade cell: how cancer begins*, Basic Books, 1998.
- [31] E. Ruoslahti, *How cancer spreads*, Sci. Am. **235** (3), 42 (1996).
- [32] L. A. Liotta, *Cancer cell invasion and metastasis*, Sci. Am. **266** (2), 54 (1992).
- [33] J. Folkman, *The vascularization of tumors*, Sci. Am. **234** (5), 59 (1976).
- [34] J. Folkman, *Fighting cancer by attacking its blood supply*, Sci. Am. **235** (3), 150 (1996).
- [35] P. Carmeliet e R. K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*, Nature **407**, 249 (2000).
- [36] G. Brasileiro Filho, *Bogliolo patologia geral*, 2^a ed., Guanabara Koogan, 1998.
- [37] R. S. Cotran, V. Kumar e S. L. Robbins, *Robbins pathologic basis of disease*, 5^a ed., W. B. Saunders Co., 1994.
- [38] D. Brown e P. Rothery, *Models in biology: mathematics, statistics and computing*, John Wiley & Sons, 1993.

- [39] T. Vicsek, *Fractal growth phenomena*, World Scientific, 1992.
- [40] J. G. Zabolitzky e D. Stauffer, *Simulations of large Eden clusters*, Phys. Rev. A **34**, 1523 (1986).
- [41] M. Plischke e Z. Rácz, *Active zone of growing clusters: diffusion-limited aggregation and the Eden model*, Phys. Rev. Lett. **53**, 415 (1984).
- [42] J. Smolle e H. Stettner, *Computer simulation of tumor cell invasion by a stochastic growth model*, J. Theor. Biol. **160**, 63 (1993).
- [43] S. Wolfram, *Theory and application of cellular automata*, World Scientific (1986).
- [44] A. S. Qi, X. Zheng, C. Y. Du e B. S. An, *A cellular automaton model of cancerous growth*, J. Theor. Biol. **161**, 1 (1993).
- [45] A. R. Kansal, S. Torquato, G. R. Harsh, E. A. Chiocca e T. S. Deisboeck, *Simulated brain tumor growth dynamics using a three-dimensional cellular automaton*, J. Theor. Biol. **203**, 367 (2000).
- [46] R. K. Sachs, L. R. Hlatky e P. Hahnefeldt, *Simple ODE models of tumor growth and anti-angiogenic or radiation treatment*, Math. Comp. Modell. **33**, 1297 (2001).
- [47] P. P. Delsanto, A. Romano, M. Scalerandi e G. P. Pescarmona, *Analysis of “phase transition” from tumor growth to latency*, Phys. Rev. E **62**, 2547 (2000).
- [48] M. Scalerandi, G. P. Pescarmona, P. P. Delsanto e B. Capogrosso Sansone *Local interaction simulation for the response of the vascular system to metabolic changes of cell behavior*, Phys. Rev. E **63**, 011901 (2000).
- [49] B. Capogrosso Sansone, P. P. Delsanto, M. Magnano e M. Scalerandi, *Effects of anatomical constraints on tumor growth*, Phys. Rev. E **54**, 2206 (2001).
- [50] B. Capogrosso Sansone, M. Scalerandi e C. A. Condat, *Emergence of taxis and Synergy in angiogenesis*, Phys. Rev. Lett. **87**, 128102 (2001).
- [51] B. Capogrosso Sansone, M. Scalerandi e C. A. Condat, *Diffusion with evolving sources and competing sinks: development of angiogenesis*, Phys. Rev. E **65**, 011902 (2001).

- [52] M. Scalerandi e B. Capogrosso Sansone *Inhibition of vascularization in tumor growth*, Phys. Rev. Lett. **89**, 218101 (2002).
- [53] T. S. Deisboeck, M. E. Berens, A. R. Kansal, S. Torquato, A. O. Stemmer-Rachamimov e E. A. Chiocca, *Pattern of self-organization in tumour systems: complex growth dynamics in a novel brain tumour spheroid model*, Cell Prolif. **34**, 115 (2001).
- [54] S. S. cross, A. J. MacDonagh, T. J. Stephenson, D. W. Cotton e J. C. Underwood, *Fractal and integer-dimensional geometric analysis of pigmented skin-lesions*, Am. J. Dermatopathol. **17**, 374 (1995).
- [55] I. Christoyianni, A. Koutras, E. Dermatas e G. Kokkinakis, *Computer aided diagnosis of breast cancer in digitized mammograms*, Comput. Med. Imaging Graph. **26**, 309 (2002).
- [56] A. Kikuchi, S. Kozuma, K. Sakamaki, M. Saito , G. Marumo, T. Yasugi e Y. Taketani, *Fractal tumor growth of ovarian cancer: sonographic evaluation*, Gynecol. Oncol. **87**, 295 (2002).
- [57] P. C. Nowell, *Clonal evolution of tumor-cell populations*, Science **194**, 23 (1976).
- [58] A. Brú, J. M. Pastor, I. Feraud, I. Brú, S. Melle e C. Berenguer, *Super-rough dynamics on tumor growth*, Phys. Rev. Lett. **81**, 4008 (1998).
- [59] A. A. Patel, E. T. Gawlinski, S. K. Lemieux e R. A. Gatenby, *A cellular automaton model of early tumor growth and invasion: the effects of native tissue vascularity and increased anaerobic tumor metabolism*, J. Theor. Biol. **213**, 315 (2001).
- [60] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling e B. P. Flannery, *Numerical recipes in Fortran 77: the art of scientific computing*, Cambridge University Press, 1992.
- [61] J. O. D. Mc Gee, P. G. Isaacson e N. A. Wright, *Oxford Textbook of Pathology*, Oxford University Press, 1992.
- [62] A. Friedman e F. Reitich, *On the existence of spatially patterned dormant malignancies in a model for the growth of non-necrotic vascular tumors*, Math. Models Meth. in Appl. Sci. **11**, 601 (2001).

- [63] G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian, R. K. Jain, *Interstitial pH and pO(2) gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation*, Nat. Med. **3**, 177 (1997).
- [64] L. J. Old, *Immunotherapy for cancer*, Sci. Am. **275**, 136 (1996).
- [65] J. Gómez-Navarro, D. T. Curiel, and J. T. Douglas, *Gene therapy for cancer*, Eur. J. Cancer **35**, 867 (1999).
- [66] J. R. Bischoff, *el. al.*, *An adenovirus that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells*, Science **274**, 373 (1996).
- [67] F. Kozusco, Pao-Hsiu Chen, S. G. Grant, B. W. Day, and J. Carl Panetta, *A mathematical model of in vitro cancer cell growth and treatment with antimetabolic agent curacin A*, Math. Biosci. **170**, 1 (2001).
- [68] F. Montalenti, G. Sena, P. Cappella, and P. Ubezio, *Simulating cancer-cell kinetics after drug treatment: application to cisplatin on ovarian carcinoma*, Phys. Rev. E **57**, 5877 (1998).
- [69] J. Tervo and P. Kolmonen, *Inverse radiotherapy treatment planning model applying Boltzmann-transport equation*, Math. Models Meth. in Appl. Sci. **12**, 109 (2002).
- [70] T. L. Jackson and H. M. Byrne, *A mathematical model to study the effects of drug resistance and vasculature on the response of solid tumors to chemotherapy*, Math. Biosci. **164**, 17 (2000).
- [71] S. Hellman and E. E. Volkes, *Advancing current treatments for cancer*, Sci. Am. **275**, 118 (1996).
- [72] J. C. Panetta, *A mathematical model of periodically pulsed chemotherapy: tumor recurrence and metastasis in a competitive environment*, Bull. Math. Biol. **58**, 425 (1996).
- [73] D. H. Berger, B. W. Feig, and G. M. Fuhrman, *The M.D. Anderson surgical oncology handbook*, Brown and Company, 1994.
- [74] R. K. Jain, *Barriers to drug delivery in solid tumors*, Sci. Am. **271**, 58 (1994).

- [75] E. Ben-Jacob, I. Cohen, I. Golding, D. L. Gutnick, M. Tcherpakov, D. Helbing, and I. G. Ron, *Bacterial cooperative organization under antibiotic stress*, Physica A **282**, 247 (2000).
- [76] The Prostate Cancer Complexity Working Group, *Merging bottom-up and top-down approaches to study prostate cancer biology*, Complexity **7**(5), 22 (2002).
- [77] N. G. van Kampen, *Stochastic processes in Physics and Chemistry*, North-Holland, 1981.
- [78] pp. 248 em [37]
- [79] M. T. Batchelor, B. I. Henry e S. D. Watt, *Mean-field analysis of Williams-Bjerknes-type growth* Physica A 256 (1998) 295.
- [80] T. Tomé e M. J. Oliveira, *Dinâmica estocástica e irreversibilidade*, Edusp, 2001.
- [81] L. E. Reichl, *A modern course in statistical physics*, University of Texas Press, 1980.
- [82] S. C. Ferreira Jr., M. L. Martins e M. J. Vilela, *Struggling cancer with virus*, será submetido para publicação em Phys. Rev. Lett. (2003).
- [83] A. Oliff, J. B. Gibbs e F. McCormick, *New Molecular Targets for Cancer Therapy*, Scim. Am. **275**, 144 (1996).
- [84] E. Martin e R. S. Hine, *A Dictionary of Biology*, Oxford University Press, 2000.
- [85] E. Martin, *Dictionary of Medicines*, Oxford University Press, 2000.
- [86] *CancerQuest*, "<http://www.cancerquest.org/dictionary.cfm?>".
- [87] *Cancer.Gov*, "<http://www.cancer.gov/dictionary/>".