

2012

Morfologia de Redes Vasculares
– Estudo Computacional –

Morfologia de Redes Vasculares – Estudo Computacional –

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação do Doutor Rui Travasso, Centro de Física Computacional.

Susete Maria Fagundes Neiva
Setembro 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Susete Neiva



Morfologia de Redes Vasculares – Estudo Computacional –

Susete Maria Fagundes Neiva
Dr. Rui Travasso (Projeto orientado por)
Centro de Física Computacional

Tese submetida à Universidade de Coimbra para obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Unidade Curricular de Projeto
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra
Setembro 2012

Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto FCOMP-01-0124-FEDER-015708.



© Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

© This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

If you can't compute, you can't compete.

Miguel Oliveira

Sumário

A morfologia das redes vasculares varia com o tipo de tecido e determina a progressão de várias patologias, nomeadamente dos tumores ou das doenças oculares, de que é exemplo a retinopatia diabética. Um dos principais mecanismos reguladores do desenvolvimento das redes vasculares é a angiogénese, um processo através do qual novos vasos sanguíneos crescem a partir de outros pré-existentes.

A angiogénese vê-se, até hoje, implicada em mais de 70 doenças que fomentam uma explosão de interesses pela sua investigação. Apenas com conhecimento biológico profundo do tema é possível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que tomam a angiogénese como alvo, promovendo-a ou impedindo-a. Com esse intuito, têm sido propostos também dezenas de modelos matemáticos e realizadas imensas simulações computacionais.

Nesta dissertação são discutidos alguns dos principais mecanismos subjacentes à angiogénese, seguido de uma breve descrição do que já foi feito ao nível dos modelos encontrados na literatura. É exposto com destaque aquele em que assenta este trabalho, um modelo multi-escala de interface difusa que descreve a dinâmica da interface entre os novos capilares formados e o estroma. O comportamento das células endoteliais vasculares, que em resposta a um gradiente de fatores pró-angiogénicos leva ao crescimento de uma árvore de vasos sanguíneos, é descrito através de quatro equações. Estes fatores pró-angiogénicos são a chave de todo o processo, sendo inicialmente produzidos por células em hipóxia e difundidos na matriz extracelular até que haja o encontro com células endoteliais de um capilar já formado.

Várias modificações ao modelo são apresentadas, de entre as quais se destacam a completa incorporação da via de sinalização Delta-Notch, o fluxo sanguíneo e formação de anastomoses. Diversas combinações de parâmetros do modelo, tais como a quimiotáxia ou a taxa de proliferação celular, foram testadas, de forma a avaliar a influência das modificações feitas no padrão vascular. Em termos quantitativos, avaliou-se a ramificação e o diâmetro médio capilar das redes formadas, sendo que as mais claras tendências são devidas à incorporação do fluxo sanguíneo no modelo.

Prevendo como crescem os capilares em diferentes situações patológicas, por variação de certos conjuntos de parâmetros, este modelo poderá ser muito vantajoso no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, podendo antever meios para minimizar efeitos adversos dos tratamentos e evitar a sua resistência.

No CD anexo ao presente documento encontram-se vídeos resultantes do trabalho de simulação, tornando assim possível, de forma mais ilustrativa, uma melhor contextualização dos eventos no tempo.

Palavras-Chave: angiogénese, modelo de interface difusa, redes vasculares, simulação.

Abstract

The morphology of vascular networks varies with the tissue and also determines the progression of various pathologies, such as tumors or ocular diseases, including diabetic retinopathy. One of the main mechanisms of vascular network growth is angiogenesis, a process that leads to the development of new blood vessels from pre-existing ones.

Nowadays, angiogenesis is considered to be related with more than 70 different diseases, which led to a growing interest on angiogenesis investigation. A deep biologic knowledge is essential for the scientific community to develop new therapeutic strategies for angiogenesis, either promoting or preventing it. With this purpose, dozens of mathematical models have been proposed and innumerous computational simulations have been developed.

In this thesis some of the main mechanisms related to angiogenesis are presented, followed by a state of art of the models found in the literature. It is also exposed, in detail, the model used in the present work, a multi-scale phase-field model, which describes the interaction between the dynamics of the new blood vessels and the stroma. The endothelial cells behavior, which in response to a pro-angiogenic factors gradient, leads to the growth of a capillary tree, is described by four equations. These factors are the key of this process. Initially, they are produced by hypoxic cells and diffused by the extra cellular matrix, until they meet with the endothelial cells of a pre-formed blood vessel.

Different modifications to the model were introduced, such as the Delta-Notch signal pathway, the blood flow and the anastomosis formation. Besides, several combinations of the model parameters were tested, such as chemotaxis and cellular proliferation rate, in order to verify their influence in the system evolution. The ramifications and the mean diameter of the capillary in the newborn network were evaluated whereas the most evident changes are due to incorporation of blood flow.

By efficiently predicting how the capillarity network grows in different pathological situations, the presented model can be very useful in the development of new therapeutic strategies, defining new ways to minimize the adverse effects of the treatments and to prevent their resistance.

In the CD that is attached to this document there are videos of the resulting simulation work. These videos are the more intuitive method of contextualizing the events in time.

Key-words: angiogenesis, multi-scale phase-field model, vascular network, simulation.

Agradecimentos

Embora esta tese seja, pela finalidade académica, um trabalho individual, existem contributos de natureza diversa que devem ser reconhecidos. Por esta razão, desejo conseguir transmitir aqui, para além de um ato formal, os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Rui Travasso, pelo papel de orientador e supervisor que envergou com distinção. Desde cedo me transmitiu um entusiasmo incontável pela investigação na área da física biológica, intensificando a minha vontade de aprender. Estou-lhe grata por isso, pela motivação capaz de se sobrepor a todos os receios e ansiedades. A permanente disponibilidade para me receber e esclarecer resultou praticamente sempre em soluções muito contributivas no contorno de obstáculos. A satisfação que manifestava pelo trabalho que fui desenvolvendo inspirou-me confiança e o seu orgulho e paixão pelo trabalho de investigação contagiaram-me. Sinto-me sobretudo privilegiada pela oportunidade de partilha deste tema com alguém que a ele tanto se dedica. Obrigado por tudo.

A todo o grupo da Matéria Condensada do Centro de Física Computacional, liderado pelo Professor Fernando Nogueira. A oportunidade de integrar as reuniões semanais do grupo, onde é discutido o trabalho desenvolvido por cada um, para além de uma experiência enriquecedora, trouxe-me noções claras de entreajuda. Sempre que expus dificuldades, estas pessoas, ainda que não envolvidas diretamente no tema, recorreram ao seu saber empírico para me iluminarem com proveitosas ideias. Agradeço-lhes todos os conselhos assim como críticas, que expandiram com certeza os meus horizontes de conhecimento. Além destes, não são menosprezáveis os “debates gastronómicos” e outros momentos de convívio que sempre nutriram o bom ambiente.

Aos pais, Emília Fagundes e Manuel Neiva, o apoio e confiança que sempre depositaram em mim. Reconheço os princípios de boa educação que me deram e as suas sábias lições de vida. O entusiasmo, seriedade e empenho que dedicam ao trabalho servem-me constantemente de incentivo para fazer “mais e melhor”. Desejo poder continuar a oferecer-lhes motivos de orgulho porque é a eles que devo tudo.

À restante família, por compreenderem as minhas visitas esporádicas e ausências em momentos especiais. Mesmo à distância, fizeram sentir o seu apoio.

Deixo também uma nota de apreço aos colegas de curso e a todo o corpo docente do MIEB 2007-2012 que comigo partilharam do seu saber. Ponho em destaque dois casos particulares, um muito obrigado à minha “antecessora”, agora Eng^a Margarida Guerra, que foi fantástica na disponibilidade e conselhos prestados desde o momento da candidatura. A sua opinião contribuiu muito para esta escolha. O segundo agradecimento especial devo-o ao Professor Miguel Morgado,

pela sua competência, disponibilidade e preocupação reveladas na coordenação deste curso e assuntos envolventes.

Não esqueço também a minha gratidão para com os amigos mais próximos, pela partilha de momentos únicos que me farão para sempre descrever como mágicos estes últimos cinco anos e Coimbra.

Agradeço ainda o suporte financeiro da FCT através do COMPETE para o projeto PTDC/SAU-ENB/110354/2009.

Susete Neiva

ÍNDICE

<i>Lista de Acrónimos</i>	<i>xi</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>xii</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>xviii</i>
Capítulo 1 _ Introdução	1
1.1 Motivação pessoal e objetivos.....	1
Capítulo 2: Revisão da literatura	4
2.1 Importância da angiogênese e relevância do fluxo sanguíneo.....	4
2.2 Princípios biológicos da angiogênese	8
2.2.1 Via de sinalização Delta-Notch.....	11
2.2.2 Metaloproteínas	13
2.2.3 Angiopietinas	13
2.3 Modelos matemáticos na literatura	15
2.3.1 Modelos contínuos.....	15
2.3.2 Modelos discretos	18
2.3.3 Modelos híbridos	20
Capítulo 3: Modelo multi-escala de interface difusa [8]	22
3.1 Equações matemáticas e pressupostos	24
3.2 Modelação computacional	29
3.3 Valores de simulação	34
3.4 Diagrama de fluxo do código	35
3.5 Aspetos do modelo a melhorar	36
Capítulo 4: Superando dificuldades...	37
4.1 Via de sinalização Delta-Notch – o “Notchkill”	39
4.2 O fluxo sanguíneo e formação de anastomoses.....	43
4.3 Sobreposição de ETCs com células em hipóxia.....	51
4.4 Aproximação do fluxo sanguíneo a vasos onde circula o sangue	56
Capítulo 5: Determinação da taxa de ramificação e do diâmetro capilar médio .	64
Capítulo 6: Resultados	67
6.1 Influência da máxima taxa de proliferação celular – por variação de αp	69
6.2 Influência da velocidade celular máxima – por variação de χ	75
6.3 Influência da quantidade de fator angiogénico – por variação de Ts	80
Conclusões e Trabalho Futuro	86
Referências	95

Lista de Acrónimos

Ang-1	<i>Angiopoietin-1</i> Angiopoietina-1
Ang-2	<i>Angiopoietin-2</i> Angiopoietina-2
EC	<i>Endothelial Cell</i> Célula Endotelial
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> Matriz Extracelular
ETC	<i>Endothelial Tip Cell</i> Célula Endotelial da Ponta
ESC	<i>Endothelial Stalk Cell</i> Célula Endotelial do Estame
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase's</i> Matriz de Metaloproteínas
PC	<i>Pericyte</i> Perícito
SMC	<i>Smooth Muscle Cell</i> Célula do Músculo Liso
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VEGFR-1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i> Receptor-1 para Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> Receptor-2 para Fator de Crescimento Vascular Endotelial
TAF	<i>Tumoral Angiogenesis Factor</i> Fator de Angiogénese Tumoral

Lista de Figuras

- Figura 1 – Programa Geral do Projeto..... 3
- Figura 2 – Desenvolvimento de sistemas vasculares. Durante a vasculogênese os progenitores endoteliais dão origem a um labirinto vascular primitivo de artérias e veias; durante a angiogênese subsequente a rede expande-se, perícitos (PC) e células do músculo liso (SMC) recobrem os canais sanguíneos e emerge uma rede vascular organizada e estereotipada [4]..... 5
- Figura 3 – O papel do oxigénio no padrão vascular. Estados de hipóxia e hiperóxia conduzem, respetivamente, ao crescimento e regressão vascular, num processo em que a oxigenação do tecido depende de um ciclo de feedback negativo [3]..... 6
- Figura 4 - Angiogénese fisiológica e patológica – excessiva e insuficiente. Os processos diferem na organização dos vasos e fluxo sanguíneo, devido ao desequilíbrio entre estímulos anti e pró angiogénicos. Adaptado de [15]..... 7
- Figura 5 – Formação de um novo vaso através de Intussusceptive angiogenesis. **a** – existência de um único vaso inicial; **b** – elementos intersticiais invadem o vaso numa zona de baixa força de tensão; **c** – formam-se cristas transvasculares em direção ao lúmen; **d** – dois vasos completamente independentes, individualizados por uma parede de separação. Adaptado de [3]..... 8
- Figura 6 - Crescimento capilar em tecidos mal perfundidos. **A** – As células endoteliais expostas a maior concentração de VEGF especificam-se em ETCs. A zona do tecido em hipóxia é indicada pela mancha central azul; **B** – As ETCs lideram o desenvolvimento de novos ramos, estendendo os seus filopódios pela matriz; **C** – O desenvolvimento das ramificações é fomentado pela proliferação das ESCs, seguindo-se o trajeto das ETCs; **D** – Fusão das ETCs de duas novas ramificações em desenvolvimento, criando um lúmen; **E** – O sangue flui através do novo capilar, oxigenando o tecido. A secreção de VEGF é interrompida; **F** – O capilar recém-desenvolvido estabiliza por recrutamento de perícitos, pela deposição da ECM e por forças mecânicas associadas ao fluxo e pressão sanguíneos [3]. 11
- Figura 7 – A sinalização Delta-Notch durante a ativação de uma ETC. Após a ligação do VEGF aos recetores VEGFR-2, é desencadeada a expressão de Dll4, que ativa os recetores Notch nas ESCs adjacentes. São induzidos processos de regulação genética que diminuem a expressão do gene de VEGFR-2. Deste modo, são reduzidas as possibilidades de conexão do VEGF difuso na ECM naquelas que se definem como ESCs. Adaptado de [18]. 12
- Figura 8 – Ação das angiopoietinas Ang-1 e Ang-2 nos vasos capilares. Ang-1 é expressa e produzida a um ritmo constante pelo tecido, enquanto Ang-2 é produzida em apenas certas circunstâncias, tendo um efeito positivo ou negativo dependendo da concentração de VEGF no tecido. Adaptado de [19]. 14

Figura 9 – Estrutura bifásica e parâmetro de ordem ϕ correspondente a uma linha horizontal que a atravessa. A variação do parâmetro de ordem mostra a natureza difusa da interface.....	23
Figura 10 – Dependência da taxa de proliferação celular αp em função da concentração de fator angiogênico T . Considera-se que acima de um valor limite $T = T_p$ a taxa de proliferação é constante.....	26
Figura 11 – Dependência da velocidade de migração celular v em função do gradiente de fator angiogênico T . Considera-se que acima de um valor limite $G = GM$ a velocidade de migração é constante.....	27
Figura 12 – Na via de sinalização Delta-Notch apenas uma célula pode tornar-se ETC se mantiver uma distância entre centros de pelo menos quatro raios celulares (aproximando as células a elementos esféricos, todos com o mesmo tamanho). Assim, admitindo qualquer uma das células das extremidades como ETC, a célula central não poderá ser uma ETC.....	28
Figura 13 – Posicionamento das fontes de VEGF (azul) relativamente ao capilar principal (a verde). A distância d é marca a zona de possibilidade de oxigenação celular, não sendo viável a existência de células em hipóxia nesta área.....	30
Figura 14 – Representação de um sistema de simulação. A – instante temporal inicial; B – instante temporal próximo do final. A verde estão representados os vasos capilares, os pontos azuis são as células em hipóxia.....	32
Figura 15 – Representação de um sistema que considera o fluxo sanguíneo. A – Fluxo sanguíneo como uma linha a vermelho aproximadamente ao meio dos capilares (verde). B – Vasos com sangue representados a vermelho. É de notar a formação de anastomoses em ambas as figuras.....	32
Figura 16 – Diagrama de fluxo relativo ao algoritmo do modelo.....	35
Figura 17 – Sequência de imagens resultante do programa à data de início do projeto. Estão representados, numa matriz extracelular (a negro), a difusão do VEGF (azul) e o crescimento consequente de vasos capilares (verde). A aproximação de um vaso capilar a uma célula em hipóxia é suficiente para que esta “desapareça” e deixe de ser produzido VEGF nesse ponto.....	37
Figura 18 – Rede capilar completamente formada, com círculos negros a delinear zonas onde teria sido esperada a ação da via de sinalização Delta-Notch [8].....	39
Figura 19 - Representação esquemática de instantes contíguos (a e b) da ação de <i>Notchkill</i> para duas ETCs (A e B) localizadas em ramificações diferentes (azul). Os centros das ETCs distam de $d < 4Rc$	41
Figura 20 – Caso especial resolvido por <i>Notchkill</i> : a existência de um vaso capilar na proximidade das duas ETCs (A e B) e que não é aquele ao qual estão associadas.....	42

Figura 21 – Modelação do fluxo sanguíneo numa rede capilar aproximada a um circuito elétrico equivalente. A vermelho estão representados os dados de partida, correspondentes à rede vascular em estudo. Estreitamentos consecutivos da rede levam ao chamado esqueleto vascular (a preto), equivalente a uma malha elétrica que permite saber em quais dos troços se verifica corrente sanguínea. Esta corrente é promovida por uma diferença de pressão, $P_2 - P_1$, mantida pela atividade mecânica do coração. Durante os cálculos matemáticos são determinados os nodos da malha (numerados de 1 a 6) e definidas ligações entre eles. 45

Figura 22 – Mecanismo de ação de *thin* para remoção de pontos não previstos no esqueleto vascular (da esquerda para a direita): ponto isolado; ponto com único vizinho pertencente à rede; ponto com dois vizinhos para os quais $\phi = 1$ não opostos mas ligados entre si por intermédio de outro; ponto não-nodo com 3 vizinhos pertencentes à rede. A azul estão representados os pontos pertencentes à rede capilar, onde $\phi = 1$ 45

Figura 23 – Circuito elétrico simples. A diferença de potencial entre A e B resulta numa corrente elétrica I , através de uma resistência R . A diferença de potencial entre A e C é nula, assim como entre B e D [34]. 48

Figura 24 – Nodo de um circuito para onde convergem as correntes I_1 e I_4 e de onde divergem I_2 e I_3 [34]. 49

Figura 25 – Concentração de VEGF na vizinhança de uma célula em hipóxia aquando da sua sobreposição por uma ETC capilar. Existe um decréscimo mais acentuado na concentração de VEGF nas zonas onde existem ESCs. A concentração de VEGF mantém-se fixa na fonte. 51

Figura 26 – Rede vascular em crescimento após a implementação do fluxo sanguíneo. Sempre que uma ETC se sobrepõe a uma célula em hipóxia, a sua migração para devido ao gradiente (calculado no centro da ETC) ser nulo. Todavia, o VEGF continua a ter uma concentração máxima na fonte, pelo que o seu consumo a nível endotelial se mantém elevado, levando a um engrossamento evidente dos ramos em questão (círculos vermelhos). 52

Figura 27 – Queda da concentração de VEGF aquando da perda de fenótipo por parte de uma ETC. O regresso ao estado de ESC representa um aumento abrupto na taxa de consumo de VEGF, provocando um gradiente acentuado de fator e consequente ativação do fenótipo de ETC (passando a verificar-se as duas condições, $T > T_c$ e $\nabla T > G_m$). 53

Figura 28 – Ponderações acerca da sobreposição de células em hipoxia por ETCs de capilares em crescimento. **A** – O cálculo do gradiente em todos os pontos da ETC pode resultar em $G > 0$. **B** – A taxa de proliferação celular depende não só da concentração de VEGF (T) mas também da força mecânica F exercida pelas ETC durante a migração. Se a ETC está parada, vem $F = 0$, podendo ser evitado o engrossamento do capilar. **C** – As ETCs, como produtoras de VEGF, propiciam a

migração de outras ETCs em sua direção e a formação de anastomoses. A consequente passagem de sangue inativa a produção de VEGF, reduzindo a taxa de proliferação celular. **D** – Contacto entre os filopódios das ETCs pode estar associado a interações mecânicas e comunicação celular, aumentando a probabilidade de anastomose. 55

Figura 29 - Sequência de imagens resultantes do programa após as modificações relatadas na secção 4.3. Ao contrário do que acontecia anteriormente, os vasos capilares não interrompem a sua migração assim que se sobrepõem a uma célula em hipóxia. As ETCs são mantidas mesmo que $\nabla T < Gm$ 56

Figura 30 – Distância desde a mesma célula em hipóxia (azul), até ao fluxo sanguíneo (d') e ao vaso capilar correspondente (d). Os capilares para os quais a distância $d = 20$ começam a consumir VEGF e a ramificar quando é atingido o mínimo de concentração. Como $d' > d$, não acontece difusão de oxigénio desde o fluxo nem o consequente desaparecimento das células em hipoxia. 57

Figura 31 – Resultado esperado da aproximação do esqueleto vascular que determina o fluxo sanguíneo a um vaso com sangue. 58

Figura 32 – Etapas da aproximação da linha de fluxo sanguíneo a vasos por onde circula o sangue. Da totalidade da rede capilar **A** é extraído o seu esqueleto completo **B**, por um mecanismo de estreitamento (**1** – thin1) que mantém no esqueleto os pontos por onde anteriormente passaram as ETCs. Por atenuação das falsas ramificações (**2** – analyze) observadas em **B** obtém-se **C**, um esqueleto “real” da rede capilar. Segundo os procedimentos detalhados na secção 4.2 para extração da linha de fluxo sanguíneo, obtém-se **D**, um esqueleto que (por ação de **3** – thin2) não considera as pontas dos capilares em crescimento. Posteriormente surge **E**, a linha de fluxo sanguíneo, que em relação ao esqueleto anterior não considera os loops de potencial nulo. Por comparação entre os esqueletos **C** e **E**, é possível determinar quais os pontos de **A** associados a este último, ou seja, aqueles pontos por onde é considerado haver passagem de sangue. 60

Figura 33 – Diagrama de fluxo da rotina que caracteriza os pontos da rede como sendo ou não pertencentes a um vaso com sangue. 61

Figura 34 – Primeiros resultados da aproximação do fluxo sanguíneo a um vaso com sangue: rede vascular não uniforme quanto à passagem de sangue nos ramos (a mesma ramificação apresenta regiões verdes e vermelhas). 62

Figura 35 – Aproximação de pontos a um vaso com sangue pode ser aperfeiçoada. A situação ideal prevê que todo o vaso principal conduza sangue oxigenado, mesmo as zonas de onde surge uma ramificação (círculo a preto). 63

Figura 36 – A rotina correct faz uma correção do comprimento do esqueleto (construído segundo uma vizinhança de 4). Admitindo a ramificação a cinzento, e o seu esqueleto a preto, o resultado da correção em tamanho feita por correct está representada pela linha a branco. A redução em comprimento do esqueleto é de 2 para 2. 65

Figura 37 – A comparação de três versões de implementação computacional do modelo de angiogénese serve para avaliar a influência das considerações assumidas em cada uma delas. O programa “antigo” é o implementado em [8], sendo por isso o primordial das três versões. O programa “com fluxo” é o fruto deste projeto, considerando a via de sinalização Delta-Notch, o fluxo sanguíneo e outras alterações mais pequenas. Por último, o programa “sem fluxo” resulta da omissão da implementação do fluxo sanguíneo do programa “com fluxo” e portanto coleciona todas as alterações feitas ao modelo computacional, exceto essa. 68

Figura 38 – Evolução geral do diâmetro capilar médio (em cima) e do número de ramificações vasculares (em baixo) resultantes da variação da taxa de proliferação celular ao nível dos três algoritmos – “antigo”, “sem fluxo” e “com fluxo” 69

Figura 39 – Variação do diâmetro capilar médio (**A**) e da ramificação (**B**) de redes produzidas pelo programa “antigo” consoante o valor da taxa de proliferação celular. **C** e **D** apresentam padrões vasculares resultantes de taxas máximas de proliferação celular baixa ($\alpha p T p = 0,77 \times 10^{-4} s^{-1}$) e elevada ($\alpha p T p = 4,23 \times 10^{-4} s^{-1}$), respetivamente. 70

Figura 40 – Esqueleto pelo qual o algoritmo de cálculo do diâmetro capilar médio se baseou para obter o valor de diâmetro correspondente à rede vascular apresentada na Figura 39C. 71

Figura 41 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “sem fluxo” consoante o valor da taxa de proliferação celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de taxas máximas de proliferação celular baixa ($\alpha p T p = 1,15 \times 10^{-4} s^{-1}$) e elevada ($\alpha p T p = 4,23 \times 10^{-4} s^{-1}$), respetivamente. 73

Figura 42 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “com fluxo” consoante o valor da taxa de proliferação celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de taxas máximas de proliferação celular baixa ($\alpha p T p = 1,15 \times 10^{-4} s^{-1}$) e elevada ($\alpha p T p = 4,23 \times 10^{-4} s^{-1}$), respetivamente. 74

Figura 43 - Evolução geral do diâmetro capilar médio (em cima) e do número de ramificações vasculares (em baixo) resultantes da variação da resposta quimiotática celular ao nível três algoritmos – “antigo”, “sem fluxo” e “com fluxo” .. 75

Figura 44 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “antigo” consoante o valor da resposta quimiotática celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de velocidade celular máxima baixa ($\chi GM = 0,10 \mu m/min$) e elevada ($\chi GM = 0,55 \mu m/min$), respetivamente. 76

Figura 45 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “sem fluxo” consoante o valor da resposta quimiotática celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de velocidade celular

máxima baixa ($\chi_{GM} = 0,10 \mu m/min$) e elevada ($\chi_{GM} = 0,55 \mu m/min$),
respetivamente. 78

Figura 46 - Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “com fluxo” consoante o valor da resposta quimiotática celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de velocidade celular máxima baixa ($\chi_{GM} = 0,10 \mu m/min$) e elevada ($\chi_{GM} = 0,55 \mu m/min$), respetivamente. 79

Figura 47 - Evolução geral do diâmetro capilar médio e do número de ramificações vasculares (em baixo) resultantes da variação da concentração de fator angiogénico nas fontes, ao nível dos três algoritmos – “antigo”, “sem fluxo” e “com fluxo”. 80

Figura 48 - Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “antigo” consoante o valor da concentração de fator angiogénicos nas fontes. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de uma concentração baixa ($T_s = 0,9$) e elevada ($T_s = 1,6$), respetivamente. 82

Figura 49 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “sem fluxo” consoante o valor da concentração de fator angiogénicos nas fontes. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de uma concentração baixa ($T_s = 0,9$) e elevada ($T_s = 1,6$), respetivamente. 83

Figura 50 - Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “com fluxo” consoante o valor da concentração de fator angiogénicos nas fontes. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de uma concentração baixa ($T_s = 0,9$) e elevada ($T_s = 1,6$), respetivamente. 84

Figura 51 – Morfologia de redes vasculares, para concentrações de fator angiogénico diferentes. Do lado esquerdo $T_s = 0,9$ e à direita $T_s = 1,6$ 87

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Principais características das ETC (fenótipo induzido pelo VEGF) e ESC.	12
Tabela 2 – Tabela de valores usados na simulação [8]. As unidades a.u. referem-se às concentrações de T	34

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação pessoal e objetivos

A morfologia das redes vasculares varia com o tipo de tecido e determina a progressão de várias patologias [1]. Um dos principais mecanismos reguladores do desenvolvimento das redes vasculares é a angiogénese, um processo através do qual novos vasos sanguíneos crescem a partir de outros pré-existentes [2].

Segundo a *Angiogenesis Foundation*, até hoje, a angiogénese é compartilhada por doenças que afetam mais de um bilião de pessoas em todo o mundo, incluídos adultos e crianças de países desenvolvidos ou em desenvolvimento. São mais de 70, os tipos de complicações graves de saúde associados à angiogénese, e a lista vê-se em constante crescimento [3,4,5].

Um vasto leque de patologias de diversos tipos pode ser desencadeado sempre que há um descontrolo no delicado equilíbrio, entre inúmeros sinais excitatórios e inibitórios, exigido pela angiogénese. Desde há 15 anos que este facto despoleta, entre os investigadores, um interesse crescente pela profunda compreensão biológica do assunto. Os estudos genéticos têm fornecido fortes conhecimentos sobre os mecanismos fundamentais e interações moleculares que regulam o crescimento dos vasos. Só desta forma, é possível aos cientistas o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, de promoção do crescimento vascular ou de inibição das características que o desencadeiam, consoante cada circunstância. Recentemente foram aprovados os primeiros agentes angiogénicos para o tratamento de cancro e cegueira [3,4,6].

Os últimos 15 anos foram grandiosos nesta área. Em 1980 existiam apenas 40 trabalhos publicados sobre o tema. Em 2010, contavam-se cerca de 6.000 [3]. Atualmente, perto de 60.000 artigos podem ser encontrados através da pesquisa “*angiogenesis*” no banco de dados PubMed. Este facto é indicativo de um crescimento exponencial de estudos sobre o assunto. A angiogénese é assim considerada, nos dias de hoje, um dos objetos de estudo mais apetecíveis e populares na área de investigação biomédica [7]. Devido a esta explosão na ciência, é possível que as terapias baseadas na angiogénese sejam uma

abordagem unificada e tenham um impacto muito grande na medicina do século XXI [5].

O cerne deste projeto recai no interesse pela estrutura das redes vasculares sanguíneas típicas nas mais variadas situações, função de distintas combinações de parâmetros do ambiente que se sabem influentes na morfologia da rede formada.

O trabalho de campo desenvolvido ao longo de todo este ano letivo desenrolou-se continuamente em torno da simulação computacional do crescimento de uma rede vascular. Nesta simulação, a dinâmica da interface entre os novos capilares formados e o estroma é descrita por um modelo multi-escala de interface difusa, desenvolvido por Travasso *et al.* [8], e cuja apresentação detalhada é feita adiante, na secção 2.4. Apesar de já existirem mais abordagens do género, o facto de o modelo integrar circunstâncias que ocorrem a nível da célula e do tecido e, ao mesmo tempo, envolver um baixo número de parâmetros, é um aspeto inovador.

Seguindo uma filosofia de tentativa e erro, foram testados diversos conjuntos de variáveis do ambiente, o que resultou em modificações e acrescentos ao modelo. Além disto, foi desenvolvido um programa auxiliar que permite a obtenção automática de resultados quantitativos – ramificação e diâmetro capilar médio da rede – a partir de imagens devolvidas pelo programa principal. Toda a implementação foi desenvolvida com recurso à linguagem de programação C.

Estando o foco deste projeto apontado ao enriquecimento do modelo e à otimização do código parcialmente desenvolvido, a paralelização no seu todo ou de algumas rotinas mais complexas, incorporou também o plano inicial de trabalhos. Com este intuito, foram procuradas noções básicas de computação paralela através da disciplina de Computação Avançada, lecionada no Departamento de Física da Universidade de Coimbra ao abrigo do Doutoramento em Física Computacional. Todavia, devido à constante expansão das etapas inicialmente propostas, e do aparecimento sistemático de novas possíveis abordagens, tão peculiares de qualquer trabalho de investigação, o tempo foi insuficiente para levar a cabo esta tarefa. Tendo a consciência de que grande parte do tempo dedicado ao projeto foi consumido em simulação e que a paralelização aumentaria significativamente a velocidade de processamento, a hipótese não se vê de todo descartada e anota-se já como objetivo futuro.

Devido à colaboração entre o Centro de Física Computacional e o IBILI, Instituto Biomédico de Investigação em Luz e Imagem, em particular o trabalho desenvolvido por Teresa Rodrigues, houve ao longo de todo este percurso uma permuta constante de conhecimentos entre os domínios biológico e computacional. Este foi efetivamente um passo fundamental neste projeto, parte integrante de um outro mais extenso, "*ANGIOGÉNESE NA RETINOPATIA DIABÉTICA: INTEGRANDO EXPERIÊNCIA E MODULAÇÃO*" – referenciado

PTDC/SAL-ENB/110354/2009, e que assenta exatamente na interatividade entre essas duas áreas, a Biologia e a Computação [9].

Prevendo como crescem os vasos capilares em diferentes casos patológicos, este estudo pode endereçar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no sentido de aumentar a sua eficácia. No entanto, para aplicação do modelo na medicina é indispensável a sua validação em laboratório, o que está em curso nas instalações do IBILI desde o início deste ano [10].

Na Figura 1 é apresentado um calendário geral das tarefas desenvolvidas no âmbito deste projeto.

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set
1													
2													
3													
4													
5													

Figura 1 – Programa Geral do Projeto.

1. Revisão da Literatura
2. Noções de C/C++
3. Aulas de Computação Avançada
4. Implementação e Simulação
5. Redação da Tese

Capítulo 2

Revisão da literatura

2.1 Importância da angiogénese e relevância do fluxo sanguíneo

Em animais primitivos, como a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, o oxigénio é capaz de se difundir por todo o seu pequeno corpo, chegando de uma forma direta a todas as células. Noutras espécies, mais evoluídas e de maior dimensão, é evidentemente impossível assumir esta técnica como meio eficiente de oxigenação celular. É através do fluxo sanguíneo que se consegue o contacto com as células distantes [4].

A função básica do sistema cardiovascular é oferecer transporte e portanto, meios de resposta às diversas exigências funcionais do organismo. Assim, é sua responsabilidade a entrega não só do oxigénio, mas também dos nutrientes às células dos demais tecidos, proporcionando-lhes as condições necessárias para a realização do metabolismo [11].

A vasculogénese é o primeiro processo morfogenético do desenvolvimento vascular e ocorre exclusivamente durante a fase inicial embrionária. Inicia-se com a diferenciação de angioblastos (precursores das células endoteliais) que logo se fundem para formar um labirinto vascular primitivo de pequenos capilares. Através da angiogénese subsequente, o plexo vascular vai-se expandindo, ocorrendo progressivamente ramificações de novos vasos a partir dos então existentes. Numa fase final, a rede encontra-se remodelada, altamente organizada e estereotipada, onde os vasos mais grossos se subdividem em vasos cada vez mais finos. Mais tarde, perícitos (*Pericyte*, PC) e células do músculo liso (*Smooth Muscle Cell*, SMC) recobrem os canais de células endoteliais, conferindo estabilidade à estrutura, como esquematiza a Figura 2 [4,6,12].

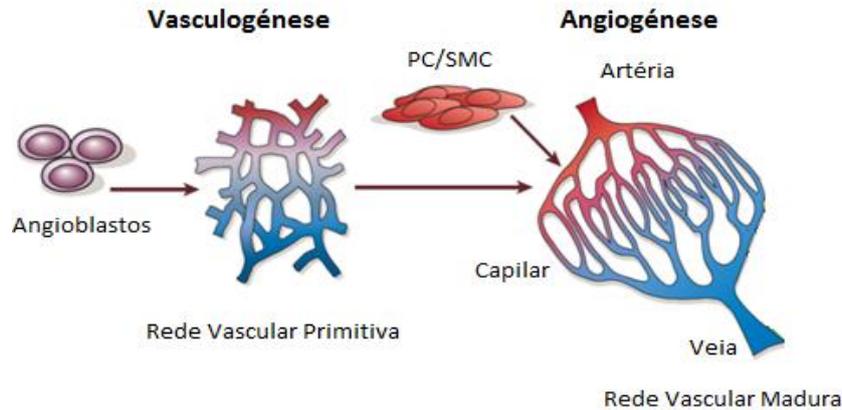


Figura 2 – Desenvolvimento de sistemas vasculares. Durante a vasculogénese os progenitores endoteliais dão origem a um labirinto vascular primitivo de artérias e veias; durante a angiogénese subsequente a rede expande-se, perícitos (PC) e células do músculo liso (SMC) recobrem os canais sanguíneos e emerge uma rede vascular organizada e estereotipada [4].

A angiogénese dita fisiológica é, portanto, um fenómeno fulcral no crescimento fetal, desde a formação da placenta até à ramificação do sistema circulatório da criança. No adulto, apresenta igual importância, sendo necessária à reparação ou regeneração tecidual, no processo de homeostase e cicatrização de feridas. Na mulher, a angiogénese está ativa a nível uterino durante alguns dias do ciclo menstrual, bem como na ovulação e maturação ovocitária. É verdade que na idade adulta, a maioria dos vasos sanguíneos permanece inerte, mas devido à notável capacidade de divisão das células endoteliais, a angiogénese pode ser rapidamente ativada em resposta a determinados estímulos fisiológicos, como os resultantes de um estado de hipóxia [4,13].

Todavia, a angiogénese não apresenta um papel exclusivo dos fenómenos fisiológicos. Em vários estádios de doenças graves, o organismo perde o controlo do equilíbrio entre sinais inibitórios e excitatórios, situação em que, geralmente, o oxigénio tem interferência direta. De facto, a proliferação e a regressão das redes vasculares são altamente influenciadas pela presença da molécula de oxigénio, através de um delicado mecanismo de *feedback* negativo [3]. Quando a oxigenação do meio não é suficiente, os estímulos provenientes dos meios em hipóxia ativam as substâncias pró-angiogénicas e inibem as anti-angiogénicas, levando ao crescimento vascular. O contrário acontece na regressão de vasos, onde as substâncias ativadas são as anti-angiogénicas e as inibidas as pró-angiogénicas.

É sabido que a expansão da rede vascular conduz, tanto a um aumento da área superficial capilar por onde se pode difundir o oxigénio, como a uma diminuição da distância de difusão entre os capilares e as células. Ambas as situações, bem como o aumento do caudal sanguíneo, contribuem para uma mais eficiente oxigenação dos tecidos. Quando os níveis de oxigénio entregues estão de

acordo com as suas necessidades, os fatores pró e anti-angiogénicos regressam aos seus níveis normais, fechando-se assim o ciclo de *feedback* [3].

A Figura 3 mostra o mecanismo descrito. A azul e vermelho encontram-se respetivamente representados os casos de hipóxia (responsável pelo crescimento vascular) e de hiperóxia (responsável pela regressão vascular) [3].

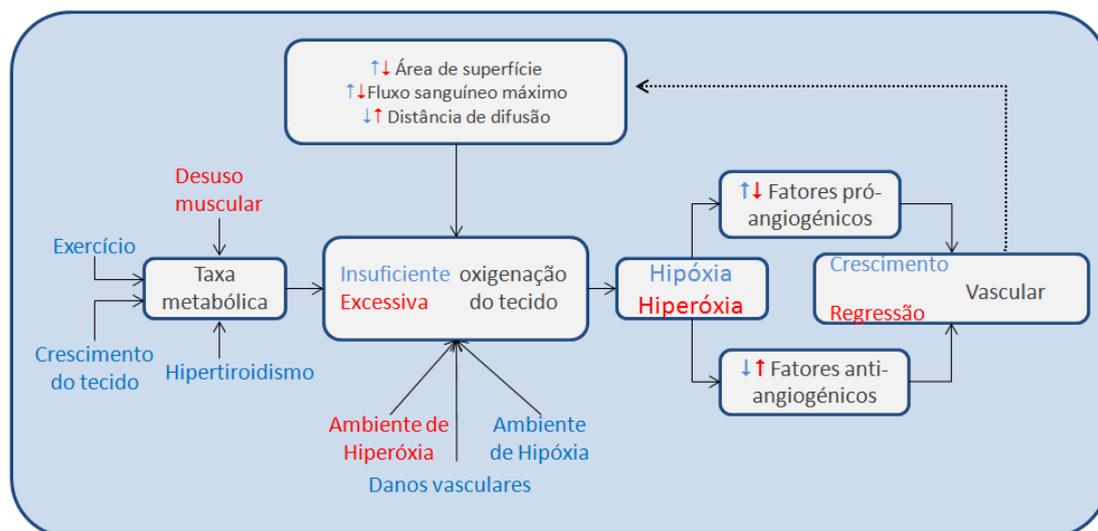


Figura 3 – O papel do oxigênio no padrão vascular. Estados de hipóxia e hiperóxia conduzem, respetivamente, ao crescimento e regressão vascular, num processo em que a oxigenação do tecido depende de um ciclo de *feedback* negativo [3].

Conclui-se daqui, que um predomínio acentuado de fatores anti-angiogénicos perante pró-angiogénicos – estímulo angiogénico insuficiente – conduz naturalmente a uma neo-vascularização diminuída, de onde podem resultar complicadas consequências. São comuns as disfunções celulares endoteliais, malformação ou mesmo regressão dos vasos. Isto dificulta atividades de cura e regeneração, podendo inclusive levar à morte de tecidos. As isquemias cardíacas ou feridas crónicas são exemplos de patologias associadas [4].

Por outro lado, no que toca a patologias advindas de um estímulo angiogénico excessivo, são delas complicações conhecidas o cancro, a retinopatia diabética, a artrite reumatoide e a psoríase, entre dezenas de outras doenças. Nestas condições, os novos vasos sanguíneos nutrem os tecidos doentes, destroem tecidos normais e, no caso do cancro, ainda permitem o escape de células tumorais para a circulação, invadindo outros órgãos até então saudáveis (metastização) [4,13]. No que toca aos novos vasos formados, são tendencialmente frágeis (geralmente sem SMCs), apresentando-se propensos a rutura e de complicada remodelação, comprometendo a circulação [6]. Estes eventos têm lugar quando as células doentes produzem quantidades exageradas de fatores de crescimento angiogénico, cujos efeitos se sobrepõem aos dos

inibidores naturais. O tratamento patológico é feito à base de terapias destinadas a travar o crescimento destes vasos [13].

No caso concreto de tumores, o fornecimento de nutrientes e de oxigénio é altamente ineficiente comparativamente com os tecidos saudáveis, devido à desorganização estrutural dos vasos sanguíneos que o irrigam. Em vários tumores sólidos, o volume da massa tumoral é tal, que as células centrais estão demasiado afastadas de qualquer vaso sanguíneo que possa alimentá-las. Devido à alta pressão no interior destes tumores, os níveis de oxigénio e nutrientes não são suficientes para alimentar as suas células. Várias delas entram em hipóxia, desencadeando a angiogénese. Será o fluxo sanguíneo a repor os níveis de oxigénio e nutrientes que alimentarão e proporcionarão o crescimento do tumor [13]. O fluxo sanguíneo e a capacidade de medir e prever a sua distribuição representa assim um ponto de extrema importância, a incorporar em qualquer modelo dedicado à angiogénese tumoral [14].

Em forma de síntese, a Figura 4 representa o contraste entre os vários aspetos que caracterizam o processo de angiogénese numa situação normal (esquerda), numa vascularização tumoral (centro) e numa regressão vascular (direita). A linha A compara a arquitetura vascular dos três casos, sendo evidente a desorganização estrutural vascular do tumor. Na linha B, as imagens fotónicas da vascularização evidenciam a grande quantidade de fluxo sanguíneo que irriga a massa tumoral. É notória também a escassez de fluxo em situações de regressão capilar, devida essencialmente ao desequilíbrio na balança de fatores pró e anti-angiogénicos, apresentada na última linha.

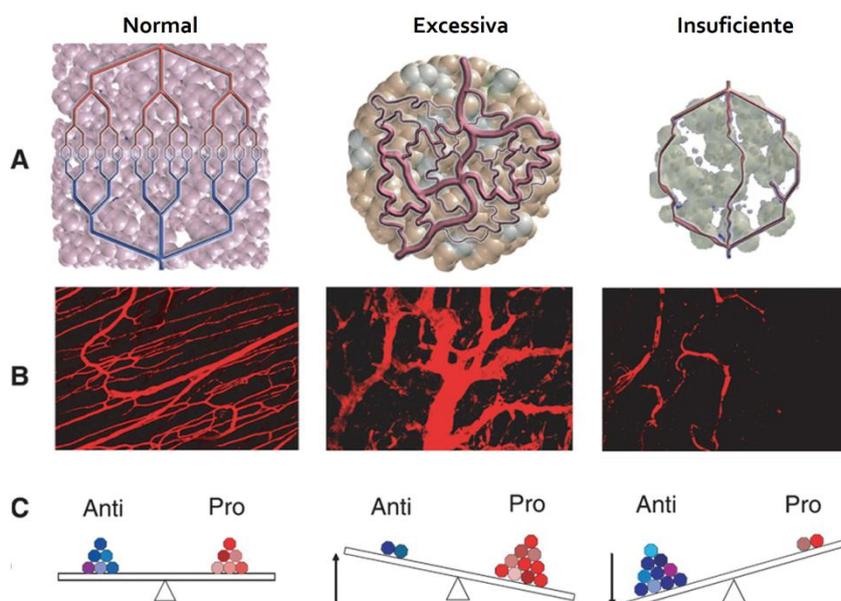


Figura 4 - Angiogénese fisiológica e patológica – excessiva e insuficiente. Os processos diferem na organização dos vasos e fluxo sanguíneo, devido ao desequilíbrio entre estímulos anti e pró angiogénicos. Adaptado de [15].

2.2 Princípios biológicos da angiogénese

São dois os tipos de angiogénese, segundo os quais há crescimento vascular a partir de vasos já existentes: *Sprouting angiogenesis* e *Intussusceptive angiogenesis*. O primeiro tipo é melhor compreendido, tendo sido descoberto há quase 200 anos atrás, contrastando com o segundo, descoberto por Burri há nem duas décadas (1996). Embora ambos os casos resultem no desenvolvimento de mais novos vasos, as duas técnicas regem-se por eventos morfológicos bem distintos.

A *Intussusceptive angiogenesis*, também chamada de angiogénese de separação, envolve a formação de vasos por um processo chamado protrusão. Considera-se que elementos intersticiais invadem um capilar em zonas onde a força de tensão é baixa, formando-se uma espécie de cristas endoteliais em direção ao lúmen. Quando duas destas estruturas se encontram, unem-se, formando uma nova parede. O efeito final é a divisão do vaso inicial em dois, como demonstrado na Figura 5 [3].

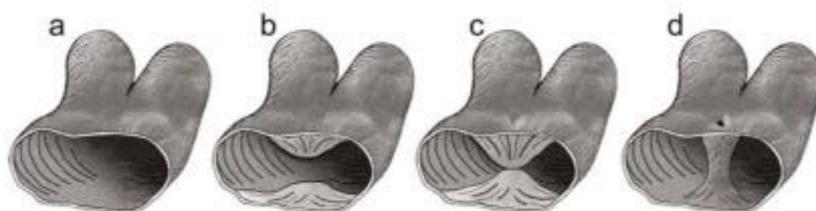


Figura 5 – Formação de um novo vaso através de *Intussusceptive angiogenesis*. **a** – existência de um único vaso inicial; **b** – elementos intersticiais invadem o vaso numa zona de baixa força de tensão; **c** – formam-se cristas transvasculares em direção ao lúmen; **d** – dois vasos completamente independentes, individualizados por uma parede de separação. Adaptado de [3].

Este tipo de angiogénese tem um desenvolvimento rápido e eficiente comparativamente à *Sprouting angiogenesis*, já que, inicialmente, só exige reorganização de células endoteliais, não estando dependente da velocidade de proliferação endotelial nem de migração celular. Esta é a explicação pela qual a *Intussusceptive angiogenesis* desempenha um papel fundamental no desenvolvimento vascular embrionário, onde o crescimento é rápido e os recursos são limitados [3].

Embora a ciência não esteja completamente dominada no que toca a este tipo menos comum de angiogénese, não restam dúvidas de que muitos fatores de crescimento e vias de sinalização estão também envolvidos. Um passo limitante na evolução da investigação da *Intussusceptive angiogenesis* deve-se à dificuldade em detetar a sua presença, mas também ao envolvimento de músculo liso no

processo. Por estas e outras questões, todo este trabalho é direcionado à modelação da *Sprouting angiogenesis* e sempre que se fala em apenas angiogénese, quer-se referir concretamente a este seu tipo [3].

Como implícito pelo seu nome, a *Sprouting angiogenesis* é caracterizada pelo rebentamento de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes. Neste contexto é comum toda uma sequência de eventos, famosa entre tecidos mal perfundidos e cujos mecanismos de deteção de oxigénio registam um nível de hipóxia considerável. A carência de oxigénio leva à secreção de fatores indutores de crescimento endotelial pelas células do parênquima¹ que vêem os recursos insuficientes para a sua atividade metabólica [3].

O exemplo mais comum de fator pró-angiogénico é o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), apresentando um triplo papel à escala celular: induz um aumento rápido da permeabilidade microvascular, ativando o fenótipo de célula endotelial da ponta (*Endothelial Tip Cell*, ETC) nas células endoteliais (*Endothelial Cell*, EC); promove a migração das ETCs em direção ao seu gradiente; e impulsiona a proliferação e sobrevivência das células endoteliais do estame (*Endothelial Stalk Cell*, ESC). Para além disto, o VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas e inibe a ação de proteínas apoptóticas em células endoteliais [3,8].

Existem várias famílias de VEGF, tendo sido o VEGF-A (também designado por VEGF-1) o primeiro a ser descoberto, em 1992 por Schweiki *et al.* Outras famílias, como o VEGF-B e VEGF-C não são significativamente potenciadas pela hipóxia, sendo esta a razão pela qual o VEGF-A tem recebido especial atenção nos últimos anos. Schweiki *et al* verificou que o estado das células se revertia quando expostas a ambientes em hipóxia e oxigenados. Estudos posteriores mostram que a inativação de VEGF-A, quer embrionária quer pós-natal precoce, por administração de inibidores de VEGF (anticorpos ou recetores solúveis), resulta na paragem do crescimento e letalidade, o que evidencia a exigência crítica de VEGF-A durante o desenvolvimento humano [16,17].

Por sua vez, o VEGF-A tem várias isoformas, que diferem entre si pelo modo como se difundem na matriz extracelular. No nome de cada uma destas isoformas vem expresso o número de aminoácidos que a compõe. As variantes de VEGF-A mais estudadas no contexto da angiogénese são o VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206, sendo compostas, respetivamente, por 121, 165, 189 e 206 aminoácidos. A afinidade e conexão com a heparina são uma característica muito importante, e acentuada no VEGF165, contribuindo para a sua forte ancoragem na matriz celular. A heparina é capaz de alterar, portanto, a acumulação e distribuição dos componentes da matriz extracelular (*Extracellular Matrix*, ECM) de um modo específico e diferencial. Dos três recetores primários com que o VEGF conta,

¹ O parênquima é o tecido responsável pela função de determinado órgão. O parênquima contrapõe-se ao estroma. Exemplos de células do parênquima são os hepatócitos, neurónios, astrócitos, etc.

apenas o Receptor-1 para Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*, VEGFR-1) e o Receptor-2 para Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*, VEGFR-2) estão associados ao crescimento vascular sanguíneo, sendo o terceiro dedicado à linfangiogênese. A presença de isoformas com diferentes capacidades de difusão é essencial para a criação de uma rede capilar funcional e para a determinação de padrões vasculares específicos [3,16,17].

Assim que, por difusão na ECM, o VEGF encontra um vaso capilar, estimula as células endoteliais que o constituem, ativando-as e conferindo-lhes propriedades especiais. Diz-se que houve aquisição do fenótipo de *tip cell*, sendo estas as células condutoras do novo vaso em direção ao aumento de concentração de fatores angiogênicos. Ao mesmo tempo, as *stalk cells* (fenótipo contrário ao *tip*) dão uso à sua grande capacidade proliferativa, para acompanhar o desenvolvimento do vaso.

Apenas as ETCs possuem, em diferentes quantidades, filopódios – longos e finos prolongamentos celulares – que desempenham três funções principais nestas células: migração, comunicação e adesão celular. No que respeita à migração das células, os filopódios segregam grandes quantidades de enzimas proteolíticas, que digerem um caminho através da ECM para o desenvolvimento da ramificação. Os filopódios das ETCs são fortemente dotados de recetores de VEGF-A (VEGFR-2), conferindo-lhes grande sensibilidade a diferenças de concentração de fator, que são determinantes na direção a tomar durante a condução dos vasos. Quando um número suficiente de filopódios de uma ETC estiver ancorado ao substrato, a contração dos filopódios puxa literalmente a ETC ao longo do estímulo de VEGF-A. Enquanto isso, as ESCs proliferam à medida que seguem atrás de uma ETC, fazendo com que o novo vaso capilar se alongue. Desenvolvem-se vacúolos que podem polarizar e coalescer, dando origem ao lúmen capilar. As ESCs tornam-se assim o tronco do capilar recém-formado [3,17].

Quando as ETCs de duas ou mais ramificações capilares convergem para a mesma fonte de VEGF-A (célula em hipóxia), as ETCs fundem-se e criam um lúmen contínuo através do qual o sangue oxigenado pode fluir. Ao processo de união entre dois vasos diferentes da rede capilar dá-se o nome de anastomose. A maturação e estabilização do capilar requerem o recrutamento de PCs e deposição de ECM [3].

A Figura 6 ilustra todo o conjunto de eventos subjacente à *Sprouting angiogenesis* desencadeada num tecido mal perfundido, como por exemplo um tumor.

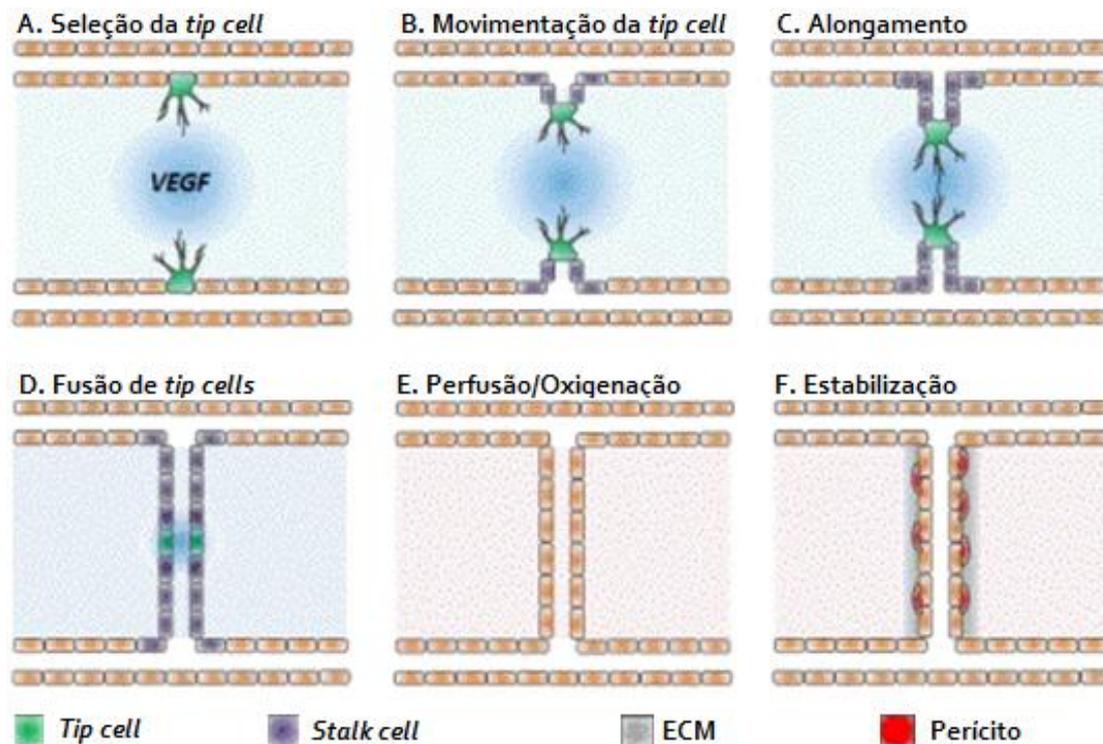


Figura 6 - Crescimento capilar em tecidos mal perfundidos. **A** – As células endoteliais expostas a maior concentração de VEGF especificam-se em ETCs. A zona do tecido em hipóxia é indicada pela mancha central azul; **B** – As ETCs lideram o desenvolvimento de novos ramos, estendendo os seus filopódios pela matriz; **C** – O desenvolvimento das ramificações é fomentado pela proliferação das ESCs, seguindo-se o trajeto das ETCs; **D** – Fusão das ETCs de duas novas ramificações em desenvolvimento, criando um lúmen; **E** – O sangue flui através do novo capilar, oxigenando o tecido. A secreção de VEGF é interrompida; **F** – O capilar recém-desenvolvido estabiliza por recrutamento de perícitos, pela deposição da ECM e por forças mecânicas associadas ao fluxo e pressão sanguíneos [3].

2.2.1 Via de sinalização Delta-Notch

A sinalização Delta-Notch é uma via relevante na regulação das decisões do destino celular durante o desenvolvimento embrionário. Na angiogénese, funciona como um sistema de sinalização célula-célula em que o ligante, Dll4 (*Delta-like-4*) se liga ao seu recetor Notch, nas células adjacentes. Tanto o recetor como o ligante estão à superfície celular, colaborando na comunicação entre células adjacentes, como representa a Figura7.

O VEGF-A induz a expressão do ligando Dll4 pelas ETCs, o que leva à ativação de recetores membranares Notch nas ESCs. A ativação do recetor Notch suprime a produção de VEGFR-2 nas ESCs, o que lhes atenua o comportamento migratório em comparação às ETCs. Embora as ETCs sejam expostas a maior concentração de VEGF-A, a sua taxa de proliferação é muito menor comparada com a das ESCs.

É importante reter que a via de sinalização Notch atua na angiogénese, prevenindo uma EC de adotar o fenótipo de ETC, no caso de já existir outra na sua vizinhança [3,8].

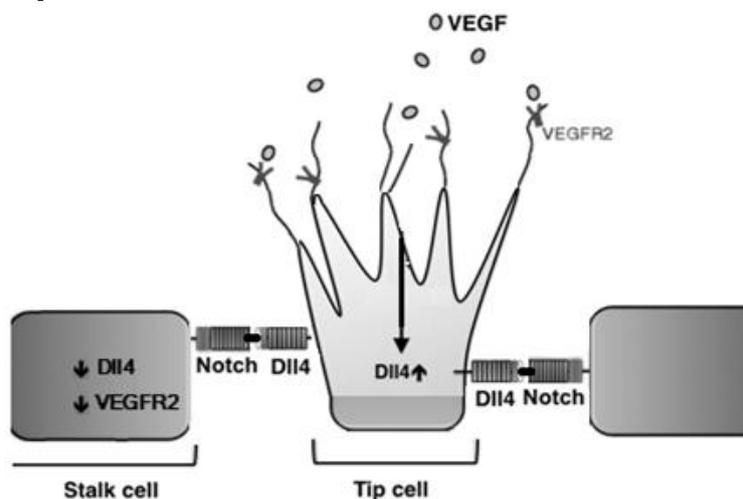


Figura 7 – A sinalização Delta-Notch durante a ativação de uma ETC. Após a ligação do VEGF aos recetores VEGFR-2, é desencadeada a expressão de Dll4, que ativa os recetores Notch nas ESCs adjacentes. São induzidos processos de regulação genética que diminuem a expressão do gene de VEGFR-2. Deste modo, são reduzidas as possibilidades de conexão do VEGF difuso na ECM naquelas que se definem como ESCs. Adaptado de [18].

As principais características relativas a cada fenótipo apresentado pelas ECs – ETCs e ESCs – encontram-se sumariados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais características das ETC (fenótipo induzido pelo VEGF) e ESC.

Fenótipo <i>tip cell</i> – ETC	Fenótipo <i>stalk cell</i> – ESC
<p>Não proliferativas.</p> <p>Altamente móveis.</p> <p>Alta sinalização por VEGFR-2.</p> <p>Baixa sinalização Notch.</p> <p>Extensão de filopódios.</p> <p>Conduzem as novas ramificações.</p> <p>Guiam a migração.</p>	<p>Proliferativas.</p> <p>Não-móveis.</p> <p>Baixa sinalização por VEGFR-2.</p> <p>Alta sinalização Notch.</p> <p>Mantêm junções.</p> <p>Responsáveis pela morfogénese do lúmen.</p> <p>Conectam-se ao vaso principal.</p>

2.2.2 Metaloproteínases

A migração das pontas está associada à produção extracelular de uma matriz de metaloproteínases (*Matrix Metalloproteinase's*, MMP), uma família de enzimas, que degradam proteoliticamente os componentes da ECM a fim de permitirem a migração das ETCs. São, portanto, responsáveis pela remodelação da vizinhança da ECM, afetando a afinidade das espécies de fator angiogénico para diferentes localizações extracelulares. Este facto tem repercussões relevantes na sua biodisponibilidade. As várias isoformas de fator são capazes de ancorar moléculas negativamente carregadas na ECM ou na superfície celular, em graus distintos (maiores ou menos quantidades), sendo a ação das MMPs relevante para o equilíbrio destas espécies.

Além disso, as MMPs também têm sido salientadas pelo seu contributo no desprendimento de PCs dos vasos durante a angiogénese. Expõem os locais de ligação pró-angiogénicos na ECM e clivam as juntas de adesão entre ECs contíguas. Todas estas evidências realçam a importância deste, que é também considerado um fator de crescimento endotelial, na angiogénese, capaz de levar a profundas alterações no padrão vascular [8,17].

2.2.3 Angiopietinas

A adesão celular é um fator importante para a formação de novos vasos sanguíneos e a sua estabilização. Nas ECs, existem junções de adesão inter-celular mediadas por caderinas que dificultam a resposta quimiotática celular ao VEGF-A. Assim, devido aos laços formados entre uma célula e os seus vizinhos, a mobilidade é um processo complicado, avultando a estabilidade celular [19].

Angiopietina-1 (*Angiopietin-1*, Ang-1) e angiopietina-2 (*Angiopietin-2*, Ang-2) são dois membros da família das angiopietinas, com papéis antagonistas especiais na regulação da angiogénese, atuando ao nível da adesão celular. Tanto a Ang-1 como a Ang-2, têm como recetor o Tie-2, que se encontra nas ECs [19].

Em relação ao seu papel, a Ang-1 desempenha várias funções que levam à maturação dos vasos e solidificação das ligações de adesão. Mais concretamente: fomenta as interações célula-célula; inibe a apoptose; está envolvida no recrutamento e sustentabilidade de células de suporte, como SMCs e PCs, característicos na maturação dos vasos; medeia interações entre as ECs e a membrana basal. A administração de Ang-1 provoca uma redução na permeabilidade do vaso e leva a um aumento da integridade vascular [19].

Por outro lado, a Ang-2, apesar de ter uma expressão bastante inferior à de Ang-1, também se liga ao recetor Tie-2, podendo bloquear a ação de Ang-1. Esta situação pode observar-se apenas em regiões estritamente localizadas de

remodelação vascular, e quando as ECs estão ativadas. Quando isto acontece, as ligações célula-célula e célula-matriz são afetadas, e a membrana basal e as células de suporte perdem o contacto com o endotélio, levando à ocorrência de malformações nos vasos.

A expressão predominante de Ang-1 sugere que esta proteína não é produzida em resposta a estímulos, sendo responsável até pela manutenção do estado quiescente das ECs. Este estado é modificado com a expressão local e temporal de Ang-2, que conduz à destruição de ligações, ao aumento da permeabilidade capilar, à ativação de mecanismos de apoptose, e por consequência, à regressão vascular.

Até aqui, seria clara a classificação da Ang-2 como substância anti-angiogénica, não fosse o seu efeito regulador fortemente dependente da presença de VEGF ou não no meio. A co-expressão de VEGF com Ang-2 estimula a proliferação e inibe a apoptose, em contraste com as características da ação individual de Ang-2. Conclui-se que, ao contrário do que se passa com Ang-1, com comportamento igual na presença ou ausência de VEGF, Ang-2 é por si só um fator anti-angiogénico mas com papel oposto na presença de VEGF [19].

A Figura 8 resume esquematicamente a regulação discutida realizada por Ang-1 e Ang-2, e o efeito da presença ou ausência de VEGF na expressão de Ang-2.

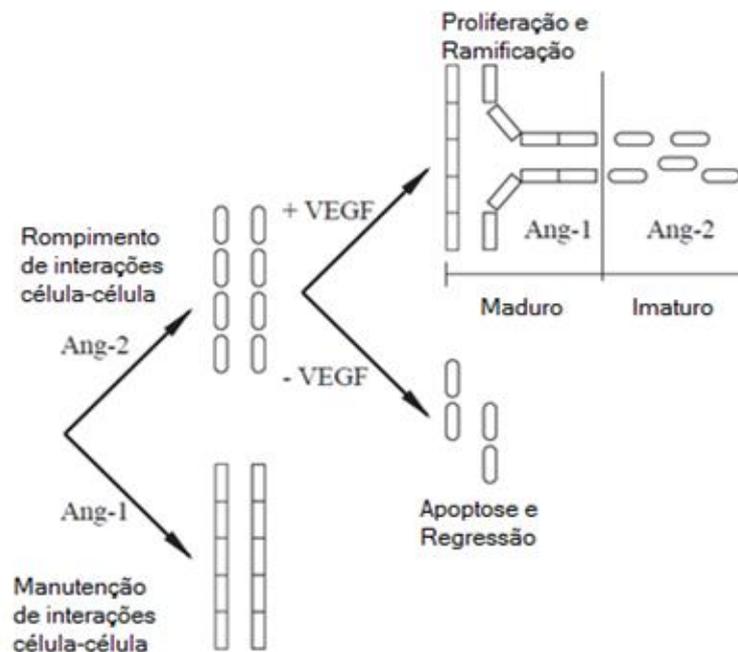


Figura 8 – Ação das angiopoietinas Ang-1 e Ang-2 nos vasos capilares. Ang-1 é expressa e produzida a um ritmo constante pelo tecido, enquanto Ang-2 é produzida em apenas certas circunstâncias, tendo um efeito positivo ou negativo dependendo da concentração de VEGF no tecido. Adaptado de [19].

2.3 Modelos matemáticos na literatura

O aumento na disponibilidade de dados biológicos verificado nos últimos anos, aliado ao progresso das tecnologias no mundo informático, tem vindo a motivar a formulação e exploração computacional da angiogénese [20].

Embora o papel dos fatores químicos deste processo esteja já consideravelmente bem documentado, o papel dos fatores mecânicos, tais como a interação entre os vasos recém-formados e a matriz extracelular, permanecem pouco compreendidos. É certo que existem meios laboratoriais de estudo *in vitro* para o efeito, mas cujas técnicas ainda não são satisfatórias, apresentando sérias limitações a nível de resolução espacial e temporal. Por esta razão, os modelos computacionais têm sido extensivamente utilizados para investigar vários aspetos da angiogénese [21].

Esta secção destina-se exatamente a fornecer uma visão global do trabalho de modelação matemática completo no campo da angiogénese. São apresentados sucintamente os modelos que tiveram mais impacto na literatura, o mesmo que dizer aqueles que mais ideias trouxeram de novo. São feitas ainda comparações entre abordagens, algumas delas com o modelo central deste projeto, o modelo de Travasso *et al.*

Dependendo da forma como é representado o sistema de interesse (células endoteliais e vasos), os modelos matemáticos da angiogénese são geralmente classificados como contínuos, discretos ou uma combinação de ambos, os modelos híbridos [21].

2.3.1 Modelos contínuos

Os modelos contínuos são usados, por norma, na descrição do comportamento em larga escala, em médias de populações celulares [20]. Neste tipo de abordagem, o modelo é regulado por equações diferenciais parciais, desenvolvidas a partir do princípio de conservação de massa e de considerações de fluxo de produtos químicos [22]. As reações bioquímicas enzimáticas de Michaelis-Menten costumam estar na base destas considerações [20]. A abordagem contínua, onde as redes capilares são descritas em termos de densidades de células endoteliais, permite assim, uma descrição unicamente macroscópica dos eventos [21,22].

Os modelos contínuos mais antigos da angiogénese induzida por tumores são baseados na analogia com o crescimento de fungos, uma vez que também estes exibem estruturas ramificadas que evoluem em resposta a sinais do ambiente [23].

Em 1985, Balding e McElwain adaptaram um modelo de crescimento fúngico (desenvolvido em 1982 por Edelstein), àquele que é considerado o primeiro modelo contínuo de angiogênese tumoral [23]. Neste trabalho, as redes vasculares são descritas através de densidades de ETCs e de células das novas ramificações vasculares [20]. Para o efeito, este modelo unidimensional serve-se de três equações diferenciais parciais não lineares, derivadas da aplicação do princípio de equilíbrio de massas a cada espécie celular. Assume ainda que as pontas dos capilares migram em direção ao tumor em resposta a um estímulo quimiotático proveniente das fontes de fator angiogénico tumoral (*Tumoral Angiogenesis Factor*, TAF – à data assim denominado, por puro conhecimento empírico de que o crescimento tumoral é induzido por fatores, mas que agora se conhecem em maior detalhe). Os autores modelam o TAF como um produto químico difusível produzido pelo tumor, com decaimento natural, e que é consumido pelas pontas migratórias dos capilares [23].

Uma vez que a extensão ao modelo de Balding e McElwain para duas e três dimensões espaciais não é particularmente complicada, em 1993 Byrne e Chaplain enveredaram nesse sentido. Para além de transformarem o sistema unidimensional em 2D, incluíram também os efeitos de haptotáxia² e interação EC-fibronectina³ [20,23].

Mais tarde, Levine *et al.* apresentaram modelos baseados na teoria contínua de movimento aleatório para descrever o início da angiogênese, incluindo a ação dos macrófagos e perícitos envolvidos no processo de maturação capilar. Levine *et al.* acoplaram também modelos unidimensionais de formação de ramificações num modelo bidimensional [22], capaz de descrever a resposta migratória das EC no interior da ECM. Este modelo considera a dinâmica do TAF, enzimas proteases, fibronectina e as concentrações de EC, o que o torna bastante complexo. Foi incluído ainda o papel de inibidores angiogénicos, nomeadamente a angiostatina.

Uma extensão ao modelo anterior, incluindo um processo de maturação de ECs e a dinâmica de angiopoietinas, foi proposto por Plank MJ *et al* em 2004 [19]. No seu artigo, Plank MJ *et al.* têm em conta a densidade de ECs, a concentração de VEGF e as concentrações de Ang-1 e Ang-2. A produção de VEGF é assumida a uma taxa constante pelas células em hipóxia do tumor e difunde-se através do tecido, estabelecendo um gradiente. Este modelo considera ainda que as ECs são divididas em células maduras (inativas) e imaturas (ativas). Embora esta suposição represente uma simplificação da realidade, isto porque a maturidade celular deve aumentar progressivamente, originando diversos estados de maturação intermédios, o comportamento fundamental é tido em conta e pode ser descrito matematicamente. As células imaturas produzem Ang-2, a angiopoietina que está

² Enquanto a quimiotáxia é a migração celular em resposta a um gradiente solúvel de agente quimiotático, a haptotáxia é uma migração celular direta ao longo de um gradiente de moléculas de uma substância quimiotática ligada a um substrato na matriz extracelular.

³ Fibronectina é uma proteína de adesão que contribui para a conexão celular à ECM.

associada a áreas localizadas de remodelação vascular elevada. Embora o estímulo necessário à expressão de Ang-2 não seja bem claro, há evidências que apostam na expressão especial de Ang-2 nas pontas dos capilares em crescimento. Os autores também consideram que a proliferação de ECs se limita a células imaturas. Para a maturação ter lugar, considera-se que os níveis de VEGF devem estar acima de um valor limite. No que diz respeito à Ang-1, o modelo considera estar presente em todo o tecido a um nível constante, e que é produzida a um ritmo proporcional à densidade de ECs maduras. A ação de ambas as angiopoietinas é consistente com o que já é conhecido do seu comportamento [19].

Ainda no âmbito dos modelos contínuos, alguns mais foram propostos, considerando características mecano-químicas da angiogénese. Exemplo disso são os modelos propostos por Manoussaki *et al.* e Holmes e Sleeman, onde a ECM é representada como um material viscoelástico que interage com as ECs [20]. Esta interação é uma característica muito importante na manutenção dos novos vasos sanguíneos endoteliais e é ela que cria as arquiteturas heterogêneas que caracterizam as redes vasculares [24]. A haptotaxia entra mais uma vez em consideração.

Assim, conclui-se que os primeiros trabalhos de modelação se concentram apenas sobre a resposta quimiotática de ECs para os fatores angiogénicos tumorais, contrariamente aos modelos posteriores, que já consideram a resposta haptotática aos gradientes de moléculas responsáveis pela adesão celular, geralmente a fibronectina, bem como o papel dos inibidores no processo angiogénico [25].

Infelizmente, os modelos que usam um quadro contínuo para o estudo da angiogénese evidenciam algumas limitações [23]. Abordagens desta natureza produzem meros resultados fenomenológicos, podendo captar apenas o comportamento de certas quantidades médias, como a densidade de ramificações por volume de tecido, a taxa média de crescimento dos vasos ou a taxa de expansão da rede [26,27]. São, portanto, incapazes de fornecer os detalhes de características microscópicas, como comprimentos de vasos ou anastomoses [26]. Neste tipo de modelos não é possível distinguir diferentes padrões de crescimento vascular. Deste modo, uma região com um único vaso grande tem a mesma contribuição de uma região com muitos vasos pequenos, mesmo que as suas áreas de superfície e, conseqüentemente, as suas taxas de entrega de nutrientes sejam muito diferentes [23]. Além disso, não é possível determinar o impacto do fluxo sanguíneo sobre a rede em evolução, já que a remodelação vascular não é tida em conta nem existem os detalhes necessários para a sua simulação [23,27].

Apesar destas falhas, deve ser recordado que os modelos contínuos fornecem informações úteis acerca da influência dos diferentes mecanismos físicos na angiogénese. Em destaque, o sucesso da angiogénese é rigorosamente controlado pelo equilíbrio entre a proliferação das ECs e a sua migração [23].

É neste contexto, surgem os modelos discretos, apresentados de seguida.

2.3.2 Modelos discretos

A fim de obter conhecimentos sobre o mundo microscópico da formação da rede capilar e para capturar observações intermédias dos testes *in vivo* e *in vitro* é necessário usar algum tipo de técnica discreta [27]. A modelação discreta opera ao nível das células endoteliais individuais, onde elas próprias são tratadas como unidades que se movem, crescem e se dividem, de acordo com regras definidas [21,27]. Assim, é possível determinar a fisiologia que governa o oxigénio, os nutrientes ou mesmo a transferência de fármacos através das redes, que dita a morfologia do sistema vascular [20].

Com efeito, foram propostas algumas abordagens que usam representações discretas espaciais, sobressaindo entre elas as apresentadas por Stokes e Lauffenburger (1991) e Anderson e Chaplain (1998) [27].

Um dos trabalhos pioneiros a descrever a angiogénese como um processo discreto foi introduzido por Stokes e Lauffenburger, em 1991. Neste modelo bidimensional baseado em agentes, as ramificações vasculares são definidas pelo trajeto das células individuais da ponta e considera-se a ocorrência de ramificação de acordo com regras probabilísticas pré-definidas. A migração das ETCs é regida por uma equação diferencial estocástica que tem em conta a quimiotáxia e o movimento aleatório [20].

Em 1998, foi apresentado por Anderson e Chaplain um modelo [28] definido numa rede, derivado da discretização de um contínuo bidimensional pré-existente. Às ETCs localizadas em pontos discretos da malha são atribuídas probabilidades de migrar para pontos adjacentes no passo de tempo de simulação seguinte. Estas probabilidades representam as contribuições quimiotáticas, haptotáticas e difusivas, típicas de uma formulação contínua. Os capilares são representados como pontos mascarados na grelha e as regras probabilísticas de ramificação dependem de há quanto tempo foi criada a ramificação, da concentração de TAF e da densidade de ECs [20]. A principal vantagem do uso da técnica de Anderson e Chaplain é a capacidade de seguir o movimento de células endoteliais individuais nas pontas capilares (onde a migração ocorre) e permitir a inclusão de processos importantes ao nível da célula individual, como a proliferação, a ramificação e a formação de *loops*. O modelo matemático concentra-se em três principais variáveis envolvidas na angiogénese induzida por tumores, a saber, ECs, TAFs e fibronectina, cada uma das quais tem um papel crucial no processo [27]. Logo após, Chaplain estendeu o modelo para três dimensões.

Sun *et al.*[29] apresentam um modelo determinístico bidimensional da angiogénese. A matriz extracelular ECM é explicitamente modelada por um campo anisotrópico direcional, influenciando a migração das ECs e o comportamento de ramificação.

Mais recentemente, modelos *Cellular Potts* foram introduzidos por Glazier e Graner para simular o rearranjo de adesão-conduzida de células biológicas. Este tipo de modelos tem sido utilizado na modelação da angiogénese por Bauer *et al.*, onde a ECM é representada como um composto de células estruturais, fibras, e fluido intersticial. A migração de células endoteliais é governada por estímulos quimiotáticos e haptotáticos. A anastomose ocorre em resposta a interações célula-célula e célula-matriz. Os autores consideram que as fibras oferecem sítios de ligação para VEGF de matriz-ligante e fibronectina. A ramificação é modelada de forma a ocorrer em resposta a divergências direcionais de gradientes de VEGF e fibronectina, bem como à orientação das fibras da ECM. Para detetar sinais de migração na vizinhança das células da ponta, são modelados filopódios que percebem a direção de ramificação, não sendo este passo dependente de componentes probabilísticas. Para explicar o ciclo celular, o modelo assume que uma ETC não pode ramificar ou proliferar, sem que tenha passado um intervalo de tempo desde o último evento de ramificação. Esta é uma suposição quase comum aos modelos existentes [20].

Mais recente ainda, em 2012, foi apresentado por Edgar *et al.* [21] um novo modelo computacional desenvolvido para simular com precisão a angiogénese com base no comprimento, orientação e ramificação de micro-vasos em tecidos vascularizados. A previsão de diferentes padrões, resultantes de alterações no crescimento dos vasos a partir da anisotropia da ECM, é uma das conclusões apresentadas. Neste trabalho, os micro-vasos são representados como uma série de segmentos de linha conectados e têm capacidade de alongação, ramificação e anastomose. O domínio de simulação é discretizado com uma malha regular, em cujos nós está especificada a informação de campo local, como a orientação das fibras de colagénio na ECM e a densidade microvascular. A orientação dos novos segmentos é determinada a partir desta informação armazenada nos nós da rede e de uma componente de movimento aleatório. Em cada passo de tempo, cada micro-vaso cresce através da adição de um novo segmento de linha nas pontas ativas dos segmentos pré-existentes. O modelo envolve assim uma representação explícita de micro-vasos como estruturas discretas, além da componente contínua apresentada nas equações diferenciais que governam as variáveis de campo influentes no crescimento dos novos vasos. Para determinar o comprimento vascular total ao longo do tempo os autores usam uma função sigmoide – curva típica para descrição do crescimento de populações com fontes limitadas. Quanto à ramificação vascular, os parâmetros que o governam são o número de ramificações inicial e uma taxa de formação de ramos ao longo do tempo. A anisotropia da matriz é ditada pela orientação das fibras de colagénio [21].

Para além dos anteriores, é ainda possível encontrar na literatura trabalhos nos quais a modelação matemática do fluxo sanguíneo em redes capilares tem sido apresentada. Nestes trabalhos, o sangue vem modelado como um fluido não-newtoniano, a duas e três dimensões. O seu objetivo é descrever a interação da pressão sanguínea e da tensão de corte, reguladores da remodelação dos vasos e

da ramificação durante a angiogénese. A migração celular das pontas é determinada pela quimiotáxia, haptotáxia, e movimento aleatório. Além disso, as enzimas degradantes da matriz, libertadas pelas ECs, são consideradas para degradar a fibronectina da ECM [20].

Embora sejam mais úteis na descrição de estruturas vasculares, os modelos discretos, em que é definida uma rede de unidades de espaço individuais, representam um aumento na complexidade do modelo e no tempo consumido em simulação, uma vez que cada unidade individual tem os seus próprios parâmetros e processos, como a proliferação ou a difusão de fatores. Devido à complexidade de todo o processo, os modelos até à data, tratam apenas um subconjunto dos fatores envolvidos na angiogénese [27].

2.3.3 Modelos híbridos

A conveniência de juntar as vantagens de ambos os tipos de modelo, contínuo e discreto, trouxe ao de cima o desafio de entender a "ponte" entre os eventos micro e macro-celulares. Hoje, sabe-se que a modelação matemática híbrida ou multi-escala é uma chave para esta ligação, combinando aspetos contínuos e discretos na descrição dos novos vasos sanguíneos, sendo capazes de responder às exigências da modelação do processo angiogénico [22]. Um modelo computacional capaz de simular, tanto a interação entre micro-vasos como a composição da ECM durante a angiogénese, constitui só por si uma plataforma valiosa para investigar, por exemplo, o papel das interações mecânicas [21,27].

Também o modelo matemático de Travasso *et al.* (2011), pilar deste projeto, se apresenta como um híbrido, combinando os benefícios da descrição da física contínua ao nível da dinâmica de fatores angiogénicos e densidades das ESCs, e a capacidade de se seguirem as ETCs individualmente [8].

Já em 2008, Milde *et al.* tinham apresentado um modelo computacional híbrido que combina uma aproximação contínua de VEGF, MMPs, fibronectina e a densidade de ESCs com uma representação discreta das ETCs. Ao contrário do que acontecia nos modelos até então propostos, ambas as isoformas de VEGF, solúveis e de matriz-ligante, têm um papel ativo como agentes quimiotáticos promotores do crescimento endotelial. É explorada concretamente uma isoforma de VEGF não-ligante e a sua clivagem por MMPs, que se prevê que tenha efeitos notórios na geometria final dos vasos. O modelo considera ainda a modelação explícita da ECM por introdução de feixes de fibras, distribuídos aleatoriamente, para influenciar a migração de ECs e conseqüente ramificação. Esta técnica torna o modelo completamente determinístico, eliminando a componente de movimento aleatório na migração celular. Os autores discutem, principalmente, a associação entre a angiogénese e o crescimento tumoral, bem como a ocorrência de metástases – fenómeno conseqüente do desprendimento de células tumorais e

sua migração através da corrente sanguínea para órgãos distantes. As espécies moleculares são representadas pela sua concentração, a migração das ETCs por partículas e os novos capilares pela densidade das células endoteliais. À semelhança do que acontece em Travasso *et al.*, a migração de ECs através da ECM segue um estímulo quimiotático que define a morfologia das ramificações recém-formadas. Todavia, existem diferenças importantes entre ambos os modelos, uma vez que Milde *et al.* consideram uma deposição de ECs na ECM, que influi o diâmetro dos vasos enquanto se aproximam as suas pontas, e consideram outros fatores para além do VEGF, tais como fibronectina (resposta haptotática) [20].

No seguimento deste *overview* de modelos híbridos, é justo referir o trabalho exposto na tese de mestrado de Margarida Guerra (Julho de 2011) [17], que constitui uma expansão para três dimensões do modelo de Travasso *et al.*. A modelação 3D deu-se na presença de algumas aproximações que tornaram a implementação mais simplificada e que não comprometem significativamente os resultados. A grande diferença entre o estudo levado a cabo por Margarida Guerra e este trabalho está nas dimensões do problema, sendo que a versão 3D se associa normalmente a estudos *in vivo*, e esta – 2D – a estudos *in vitro*. Apesar de o sistema real ser efetivamente tridimensional e das vantagens a nível visual, a maioria dos estudos laboratoriais de angiogénese acontece ainda *in vitro*, seja por questões monetárias ou de ética. Para além disso, como a implementação 3D é um processo mais penoso, é sempre vantajoso que exista uma implementação 2D prévia e com possibilidade de extensão para 3D. Assim, como resultado do presente trabalho, em que se explora a versão bidimensional do modelo, emergem tópicos certamente interessantes para extensão tridimensional futura, dos quais se destaca o fluxo sanguíneo [17,30].

Capítulo 3

Modelo multi-escala de interface difusa [8]

Neste capítulo é exposta uma descrição do modelo de angiogénese tumoral criado por Travasso *et al.* [8] (2011). O próximo capítulo exige conhecimentos vinculados acerca deste modelo, já que é sobre ele que se atua. Pretende-se que o leitor retenha os princípios matemáticos empregues e o traçado geral do código computacional, de modo a compreender as alterações que lhe foram feitas.

Partindo do título para a análise do modelo, instantaneamente se é remetido aos conceitos de *multi-escala* e de *interface difusa*.

O formalismo matemático de interface difusa destacou-se, recentemente, como uma poderosa abordagem na modelação computacional com o objetivo de prever a evolução morfológica de misturas heterogéneas com interfaces que se movem. Esta ferramenta pressupõe a existência de duas (ou mais) fases, separadas por uma interface de determinada espessura ε , na qual as quantidades físicas (concentração, etc.) variam continuamente. Os modelos que seguem esta teoria consideram uma função ϕ , chamada parâmetro de ordem, cujos valores identificam as fases do material ao longo do tempo. É comum que se $\phi = 1$ determinar um domínio, e $\phi = -1$ o domínio oposto, e dada a continuidade da região interfacial em que $-1 < \phi < 1$, a localização da interface seja considerada em $\phi = 0$, tal como se verifica na Figura 9. Nesta abordagem, o objetivo é estudar a dinâmica da interface entre as fases sem o uso de condições de fronteira nas interfaces, mas sim através de um único conjunto de equações de derivadas parciais para ϕ que é válido em todos os domínios. Estas equações podem ser resolvidas através de qualquer método *standard*. A solução para o problema macroscópico é obtida no limite em que a espessura da interface tende para zero [31].

Assim, esta metodologia é capaz de prever a evolução temporal e espacial de morfologias complexas, sem explicitamente controlar a posição das zonas de separação de domínios. [31].

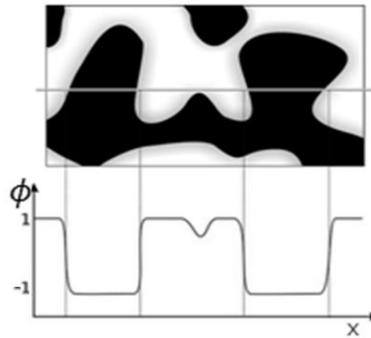


Figura 9 – Estrutura bifásica e parâmetro de ordem ϕ correspondente a uma linha horizontal que a atravessa. A variação do parâmetro de ordem mostra a natureza difusa da interface.

Os avanços neste formalismo têm impulsionado o seu uso ao nível das mais diversas aplicações, incluídas transições de fase, o crescimento de grãos ou mesmo a formação de padrões em superfícies [31]. Foi neste contexto que Travasso *et al.* introduziu o formalismo de interface difusa no modelo da angiogénese, já que era objetivo a descrição da dinâmica da interface que separa os novos capilares do estroma [8].

Por sua vez, o termo multi-escala, também incorporado no nome do modelo, provém da classe em que este vem inserido. Sendo um modelo híbrido, manifesta origens contínuas e discretas, ambas subjacentes às equações matemáticas que o compõem. Em relação à natureza contínua, a ela estão associados os fenómenos de proliferação celular endotelial e as propriedades globais do tecido. Por sua vez, as características discretas, dizem respeito à descrição dos fenómenos que ocorrem ao nível celular e não populacional, como é o caso da ativação do fenótipo de ETC e o surgimento de novas ramificações.

Embora por esta altura se suponha que o leitor tenha já uma boa base de conhecimentos, quer físicos quer biológicos, suficientes à compreensão do processo, alguns deles serão ainda lembrados ao longo do documento.

No modelo, os vasos sanguíneos consideram-se constituídos por ECs com grande capacidade proliferativa e que, perante um estímulo, se podem especializar em ETCs. A ativação deste fenótipo é o resultado dos mecanismos internos de regulação genética, desencadeados pela ação de promotores endoteliais. Estas substâncias são produzidas num conjunto de células em hipóxia aleatoriamente distribuídas e às quais nesta tese, se chamarão de fontes (de fator pró-angiogénico) [8].

Após a ativação das ETCs, estas tornam-se nas principais responsáveis por guiar as novas ramificações a partir de capilares originais. Ao mesmo tempo, as ESCs acompanham o seu crescimento com um contributo proliferativo. É importante referir que a velocidade de migração das ETCs, e consequentemente

dos novos vasos, é considerada como sendo proporcional ao gradiente de fatores de crescimento.

Os autores do modelo descrito em [8] consideram também a existência de MMPs produzidas pelas células do tecido, cuja ação biológica principal é a remodelação estrutural da ECM. A afinidade da ECM para com os fatores angiogénicos é assim alterada, perturbando a sua biodisponibilidade. O modo como os fatores de crescimento angiogénico interagem no meio é dependente da classe em que se inserem. Tanto os fatores difusíveis como os de matriz-ligante são isoformas contribuintes para a variação do padrão vascular [8].

3.1 Equações matemáticas e pressupostos

Todo o modelo matemático e simulação computacional de [8] se baseiam em quatro equações.

Na primeira delas, o modelo faz referência a um fator angiogénico T_i (onde o índice i representa a possibilidade de descrever as diferentes isoformas) que se difunde pela ECM, desde a área tumoral em hipóxia, onde é produzido, até às células do endotélio capilar que o consomem. A produção deste fator é cancelada pela proximidade de um vaso sanguíneo, assumido como transportador ativo e eficaz de sangue oxigenado (este será um aspeto a melhorar, com a inclusão do fluxo sanguíneo, ver secção 3.5).

A variação da concentração de $T_i(\vec{r}, t)$ ao longo do tempo é dada pela diferença entre a sua migração difusiva e o seu consumo a nível endotelial. Em termos matemáticos esta variação é descrita pela Equação (1) (deduzida no Apêndice A):

$$\partial_t T_i = \nabla \cdot (D_i(r) \nabla T_i) - \alpha_T T_i \phi \theta(\phi) \quad (1)$$

onde D é a constante de difusão de fator angiogénico, α_T é sua taxa de consumo pelas ECs e $\theta(\phi) = \begin{cases} 0 & \text{se } \phi < 0 \\ 1 & \text{se } \phi \geq 0 \end{cases}$ é a função de Heaviside.

A constante de difusão D regula a dinâmica dos fatores angiogénicos, cujo valor pode sofrer alterações consoante as condições químicas do meio, por exemplo perante uma alteração do pH. Sabendo que os fatores angiogénicos se podem manifestar em diversas isoformas, nomeadamente a difusível e a heparina-ligante, é correto pensar que essas mesmas isoformas terão métodos de difusão diferentes na ECM e que é possível equacionar o problema de uma forma genérica. A constante de difusão D assumida em (1) é escrita como $D_i(r)$, que para isoformas difusíveis (d) é constante e portanto $D_d(r) = D$. No caso de isoformas heparina-ligante (h), a constante depende da sua posição, sendo dada por $D_h(r)$.

A taxa de consumo α_T é escolhida de modo a que a concentração de T_i decaia exponencialmente dentro do capilar numa distância da ordem do raio de uma célula, R_c . Assim, matematicamente, a taxa de consumo de fator é dada pela expressão $\alpha_T = \frac{D}{R_c^2}$, implicando uma relação entre a disponibilidade de fator angiogénico no meio e o raio celular endotelial.

Tal como anteriormente referido no âmbito dos modelos de interface difusa, ϕ é o parâmetro de ordem que distingue as duas fases distintas do sistema. Inicialmente, as zonas fora do capilar correspondem a $\phi = -1$ e dentro do capilar o valor de ϕ é $\phi = 1$. Por vezes ϕ pode tomar valores maiores que 1, o que corresponde a zonas de grande consumo endotelial de T . Estas zonas são descritas como áreas de elevada proliferação celular que levarão a uma expansão do capilar. Por sua vez, a parede que separa os dois principais domínios capilares recebe o valor intermédio $\phi = 0$. Deste modo, a função de Heaviside, ou de degrau unitário, assume especial importância na garantia de que o consumo de fator não se dá fora do capilar, mas sim apenas onde o parâmetro de ordem é não negativo. Assim sendo, fora do capilar, a variação da concentração de T depende exclusivamente da sua difusão.

No modelo original é possível o estudo dos efeitos da Ang-2 e das MMPs nos padrões vasculares resultantes. No entanto, neste trabalho, será considerado apenas um fator angiogénico como regulador do processo.

Assim, assume-se $i = d$, isto é, a existência de um único fator pró-angiogénico – o VEGF. Encarando o fator como uma isoforma difusível, resulta um valor constante para D , tornando-se válida para implementação a Equação (2):

$$\partial_t T = D \nabla^2 T - \alpha_T T \phi \theta(\phi). \quad (2)$$

A segunda das quatro equações do modelo refere-se à posição do capilar e corresponde à Equação (3). Resulta da hipótese da existência de uma fronteira bem definida entre a parede do vaso e o tecido, delimitando a área capilar. A posição desta fronteira, ou mais concretamente a posição do capilar, é dada pela dinâmica da interface acrescida da proliferação celular. Matematicamente vem

$$\partial_t \phi = M \nabla^2 [-\phi + \phi^3 - \varepsilon \nabla^2 \phi] + \alpha_p(T) \phi \theta(\phi). \quad (3)$$

Nesta expressão, o primeiro termo ($M \nabla^2 [-\phi + \phi^3 - \varepsilon \nabla^2 \phi]$) é responsável pela manutenção de uma interface que separa as duas fases, o interior e o exterior do tubo capilar. Por outro lado, o segundo termo ($\alpha_p(T) \phi \theta(\phi)$) descreve a proliferação de ESCs. A dedução da Equação (3) encontra-se anexada ao documento, no Apêndice B.

Ainda na Equação (3), a constante M é o coeficiente de mobilidade das ECs e ε é a espessura da parede capilar. A taxa de proliferação celular é dada por $\alpha_p(T)$, que representa a soma das concentrações de todas as formas angiogénicas consideradas. É importante referir que para os pontos onde $T < T_p$ vem $\alpha_p(T) = \alpha_p T$, e que naqueles em que a concentração de fator angiogénico é superior, a taxa de proliferação atinge o seu valor máximo para $\alpha_p(T) = \alpha_p T_p$ (ver Figura 10). Novamente, a função de Heaviside é utilizada para garantir que a proliferação é um fenómeno exclusivo das zonas onde ϕ é não negativo.

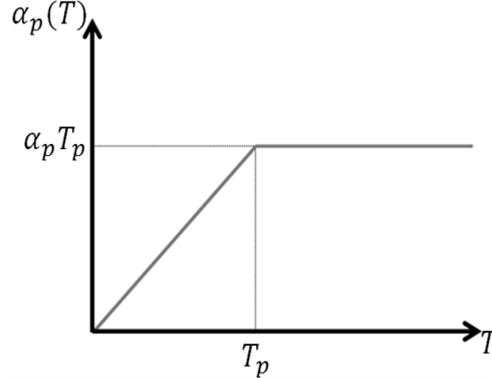


Figura 10 – Dependência da taxa de proliferação celular α_p em função da concentração de fator angiogénico T . Considera-se que acima de um valor limite $T = T_p$ a taxa de proliferação é constante.

Em relação à terceira equação do modelo, esta pretende descrever a velocidade de migração das ETCs ativadas, que dá origem às novas ramificações. No modelo aqui descrito, só podem adquirir este fenótipo as ECs que verificam um determinado conjunto de requisitos. Para além da concentração mínima de fator de crescimento necessária ao evento de ativação celular, é exigido um gradiente promotor da sua locomoção. É ainda considerada a via de sinalização Delta-Notch, que permite que sejam apenas ativadas as ECs que ainda não têm uma ETC vizinha e, claro, é estipulado que ϕ seja maior que um certo valor positivo definido.

As ETCs já ativadas serão a força locomotora das novas ramificações, movendo-se sob a influência de um processo chamado quimiotáxia, a locomoção celular em direção a um gradiente químico. A velocidade v do seu movimento é proporcional ao gradiente de fator angiogénico ∇T e vem descrita por aquela que é considerada a terceira equação do modelo:

$$v = \chi \nabla T \left[1 + \left(\frac{G_M}{G} - 1 \right) \Theta(G - G_M) \right]. \quad (4)$$

Nesta expressão, χ é a resposta quimiotática das ETCs e G_M representa o gradiente de fator angiogénico necessário para que se atinja a velocidade máxima de deslocação. Para cada uma das ETCs, o gradiente ∇T é medido no seu centro, sendo que para valores do seu módulo ($G \equiv |\nabla T|$) superiores ao valor de G_M , as ETCs atingem o seu máximo de velocidade. Tal deve-se ao facto de mesmo para

valores elevados de gradiente do fator angiogénico, a velocidade das ETCs é limitada pelas propriedades do tecido e pela saturação dos recetores ativos de fator angiogénico na frente da célula (onde T é mais elevado). Esta situação é considerada no modelo, tomando-se χG_M como a velocidade máxima das ETCs. Mais uma vez, a função de Heaviside tem um papel importante na correta modelação de todo este processo, já que se baseia na diferença entre o gradiente medido (G) e o seu valor máximo (G_M) estipulado para definir o modo como varia a velocidade. Assim, se $G < G_M$ o argumento da função de Heaviside é negativo e como tal, o seu resultado é zero. Isto significa que a velocidade de migração nessas circunstâncias é dada por apenas:

$$v = \chi \nabla T. \quad (5)$$

É apenas no caso concreto em que $G \geq G_M$ que a velocidade de migração celular depende da totalidade da expressão entre parênteses retos. Ora, se $G \geq G_M$, tem-se $G - G_M \geq 0$, tomando a função de Heaviside o valor de 1. Por seu lado, a fração $\frac{G_M}{G}$ toma necessariamente um valor menor ou igual a 1, limitando a velocidade celular, tanto mais quanto maior for a diferença entre o gradiente efetivo e o valor pré definido (G_M). A situação está representada graficamente na Figura 11.

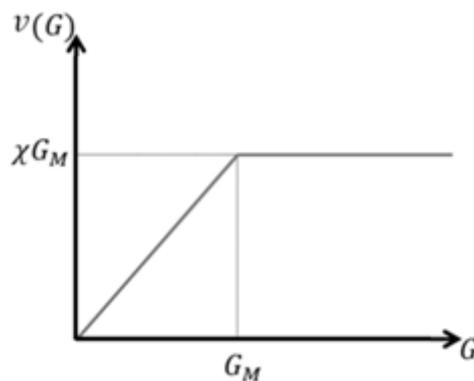


Figura 11 – Dependência da velocidade de migração celular v em função do gradiente de fator angiogénico T . Considera-se que acima de um valor limite $G = G_M$ a velocidade de migração é constante.

Para que as células ativas se movam, é requerido também um mínimo valor de gradiente de T , G . O modelo assume que se essas condições forem satisfeitas no centro da EC, ela adquire o fenótipo de ETC, com a ressalva de que os mecanismos de contacto célula-célula (como relatado para a via Notch) impedem a ativação de duas células vizinhas. Inspirado nesse mecanismo, apenas pontos para os quais existe uma distância mínima de $4R_c$ (R_c é o raio de uma EC) ao centro de todas as ETCs já existentes, podem tornar-se centros de ativação. A Figura 12 esquematiza a situação.

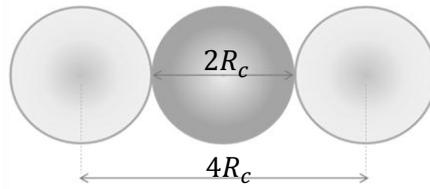


Figura 12 – Na via de sinalização Delta-Notch apenas uma célula pode tornar-se ETC se mantiver uma distância entre centros de pelo menos quatro raios celulares (aproximando as células a elementos esféricos, todos com o mesmo tamanho). Assim, admitindo qualquer uma das células das extremidades como ETC, a célula central não poderá ser uma ETC.

Além disso, e como referido anteriormente, considera-se um valor mínimo de T (T_c) para o qual uma célula pode ser ETC, e um valor mínimo de G (G_m) para que a ETC se mova quimiotaticamente. Desta forma, reproduz-se o que ocorre no sistema biológico quando a concentração de fator promotor de crescimento endotelial é insuficiente ou o sinal quimiotático é pequeno, ou seja, quando $T < T_c$ ou $G < G_m$, voltando a ETC ao estado de ESC.

Sabe-se ainda que as ETCs são as ECs que se movimentam durante a angiogénese, produzindo um aumento da densidade celular através da proliferação das ESCs subjacentes, que se estendem pelo caminho traçado pela ETC. Esta densidade celular depende, obviamente da velocidade de locomoção de cada ETC, existindo uma relação de proporcionalidade inversa entre os dois valores. A Equação (6), quarta equação do modelo, diz respeito ao parâmetro de ordem ϕ no interior das ETCs e pretende descrever este efeito, fundindo a dinâmica das ETCs com a dinâmica do capilar :

$$\phi_c = \frac{\alpha_p(T)\pi R_c}{2|v|}, \quad (6)$$

onde $|v|$ é o valor absoluto da velocidade das ETCs.

A expressão anterior resulta do rácio entre a quantidade de material produzido na região da ETC por unidade de tempo (dada por $\alpha_p(T)\pi R_c^2$) e a área varrida pela ETC por unidade de tempo ($2R_c|v|$). Assim, o valor de ϕ_c não descreve a densidade celular nas ETC, mas, mais corretamente, a densidade das ESCs na sua vizinhança. Assim, a Equação (6) modela corretamente a proporcionalidade inversa existente entre a velocidade das ETCs e a densidade de ESCs.

3.2 Modelação computacional

O sistema bidimensional considerado tem uma geometria de simulação de 300x300 pontos de rede e as condições de fronteira são consideradas periódicas.

Embora o código esteja preparado para o estudo de fatores como a Ang-2, as metaloproteínases e dois tipos de VEGF, Travasso *et al.* implementaram no código “interruptores” que permitem manter ligados apenas os fatores que se pretendam estudar, neste caso o VEGF difusível.

A arquitetura geral do código assenta numa estrutura de duas rotinas principais: a *ini*, onde são inicializados todos os campos do sistema e a *step*, que calcula a evolução desses mesmos campos na iteração de tempo seguinte, até que seja atingido um tempo de simulação razoável, previamente definido.

Durante a inicialização, em primeiro lugar, faz-se a calibração do sistema, definindo-se a concentração de VEGF igual a 0 e o parâmetro de ordem ϕ igual a -1 , para todos os pontos do espaço. Nesta altura, toda a área é “fora de capilar” e ainda não houve eventos de produção de VEGF. Ambos os valores, de T e ϕ , são guardados em matrizes com as dimensões do sistema.

De seguida, são adicionadas ao sistema cerca de 150 células em hipóxia, com distribuição aleatória. As posições destas futuras fontes de VEGF são armazenadas numa lista, em que a primeira coluna corresponde à posição x e a segunda à posição y de cada fonte.

Posteriormente, um vaso inicial, a partir do qual ramificam os novos vasos inerentes ao processo de angiogénese, é colocado na matriz. A largura deste vaso é de 10 unidades de rede, estando posicionado em $0 < x < 10$, ao longo de todo o eixo OY . O parâmetro de ordem ϕ , que até então tomava o valor de -1 para todos os pontos do sistema, torna-se igual a 1 nos pontos onde existe vaso.

O facto de as posições das fontes terem sido definidas aleatoriamente sem restrições, deixa aberta a possibilidade de existência de células em hipóxia em qualquer ponto da matriz. Ora, tendo sido já adicionado um vaso ao sistema, é errado que alguma célula em hipóxia esteja posicionada a uma distância menor que a de difusão do oxigénio a partir do vaso. A proximidade de oxigénio é capaz de satisfazer as necessidades celulares, deixando de fazer sentido a produção de VEGF (ver Figura 13). Assim, são executados cálculos de distâncias desde o capilar até todas as fontes com o objetivo de eliminar aquelas cuja posição pertença à área de difusão do oxigénio (definida por d). No trabalho desenvolvido por Travasso *et al.* simulou-se o desenvolvimento da rede capilar para distribuições regulares de fontes de fator angiogénico, representando a disposição regular das células no tecido. Verificou-se que a rede capilar resultante é caracterizada por valores de densidade de ramos e diâmetro do capilar semelhantes aos do caso de distribuição aleatória.

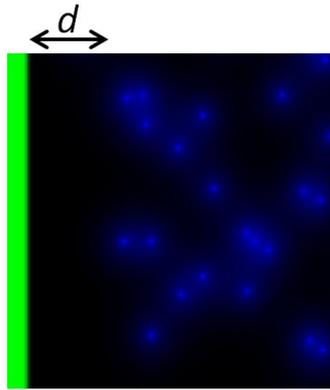


Figura 13 – Posicionamento das fontes de VEGF (azul) relativamente ao capilar principal (a verde). A distância d é marca a zona de possibilidade de oxigenação celular, não sendo viável a existência de células em hipóxia nesta área.

Iniciado o sistema, é invocada a rotina *step*, que ditará toda a sua evolução. Todo o seu conteúdo será repetido a cada passo temporal. A primeira tarefa executada na rotina *step* é a verificação da existência de alguma fonte suficientemente próxima de um capilar capaz de a desativar. Para o efeito, é verificado se, numa circunferência de raio d (distância de difusão do oxigénio) em torno de cada fonte, existe algum ponto onde $\phi > 0$, ou seja, se existe capilar.

Segue-se o cálculo do gradiente, G , de fator angiogénico em cada ponto. Este valor é determinado segundo as duas componentes x e y , sendo o gradiente em cada direção dado pela derivada da concentração T nos dois pontos vizinhos. Assim, segundo a direção horizontal, o gradiente no ponto x é dado pela interpolação da concentração T em $x + 1$ e $x - 1$. Segundo a direção vertical o procedimento de cálculo é análogo. Os gradientes segundo cada direção são guardados em cada plano de uma matriz tridimensional.

Em seguida, a rotina permite a ativação de ETCs no caso de alguns critérios serem cumpridos pelos candidatos. Apenas os pontos que verifiquem $\phi > 0.9$, $T > T_c$ e $|\nabla T| > G_m$ são considerados. A primeira condição garante que a ETC é escolhida a partir das células localizadas no interior do capilar, a segunda indica a existência de uma concentração mínima de VEGF capaz de iniciar a diferenciação da EC e a terceira assegura a existência de um gradiente de T capaz de promover a sua locomoção. De referir que as três condições são verificadas para o centro da EC.

Para além destas, os candidatos a ETC são submetidos a outras duas triagens. Em primeiro lugar, a nova ETC tem que estar localizada a pelo menos $4R_c$ de distância do centro de todas as ETCs já existentes. Em segundo, o centro da nova célula deve localizar-se a uma distância superior a R_c desde a superfície do capilar, garantindo que ela própria se encontra completamente dentro do vaso. O primeiro ponto encontrado a preencher todos os requisitos é promovido efetivamente a uma ETC, sendo registada numa lista *Bolas*, do tipo *double*, a sua posição (x, y) . No máximo, uma célula é ativada por passo de tempo.

Para simular a migração das ETCs é necessário saber informações como a velocidade de locomoção e a direção a tomar. A matriz de gradientes para cada ponto da rede, até então guardada, é um elemento fundamental para esta tarefa, ainda que não se possam obter de forma direta os gradientes para as ETCs, cujas posições estão armazenadas como *double*. Para o efeito, para cada ETC, são calculadas, por interpolação linear, os valores de ambos os gradientes direcionais (segundo a direção x e segundo a direção y). O gradiente na ETC (módulo destes valores) é então filtrado pela condição $G < G_m$. Se o gradiente for inferior àquele que se considera ser mínimo para promover a migração, o fenótipo de ETC desaparece (o mesmo acontece se $T < T_{cut}$), retornando a célula ao estado de ESC. Neste contexto, destaca-se o caso em que a concentração de VEGF é muito elevada, do qual resulta uma distribuição praticamente uniforme deste fator no meio. A migração das ETCs fica assim comprometida pelo facto de o gradiente não ser suficientemente forte para direcionar a migração, embora os filopódios das ETCs pressintam o fator no meio. Neste caso, o modelo delibera a perda do fenótipo de ETC, tornando-se os ramos constituídos apenas por ESCs que imediatamente põem em ação a sua capacidade proliferativa. Depois de movidas, as novas posições das ETCs são encontradas e atualizadas na lista *Bolas*, com base na sua posição anterior e na velocidade (por aplicação da Equação (4)).

Por último, são recalculados os valores de ϕ e T para todos os pontos do sistema, que guardarão informação útil para a próxima execução da rotina *step*. Para cada unidade da rede vascular que não é ETC, a atualização dos seus valores de T e ϕ é realizada respetivamente de acordo com a Equação (2). O valor da constante de difusão D está inicialmente definido, e $\nabla^2 T$ é uma quantidade calculada com recurso a uma expressão do Laplaciano discreto. Por sua vez, o potencial químico $\mu = -\phi + \phi^3 - \varepsilon \nabla^2 \phi$ é calculado para todos os pontos, a partir dos valores de ϕ armazenados e de uma função auxiliar que calcula Laplacianos.

A cada intervalo de “impressão” definido no início do programa, são produzidos arquivos, onde constam informações capazes de reconstruir vários aspetos importantes ocorridos durante a evolução temporal do sistema. Assim sendo, o programa implementado produz, dois ficheiros-matriz, *A.instante_temporal* e *T.instante_temporal*, onde estão guardados, para cada ponto, os valores do parâmetro de ordem ϕ e da concentração de fator angiogénico T , respetivamente. Para além destes, com o objetivo de fornecer uma análise mais direta de toda a evolução do sistema, é extraída também a cada intervalo de tempo uma figura de formato *.ppm* que representa visualmente as duas quantidades referidas. Assim, para qualquer parâmetro-input sob estudo, no instante $t=0$ obtém-se uma representação do sistema inicial: um vaso principal do lado esquerdo (na Figura 14A a verde), e um grupo de células em hipóxia (pontos azuis da Figura 14A) dispostas aleatoriamente na ECM.

Sabendo que as células em hipóxia estão continuamente a produzir isoformas difusíveis de fator angiogénico, e que esse fator é a chave de ativação

de ETCs, para instantes temporais superiores emergirá uma árvore de vasos capilares. Na Figura 14B observa-se uma estrutura vascular hierarquicamente ramificada, onde pequenos capilares emergem a partir de outros maiores. O alinhamento global da estrutura é direcionado para as fontes de fator angiogénico (algumas ainda visíveis no lado direito da Figura 14B).

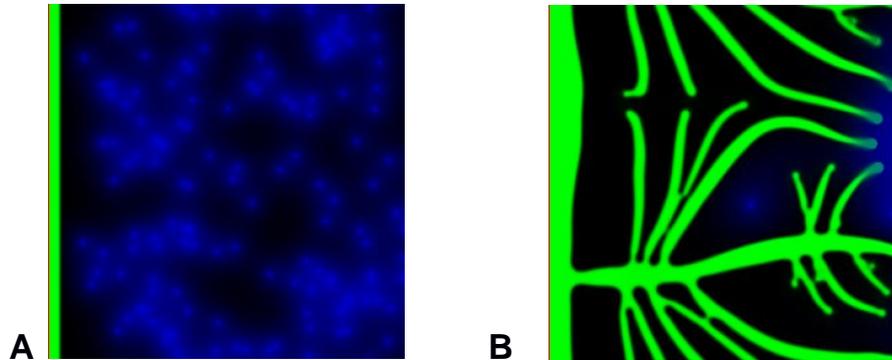


Figura 14 – Representação de um sistema de simulação. A – instante temporal inicial; B – instante temporal próximo do final. A verde estão representados os vasos capilares, os pontos azuis são as células em hipóxia.

A propósito da modelação do fluxo sanguíneo, torna-se valiosa a informação relativa aos locais de passagem de sangue. Assim, para essas situações, foi incluído que o programa disponibilizasse, para além dos já referidos, um ficheiro-matriz *B.instante_temporal*, que disponibiliza, para cada ponto, o valor de ϕ' , uma quantidade que distingue os domínios onde passa ou não sangue. Também as figuras *.ppm* tornam acessível esta informação. Através da sua visualização, é possível identificar, a cor vermelha, a passagem de sangue nos capilares. Inicialmente o fluxo sanguíneo é caracterizado por uma simples linha encarnada, sendo apenas mais tarde visível todo o vaso com sangue. As figuras 15A e 15B antecipam o tipo de resultados esperados ao longo de cada uma das intervenções no código.

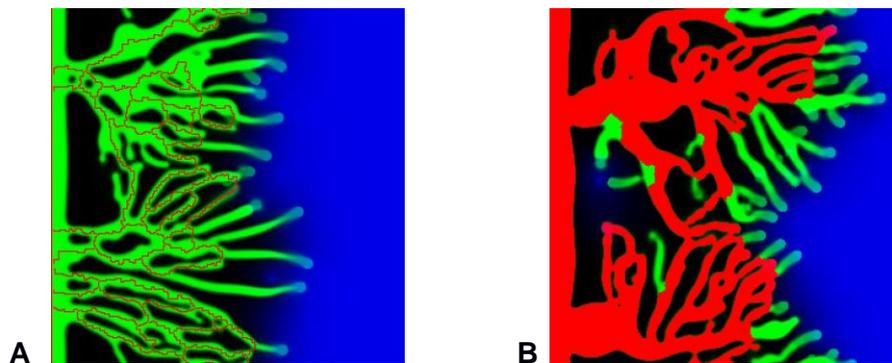


Figura 15 – Representação de um sistema que considera o fluxo sanguíneo. A – Fluxo sanguíneo como uma linha a vermelho aproximadamente ao meio dos capilares (verde). B – Vasos com sangue representados a vermelho. É de notar a formação de anastomoses em ambas as figuras.

Em ambas as figuras é possível observar vários eventos de anastomose que ocorrem quando um ou mais ramos crescem simultaneamente em direção à mesma célula em hipóxia.

No que respeita às unidades, as quantidades extraídas da simulação são adimensionais. A fim de obter informação quantitativa a partir da simulação, foi relacionada a magnitude das diferentes constantes com os valores observados *in vivo*. Apesar de as células endoteliais constituírem uma população muito diversificada, podendo apresentar funções e formas muito distintas, os autores fixaram para uma unidade de rede o tamanho de $1,25\mu m$ e definiram $R_c = 5\mu m = 4$ unidades de rede.

Uma vez que normalmente a constante de difusão de quimio-atrativos é de duas a três ordens de grandeza superior à constante associada aos movimentos celulares endoteliais, foi imposta no modelo essa relação entre as duas constantes e portanto, $D = 100$. Por sua vez, a mobilidade das células endoteliais expressa na Equação (3) definiu-se como sendo $M = 1$, podendo variar consideravelmente com o tipo de tecido. Todas estas suposições fixam a unidade de tempo da simulação em 26 minutos reais.

A Tabela 2 da secção 3.3 mostra em maior detalhe o valor dos vários parâmetros usados na simulação e a sua correspondência real. É apresentado ainda, na secção 3.4, um diagrama de fluxo das principais atividades levadas a cabo pelo programa – Figura 16.

3.3 Valores de simulação

Tabela 2 – Tabela de valores usados na simulação [8]. As unidades a.u. referem-se às concentrações de T .

Parâmetro	Descrição	Valor de simulação	Valor <i>in vivo</i>
	Unidade de rede	1	1.25 μm
	Unidade de tempo	1	26 min
R_c	Raio celular	4	5 μm
D	Constante de difusão de fator angiogénico	100	$10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$
M	Mobilidade celular endotelial	1	$10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$
d	Distância de difusão de oxigénio	20	25 μm
α_T	Taxa de consumo de fator angiogénico	6.25	0.004 s^{-1}
ε	Espessura da interface	1	1.25 μm
T_s	Fator angiogénico na fonte	1	
T_p	Concentração de fator angiogénico para proliferação máxima	0.3	
T_c	Concentração de fator angiogénico para ramificação	0.055	
G_M	Gradiente de fator angiogénico para velocidade máxima	0.03	0.0375 a. u./ μm
G_m	Gradiente de fator angiogénico para ramificação	0.01	0.0125 a. u./ μm

3.4 Diagrama de fluxo do código

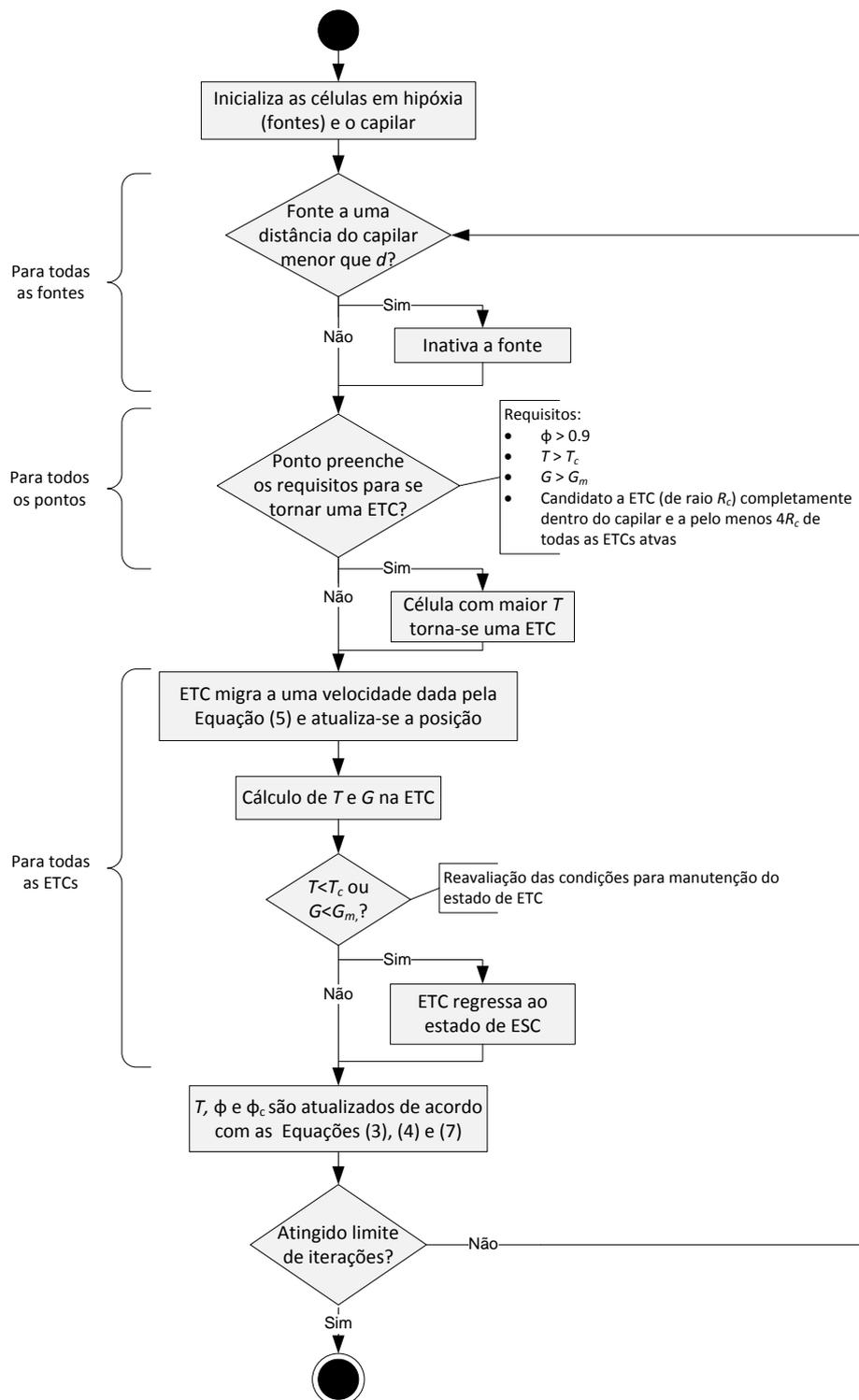


Figura 16 – Diagrama de fluxo relativo ao algoritmo do modelo.

3.5 Aspectos do modelo a melhorar

Apesar de todas as considerações já abordadas e descritas, o modelo falha um aspecto importantíssimo da biologia: as células em hipóxia devem libertar fatores angiogénicos até que o oxigénio lhes seja devidamente entregue. Em [8], o modelo não prevê o fluxo sanguíneo, assumindo que basta a presença de um capilar a certa distância d das células em hipóxia para que se considerem devidamente oxigenadas e deixem de produzir VEGF. Este aspecto pode influenciar negativamente os resultados do estudo da angiogénese, já que a existência de vasos não é sinónima de eficiente oxigenação. Naturalmente, os vasos que não permitem uma entrega arterial e uma recolha venosa dos produtos excretados pelas células, não constituem um método de oxigenação eficaz. Tal deve-se ao facto de o sangue que os preenche se manter consideravelmente estagnado, sem renovação, sempre que não existem diferenças de pressão promotoras de movimento, sendo desprezável a quantidade de oxigénio que possa chegar por esse meio às células. Considerou-se, portanto, de importância prioritária a incorporação do fluxo sanguíneo no modelo e o estudo dos seus efeitos na remodelação da rede. A modelação do fluxo sanguíneo desenvolvida é abordada no Capítulo 4.

Para além do referido anteriormente, sabe-se também da biologia, que nem todas as células endoteliais podem adquirir o fenótipo de ETC só porque há uma concentração de fator angiogénico que preenche os requisitos de ativação. Como discutido na secção dos princípios biológicos, a via de sinalização Delta-Notch não permite a existência de duas células endoteliais ativas vizinhas. No modelo, este mecanismo é somente tido em conta no momento de ativação celular, mas deveria sê-lo também em situações onde duas ETCs (já ativadas) se tocam. Neste caso, devido à sinalização Delta-Notch somente uma deveria continuar a ser ETC.

Finalmente, e apesar de o modelo de Travasso *et al.* ter em consideração um número considerável de processos biológicos, não faz referência ao efeito de haptotáxia, ponderado nos modelos mais recentes do estado da arte. Embora os modelos de angiogénese tratem apenas um subconjunto de parâmetros devido à extrema complexidade do processo, a inclusão do efeito haptotático seria uma referência para trabalho futuro.

Capítulo 4

Superando dificuldades...

Não havendo um plano rigoroso de trabalhos a seguir, as tarefas foram sendo incrementadas ao longo do projeto e direcionadas para a resolução de problemas detetados nos resultados de então. Estes resultados, submetidos a constantes avaliações, são um conjunto de imagens devolvidas pelo programa a cada “intervalo de impressão” (habitualmente 1000 iterações), de onde se identificam vasos sanguíneos e a difusão de VEGF na matriz extracelular. A partir de uma sequência destas imagens é possível seguir visualmente a evolução do sistema e inferir eventuais incorreções no programa. A Figura 17 apresenta um conjunto de imagens extraídas do programa à data de início deste projeto para um conjunto de parâmetros definidos em [8] como *wild type*.

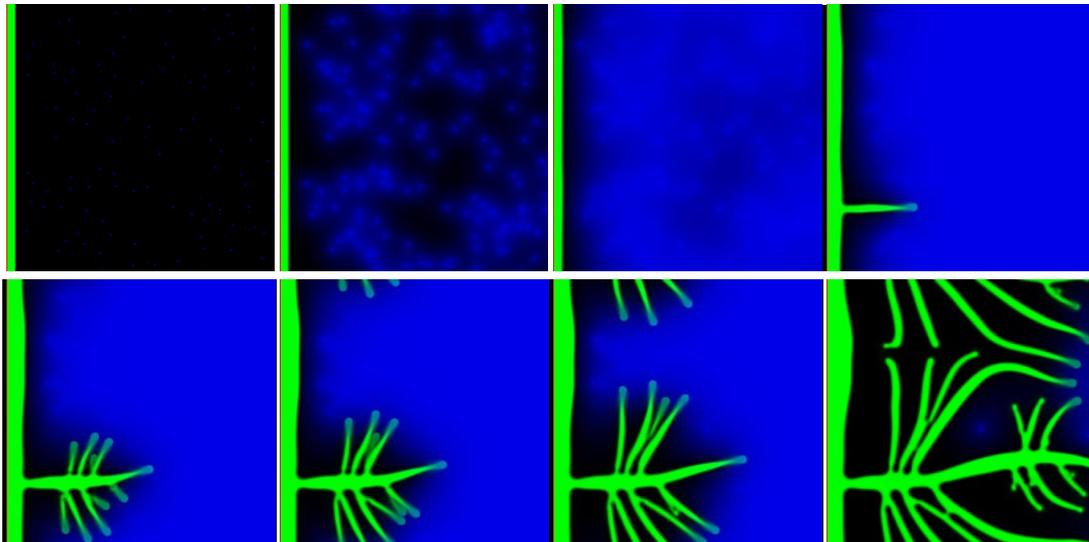


Figura 17 – Sequência de imagens resultante do programa à data de início do projeto. Estão representados, numa matriz extracelular (a negro), a difusão do VEGF (azul) e o crescimento conseqüente de vasos capilares (verde). A aproximação de um vaso capilar a uma célula em hipóxia é suficiente para que esta “desapareça” e deixe de ser produzido VEGF nesse ponto.

Mesmo que a evolução do sistema ilustrado não exponha incorreções evidentes, foram apresentados em [8] algumas conclusões de resultados e

trabalho futuro que deixam em aberto pontos de partida a este projeto. Tal como referido do capítulo anterior, a introdução da via de sinalização Delta-Notch e a necessidade de modelação do fluxo sanguíneo constituem pontos de destaque. Os restantes desafios foram surgindo naturalmente no seguimento das alterações consumadas.

Este capítulo encontra-se subdividido em várias secções, sendo que cada uma delas se deve ao tratamento de um problema concreto. Com este propósito, são referidas algumas soluções ponderadas e detalhados os métodos efetivamente postos em prática. Não é todavia possível fazer referência à totalidade dos casos abordados, sendo que muitos deles se serviram da filosofia de “tentativa e erro”. Por este motivo são apresentados apenas aqueles estudos que de alguma forma levaram a um tipo de modificação construtiva.

4.1 Via de sinalização Delta-Notch – o “Notchkill”

De uma avaliação dos resultados obtidos por Travasso *et al.* em [8] verifica-se para situações de elevada proliferação celular, a existência de zonas onde seria de esperar a ação da via de sinalização Delta-Notch. Um exemplo do caso referido é apresentado na Figura 18, onde os círculos negros assinalam a migração paralela conjunta de várias ramificações que anteriormente terão convergido para a mesma célula em hipóxia.

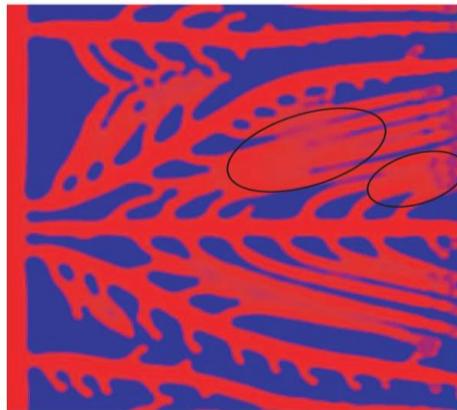


Figura 18 – Rede capilar completamente formada, com círculos negros a delinear zonas onde teria sido esperada a ação da via de sinalização Delta-Notch [8].

Na situação representada, o facto de terem existido capilares a migrar lado a lado não deixa nítida a sua parede de separação. Nestas zonas, o valor de ϕ que caracteriza as fases do sistema não sofre uma transição suficientemente abrupta para demarcar a existência de vários ramos. É assumida, então, a existência de apenas um vaso espesso (resultante da fusão lateral de vários outros). Assim sendo, esse vaso apresenta mais que uma ETC (próximas entre si) na liderança da sua migração, ao contrário do que é biologicamente permitido.

Com vista à resolução deste problema, a primeira intervenção no código esteve associada aos efeitos da via de sinalização Delta-Notch, através da rotina *Notchkill*. Como se entende pelo nome, a sua função é provocar a “morte” de uma de duas ETCs (isto é, o regresso da célula ao estado de ESC) que não respeitem o princípio biológico da via de sinalização referida: não podem existir duas ETCs vizinhas. Assim, baseada no cálculo de distâncias, a rotina recebe quatro valores relativos às posições das duas ETCs em avaliação: x_A , y_A , x_B e y_B .

A ideia geral de garantir que os centros das ETCs estão distanciados de pelo menos quatro raios celulares não é em si a maior dificuldade na resolução deste problema. A complexidade do assunto reside na necessidade de perceber se realmente as ETCs são ou não células vizinhas, ainda que os seus centros tenham uma localização próxima. Este acontecimento é típico durante a migração das pontas capilares em direção à mesma célula em hipóxia, onde os centros das

ETCs que os guiam estão continuamente em aproximação. Nestes casos, mesmo estando mais próximos que $4R_c$, as ETCs não pertencem ao mesmo ramo, não podendo ser por isso consideradas células vizinhas. Consequentemente, a desativação de uma delas por ação da via de sinalização Delta-Notch não é prevista.

Considere-se o caso da Figura 19, onde estão representadas duas ETCs, A e B, com centros localizados em (x_A, y_A) e (x_B, y_B) , respetivamente. A ação de *Notchkill* tem início com o cálculo da distância de separação das ETCs, d . Para todos os casos em que $d < 4R_c$ verifica-se a existência de algum ponto, ao longo da linha que une os dois centros, cujo valor de ϕ seja negativo (isto é, que não pertença ao capilar). Se não existir, então uma das células é automaticamente transformada em ESC. Para o efeito, as condições de fronteira segundo OY são tratadas por replicação matricial.

No caso em que a linha de união direta das ETCs atravessa uma região de estroma, o cálculo matemático prossegue para a determinação do ponto médio da porção de linha que cruza essa região. Aí, é virtualmente traçada uma linha que lhe é perpendicular (tracejado vermelho na Figura 19a). Esta linha é percorrida, segundo os dois sentidos, até que se verifique um ponto de cruzamento com um vaso capilar (cruz vermelha na Figura 19a). A partir deste momento, a distância entre ETCs deixa de corresponder ao comprimento da linha resultante da sua ligação direta (Figura 19a), passando a ser representada pela soma das distâncias, em linha reta, entre o centro de cada uma das ETCs e a zona assinalada pela cruz vermelha, de acordo com a Figura 19b.

Assim, e enquanto a distância continuar a ser menor que os quatro raios celulares estipulados para a via Delta-Notch, o processo é repetido até que se verifique o contrário e enquanto existirem nos segmentos pontos em que $\phi < 0$. A cada repetição é traçada uma perpendicular no ponto médio da parte do segmento de reta que passa fora do capilar. Ao longo da sua extensão é procurado um novo ponto de interseção com o vaso. Na Figura 19b, os pontos a amarelo seriam os próximos a ser encontrados neste contexto, sendo a distância entre as duas ETCs, por essa altura, dada pelo comprimento dos segmentos de reta que unem as células por intermédio de todas as três cruces (amarelas e vermelha). No limite pode considerar-se que há uma aproximação à estrutura vascular, obtendo-se a distância real (ao longo do capilar) entre as ETCs.

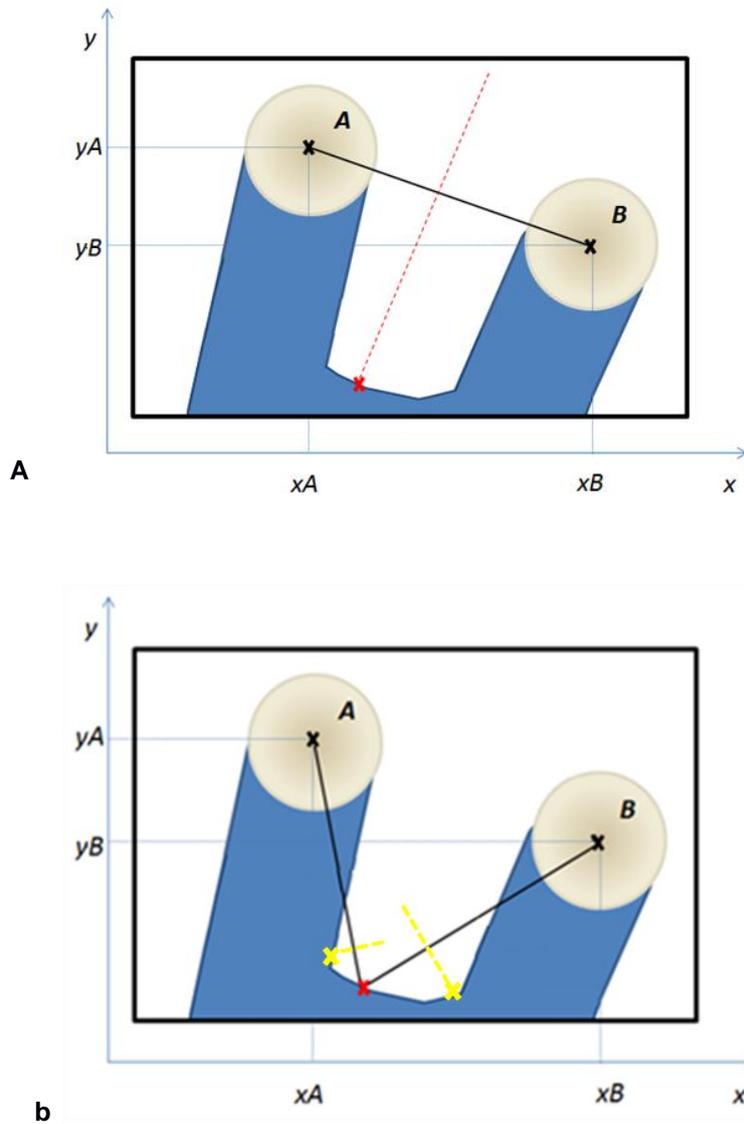


Figura 19 - Representação esquemática de instantes contíguos (a e b) da ação de *Notchkill* para duas ETCs (A e B) localizadas em ramificações diferentes (azul). Os centros das ETCs distam de $d < 4R_c$.

Assumindo-se, para o caso, $d < 4R_c$, as ETCs podem ou não estar a violar o princípio de sinalização Delta-Notch, sendo requerido para essa conclusão um estudo mais aprofundado – a distância por meio capilar. A metodologia usada no cálculo dessa distância tem por base uma aproximação recursiva à estrutura capilar (a azul). Assim, o processo é repetido até enquanto houver nas linhas pontos fora dos capilares e enquanto a distância for menor que $4R_c$. Se ao fim de noventa iterações de cálculo a distância continuar a obedecer a $d < 4R_c$, resulta que uma das duas ETCs deve regressar ao fenótipo de ESC. Por outro lado, basta que a distância satisfaça a condição $d > 4R_c$ uma única vez para o ciclo de cálculos ser encerrado, sendo concluído que ambas as células podem manter o fenótipo de ETC.

No que toca à primeira situação apresentada (Figura 18), apesar de se estar perante ETCs de ramos distintos, o facto de esses ramos estarem a migrar lado a lado faz com que sejam interpretados como um único vaso, do qual fazem parte as várias ETCs. Assim, no momento em que os ramos se juntam, aconteceria a despromoção de uma ETC se a distância entre as duas fosse $d < 4R_c$. Resultaria que apenas um dos dois ramos seguiria em frente.

Para além dos ótimos resultados obtidos através desta rotina, não deixam de ser curiosas algumas situações. Um resultado especial previsto por *Notchkill* vem representado na Figura 20: a existência de um vaso capilar na proximidade das duas ETCs em estudo e que não é aquele ao qual estão associadas. Neste caso, o primeiro ponto encontrado segundo a perpendicular ao longo do segmento de reta que une as ETCs (A e B) não pertence à ramificação que lhes está associada. Assim, acontece que iterativamente os segmentos de reta passarão muitas vezes fora do capilar sendo que mais tarde ou mais cedo a distância ultrapassará os $4R_c$, mantendo ambas as ETCs.

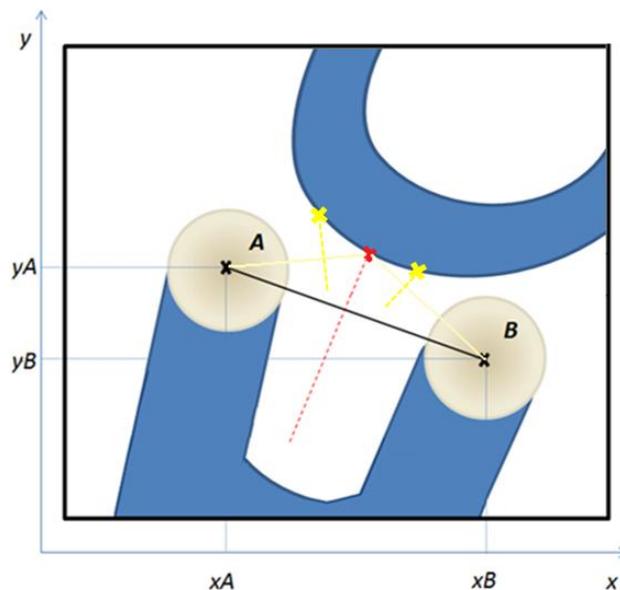


Figura 20 – Caso especial resolvido por *Notchkill*: a existência de um vaso capilar na proximidade das duas ETCs (A e B) e que não é aquele ao qual estão associadas.

Contudo, tendo em conta o sentido normal de evolução do sistema, em que há um vaso principal de um lado e uma região de produção de VEGF do lado oposto (rever Figura 17), estas situações acontecem muito raramente.

4.2 O fluxo sanguíneo e formação de anastomoses

Segundo o relatado na secção 3.5, a modelação do fluxo sanguíneo constituiu um tópico de elevada prioridade, já que torna possível a determinação de um contributo mais real em oxigenação celular por parte dos diversos ramos que constituem a rede vascular.

Biologicamente, sempre que dois ou mais ramos convergem para a mesma fonte de VEGF e se juntam no mesmo ponto, verificam-se eventos de fusão. Assim sendo, apenas uma das ramificações continua a sua migração, servindo a(s) restante(s) à formação de *loops* vasculares, através dos quais circula o sangue oxigenado.

Facilmente se compreende que em [8] este processo (denominado anastomose) não é considerado, uma vez que não está determinado o fluxo sanguíneo. Assim sendo, sempre que uma ponta capilar se aproxima de uma célula em hipóxia (a pelo menos $d = 20$) esta para de produzir fator de crescimento pois assume ter reunido níveis de oxigénio necessários ao seu metabolismo. Acontece então que os restantes capilares não são mais induzidos a migrar nesse sentido, diminuindo a probabilidade de encontros entre vasos.

Ao contrário, impedindo que as pontas capilares contribuam para uma eficiente oxigenação celular, a implementação do fluxo sanguíneo deixa em aberto a produção de VEGF pelas fontes, mesmo que o vaso se encontre muito próximo delas. Assim, os restantes vasos são continuamente convidados a migrar nesse sentido, aumentando a probabilidade de formação de anastomoses. O fluxo sanguíneo apresenta desta forma um propósito acrescido, sendo em seguida explicada a sua implementação.

Como se sabe, a modelação de sistemas biológicos recai, grande parte das vezes, em analogias inter-sistemas, mais particularmente na aproximação a sistemas elétricos. Reduzindo um sistema biológico complexo a um circuito elétrico análogo, torna-se facilitada a sua interpretação, pela possibilidade de recurso a regras matemáticas conhecidas [32].

Neste contexto e para o caso concreto deste modelo, o fluxo sanguíneo é interpretado como um fluxo de Poiseuille, de modo a poder ser implementado de um modo análogo a um circuito elétrico. Assim, tem-se um circuito fechado onde existe uma diferença de pressão gerada pela ação mecânica cardíaca que, apesar da resistência dos vasos, é capaz de manter uma corrente de sangue. Desta forma, é possível identificar os vasos onde efetivamente há corrente, tornando-se conhecidos os vasos que devem ou não contribuir para a oxigenação eficiente dos tecidos. O efeito dos restantes no desaparecimento das fontes de VEGF é desprezado.

Para tal, foi implementado um programa que é invocado a cada dez passos de tempo pelo programa principal, de modo a diminuir os recursos computacionais requeridos. O *input* deste programa é a matriz dos valores de parâmetro de ordem (ϕ), a partir da qual se projeta a rede capilar formada. Como resultado, é devolvido ao programa principal uma nova matriz (ϕ') composta de valores 1 ou -1 , consoante os pontos pertençam ou não a um esqueleto que define a passagem de fluxo sanguíneo.

O *script* é composto de várias rotinas, cujas funções passam pela leitura da rede capilar; pela sua redução a um esqueleto; pela determinação de nodos; pelo estabelecimento de ligações entre esses mesmos nodos; pela escrita de um sistema de potenciais e respetiva resolução. À medida que são executadas estas tarefas, há uma redução contínua do número de pontos que no final podem representar a passagem de sangue e que são armazenados na matriz de *output*.

Quando é feita a leitura da matriz de parâmetro de ordem recebida pelo programa, é também criada aquela que será a matriz de *output*. Esta expressa, através de valores de ϕ , dois domínios distintos – o local de passagem do fluxo sanguíneo e o domínio oposto. Assim, a cada ponto da nova matriz é atribuído o valor de 1 ou -1 , consoante os pontos da matriz de entrada verificarem ou não, respetivamente, $\phi \geq -0.3$. O valor de ϕ neste caso indica, como é sabido, se o ponto pertence ao interior do capilar, onde $\phi \geq 0$. Por questões de segurança, o valor tomado para projetar a rede é ligeiramente inferior (-0.3), representando um pequeno espessamento da rede que não traz problemas, dado o objetivo seguinte da sua redução a um esqueleto. A Figura 21 esquematiza todo o processo de deteção do fluxo sanguíneo, sendo a rede capilar a vermelho o resultado correspondente a esta primeira parte dita de “leitura”.

É exatamente sobre a matriz de *output* recém-criada que atua a rotina *thin*, responsável pela transformação dos vasos num esqueleto, também chamado de malha, por analogia aos sistemas elétricos.

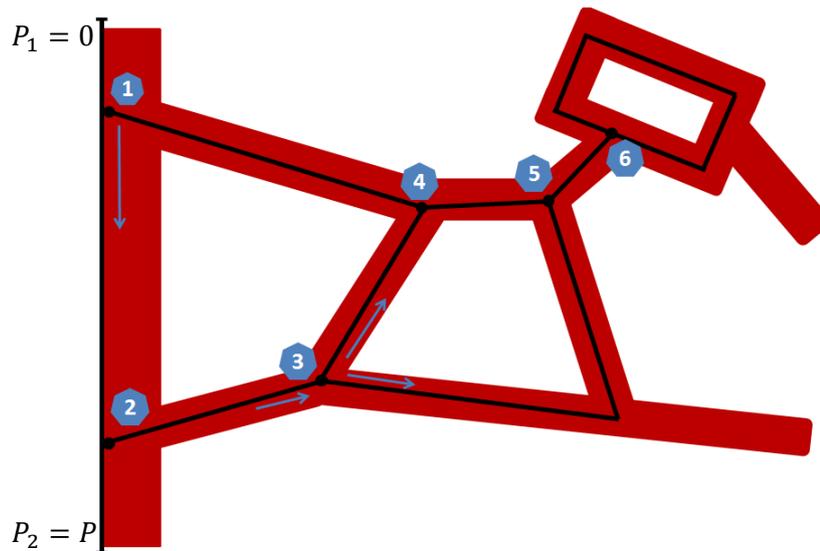


Figura 21 – Modelação do fluxo sanguíneo numa rede capilar aproximada a um circuito elétrico equivalente. A vermelho estão representados os dados de partida, correspondentes à rede vascular em estudo. Estreitamentos consecutivos da rede levam ao chamado esqueleto vascular (a preto), equivalente a uma malha elétrica que permite saber em quais dos troços se verifica corrente sanguínea. Esta corrente é promovida por uma diferença de pressão, $P_2 - P_1$, mantida pela atividade mecânica do coração. Durante os cálculos matemáticos são determinados os nodos da malha (numerados de 1 a 6) e definidas ligações entre eles.

O processo de extração do esqueleto inicia-se com a construção de uma lista *bound*, onde são gravados pontos que fazem parte da rede e mais concretamente da sua fronteira. Enquanto existirem pontos-fronteira nessa lista, é escolhido aleatoriamente um deles para se estudar. Os pontos cuja soma do valor dos seus quatro vizinhos corresponder a -4 são pontos isolados, não devendo ser ponderados como pontos de possível passagem de sangue. À semelhança desta situação, também os pontos com apenas um vizinho, ou dois vizinhos não opostos e ligados entre si por intermédio de outro, não devem continuar a ser pontos da malha que determina o fluxo sanguíneo. Para além destes casos, também não são admitidos para o esqueleto os pontos que apresentem três dos seus vizinhos pertencentes à rede e não são nodos (ver Figura 22).

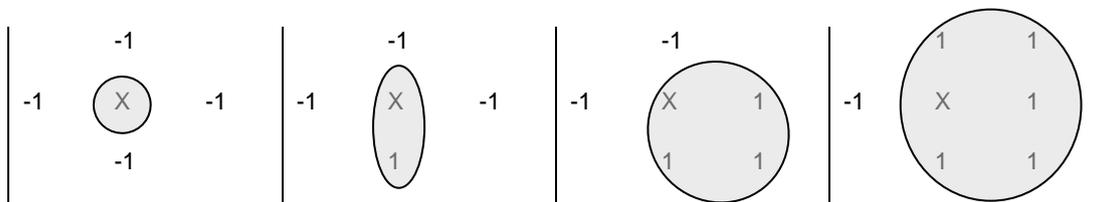


Figura 22 – Mecanismo de ação de *thin* para remoção de pontos não previstos no esqueleto vascular (da esquerda para a direita): ponto isolado; ponto com único vizinho pertencente à rede; ponto com dois vizinhos para os quais $\phi = 1$ não opostos mas ligados entre si por intermédio de outro; ponto não-nodo com 3 vizinhos pertencentes à rede. A azul estão representados os pontos pertencentes à rede capilar, onde $\phi = 1$.

A detecção de qualquer um dos quatro casos referidos na Figura 22 culmina na remoção do ponto em questão da matriz de *output* e da lista dos pontos-fronteira a estudar. A lista *bound* é atualizada a cada iteração, pois a cada remoção feita podem haver pontos adjacentes a tornar-se fronteira. Este método iterativo leva à redução da rede capilar a um conjunto de pontos em que $\phi = -1$. O resultado de todos estes cálculos está representado na Figura 21 pelo esqueleto negro.

Assim, vê-se resolvido o problema da contribuição das pontas capilares em crescimento para a oxigenação dos tecidos, faltando apenas a resolução dos casos de *loop* sem retorno, como aquele apresentado desde o ponto 5 da Figura 21. Neste contexto, torna-se fulcral o conhecimento dos pontos de interseção entre os segmentos de reta que compõem o esqueleto e que correspondem aos nodos da malha elétrica equivalente do sistema. Na Figura 21, os nodos estão definidos por um número que os identifica, à semelhança do que acontece na rotina *nodos* do programa.

Neste, são considerados dois tipos de estruturas que definem os nodos e as suas ligações (os segmentos de reta entre dois nodos consecutivos). Cada nodo é composto da sua posição x , posição y e de um vetor que, para cada ligação em que está envolvido, guarda a informação acerca de qual dos seus pontos vizinhos segue a ligação. Por sua vez, a estrutura que define a ligação é constituída por seis componentes: os nodos inicial e final, o comprimento e diâmetro da ligação, o valor de intensidade de corrente e um *array* que mantém informação relativa a qual dos seus nodos possui o maior potencial e se a ligação atravessa uma fronteira do sistema.

A determinação dos nodos da malha em si é um processo muito simples. São procurados, de entre todos os pontos do esqueleto, aqueles cuja soma do valor dos seus quatro vizinhos é positiva e não nula. Ora, isto significa que pelo menos três dos seus vizinhos pertencem à rede, fazendo dele um nodo. Todavia, a passagem de sangue no capilar principal não é posta em questão, acontecendo que a linha representativa não integra os cálculos de uma forma direta. Assim, os nodos que representam o início das ramificações estão na posição x imediatamente seguinte à desta linha. Tal facto leva à consideração de uma exceção na determinação destes nodos (nodos 1 e 2 da Figura 21), que possuem apenas dois vizinhos.

Conhecidos os nodos do sistema, é invocada uma rotina chamada *junta*, cuja função é o estabelecimento de ligações entre todos os nodos encontrados. O que faz desta rotina um processo extremamente complexo são as condições de fronteira segundo OY .

Inicialmente parte-se de um nodo para um vizinho seu que também pertença ao esqueleto e que pode ou não ser outro nodo. No caso de não ser, a rotina verifica qual dos seus vizinhos (que não o de partida) pertence ao esqueleto e confirma se é um nodo. A verificação é sucessiva até que seja encontrado um vizinho-nodo, nomeado nodo de finalização.

Desta forma é percorrido integralmente cada ramo da malha, sendo estabelecida uma nova ligação, descrita pelo nodo inicial e final e pelo seu comprimento total (incrementado de uma unidade sempre que ao percorrer a ligação for encontrado um vizinho que não é nodo). No esquema da Figura 21 resultariam sete ligações, considerando que a linha de fluxo no capilar principal não contribui para a contagem.

A dificuldade desta rotina está no tratamento dos casos onde houve transposição da fronteira horizontal pelo esqueleto. A técnica usada para condições de fronteira periódicas segundo OY é a replicação de matrizes, através da qual se é estudado o sentido pelo qual se deu a transposição (pela parte inferior ou superior da matriz principal). Esta conclusão é fundamental para a determinação do sentido da corrente sanguínea, através da aplicação das Leis de Kirchhoff em aproximação ao escoamento de Poiseuille.

Não surpreendentemente, o que gera o fluxo de um fluido é a diferença de pressão, existindo uma relação muito simples entre as duas quantidades [33]. Quanto maior a diferença de pressão entre dois pontos, maior será a taxa de fluxo Q . Esta relação é representada pela seguinte expressão:

$$Q = \frac{P_2 - P_1}{R}, \quad (7)$$

em que P_1 e P_2 caracterizam as pressões em dois pontos, como por exemplo as extremidades do tubo por onde circula o fluido e R é a resistência ao fluxo. Esta quantidade depende do comprimento e raio do tubo e da viscosidade dinâmica do fluido. Assim, e segundo Poiseuille, a resistência R do fluxo laminar de um fluido incompressível com viscosidade η através de um tubo uniforme de raio r e comprimento L , é dada pela Equação:

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}. \quad (8)$$

A resistência ao fluxo é, portanto, diretamente proporcional à viscosidade do fluido η e ao comprimento L do tubo, ambos intervenientes diretos na quantidade de atrito criado ao fluido. Por sua vez, o raio r do tubo também afeta a resistência, sendo que quanto maior o raio, muito menor (potência de 4) a resistência e conseqüentemente, maior o fluxo [33].

Da fusão das Equações (7) e (8) resulta a Equação (9), a segunda Lei de Poiseuille, que descreve o fluxo laminar Q de um fluido de viscosidade dinâmica η dentro de um tubo cilíndrico de raio r e comprimento L , sujeito a um gradiente de pressão externa e constante ΔP .

$$Q = \frac{\Delta P \pi r^4}{8\eta L}. \quad (9)$$

O escoamento do sangue através dos vasos capilares é um exemplo de aplicação desta igualdade, onde ΔP corresponde ao gradiente de pressão criado e mantido pelo batimento cardíaco e r e L correspondem ao raio e comprimento do tubo capilar, respetivamente [33]. Os vasos capilares não apresentam todos o mesmo raio nem comprimento, sendo característico de cada um deles um valor de fluxo específico. Para determinar o fluxo sanguíneo em cada ramo da rede capilar é necessário ter em consideração o seu raio, comprimento e a diferença de pressão em cada extremidade.

No entanto, neste problema só se pretende saber quais os vasos onde passa sangue e não qual o valor exato do caudal. Por essa razão, não é necessário tomar todos os detalhes do coeficiente de resistência $R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$. No programa, este termo foi substituído simplesmente pelo comprimento do vaso L , já que este valor é um resultado direto da rotina *junta*.

No que diz respeito à aproximação a sistemas elétricos, a Lei de Ohm ($V = RI$), tanto quanto a Lei de Poiseuille em sistemas fluídicos, ilustra um fenómeno de transporte, sendo possível estabelecer uma analogia entre as duas. Em circuitos elétricos, o potencial elétrico V corresponde ao gradiente de pressão ΔP , e a corrente elétrica I é análoga ao fluxo Q dos sistemas fluídicos [33].

Num circuito elétrico, o sentido da corrente gerada pela diferença de potencial dá-se desde o ponto onde a energia potencial é mais baixa para um ponto onde a energia potencial é mais elevada. Uma diferença de potencial constante V é capaz de manter, num circuito como o da Figura 23, uma corrente estacionária (equivalente ao fluxo sanguíneo) [34].

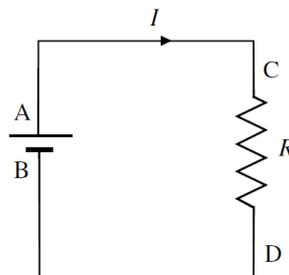


Figura 23 – Circuito elétrico simples. A diferença de potencial entre A e B resulta numa corrente elétrica I , através de uma resistência R . A diferença de potencial entre A e C é nula, assim como entre B e D [34].

A análise dos circuitos elétricos pode fazer-se mediante a consideração de duas leis muito simples, as leis de Kirchhoff [34]:

1. **Lei dos nodos:** a soma das correntes que entram num ponto de um circuito é igual à soma das correntes que dele saem.
2. **Lei da malhas:** a soma de todas as diferenças de potencial, ao longo de um percurso fechado qualquer, num circuito é nula.

A Figura 24 representa um nodo de um circuito para onde convergem e de onde divergem correntes. De acordo com a lei dos nodos, $I_1 + I_4 = I_2 + I_3$ [34].

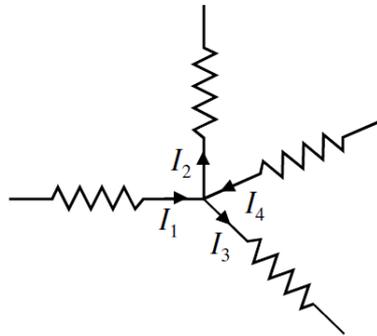


Figura 24 – Nodo de um circuito para onde convergem as correntes I_1 e I_4 e de onde divergem I_2 e I_3 [34].

De forma semelhante, e ilustrando o caso concreto do esqueleto vascular da Figura 21, obtém-se para o nodo 3:

$$I_{23} = I_{34} - I_{35}, \quad (10)$$

de onde, por aplicação da Lei de Ohm, se obtém:

$$\begin{aligned} \frac{V_2 - V_3}{R_{23}} &= \frac{V_3 - V_4}{R_{34}} + \frac{V_3 - V_5}{R_{35}} \\ \Leftrightarrow \frac{V_2}{R_{23}} + \frac{V_4}{R_{34}} + \frac{V_5}{R_{35}} - V_3 \left(\frac{1}{R_{23}} + \frac{1}{R_{34}} + \frac{1}{R_{35}} \right) &= 0. \end{aligned} \quad (11)$$

Assim, por analogia com a Lei de Poiseuille, e admitindo que o coeficiente de viscosidade e o raio dos ramos não variam significativamente na rede ($R \propto L$) obtém-se para o nodo 3:

$$\frac{P_2}{L_{23}} + \frac{P_4}{L_{34}} + \frac{P_5}{L_{35}} - P_3 \left(\frac{1}{L_{23}} + \frac{1}{L_{34}} + \frac{1}{L_{35}} \right) = 0. \quad (12)$$

Na Equação (12) L_{ij} representa o comprimento da ligação entre os nodos i e j , determinados anteriormente na rotina *junta*.

Sabendo o potencial (ou pressão), em todos os nodos do esqueleto vascular é possível determinar a corrente sanguínea em cada troço. Para o efeito existe uma rotina que escreve um sistema de equações idênticas à Equação (12) para todos os nodos. Para encontrar a solução do sistema é usado o método da Eliminação de Gauss, resultando na determinação do potencial em todos os nodos (sejam eles dois nodos consecutivos, nodos associados ao capilar principal ou nodos comuns). Os ramos onde a diferença de potencial entre as suas extremidades é nula não admitem circulação sanguínea, resultando na sua remoção do esqueleto.

Todavia, o que viabiliza os resultados correspondentes à modelação do fluxo sanguíneo é a condição que induz o “desaparecimento” das células em hipóxia. Com esse objetivo, impôs-se que a distância d , a que as células em hipóxia se desativam, seja medida desde a linha de fluxo e não desde qualquer ponto pertencente à rede vascular (admitindo que todos os vasos proporcionam uma oxigenação adequada), como antes acontecia.

Conhecendo os vasos onde efetivamente há circulação sanguínea é possível o ajuste da entrega de nutrientes e oxigénio ao tecido, podendo esta transformação levar a uma completa remodelação da rede vascular.

4.3 Sobreposição de ETCs com células em hipóxia

A presença do fluxo sanguíneo no modelo resolve, como esperado, várias situações, desde os eventos de anastomose até à “real” contribuição dos vasos para a oxigenação dos tecidos. No entanto, advieram da sua implementação alguns problemas que não estavam previstos nem antes tinham lugar.

Um deles está relacionado com o facto de as pontas dos capilares em crescimento já não contribuírem para a desativação das fontes quando a distância entre os dois é inferior à de difusão do oxigénio. Assim sendo, e sabendo que as ETCs que guiam as ramificações migram em direção ao gradiente de VEGF (fontes), existem sérios riscos de haver sobreposição das ETCs com as células em hipóxia ativas. Uma vez que o cálculo do gradiente de VEGF é feito no centro da ETC, o facto de esta se sobrepor espacialmente à célula em hipóxia (onde o valor da concentração se mantém fixo) significa que $|\nabla T| = 0$. Consequentemente, a velocidade de migração celular torna-se nula, fazendo com que o capilar pare de se alongar.

Associado a este problema, existe um outro relacionado com o facto de um capilar se tornar descontroladamente mais espesso sempre que está parado e existe uma fonte de VEGF na proximidade. A razão pela qual isto acontece é que, apesar de haver um consumo endotelial contínuo de VEGF (por parte das ESCs), ele nunca se esgota devido à manutenção da sua concentração na fonte, tal como representado na Figura 25. Assim sendo, verifica-se um forte consumo de VEGF a nível endotelial, promovendo a proliferação das ESCs.

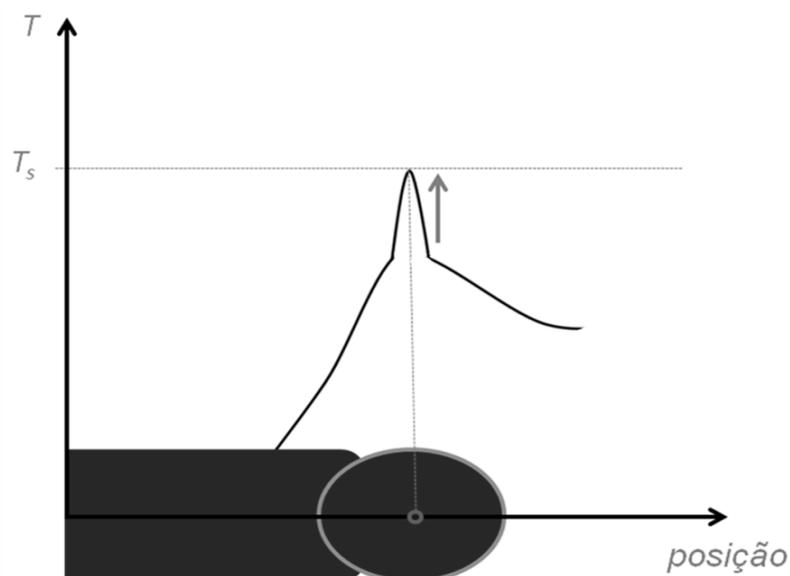


Figura 25 – Concentração de VEGF na vizinhança de uma célula em hipóxia aquando da sua sobreposição por uma ETC capilar. Existe um decréscimo mais acentuado na concentração de VEGF nas zonas onde existem ESCs. A concentração de VEGF mantém-se fixa na fonte.

O problema anteriormente descrito encontra-se visível na Figura 26, na qual se evidencia (através dos círculos a vermelho) a interrupção na migração dos vasos sobrepostos a uma célula em hipóxia. Esta situação verificou-se ser frequente depois da implementação do fluxo sanguíneo pelo que a sua resolução se tornou inadiável.

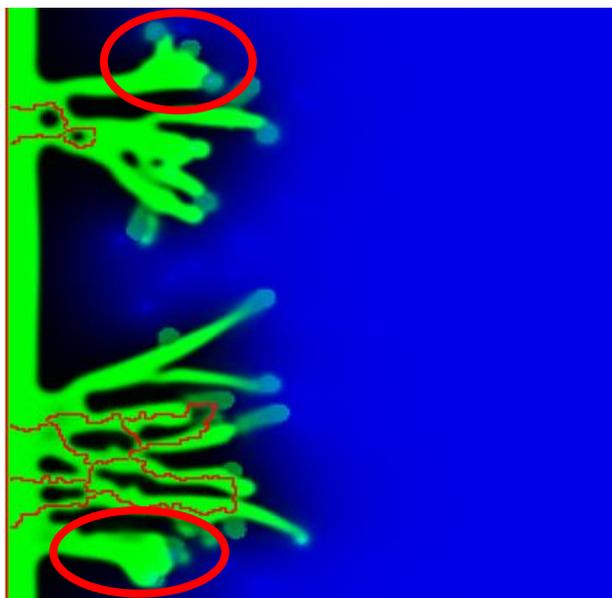


Figura 26 – Rede vascular em crescimento após a implementação do fluxo sanguíneo. Sempre que uma ETC se sobrepõe a uma célula em hipóxia, a sua migração para devido ao gradiente (calculado no centro da ETC) ser nulo. Todavia, o VEGF continua a ter uma concentração máxima na fonte, pelo que o seu consumo a nível endotelial se mantém elevado, levando a um engrossamento evidente dos ramos em questão (círculos vermelhos).

Para resolver o problema propuseram-se algumas soluções, nomeadamente o cálculo da média do gradiente em toda a ETC, de modo a que não fosse o valor de apenas o seu centro a determinar a velocidade de migração. Na realidade, a ETC usa filopódios para testar a vizinhança e obter um valor médio do gradiente de fator angiogénico. Assim, o valor de fator angiogénico em vários pontos, e não só no centro, é o que controla a migração da ETC.

Devido à sua simplicidade de implementação este foi o método ao qual se deu preferência e está representado na Figura 28A.

No entanto, depois de ter sido posto em prática, os resultados mantinham aparentemente os mesmos problemas: os capilares continuavam sobrepostos às fontes de VEGF. Percebeu-se que a causa desta situação era o facto de as ETCs estarem continuamente a ser “criadas” e “mortas”, sem que chegassem a manifestar qualquer movimento. Investigou-se o porquê desta anómala situação e concluiu-se que, apesar de a média do gradiente em toda a ETC ser superior a 0,

era ainda inferior a G_m , o valor mínimo definido para ocorrer ramificação. Ora, este facto deixa comprometida a manutenção do fenótipo de ETC, apesar de ser máxima a concentração de VEGF (T_s). Nesse momento, a célula voltava ao estado de ESC. A concentração de VEGF decaía repentinamente, pois o fator passava a ser consumido a uma taxa muito superior à praticada pelas ETCs. Assim, o gradiente disparava de acordo com a Figura 27, o que constituía condição para que o fenótipo de ETC fosse novamente ativado. Um ciclo entre os eventos de ativação e desativação do fenótipo de ETC não permitiam o movimento da célula.

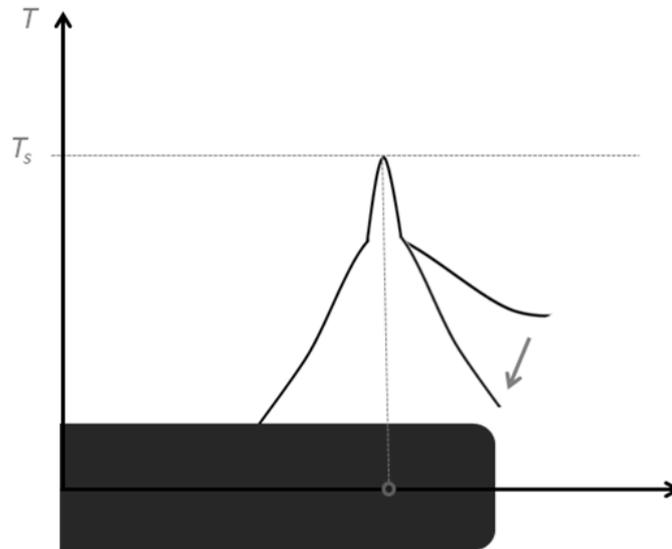


Figura 27 – Queda da concentração de VEGF aquando da perda de fenótipo por parte de uma ETC. O regresso ao estado de ESC representa um aumento abrupto na taxa de consumo de VEGF, provocando um gradiente acentuado de fator e consequente ativação do fenótipo de ETC (passando a verificar-se as duas condições, $T > T_c$ e $|\nabla T| > G_m$).

Neste contexto, torna-se importante relembrar a condição de que para $|\nabla T| < G_m$ a ETC regressa ao estado de ESC, acontecendo que o capilar deixa de ter alguma ETC que o conduza, permanecendo sobreposto à fonte. Assim, para que o cálculo da média do gradiente em toda a ETC pudesse oferecer os resultados esperados, seria necessário reformular também as condições de manutenção de fenótipo de ETC. Por esse motivo, o regresso ao estado de ESC tornou-se exclusivamente dependente da concentração de VEGF, da sua localização nos vasos e da distância mantida em relação às ETCs vizinhas.

No entanto, deixando o gradiente da concentração de VEGF de fazer parte das condições relacionadas com a expressão do fenótipo de ETC, torna-se importante avaliar o seu impacto no cálculo da sua velocidade de migração das ETCs quando $|\nabla T| \leq G_m$. Ora, dependendo ϕ_c da razão entre a taxa de proliferação e da velocidade (Equação (7)), acontece que se $|\nabla T| \leq G_m$, então

$v = 0$ e ϕ_c diverge. Para evitar esta situação, retirou-se a influência de G_m na expressão que determina a velocidade das ETCs de acordo com a Equação (14):

$$\vec{v} = \begin{cases} 0 & \text{se } \nabla T < G_m \\ \chi \nabla T & \text{se } G_m \leq \nabla T < G_M \\ \chi G_M \frac{\nabla T}{G} & \text{se } \nabla T \geq G_M \end{cases} \quad (13)$$

Todas estas modificações fazem sentido, já que o objetivo é o capilar em crescimento não parar de migrar e portanto, para além de manter a célula ativa, mantê-la com velocidade superior a zero. Quanto à expressão de ϕ_c , impôs-se que $|\nabla T|$ seja substituído por G_m para $|\nabla T| = G_m$.

Embora as alterações até aqui tenham sido suficientes para resolver o problema desta secção, outras soluções mais complexas tinham sido pensadas. De entre elas destaca-se a possibilidade de se fazer depender a proliferação celular não só da difusão de fator mas também de forças mecânicas que são exercidas pelas ETCs nas células adjacentes durante a ramificação, um fenómeno que também é observado *in vivo* [35]. Quando a ETC está parada sobre uma célula em hipoxia, a força F (na Figura 28B) é igual a zero, podendo impor-se que a taxa de proliferação α_p dependa não só da concentração de VEGF (T_i) mas também da força exercida. Este seria um bom modo de evitar o engrossamento descontrolado dos capilares.

Para além desta solução, outra ainda foi equacionada, baseando-se esta no conhecimento de que as ETCs também produzem VEGF, tal como representado na Figura 28C [17]. A consideração deste facto no modelo levaria a uma variação na direção de migração de cada ETC por alteração da concentração de VEGF no meio. Desta forma, mais facilmente haveria aproximação entre ETCs, podendo ocorrer eventos de anastomose com mais frequência. A formação de *loops* e passagem de sangue seriam mais prováveis, resultando na diminuição de fontes e da sua sobreposição por parte de ETCs.

Finalmente, uma última solução merece referência. Embora o modelo não considere a possibilidade de duas ETCs estarem juntas por intermédio de filopódios, na Natureza podem efetivamente estar, pelo que uma solução passaria pela implementação desta coexistência. Daqui, resultaria um modelo mais complexo no qual os filopódios das ETCs seriam considerados e através dos quais pode haver comunicação celular ou mesmo interação mecânica, podendo as ETCs puxar-se uma em direção à outra e conduzindo a eventos de anastomose, corrente sanguínea e redução do número de fontes ativas. A Figura 28D ilustra a situação descrita.

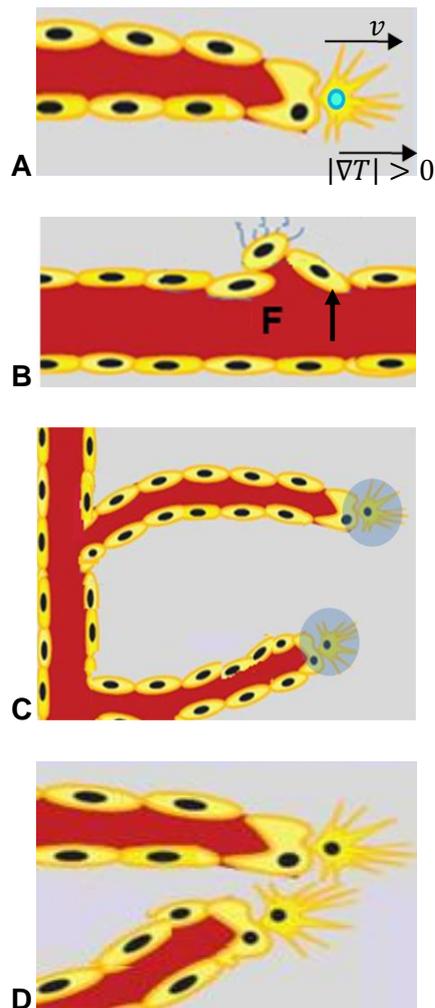


Figura 28 – Ponderações acerca da sobreposição de células em hipoxia por ETCs de capilares em crescimento. **A** – O cálculo do gradiente em todos os pontos da ETC pode resultar em $G > 0$. **B** – A taxa de proliferação celular depende não só da concentração de VEGF (T) mas também da força mecânica F exercida pelas ETC durante a migração. Se a ETC está parada, vem $F = 0$, podendo ser evitado o engrossamento do capilar. **C** – As ETCs, como produtoras de VEGF, propiciam a migração de outras ETCs em sua direção e a formação de anastomoses. A consequente passagem de sangue inativa a produção de VEGF, reduzindo a taxa de proliferação celular. **D** – Contacto entre os filopódios das ETCs pode estar associado a interações mecânicas e comunicação celular, aumentando a probabilidade de anastomose.

4.4 Aproximação do fluxo sanguíneo a vasos onde circula o sangue

O cálculo do gradiente médio nas ETCs em conjunto com a reformulação da condição para manutenção de fenótipo de ETC resolve completamente a interrupção na migração dos vasos sanguíneos, tal como a Figura 29 mostra.

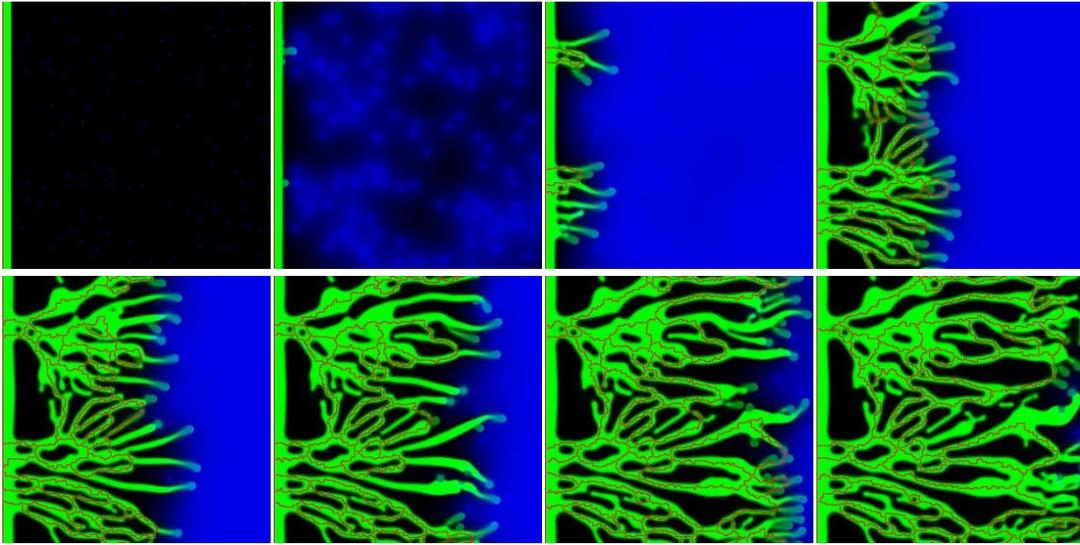


Figura 29 - Sequência de imagens resultantes do programa após as modificações relatadas na secção 4.3. Ao contrário do que acontecia anteriormente, os vasos capilares não interrompem a sua migração assim que se sobrepõem a uma célula em hipóxia. As ETCs são mantidas mesmo que $|\nabla T| < G_m$.

Aparentemente sem mais problemas de maior a resolver, prosseguiu-se para o estudo da influência dos diversos parâmetros no desenvolvimento das redes vasculares. O primeiro intuito foi o de avaliar o impacto das modificações feitas ao modelo por comparação com os resultados do estudo descrito em [8]. Assim, para além da resposta quimiotática e da taxa de proliferação celular, também a concentração de fator angiogénico na fonte (T_s) foi um parâmetro estudado. Em [8], o valor da concentração de fator angiogénico mínimo para ocorrência de ramificação é imposto por $T_{cut} \approx \frac{T_s e^{-1}}{1+d/R_c}$, exceto nas situações em que se pretende avaliar a influência de T_s no desenvolvimento das redes vasculares. Nestes casos, sendo conveniente que T_{cut} não se adapte ao valor definido da concentração na fonte T_s , considera-se válido o uso da expressão $T_{cut} \approx \frac{e^{-1}}{1+d/R_c}$.

Tendo sido usada precisamente a mesma metodologia, observou-se, a partir dos resultados obtidos com diversos valores de T_s testados, que para os mais pequenos a rede vascular se comportava de modo oposto nas situações em que o fluxo era e não considerado. No caso em que o fluxo não era considerado no

modelo, verificou-se, para valores pequenos de T_s , um espessamento acentuado do capilar principal e poucas ou nenhuma ramificação, de acordo com os resultados obtidos em [8]. Sendo baixa a quantidade de VEGF produzida pelas fontes, mais tempo de difusão seria necessário até que fosse perfeita a nível endotelial a concentração exigida para ativação celular. Assim, o resultado obtido faz todo o sentido, já que as fontes se “desligam” a uma distância $d = 20$ desde o capilar e nessa altura ainda não tinha decorrido tempo suficiente para ter sido atingida uma concentração de VEGF suficiente para ativação celular. Como é normal, não havendo células com fenótipo ETC, não se verificam eventos de ramificação capilar.

Reparou-se, no entanto, no comportamento oposto da ramificação da rede vascular para casos em que o fluxo sanguíneo era considerado. Mesmo durante os primeiros instantes temporais, onde a única diferença entre os programas (“com fluxo” e “sem fluxo”) é a passagem de sangue no capilar principal, foram estranhamente verificados vários eventos de ramificação.

Ora, a explicação deste acontecimento foi encontrada na discrepância entre os conceitos de distância usados. No caso em que o fluxo sanguíneo não é considerado, há uma coincidência destes termos que não se verifica depois da implementação do fluxo sanguíneo. Neste último, devem considerar-se como sendo diferentes os conceitos de distância à linha de fluxo (geralmente situada próximo do centro do vaso) e distância ao vaso que o comporta. A Figura 30 ilustra os conceitos de distância a compreender neste contexto. Por um lado, d' governa o desaparecimento das células em hipóxia através do fornecimento de oxigénio pelo fluxo sanguíneo, por outro, d é quem dita o consumo endotelial do fator angiogénico e o desencadeamento das ramificações. Deste modo, sendo d uma distância sempre mais curta que d' , haverá um desaparecimento das células em hipóxia mais tardio que nos casos onde o fluxo sanguíneo não se encontra implementado (e onde $d' = d$).

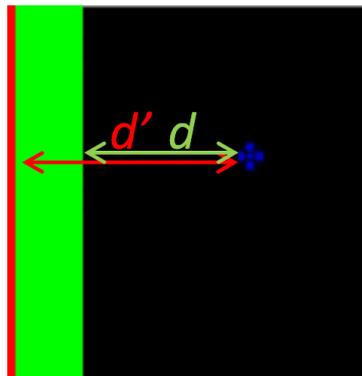


Figura 30 – Distância desde a mesma célula em hipóxia (azul), até ao fluxo sanguíneo (d') e ao vaso capilar correspondente (d). Os capilares para os quais a distância $d = 20$ começam a consumir VEGF e a ramificar quando é atingido o mínimo de concentração. Como $d' > d$, não acontece difusão de oxigénio desde o fluxo nem o consequente desaparecimento das células em hipoxia.

Voltando à análise da rede capilar desenvolvida no caso onde o fluxo sanguíneo era considerado, como as células em hipoxia desapareciam mais tardiamente, havia logicamente mais tempo para proliferação endotelial e para indução de novas ramificações. Assim, tanto os valores de ramificação como do diâmetro capilar médio apresentavam-se incrementados. Concluiu-se, então, que a melhor forma de evitar esta situação seria igualar as distâncias d e d' . Impor que as fontes passassem a desaparecer a uma distância dada por d' a menos de um raio do ramo seria uma tarefa fácil de implementar, mas não muito segura devido à componente aleatória com que é esboçada a linha de fluxo. Em vez disso, optou-se pela transformação do esqueleto vascular que determina a passagem de sangue em vasos onde ele circula. A ideia seria obter o resultado apresentado na Figura 31, onde se representa a passagem de sangue através de uma rede capilar já conhecida (rever Figura 21).

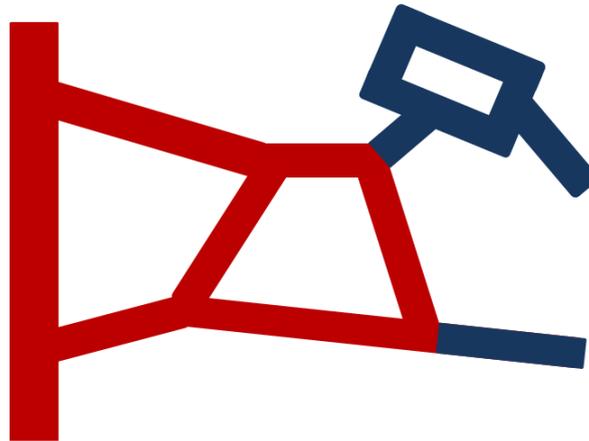


Figura 31 – Resultado esperado da aproximação do esqueleto vascular que determina o fluxo sanguíneo a um vaso com sangue.

O resultado apresentado na Figura 31 torna-se possível pela atribuição dos pontos da rede vascular inicial à linha de fluxo (que no caso atravessa a rede nas zonas a vermelho). Por comparação de todos os pontos entre essa linha e a de um esqueleto completo da rede, tornar-se-iam pontos onde passa sangue aqueles que estivessem à mesma distância dos dois.

Assim, surgiu a necessidade de construir um esqueleto que considerasse não só os circuitos de potencial nulo mas ainda as pontas do capilar em crescimento. Para o efeito, à medida que as ETCs se movimentam na matriz (durante a migração dos capilares), é passada ao programa que calcula o fluxo, uma matriz com as posições correspondentes.

Ora, partindo da rede vascular, os pontos são estudados aleatoriamente um por um e removidos no caso de não verificarem determinadas características (à semelhança da ação de *thin* incluída na secção 4.2 a propósito da criação da linha de fluxo sanguíneo). A diferença, neste caso (chamado *thin1*), está nas tais

características que os pontos devem apresentar para poderem continuar a incorporar o esqueleto vascular. É aqui que a informação acerca dos caminhos seguidos pelas ETCs é importante, tornando-se tudo tão simples quanto “obrigar” o esqueleto a manter esses pontos na sua constituição. Consequentemente todas essas posições por onde passaram as ETCs são ligadas entre si, resultando um esqueleto cujas pontas capilares estão efetivamente consideradas.

No entanto, para além de incluir as pontas, este procedimento gera também a criação de muitas falsas ramificações ao longo dos capilares mais espessos. Uma vez que as ETCs na matriz seguem um trajeto não muito regular (em parte devido à componente aleatória do fluxo sanguíneo) são guardadas posições que à leitura de *thin1* significam a existência de várias ramificações pequenas. Assim, é necessário remover as falsas ramificações criadas, já que o objetivo será comparar o esqueleto que considera as pontas com a linha de fluxo sanguíneo e assim fazer uma atribuição justa dos pontos da rede. Neste caso, para eliminar as falsas ramificações recorreu-se ao cálculo prévio do diâmetro capilar médio da rede, por intermédio da rotina *analyze*. Uma vez que se trata de uma rotina “reaproveitada” do programa de cálculo das ramificações e diâmetro capilar médio, será melhor compreendida no próximo capítulo, dedicado a esse assunto. No entanto, o seu funcionamento geral relaciona-se com o cálculo do diâmetro através da razão entre o número de pontos pertencentes aos vasos e o número total de pontos que formam o esqueleto. Assim, é verificado até que ponto a remoção das ramificações mais pequenas não fazem variar substancialmente o diâmetro capilar médio. As falsas ramificações são assim eliminadas, iterativamente, até que o diâmetro calculado estabilize.

A partir desse momento, é calculada a linha de fluxo sanguíneo como habitualmente, tendo sempre por base o sistema de trabalho anterior. Portanto, pelo processo já descrito na secção 3.2, por análise da vizinhança dos pontos do esqueleto, as pontas dos capilares são removidas, usando a rotina *thin* que é chamada neste processo de *thin2* (para a diferenciar de *thin1*). Com base nas Leis de Kirchhoff em aproximação ao escoamento de Poiseuille, obtém-se um novo esqueleto onde não constam os *loops* de potencial nulo.

Uma representação de todas estas etapas é feita na Figura 32. Todos os sistemas (representados por letras) têm a particularidade de terem sido sempre calculados a partir dos anteriores. Comparando o esqueleto após terem sido removidas as falsas ramificações com o esqueleto que determina os ramos onde efetivamente passa sangue, e conhecendo os pontos de toda a rede vascular de onde se partiu, são determinados os pontos que se localizam mais perto deste último, e onde se deve verificar a passagem de sangue.

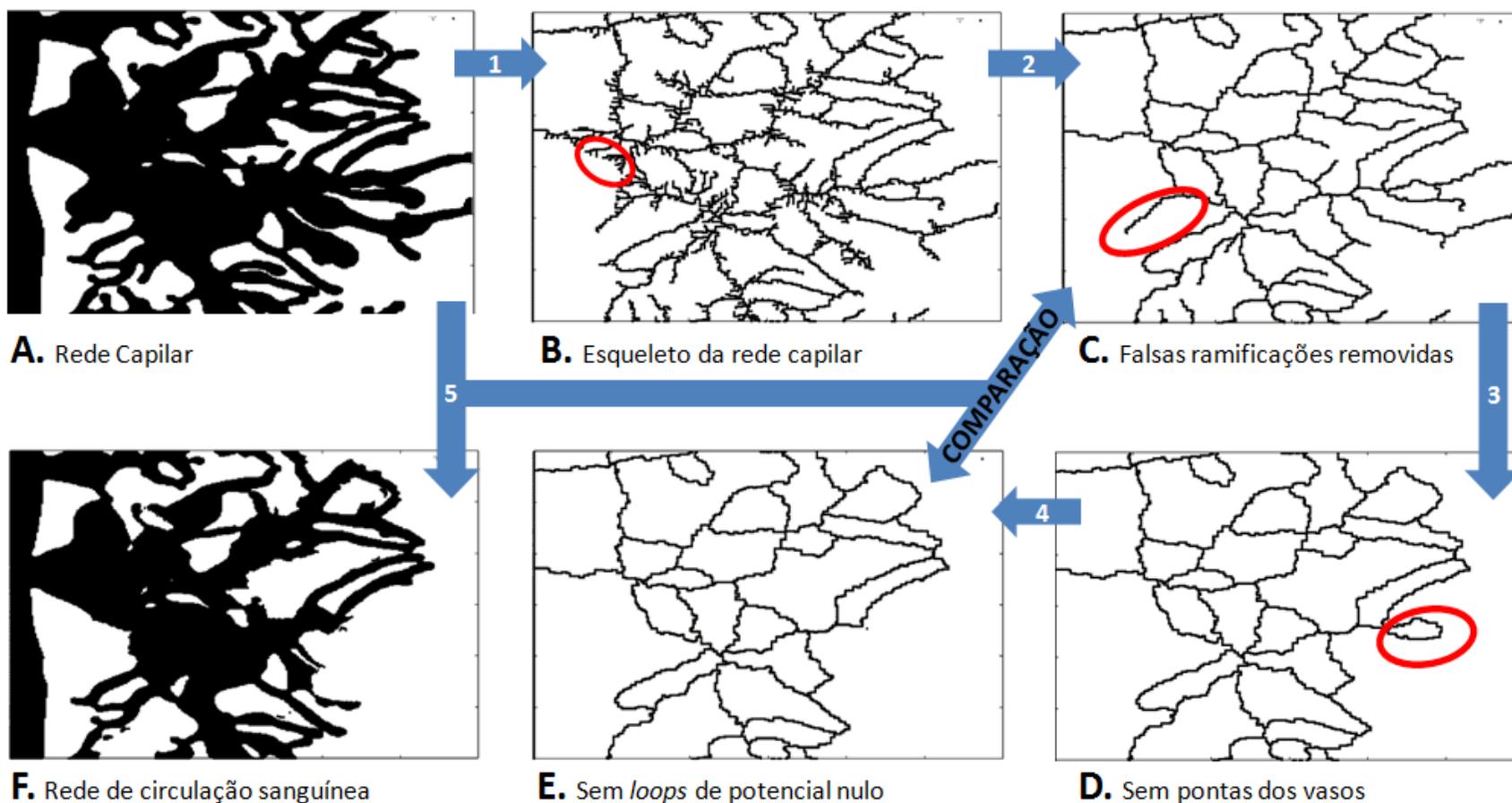


Figura 32 – Etapas da aproximação da linha de fluxo sanguíneo a vasos por onde circula o sangue. Da totalidade da rede capilar **A** é extraído o seu esqueleto completo **B**, por um mecanismo de estreitamento (1 – *thin1*) que mantém no esqueleto os pontos por onde anteriormente passaram as ETCs. Por atenuação das falsas ramificações (2 – *analyze*) observadas em **B** obtém-se **C**, um esqueleto “real” da rede capilar. Segundo os procedimentos detalhados na secção 4.2 para extração da linha de fluxo sanguíneo, obtém-se **D**, um esqueleto que (por ação de 3 – *thin2*) não considera as pontas dos capilares em crescimento. Posteriormente surge **E**, a linha de fluxo sanguíneo, que em relação ao esqueleto anterior não considera os *loops* de potencial nulo. Por comparação entre os esqueletos **C** e **E**, é possível determinar quais os pontos de **A** associados a este último, ou seja, aqueles pontos por onde é considerado haver passagem de sangue.

Inicialmente, esta atribuição de pontos com base em distâncias tinha sido implementada por distâncias de todos os pontos da rede a todos os pontos de cada esqueleto, avaliando-se para qual deles a distância era menor. Para otimizar o tempo de processamento aplicou-se uma técnica baseada em quadrados, como explorada no seguinte diagrama de fluxo (Figura 33).

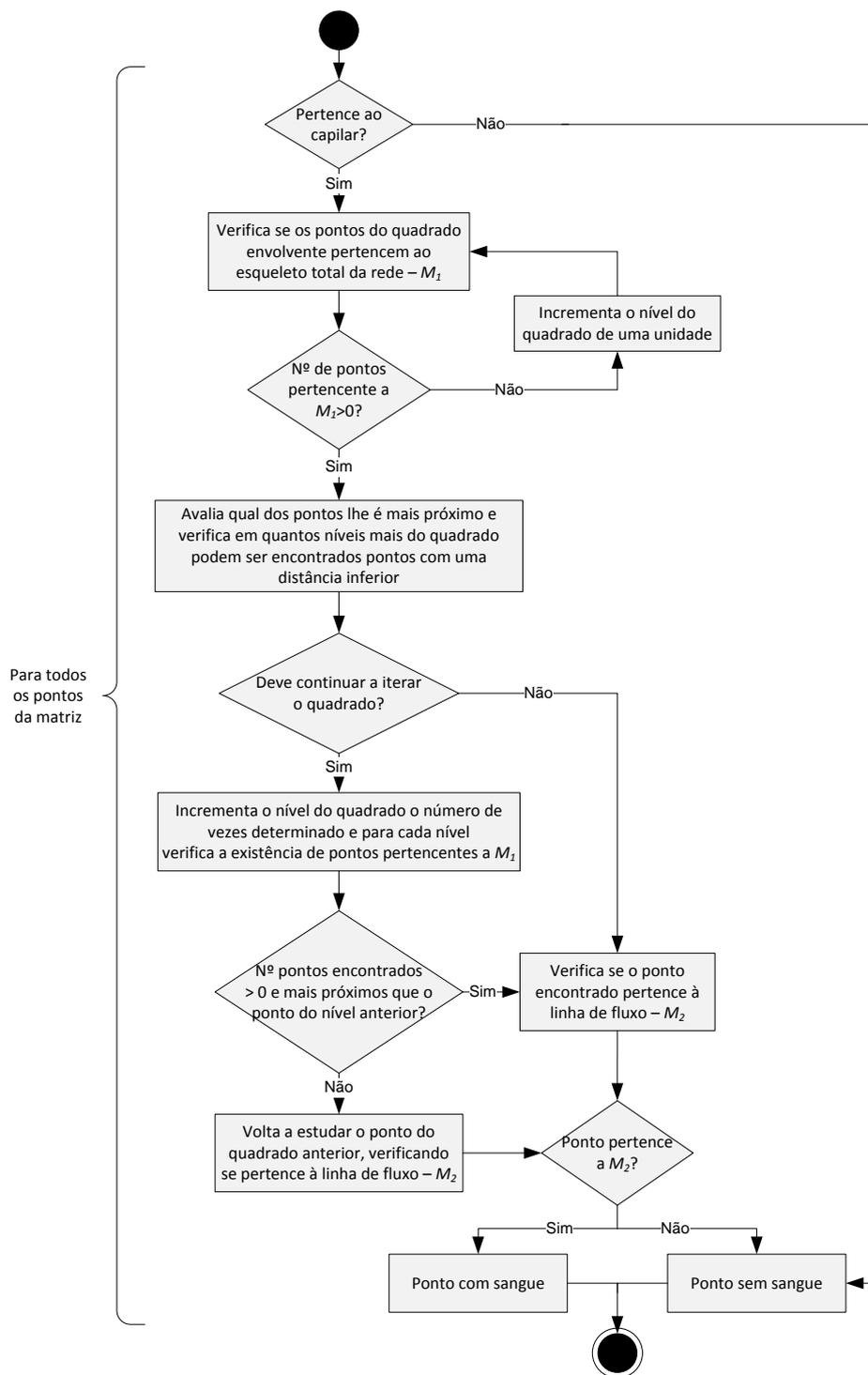


Figura 33 – Diagrama de fluxo da rotina que caracteriza os pontos da rede como sendo ou não pertencentes a um vaso com sangue.

Partindo-se de um ponto da rede capilar, é verificado se num quadrado de comprimento $2l + 1$ que o envolve existe algum ponto do esqueleto maior (M_1). No caso afirmativo, se esse ponto também verifica $\phi' = 1$ na matriz da linha de fluxo (M_2), significa que o ponto dista do mesmo valor dos dois esqueletos. É concluído então que esse ponto corresponde a um vaso onde o sangue circula, sendo atribuído ao parâmetro de ordem o valor $\phi' = 1$, que corresponderá a um pixel vermelho nas figuras .ppm. No caso em que o quadrado em estudo não possui nenhum ponto pertencente a nenhum dos esqueletos, é incrementado de uma unidade ($l = l + 1$), até que seja encontrado um ponto pertencente a pelo menos M_1 . Note-se que esta técnica apenas é possível sabendo que os esqueletos são gerados sempre a partir dos anteriores.

Como resultado desta tarefa, obtiveram-se redes vasculares (Figura 34) onde nem sempre os capilares apresentavam uma fase uniforme (completamente com ou sem sangue).

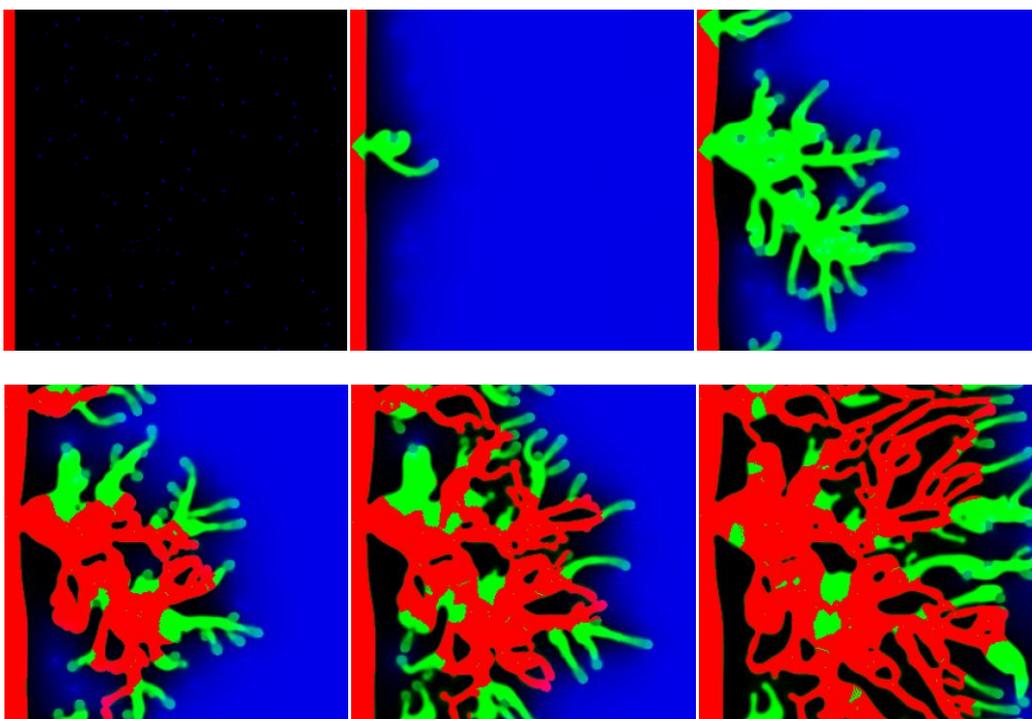


Figura 34 – Primeiros resultados da aproximação do fluxo sanguíneo a um vaso com sangue: rede vascular não uniforme quanto à passagem de sangue nos ramos (a mesma ramificação apresenta regiões verdes e vermelhas).

Esta situação levou a crer na existência de falsas ramificações que a rotina *analyze* não conseguiu resolver, típicas nos vasos demasiado espessos. Assim, sempre que existem pontos do esqueleto resultante da rotina *analyze* extra ao esqueleto obtido pela rotina *thin2* e havendo algum ponto do vaso mais próximo desses do que do esqueleto de *thin2*, é-lhes excluída a passagem de sangue.

Ainda que estas falhas não comprometam significativamente o desaparecimento das fontes (constituindo casos de baixa preocupação), qualquer aperfeiçoamento feito no futuro neste sentido seria bem-vindo. Outros retoques a outras situações indesejadas, como a ilustrada na Figura 35 seriam interessantes de se fazer.

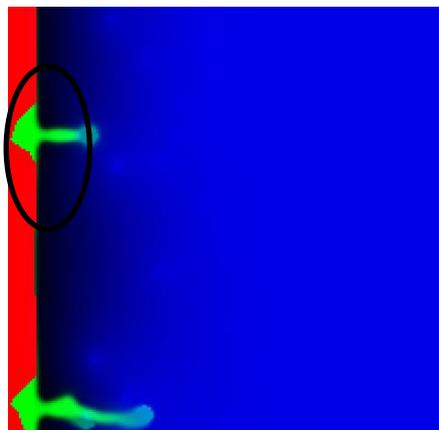


Figura 35 – Aproximação de pontos a um vaso com sangue pode ser aperfeiçoada. A situação ideal prevê que todo o vaso principal conduza sangue oxigenado, mesmo as zonas de onde surge uma ramificação (círculo a preto).

Capítulo 5

Determinação da taxa de ramificação e do diâmetro capilar médio

A ramificação de uma rede vascular é uma medida muito fácil de entender quando se tem presente o conceito de “ligação”.

As ramificações não são mais do que a conexão entre dois nodos distintos, já discutidos na secção 4.2 a propósito da determinação do fluxo sanguíneo. De facto, estes dois programas apresentam alguns conceitos comuns, o que faz com que estejam de certa forma correlacionados. A rotina *analyze* constitui a base do cálculo do diâmetro capilar médio no presente programa, tendo já sido referenciada no contexto da remoção das falsas ramificações necessária à aproximação a vasos com sangue.

Menos intuitiva é a forma como o diâmetro capilar médio é calculado, já que se baseia na razão entre o número total de pontos da rede e o comprimento do seu esqueleto. Para o efeito, recorre-se a uma aproximação dos vasos a retângulos, dos quais se conhece a área e o comprimento e se pretende saber a largura.

Neste contexto as pontas onde não se considera passagem sangue surgem como elementos importantes a considerar no cálculo dos diâmetros. Se assim não fosse, os pontos que pertencem a essas porções de vasos seriam redistribuídos ao longo dos troços adjacentes, incrementando o diâmetro desses vasos. Para evitar que os resultados se tornem enganadores a esse nível, é usado nos cálculos um esqueleto que passa pelos locais onde as ETCs passaram para o fenótipo ESC. Novamente, este processo é semelhante ao que acontece na determinação dos vasos com sangue, com a ressalva de que aqui não há necessidade de sobrecarregar o programa com todas as posições de locais de passagem das ETCs. Isto porque durante a determinação do fluxo é conveniente que mesmo para instantes temporais pequenos exista um registo fidedigno da estrutura capilar. Ao

invés, neste programa os locais de passagem não acrescentam informação ao que já é conhecido dos locais de desativação das ETCs. Desta forma, resulta um esqueleto que inclui as pontas dos capilares em crescimento (bem como, indesejadamente, algumas falsas ramificações sempre que o diâmetro dos vasos é grande).

Outro aspeto que pode tornar os resultados enganadores é a contribuição dos pontos que fazem parte do capilar principal. Uma vez que a linha do esqueleto que o representa não é tida como tal pelo programa, novamente o diâmetro viria aumentado, devido à redistribuição dos seus pontos pelos troços dos vasos secundários. Ainda que para muitos conjuntos de parâmetros essa contribuição seja pouco significativa, para outros que conduzem a um engrossamento elevado do vaso inicial, o diâmetro viria substancialmente aumentado.

A solução mais lógica para resolver esta situação passa pelo corte da porção correspondente ao vaso principal. No entanto, consoante a rede vascular em estudo, a largura do vaso principal é variável, não sendo possível estabelecer um intervalo de corte fixo. O intervalo de corte desde $x = 0$ é então determinado pelo mínimo valor de x em que $\phi = -1$ (fora do vaso), ao qual se acrescenta um valor Δ conveniente de forma a minimizar o impacto de possíveis irregularidades do vaso. Inicialmente, a procura do mínimo valor de x para o qual $\phi = -1$ era feita apenas através da última linha da matriz, podendo acontecer que uma ramificação se estendesse ao longo dessa mesma linha, resultando erradamente no corte de grande parte da informação relevante do sistema.

Para além destes procedimentos, existe ainda neste programa uma rotina *correct* que inclui as direções diagonais no cálculo do comprimento da linha de esqueleto. Esta rotina é responsável pela atenuação das situações de escadaria formada pelo uso exclusivo de uma vizinhança de 4 durante o esboço dos esqueletos. A Figura 36 faz compreender que o diâmetro viria diminuído sem esta modificação, sendo ele o resultado da razão entre o número de pontos que constituem a rede e o número de pontos do seu esqueleto.

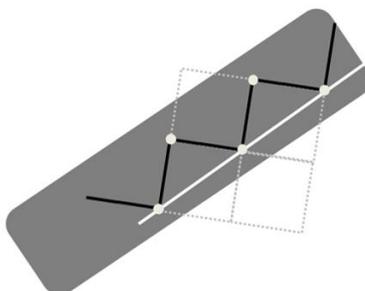


Figura 36 – A rotina *correct* faz uma correção do comprimento do esqueleto (construído segundo uma vizinhança de 4). Admitindo a ramificação a cinzento, e o seu esqueleto a preto, o resultado da correção em tamanho feita por *correct* está representada pela linha a branco. A redução em comprimento do esqueleto é de 2 para $\sqrt{2}$.

Além destas considerações, o diâmetro capilar médio e número de ramificações da rede vascular não são avaliados no mesmo instante temporal para todas as redes, como acontecia inicialmente. Os conjuntos de parâmetros testados produzem redes capilares muito diferentes, sendo necessário avaliar para cada uma delas qual o momento da sua evolução mais justo para estimar as duas quantidades.

Ora, sabendo que a Equação (3) pressupõe a diminuição das interfaces capilares através do termo energético $-\varepsilon \nabla^2 \phi$, facilmente se compreende que, assim que a concentração de VEGF no meio é diminuta, há regressão das ramificações. Tendo sido satisfeitas as necessidades em oxigénio das células em hipóxia, para dado instante temporal variável, é verificado um decréscimo no número de ramificações capilares. Assim, ao longo da evolução de uma rede capilar totalmente formada, é verificado um padrão no seu número de ramificações, sendo que inicialmente aumenta até desaparecerem as fontes e depois começa a decrescer para penalizar as interfaces.

Para fazer uma contagem mais justa do número de ramificações e diâmetro para cada situação (em que a rede evolui a ritmos diferentes), o programa devolve esses dois resultados para o instante temporal em que o número de ramificações é o mais elevado. Considera-se esta a melhor forma de suprimir a incerteza associada ao ritmo de desenvolvimento da rede vascular, caraterístico de cada conjunto de parâmetros de teste.

No seguimento desta alteração, aconteceu que, sendo o diâmetro dado pela razão entre o número de pontos da rede e o comprimento do seu esqueleto, sempre que não é detetado esqueleto algum resulta um diâmetro infinito. Esta situação é típica para instantes de tempo iniciais, onde não há registo de posições da despromoção de ETCs, nem consequentemente esqueleto. Dada a região temporal a que se torna interessante avaliar o diâmetro capilar, foi resolvido que o diâmetro bem como o número de ramificações sejam considerados nulos sempre que não é detetado qualquer esqueleto (instantes de tempo iniciais).

Capítulo 6

Resultados

À semelhança dos estudos levados a cabo por Travasso *et al.* em [8], foram criadas várias combinações de parâmetros para estudar o comportamento da rede vascular formada. Para cada conjunto de *input*, a rede capilar resultante pode ser caracterizada por valores distintos de densidade de ramos e de diâmetro capilar médio.

A taxa de proliferação celular e a resposta quimiotática são dois elementos que se mostraram em [8] muito influentes no padrão vascular formado. Por este motivo, decidiu-se comparar, através da avaliação dos seus efeitos, a performance do programa antes e depois das intervenções que lhe foram feitas. Neste contexto o grande destaque deve ser atribuído à incorporação do fluxo sanguíneo e conseqüente probabilidade de formação de anastomoses, não menosprezando as restantes considerações. Assim sendo, foram realizados estudos entre duas variantes do novo algoritmo, nas quais a totalidade da rede ou apenas os vasos com sangue ditam o desaparecimento do estado de hipóxia celular. Testando o mesmo conjunto de parâmetros de entrada no programa antigo e nas duas variantes do mais recente programa (“sem fluxo” e “com fluxo”), torna-se possível avaliar a significância quer da totalidade das alterações feitas, quer de cada delas individualmente (Figura 37).

A comparação das três versões do programa baseia-se essencialmente na avaliação do diâmetro capilar médio bem como do número de ramificações da rede final, produzida por diversos conjuntos de parâmetros potencialmente influentes. Para cada caso, através do programa descrito no Capítulo 5, mediu-se o diâmetro capilar médio em μm e o número de ramos por mm^2 , sendo que um único ramo compreende o capilar entre dois pontos de ramificação consecutivos. Para além destes juízos, são feitas analogias aos resultados experimentais encontrados na literatura.

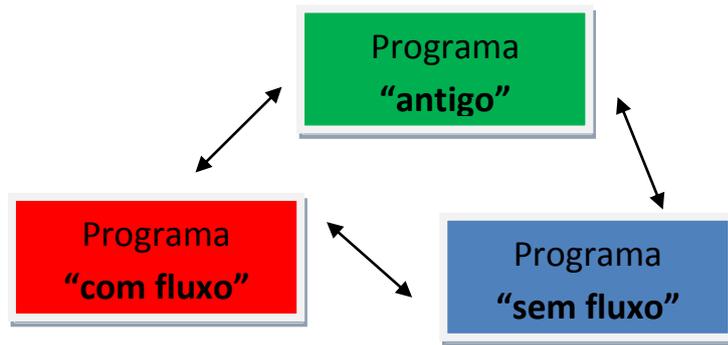


Figura 37 – A comparação de três versões de implementação computacional do modelo de angiogênese serve para avaliar a influência das considerações assumidas em cada uma delas. O programa “antigo” é o implementado em [8], sendo por isso o primordial das três versões. O programa “com fluxo” é o fruto deste projeto, considerando a via de sinalização Delta-Notch, o fluxo sanguíneo e outras alterações mais pequenas. Por último, o programa “sem fluxo” resulta da omissão da implementação do fluxo sanguíneo do programa “com fluxo” e portanto coleciona todas as alterações feitas ao modelo computacional, exceto essa.

Para o efeito foram estudadas vinte amostras de rede, correspondentes a diferentes *seeds* que determinam a aleatoriedade das fontes de VEGF. Apesar de em [8] Travasso *et al.* terem concluído que a disposição das fontes de fator angiogénico não é significativamente influente as medidas de diâmetro e ramificações, resolveu-se ainda assim incrementar (de três para vinte) o número de amostras estudadas no artigo, para minimizar o impacto que possa resultar desse processo. Assim, para que a comparação entre as três versões do programa fosse justa no que toca a esse aspeto (disposição inicial das fontes) foram repetidas as simulações feitas em [8] com o programa “antigo” para as mesmas vinte *seeds* testadas com “sem fluxo” e “com fluxo”.

Assim, para transmitir o comportamento da rede vascular final, calculou-se, para cada valor dos três parâmetros sob estudo (α_p , χ e T_s), a mediana das medidas de diâmetro capilar médio e de densidade de ramificação da rede obtidos nas 20 *seeds*. Representou-se graficamente, para cada um dos três programas, esse valor em função dos parâmetros em análise e atribuiu-se-lhe como incerteza o erro padrão da mediana $\sigma_{mediana} = 1,253 \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$ onde σ representa o desvio padrão. A mediana foi escolhida para tratar estes dados, por se mostrar insensível a *outliers* que possam eventualmente acontecer para determinada disposição inicial das fontes.

De forma a aumentar a legibilidade dos gráficos resultantes, os resultados de cada uma das versões estão representados a cores diferentes, sendo o verde a cor característica do programa “antigo”, o vermelho do programa “com fluxo” e por último, o azul de “sem fluxo”. Estas cores prevêem-se rapidamente interpretáveis já que apenas ao “com fluxo” se associam vasos com sangue (também representado a vermelho nos ficheiros *.ppm*) e se relembra a predominância da cor verde nos resultados de “antigo”.

6.1 Influência da máxima taxa de proliferação celular – por variação de α_p

Em primeiro lugar, variou-se a máxima taxa de proliferação das ESCs ($\alpha_p T_p$), por alteração do valor do parâmetro α_p no modelo. Observou-se, pelas três variantes do algoritmo da angiogénese, que o **aumento da proliferação das células endoteliais leva a um aumento claro da densidade de ramos**. Por sua vez, o diâmetro capilar médio não evolui de um modo tão claro, como se pode averiguar na Figura 38.

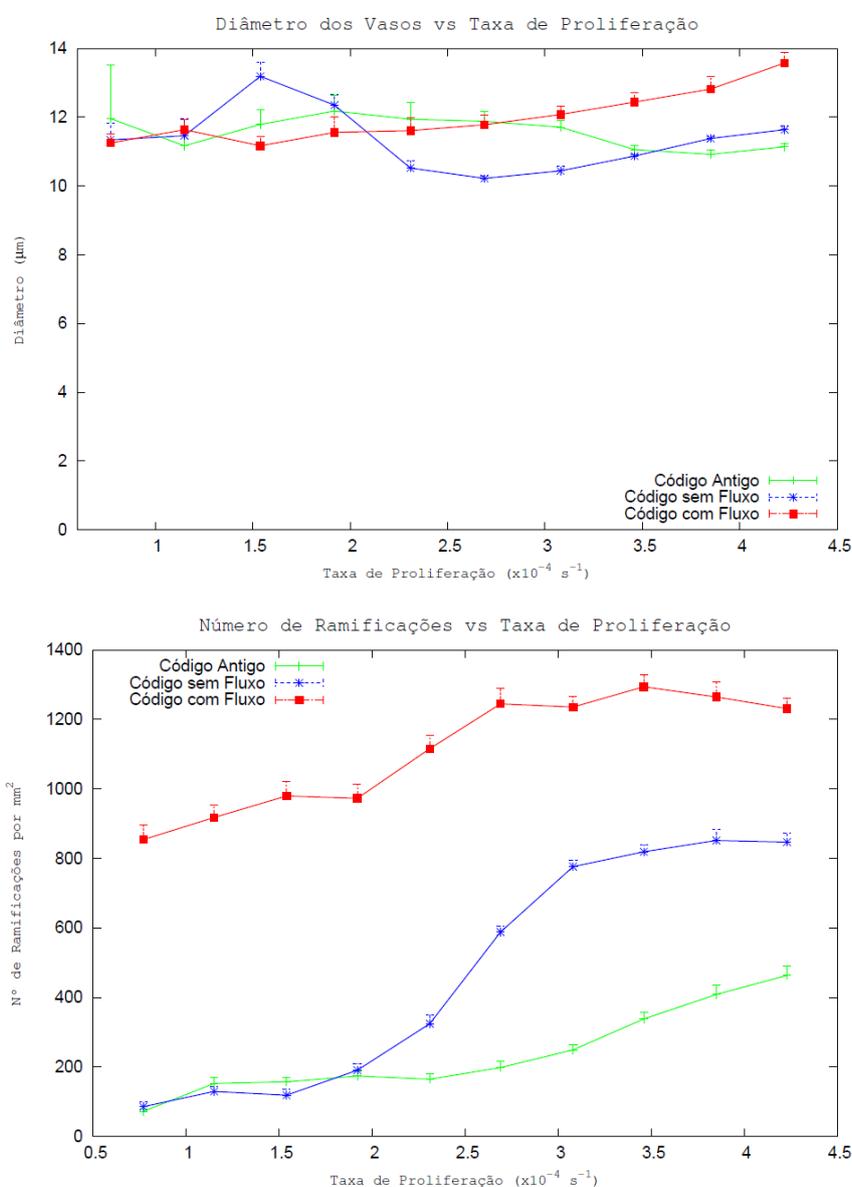


Figura 38 – Evolução geral do diâmetro capilar médio (em cima) e do número de ramificações vasculares (em baixo) resultantes da variação da taxa de proliferação celular ao nível dos três algoritmos – “antigo”, “sem fluxo” e “com fluxo”.

Ao contrário do que era esperado, o programa “antigo” não ofereceu um padrão nitidamente crescente do diâmetro capilar (Figura 39A). Seria de esperar que uma taxa de proliferação baixa por parte das ESCs conduzisse a um diâmetro capilar pequeno devido à menor contribuição do termo $\alpha_p(T)\phi\theta(\phi)$ na Equação (3). No entanto, as figuras 39A e 39B (exemplos típicos de padrões observados para baixas e elevadas taxas de proliferação celular) sugerem o contrário, sendo que para valores de α_p pequenos os vasos capilares apresentam-se extremamente finos.

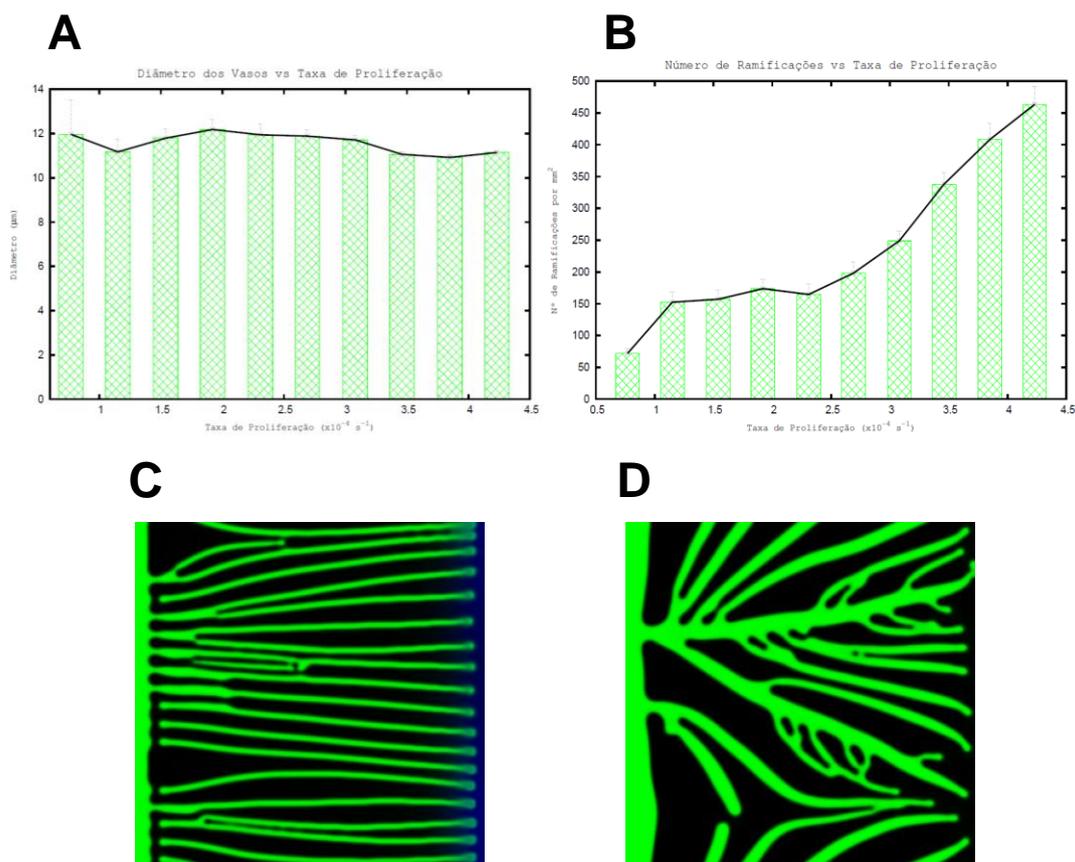


Figura 39 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “antigo” consoante o valor da taxa de proliferação celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de taxas máximas de proliferação celular baixa ($\alpha_p T_p = 0,77 \times 10^{-4} s^{-1}$) e elevada ($\alpha_p T_p = 4,23 \times 10^{-4} s^{-1}$), respetivamente.

Para melhor entender a discrepância entre a informação retirada destas imagens (Figura 39C e Figura 39D) e a informação extraída do gráfico apresentado na Figura 39A, explorou-se em detalhe os resultados intermédios do programa de cálculo. Sabendo-se que o diâmetro depende do número de pontos pertencentes aos vasos e do esqueleto que através deles é traçado, extraiu-se o esqueleto da rede correspondente à rede da Figura 39C relativo ao instante temporal em que o

número de ramificações é máximo (já que é dele que resulta o valor do diâmetro apresentado na Figura 39A). O resultado obtido está representado na Figura 40.

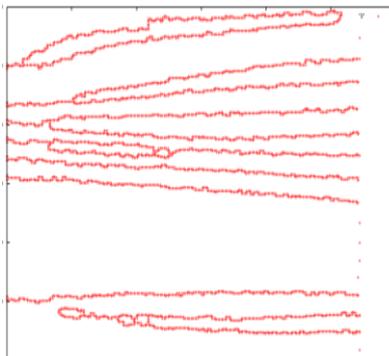


Figura 40 – Esqueleto pelo qual o algoritmo de cálculo do diâmetro capilar médio se baseou para obter o valor de diâmetro correspondente à rede vascular apresentada na Figura 39C.

Como se pode ver pela sua falha central, o esqueleto não abrange todas as ramificações representadas na Figura 39C. A razão pela qual isto acontece é que as ramificações correspondentes, ao contrário do normal, apresentam uma descontinuidade desde o vaso principal. Enquanto cresciam, estas ramificações e o vaso principal perderam a ligação.

A explicação para este facto é que quando a ETC está a puxar o vaso, o valor de ϕ_c é baixo porque o valor de α também o é. Esta situação ocorre principalmente no início, onde o valor de T é baixo também. Logo, quando acontece o rearranjo de ϕ de modo a obter-se $\phi = 1$ dentro do capilar, acontece este "pinching-off" no início dos capilares.

Desta forma, tendo em conta a área capilar (Figura 39C) e o esqueleto (Figura 40) que integra o cálculo do diâmetro médio dessa rede, torna-se compreensível a informação apresentada na Figura 39A, já que também os pontos das ramificações "flutuantes" são redistribuídos pelo esqueleto, incrementando seriamente o diâmetro capilar medio. Por outro lado, como também pela avaliação visual dos ficheiros *.ppm*, é constatado que para valores altos de α_p , essa desconexão das ramificações ao vaso principal não ocorre tão frequentemente, resulta um valor para o diâmetro capilar mais confiável. É de notar ainda, que o tamanho da barra de erro associada ao menor valor de α_p testado (na Figura 39A) traduz uma grande dispersão de resultados para este valor do parâmetro. Posto tudo isto, aceita-se como sendo válida a conclusão de que o diâmetro dos vasos aumenta com a proliferação celular, ainda que o gráfico da Figura 39A transmita a ideia contrária.

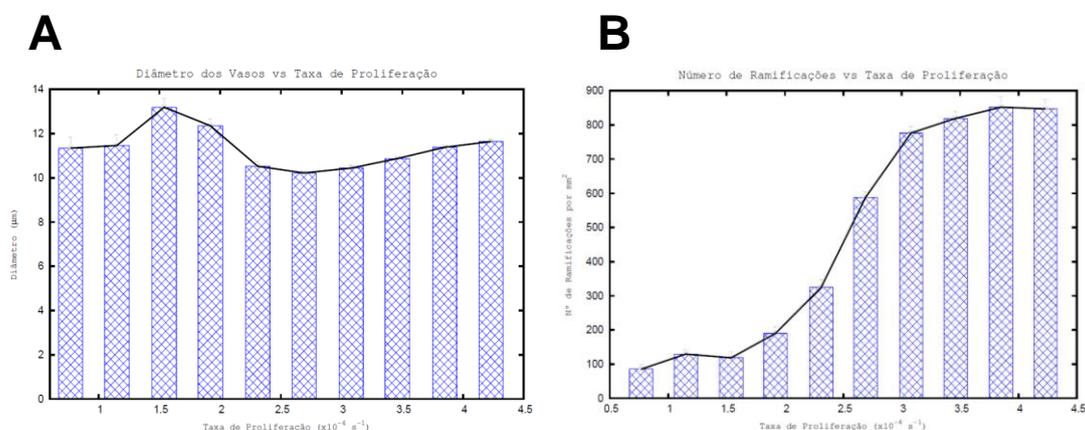
A situação de existirem ramificações desconectadas do vaso principal não está prevista no programa de cálculo do diâmetro, ficando prometida particular atenção a este assunto num próximo trabalho futuro.

Naturalmente, o número de ramificações não é tão afetado por esta falha quanto o diâmetro, pois aqui tem-se em conta o número de ligações do esqueleto e não o número total de pontos que as constituem (este cria um rácio maior quando as ramificações flutuantes são grandes). Assim sendo, o número de ramificações respeita a tendência prevista, verificando-se um crescimento bem demarcado do número de ramificações à medida que a taxa de proliferação celular aumenta (Figura 39B).

Atentando novamente o padrão vascular da Figura 39C, verifica-se que, para valores de α_p muito pequenos, os capilares são tão finos que dificilmente a sua espessura permite a ativação de uma ETC. Sendo assim, para uma taxa de proliferação celular baixa as ramificações estão em menor número relativamente aos casos em que α_p é elevado (ver padrão da Figura 39D). No entanto, relembrando que as ligações desconectadas do vaso principal são mais frequentes para valores menores de α_p e não são contabilizadas no esqueleto, o resultado justo seria uma curva do número de ramificações por taxa de proliferação mais suave que a apresentada na Figura 39B.

De seguida, apresentam-se os resultados relativos ao algoritmo “sem fluxo”, onde novamente se verifica uma curva de diâmetro capilar médio pouco de acordo com o que seria óbvio (Figura 41A): o aumento do diâmetro médio capilar com α_p , jé que o termo de proliferação no modelo corresponde a um aumento da área do vaso por unidade de tempo.

Da mesma forma que no programa “antigo”, também neste caso é possível constatar para taxas de proliferação baixas (Figura 41C) a presença de ramificações que durante a sua evolução se desconectaram do vaso principal. Assim, e da mesma forma que em “antigo”, é encontrada a razão pela qual não é claro na Figura 41A um crescimento do diâmetro dos vasos por aumento da taxa de proliferação das ESCs.



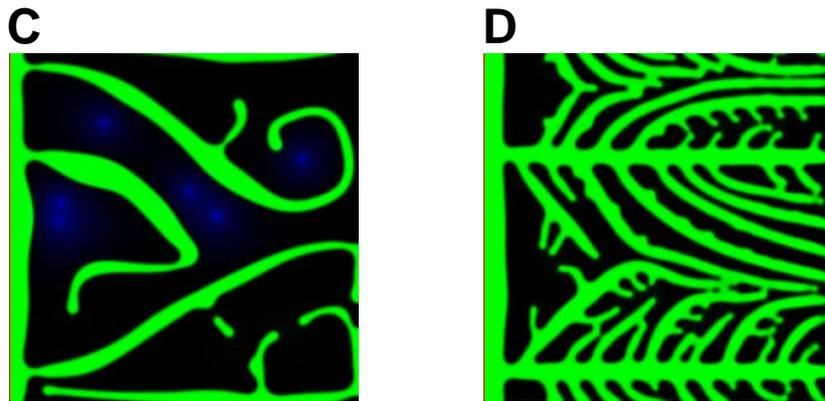


Figura 41 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “sem fluxo” consoante o valor da taxa de proliferação celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de taxas máximas de proliferação celular baixa ($\alpha_p T_p = 1,15 \times 10^{-4} s^{-1}$) e elevada ($\alpha_p T_p = 4,23 \times 10^{-4} s^{-1}$), respetivamente.

Quanto às ramificações, o gráfico da Figura 41B exibe um aumento acentuado no seu número em função do aumento da taxa de proliferação celular. A Figura 41D não deixa margem para dúvidas que quando as ESCs proliferam mais, maior é o número de ramificações da rede resultante.

Neste contexto, é de elevada importância a informação contida na Figura 38, onde são comparados os resultados oferecidos por cada algoritmo. Assim, para o maior valor de α_p testado, verificam-se aproximadamente 450 ramificações por mm^2 , em contraste com os resultados obtidos utilizando o programa “sem fluxo”, onde o número de ramificações atinge sensivelmente o dobro desse valor (800 ramificações por mm^2).

Quanto ao diâmetro, apesar de as quantidades apresentadas não inspirarem confiança para serem retiradas conclusões a partir delas, seria normal que os vários eventos de migração capilar conjunta, típica de valores de α_p elevados, no programa “antigo” produzissem um diâmetro capilar maior que em “sem fluxo”. Como nesta versão do programa a via Delta-Notch é considerada para situações de convergência dos vasos, não é permitido o seguimento de capilares lado a lado (repare-se nos eventos de fusão da Figura 41D), resultando automaticamente num diâmetro capilar médio inferior ao correspondente no programa “antigo”. Assim, é normal que para valores de α_p grandes se obtenham diâmetros ligeiramente menores na Figura 41B quando comparados com os da Figura 39B.

Para melhor compreender a razão de ser deste comportamento imprevisto do diâmetro dos vasos, mais testes serão realizados. A discrepância entre a densidade de vasos criados pelos algoritmos “antigo” e “sem fluxo” também será investigada.

Por último, por análise dos resultados fornecidos pelo programa “com fluxo” é verificado um aumento no diâmetro capilar médio bem como no número de ramificações em função de valores maiores de $\alpha_p T_p$, de acordo com os gráficos da Figura 42 (A e B).

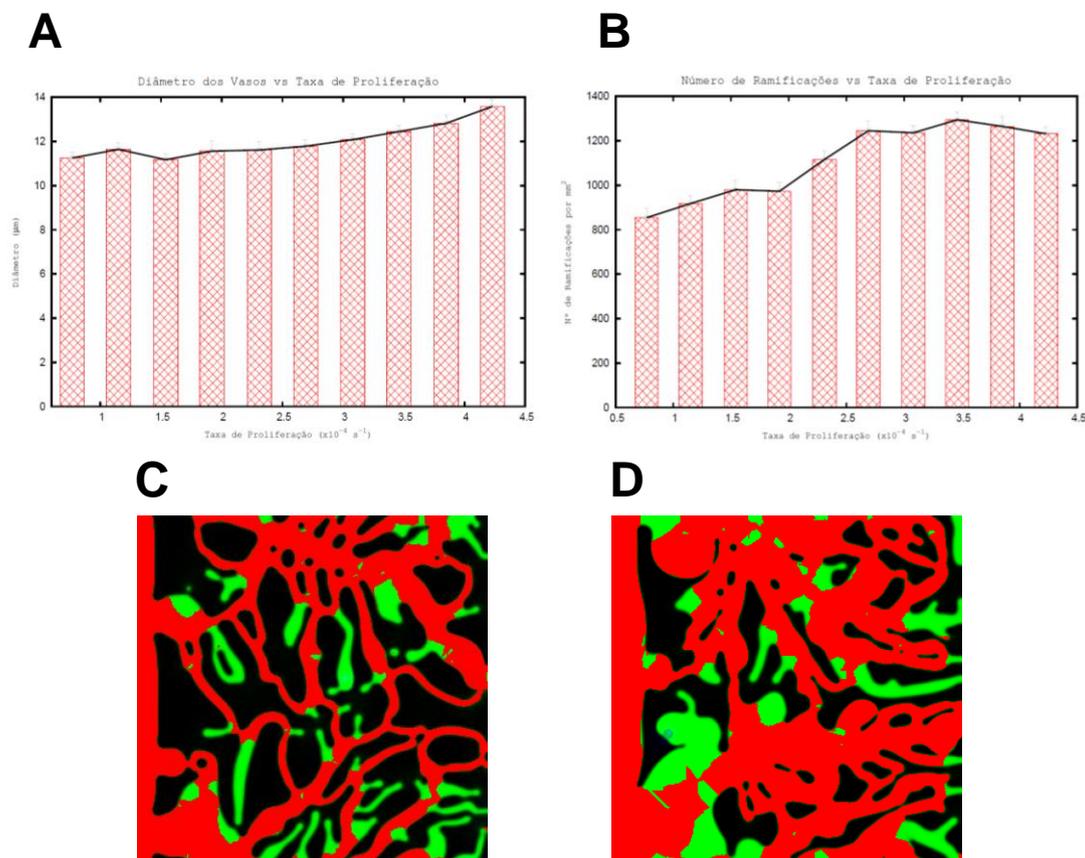


Figura 42 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “com fluxo” consoante o valor da taxa de proliferação celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de taxas máximas de proliferação celular baixa ($\alpha_p T_p = 1,15 \times 10^{-4} s^{-1}$) e elevada ($\alpha_p T_p = 4,23 \times 10^{-4} s^{-1}$), respetivamente.

Neste caso, em que é considerado o fluxo sanguíneo, a célula em hipóxia desaparece mais tardiamente devido à não contribuição de certas zonas capilares para a eficiente oxigenação dos tecidos. É necessário esperar a ocorrência de uma anastomose perto das células em hipóxia para que interrompam a produção de fator. Deste modo, resulta mais tempo para a proliferação das ESCs, para além de que, continuando as fontes de produção ativas por mais tempo, são também ativadas mais ETCs e induzidas mais novas ramificações. Consequentemente, tanto o diâmetro capilar médio quanto o número de ramificações apresentam os maiores valores na Figura 38. Segundo este raciocínio, torna-se normal que ambos os resultados (diâmetro capilar médio e taxa de ramificação) relativos ao programa que considera o fluxo sanguíneo se apresentem maiores que nas situações correspondentes “sem fluxo” e “antigo”, qualquer que seja o estudo em causa.

6.2 Influência da velocidade celular máxima – por variação de χ

A velocidade máxima de migração das ETCs no tecido também foi variada no modelo, desta vez por alteração do valor de χ . Todas as três versões do programa produziram resultados de onde se observam mudanças no padrão vascular, e de entre as quais são dramáticas as do algoritmo que considera o fluxo sanguíneo, como é evidente nos gráficos da Figura 43.

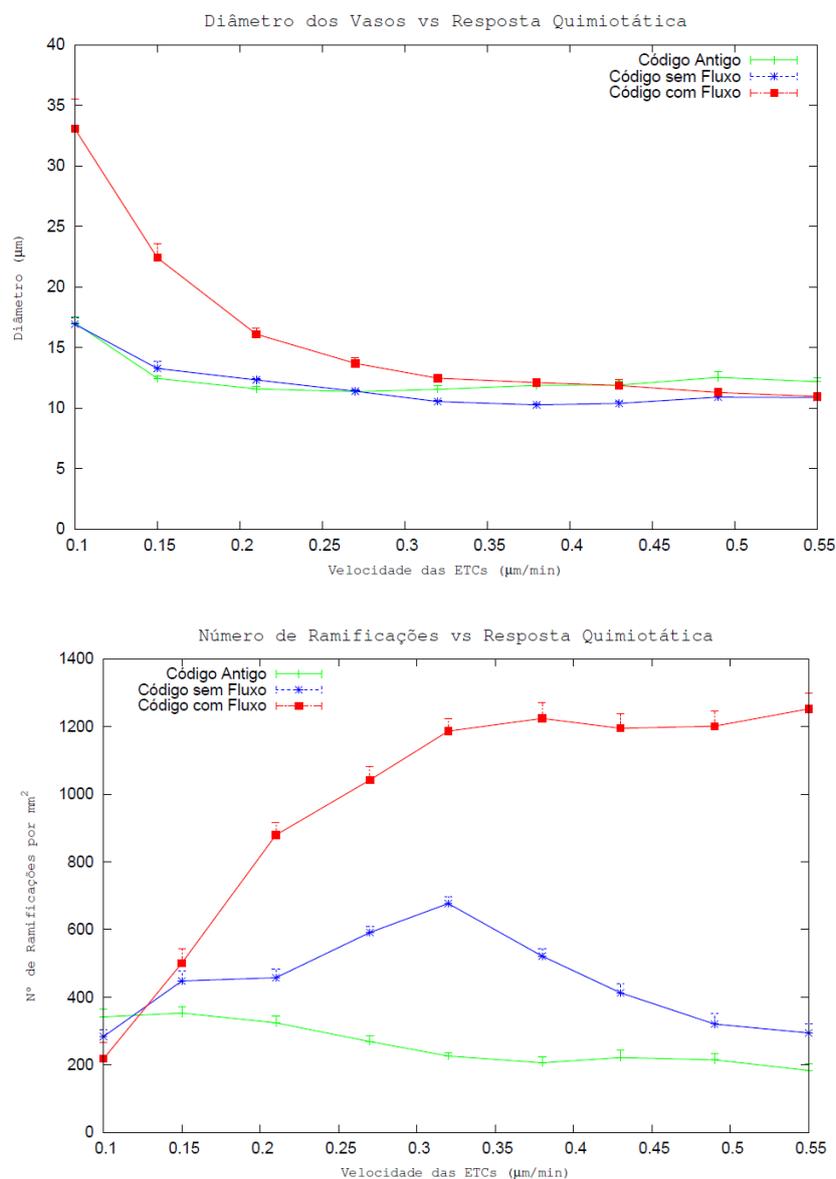


Figura 43 - Evolução geral do diâmetro capilar médio (em cima) e do número de ramificações vasculares (em baixo) resultantes da variação da resposta quimiotática celular ao nível três algoritmos – “antigo”, “sem fluxo” e “com fluxo”.

Para o programa “antigo” verificou-se que, de uma forma geral, **um aumento da velocidade das ETCs conduz a uma rede menos ramificada e cujos vasos têm menor diâmetro** (Figura 44A e Figura 44B). As figuras 44C e 44D apresentam exemplos típicos de padrões observados para baixas e altas velocidades das ETCs. Para uma velocidade máxima baixa (Figura 44C), os vasos são ligeiramente mais grossos e ramificados. Como a ETC se move muito lentamente, mais tarde o vaso se torna próximo da célula em hipóxia, atrasando a difusão do oxigénio até ela. Assim, o tempo de produção de VEGF nas fontes é maior, sendo difundido através da ECM num intervalo de tempo também maior. A sua concentração torna-se conseqüentemente mais alta junto ao capilar. Concentrações elevadas de VEGF levam à ativação de ETCs e ao conseqüentemente aumento do número de ramificações na rede. O tempo decorrido até que as fontes desapareçam é também suficiente à proliferação das ESCs, o que provoca um aumento substancial do diâmetro capilar médio. O contrário se passa para altos valores de χ testados, onde as ETCs se movem rapidamente fazendo desativar a produção de VEGF nas fontes. O tempo torna-se insuficiente quer para difusão de fator até junto do capilar, quer para proliferação das ESCs. Para além disto, para ramificações muito finas, o espaço é limitado para fazer “arrancar” uma ETC (líder da ramificação). O resultado é um número de ramificações e valor de diâmetro capilar médio menores (ver rede da Figura 44D).

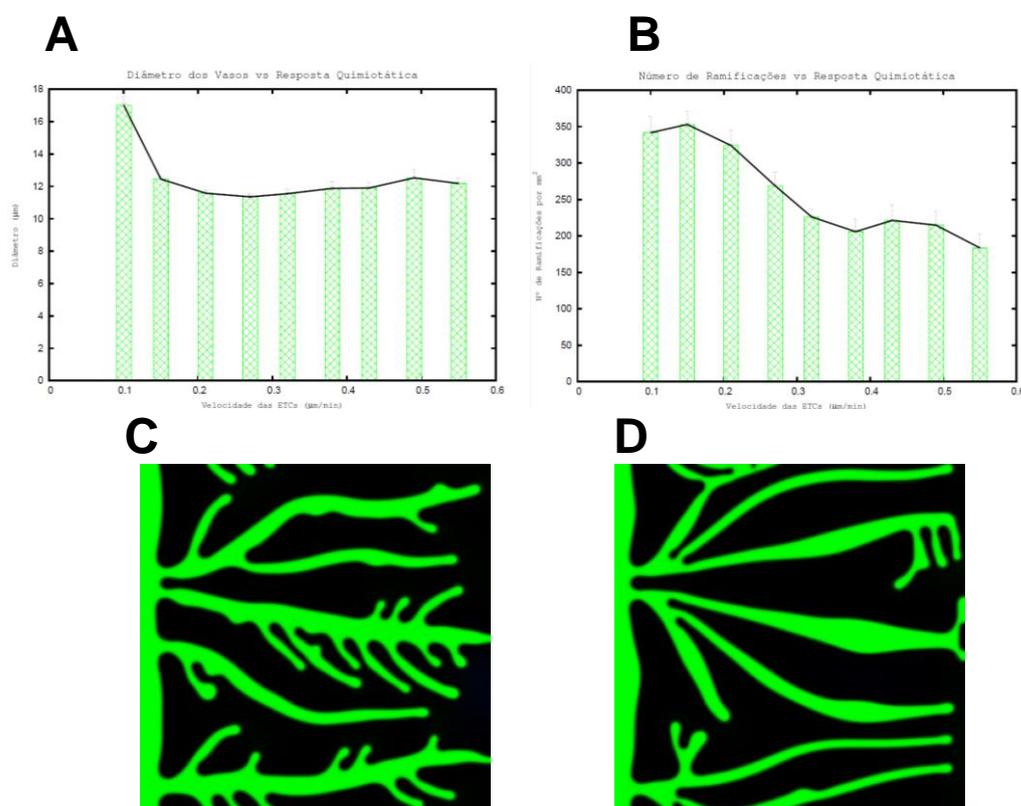
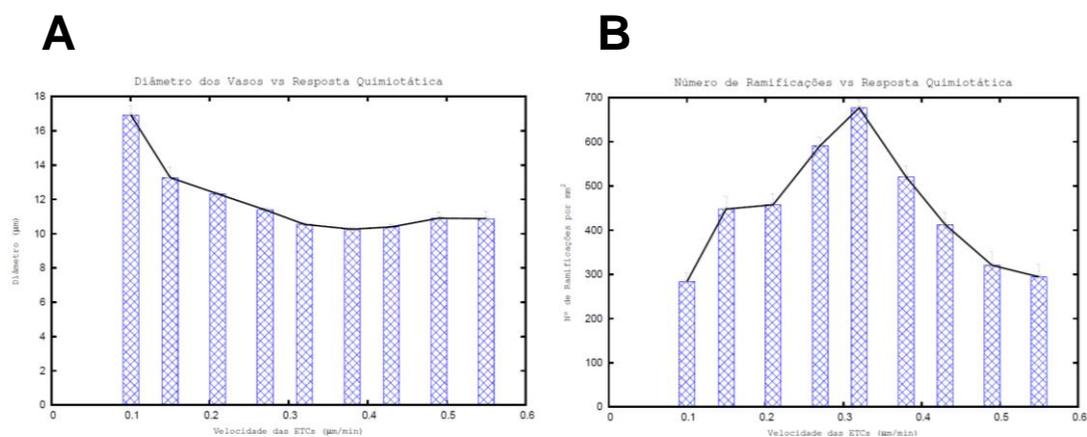


Figura 44 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “antigo” consoante o valor da resposta quimiotática celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de velocidade celular máxima baixa ($\chi G_M = 0,10 \mu m/min$) e elevada ($\chi G_M = 0,55 \mu m/min$), respetivamente.

Do mesmo modo, **também o algoritmo “sem fluxo” resulta em que, para baixos valores de χ das ETCs, o diâmetro dos vasos médio é maior.** Neste caso, as ETCs caminham tão devagar que o tempo é demasiado para ocorrer consumo de fator angiogénico nas ESCs e proliferação. Pelo padrão apresentado na Figura 45C nota-se que os vasos são espessos e a estrutura é moderadamente ramificada. É possível que a concentração de fator em redor do vaso se mantenha inferior à necessária para ativação de ETCs e consequentemente de ramificação.

Ao contrário, elevados valores de χ conduzem a vasos mais finos, sendo que a densidade de vasos não é muito diferente da verificada para velocidades celulares muito baixas (Figura 45D). A este propósito é de notar o pico de ramificações presente na curva da Figura 45C, que sugere que para valores de velocidade intermédios se verifica o maior número de novos capilares produzidos na rede final. O facto de as ESCs (que constituem a maior parte da área capilar) manterem um consumo elevado para valores de velocidade de migração vascular pequenos, explica que a concentração de VEGF junto ao capilar mais dificilmente atinja um valor mínimo para ativar as ETCs. Por sua vez, sendo a velocidade celular muito elevada, rapidamente é interrompida a difusão de VEGF, não havendo tempo suficiente para difusão de VEGF até ao capilar, resultando também num número de novos ramos pequeno.

No entanto, apesar de terem sido encontradas ligeiras diferenças no comportamento das redes produzidas pelo algoritmo “antigo” e pelo “sem fluxo”, essas diferenças tornam-se mínimas por análise da Figura 43. De facto, comparativamente aos resultados apresentados pelas redes onde é considerado o fluxo, estes dois algoritmos apresentam resultados muito semelhantes, especialmente os relativos ao diâmetro capilar. Conclui-se então que, tal como se previa, **as restantes alterações feitas ao modelo não provocam variações significativas no padrão vascular tanto quanto a incorporação do fluxo sanguíneo.**



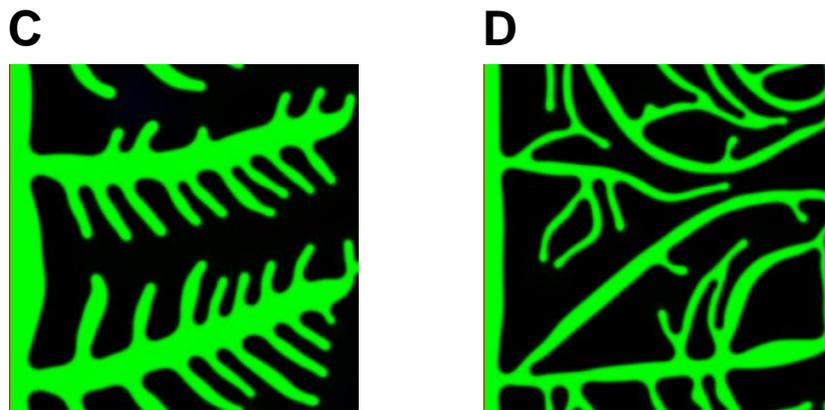


Figura 45 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “sem fluxo” consoante o valor da resposta quimiotática celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de velocidade celular máxima baixa ($\chi G_M = 0,10 \mu m/min$) e elevada ($\chi G_M = 0,55 \mu m/min$), respetivamente.

Quanto ao programa que considera o fluxo sanguíneo, a curva dos diâmetros segue a mesma tendência (decrecente) mas muito mais acentuada que as outras (ver Figura 43). Para valores de velocidade máxima celular baixos, verifica-se uma espessura muito maior dos capilares (sensivelmente o dobro). Tendo presente a formação de anastomoses, sabe-se que nem sempre os vasos contribuem para o desaparecimento do estado de hipoxia, mantendo-se a produção de VEGF por mais tempo relativamente aos outros dois algoritmos. Assim, nesse caso, as ESCs proliferam mais e durante mais tempo que nos outros dois. Para além disso, ao se dilatarem, os vasos estão constantemente a aproximar-se das fontes, mantendo a concentração em seu redor ainda maior. Portanto, é normal que, havendo anastomose, as alterações na forma da rede capilar sejam mais acentuadas à medida que se varia o valor de velocidade celular.

Em relação à ramificação (Figura 46B), também essa é uma curva muito mais acentuada. As redes para as quais os valores de χ são baixos (Figura 46C) apresentam poucos ramos. Tendo em conta o elevadíssimo diâmetro dos vasos, deixa de haver tanto espaço para se ramificarem, além de que o consumo nas ESCs é grande, mantendo uma concentração de VEGF fora do capilar inferior à necessária para ativação celular. Por outro lado, para valores de χ elevados, as redes são muito ramificadas e os seus vasos são finos (Figura 46C). Significa isto que o consumo de VEGF nas ESCs não faz decair de forma significativa a sua concentração no exterior, resultando na ativação de um maior número de ETCs.

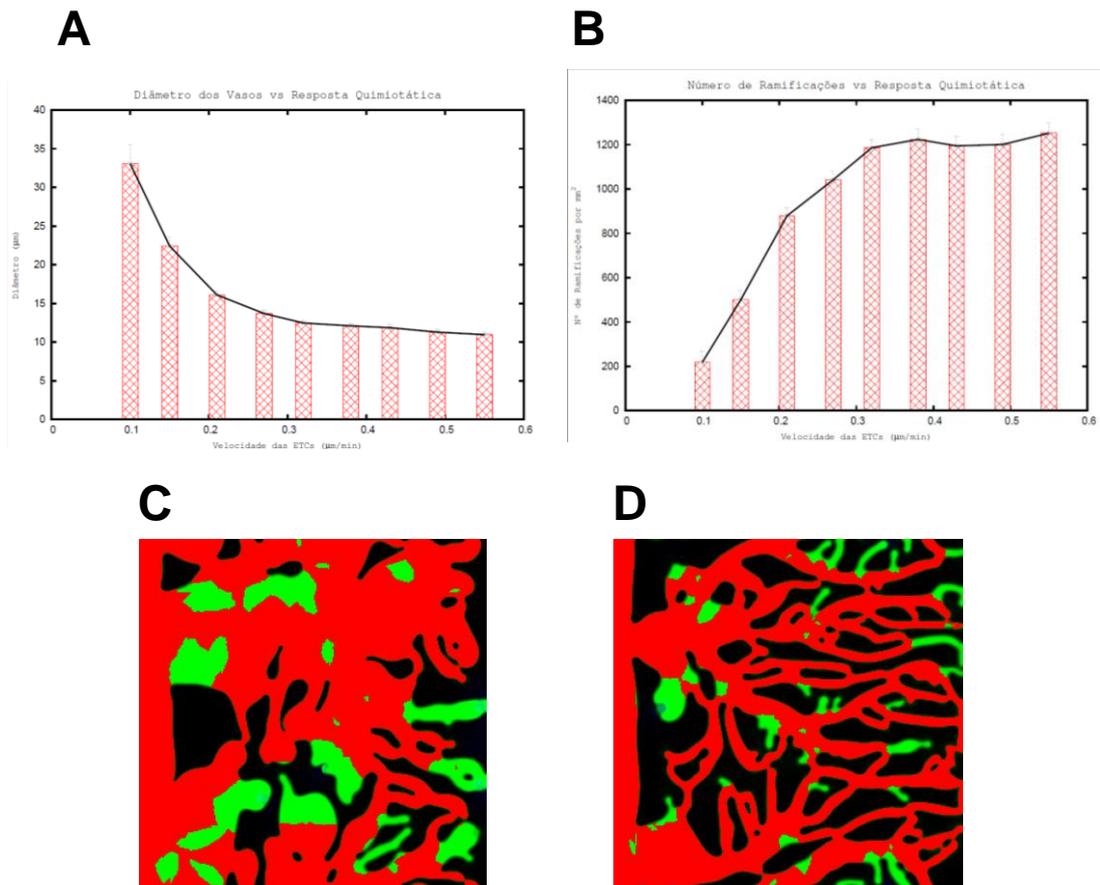


Figura 46 - Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “com fluxo” consoante o valor da resposta quimiotática celular. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de velocidade celular máxima baixa ($\chi G_M = 0,10 \mu\text{m}/\text{min}$) e elevada ($\chi G_M = 0,55 \mu\text{m}/\text{min}$), respetivamente.

A grande conclusão acerca deste estudo é que **a presença de fluxo nas redes contribui para uma intensificação dos padrões observados em ambos os casos em que o fluxo não é considerado**. Entre estes dois últimos, não são relevantes as diferenças na morfologia vascular final, o que realça o impacto da presença do fluxo sanguíneo. Para os mesmos valores de teste, as redes formadas podem ser tão diferentes quanto as apresentadas na Figura 46C e 44C, que representam casos onde o fluxo é e não é considerado, respetivamente.

6.3 Influência da quantidade de fator angiogénico – por variação de T_s

Por último, avaliou-se o impacto no padrão vascular por influência da quantidade de fator angiogénico produzido nas células em hipóxia. Para o efeito, foi simulada a formação de uma rede de vasos capilares na presença de diferentes valores do parâmetro T_s . Para todas as variantes do programa observou-se uma tendência clara tanto na evolução dos diâmetros vasculares como no número de ramificações, de acordo com a Figura 47, sendo que os resultados obtidos através de “com fluxo” atenuam as diferenças entre os outros dois algoritmos.

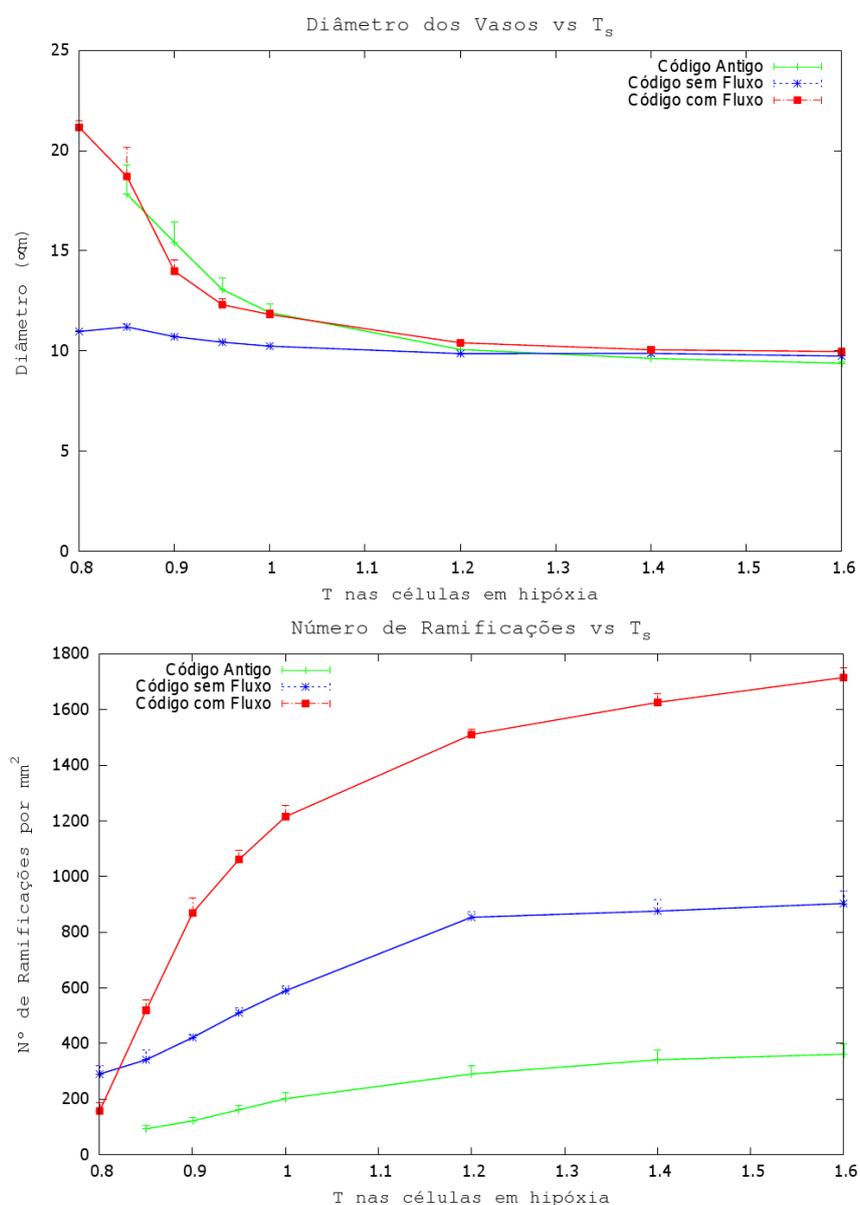
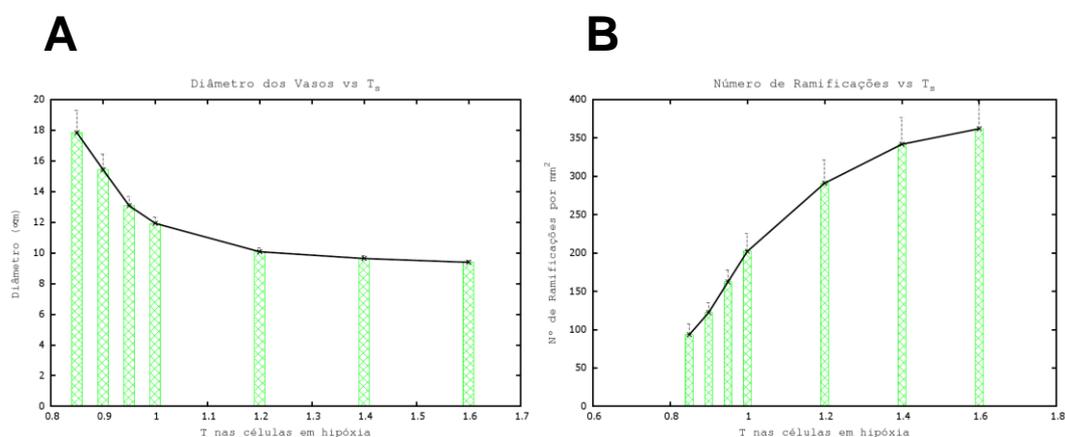


Figura 47 - Evolução geral do diâmetro capilar médio e do número de ramificações vasculares (em baixo) resultantes da variação da concentração de fator angiogénico nas fontes, ao nível dos três algoritmos – “antigo”, “sem fluxo” e “com fluxo”.

Observa-se, para o algoritmo estudado no artigo [8], que **quanto menor for a concentração do fator de crescimento, maior é a escassez de vasos na rede obtida** (Figura 48A). Para além disso, uma evolução calma do sistema leva a que a quantidade de VEGF que chega ao capilar seja praticamente toda consumida pelas ESCs, intensificando a proliferação e provocando o espessamento dos vasos. Contudo, ainda que o VEGF seja praticamente todo consumido, a sua concentração não é alta o suficiente para resultar um engrossamento capilar abismal. Assim, no que diz respeito ao diâmetro dos vasos que crescem por indução de fator produzido em baixas quantidades, eles são espessos mas não demasiado, como se pode verificar pela Figura 48C.

Um padrão oposto, em que os vasos são bastante mais finos e a rede é mais ramificada, é apresentado na Figura 48D. De facto, à medida que se testaram níveis mais altos de fator angiogénico, verificou-se uma brusca diminuição da espessura dos vasos (de notar que o diâmetro varia de entre aproximadamente $\approx 18\mu m$ e $\approx 10\mu m$). No entanto, para além de uma certa concentração de fator angiogénico ($T_s \geq 1$), o diâmetro dos vasos mantém-se praticamente constante, o que comprova uma diminuição desta quantidade ainda mais acentuada para valores pequenos de T_s .

Quanto à densidade de ramos da rede formada, para valores baixos de T_s resulta uma rede vascular com poucos novos vasos, sendo o seu valor tão pequeno quanto for a concentração de fator produzido. Abaixo do valor de teste $T_s \lesssim 0,8$ torna-se muito difícil observar ramificações, já que a evolução do sistema se dá a um ritmo extremamente lento. Este resultado está de acordo com as observações experimentais, na medida em que uma redução severa dos níveis de produção de VEGF-A resulta na ausência de uma rede vascular funcional, podendo inclusive acontecer mortalidade precoce em organismos em desenvolvimento [8].



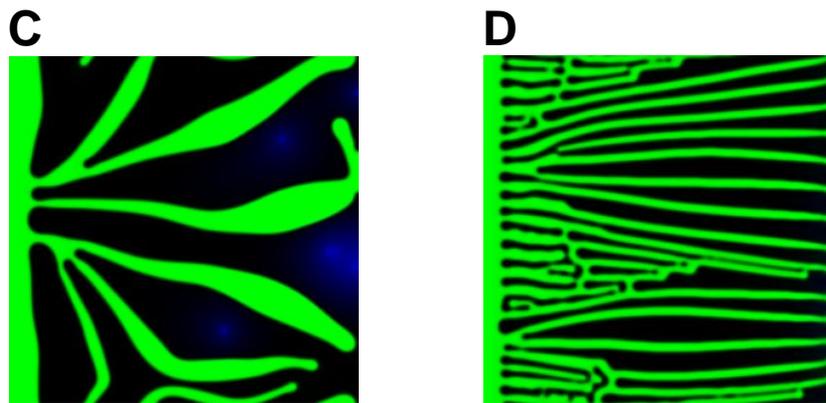


Figura 48 - Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “antigo” consoante o valor da concentração de fator angiogénicos nas fontes. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de uma concentração baixa ($T_s = 0,9$) e elevada ($T_s = 1,6$), respetivamente.

Relativamente aos resultados apresentados, **o programa “sem fluxo” produz redes cuja morfologia se comporta de maneira idêntica ao “antigo”**, consoante se variam os níveis de VEGF produzidos nas fontes. Esta conclusão pode ser investigada através das figuras 49A e 49B. No entanto, importa referir a suavidade com que o diâmetro dos vasos destas redes decai. De facto, pelas figuras 49C e 49D pode afirmar-se que o diâmetro capilar se mantém aproximadamente constante para níveis mínimos e máximos da quantidade de fator produzido testados.

Da análise destes dois padrões é curioso também o espessamento acentuado do capilar principal para níveis baixos de fator nas fontes (Figura 49C). Sublinha-se assim a importância do corte do capilar principal durante o cálculo dos diâmetros, sendo que se esse desconto não fosse considerado resultaria um diâmetro capilar médio superior ao atualmente obtido para valores de concentração de VEGF nas fontes pequeno.

Quanto ao número de ramificações, este evolui com o aumento da produção dos níveis de VEGF a um ritmo crescente, ligeiramente mais acentuado do que nas redes resultantes do programa “antigo” (ver último gráfico da Figura47).

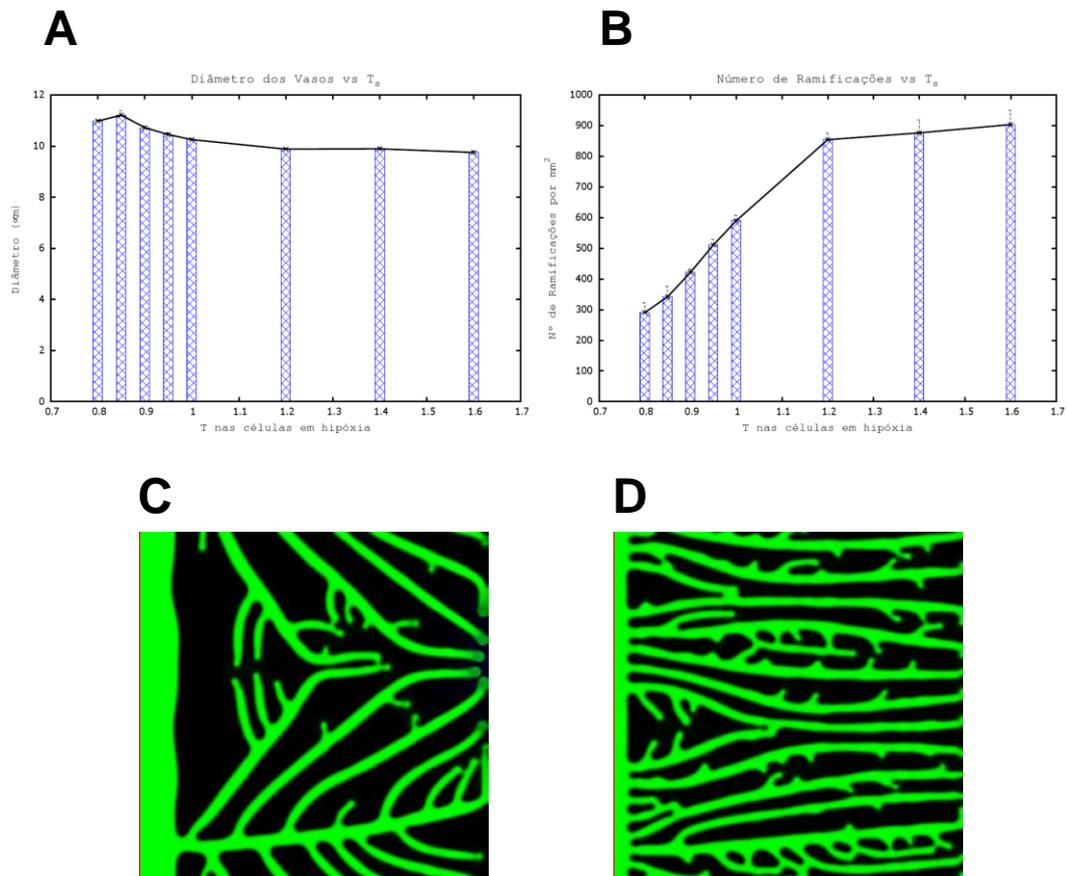


Figura 49 – Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “sem fluxo” consoante o valor da concentração de fator angiogénico nas fontes. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de uma concentração baixa ($T_s = 0,9$) e elevada ($T_s = 1,6$), respetivamente.

Relativamente à consideração de fluxo sanguíneo no modelo, os resultados para a variação da concentração de fator angiogénico mantida nas fontes também se manifestam de um modo mais apelativo. Mais uma vez se está perante uma situação que é influenciada pelo desaparecimento tardio dos estados de hipóxia, desencadeado pela formação de anastomoses e corrente de sangue. Assim, para valores pequenos desta quantidade, geram-se redes com vasos muito espessos (incluindo o capilar principal), semelhantes à apresentada na Figura 50C. Se a quantidade de fator angiogénico nas fontes é pequena, menor é o gradiente criado na ECM e menos ETCs serão ativadas. Resulta daqui um número menor de vasos na rede final. Para além disto, um gradiente pequeno propicia a lenta migração dos vasos em direção às células em hipóxia, acontecendo que mais tempo se dedica ao consumo de fator a nível endotelial e à proliferação celular. Os vasos aumentam de espessura, mais ainda que nas situações correspondentes onde não é

considerado o fluxo sanguíneo, já que o crescimento das pontas capilares não trava essa tendência.

Ao contrário, **valores de T_s elevados conduzem a redes muito ramificadas, onde os vasos são bastante finos**, como se verifica na Figura 50D. Uma migração mais rápida dos vasos (devido ao gradiente de fator) faz com que as pontas capilares rapidamente se posicionem perto das fontes de VEGF, sendo induzida, nesses locais, a ativação de um maior número de ETCs, o que se traduz num maior número de ramificações. Nesse caso, também a proliferação é maior comparativamente à dos outros algoritmos, resultando que na Figura 47, apesar de estar em constante crescimento, a curva relativa à densidade de ramos é sempre superior às dos outros algoritmos. Para níveis elevados de fator, o diâmetro dos vasos resultantes de “com fluxo” não baixa ao nível do dos vasos que não consideram a passagem de sangue, ainda que esta distância não seja muito evidente.

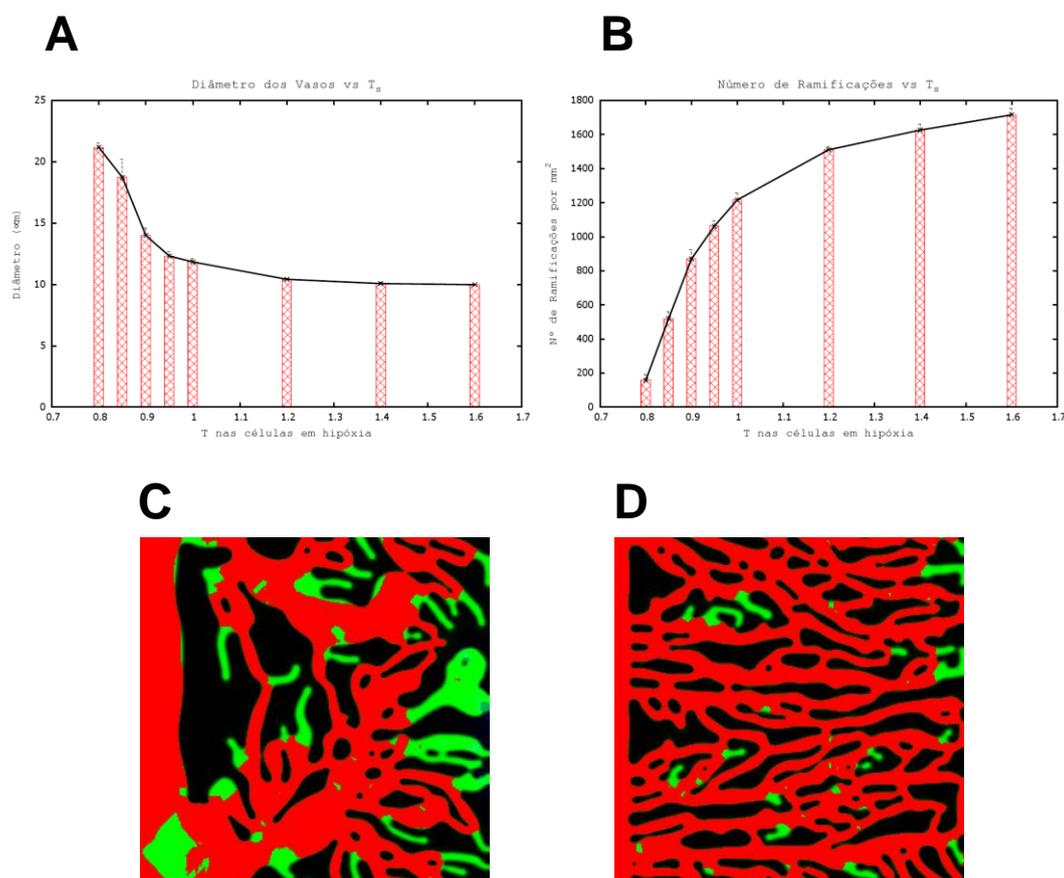


Figura 50 - Variação do diâmetro capilar médio (A) e da ramificação (B) de redes produzidas pelo programa “com fluxo” consoante o valor da concentração de fator angiogénico nas fontes. C e D apresentam padrões vasculares resultantes de uma concentração baixa ($T_s = 0,9$) e elevada ($T_s = 1,6$), respetivamente.

Neste contexto, é interessante fazer referência ao estudo levado a cabo por Haigh *et al.* em [36], onde é relatado o efeito de médias e abruptas reduções dos níveis de VEGF-A na vascularização. Este ponto constitui uma ferramenta válida de teste ao presente modelo teórico, por comparação dos resultados experimentais com os apresentados nesta secção.

Os autores constataram, neste estudo, que uma diminuição do VEGF-A na retina de ratos resulta numa escassez de vasos quando comparado com o grupo de controlo e que, surpreendentemente, a espessura desses vasos não varia. Concluem ainda que esta diminuição da vasculatura e consequente estado de hipóxia resultam na falta de uma rede vascular funcional, o poderá conduzir a degeneração dos tecidos e mortalidade embrionária precoce.

De facto, para os três algoritmos testados, é verificado que o aumento da concentração de fator angiogénico nos tecidos leva a uma maior densidade de ramos, o que está de acordo com os resultados experimentais referidos. No entanto, ao contrário das observações experimentais, quanto ao diâmetro dos vasos, verifica-se uma diminuição significativa na espessura das estruturas à medida que é aumentada a concentração de fator nos tecidos.

Capítulo 7

Conclusões e Trabalho Futuro

No sentido de estudar computacionalmente a morfologia das redes vasculares, este projeto deu continuidade ao trabalho apresentado por Travasso *et al.* no artigo [8]. Nesse trabalho encontra-se desenvolvido um modelo matemático híbrido de interface difusa que simula o processo de angiogénese e que tem a capacidade de produzir virtualmente redes vasculares capazes de serem inspecionadas de um ponto de vista morfológico. Com intuito de explorar e enriquecer os resultados apresentados no artigo foi dada continuação aos tópicos apontados como trabalho futuro, entre os quais se encontravam a completa implementação da via de sinalização Delta-Notch e a inclusão do fluxo sanguíneo.

Para o efeito, foram sequencialmente implementadas novas alterações ao algoritmo de previsão das redes vasculares, das quais se destaca a inclusão do fluxo sanguíneo e conseqüente probabilidade de formação de anastomoses.

Como ferramenta de estudo da influência das alterações implementadas, usou-se a comparação da morfologia das redes geradas a partir do algoritmo antigo (que reproduz as redes do artigo) e do novo algoritmo, que inclui a completa regulação das ETCs mediada por sinalização Delta Notch e a passagem de sangue, entre outras alterações, como a independência do gradiente na regulação da manutenção do fenótipo de ETC.

No entanto, perante várias alterações feitas, achou-se que seria difícil a associação de cada uma delas às diferenças observadas no padrão vascular. Por esta razão, estudou-se um terceiro algoritmo (“sem fluxo”), baseado no mais recente (“com fluxo”) e de onde apenas foi excluída a contribuição do fluxo sanguíneo. Dessa forma, tornar-se-ia mais fácil a avaliação da influência de apenas este tópico, bem como o impacto individual das restantes modificações.

Neste contexto, simularam-se os principais mecanismos responsáveis pela formação dos padrões vasculares, sendo que a morfologia das redes resultantes constituiu função dos níveis de fator angiogénico nas fontes, da velocidade de migração das ETCs e da taxa de proliferação celular. Cada um destes três parâmetros foi variado individualmente numa certa gama de valores, tendo-se mantido fixos cada um dos outros dois (os valores considerados como *wild type*

para cada um dos parâmetros foram $T_s = 1$, $\chi_{GM} = 0,35 \mu m/min$ e $\alpha_p T_p = 2,69 \times 10^{-4} s^{-1}$, respetivamente).

Para cada um dos casos analisados, estudou-se como é quantitativamente alterada a morfologia final da rede capilar por variação do respetivo parâmetro. A partir desta análise, ficou claro que os melhoramentos entre o programa “antigo” e o programa “sem fluxo” (nos quais se insere a via de sinalização Delta-Notch) não alteraram significativamente a morfologia das redes observada. Por sua vez, da inclusão do fluxo sanguíneo tornaram-se claras as tendências de padrão das redes já verificadas em [8].

É impressionante que relativamente pequenas variações na grandeza de alguns parâmetros no modelo levem a tão dramáticas diferenças na morfologia da rede vascular, especialmente naquelas em que é considerado o fluxo sanguíneo. Por exemplo, um fator de 2 na concentração de fator angiogénico leva a morfologias da rede tão diferente quanto às observadas nas seguintes imagens.

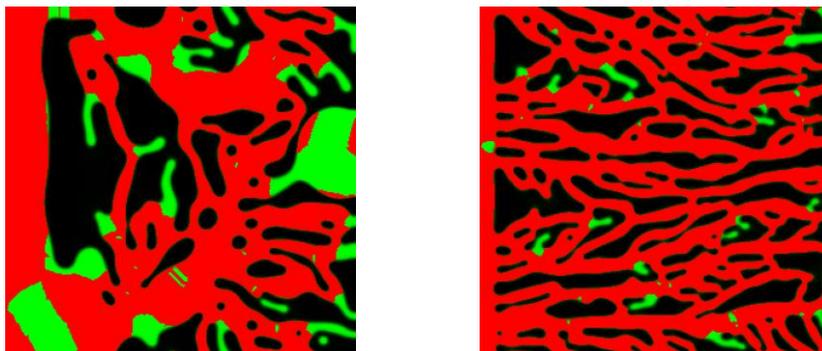


Figura 51 – Morfologia de redes vasculares, para concentrações de fator angiogénico diferentes. Do lado esquerdo $T_s = 0,9$ e à direita $T_s = 1,6$.

Este facto realça a sensibilidade do algoritmo aos parâmetros de teste. Assim se comprova que a angiogénese é o resultado de um delicado equilíbrio entre diversos parâmetros, como sugerido na literatura, e que variações dos seus valores podem ser responsáveis pelas diferenças observadas nos padrões vasculares de tecidos em diferentes condições fisiológicas e patológicas.

Os estudos realizados confirmam (tal como sugerido em [8]) que a taxa de proliferação celular, a velocidade das ETCs, e a concentração de fator produzido nas fontes desempenham um papel importante e complementar na padronização das redes vasculares, ao nível da espessura e do grau de ramificação dos vasos. Existem ainda, no entanto, resultados menos bem compreendidos, sendo necessário mais estudos para que se possam relacionar muitas das observações com os mecanismos modelados. Alguns deles estão já em curso.

Já em contexto de trabalho futuro, o cálculo da variância e o histograma são estudos importantes a referir, já que forneceriam uma perspetiva da distribuição espacial dos ramos em função do seu diâmetro.

A comparação sistemática dos resultados teóricos e laboratoriais serve de guião a este tipo de estudos, requerendo um trabalho exaustivo de ambas as partes. Neste sentido, fica agendada a correlação entre os resultados obtidos pelo novo algoritmo, sendo que concordâncias encontradas poderão fornecer uma ferramenta relevante de previsão e diagnóstico precoce, podendo ainda ajudar a definir novas terapias. Neste âmbito, o modelo apresentado pode ser usado também no estudo de muitas outras configurações experimentais para validar e sugerir diferentes hipóteses biológicas. Seria interessante estudar a influência de alguns outros aspetos como a ação das metaloproteínases e a ação de regulação das angiopoietinas (já previstas pelo modelo de [8]) numa rede vascular onde é considerado o fluxo sanguíneo.

A experiência clínica demonstra que pacientes com cancro a seguirem terapias de inibição de VEGF (mesmo que em combinação com quimioterapia) ainda morrem, sugerindo que esta estratégia é insuficiente ou que evoca resistência [4]. Neste caso, seria oportuno estudar a resistência a esse tratamento, tornando por exemplo variável a quantidade de fator angiogénico produzido nos tecidos ao longo do tempo.

Existem, no entanto, ainda vários pontos do código a melhorar antes de se prosseguir para este tipo de estudos mais complexos do padrão vascular. O programa de cálculo dos diâmetros é um exemplo, sendo fulcral uma determinação fiel do diâmetro capilar médio e da densidade de ramos das redes vasculares.

O melhoramento das propriedades mecânicas do sistema é outro tópico que ajudaria a resolver algumas situações, como a constante minimização das interfaces vasculares (por redução da energia), que nem sempre acontece nos processos biológicos. Este assunto está a ser resolvido em paralelo a este projeto e espera-se que no final seja possível incorporar no mesmo sistema todas as modificações levadas a cabo pelas duas vias.

Paralelizar o código constituiria uma vantagem no que toca ao aumento da velocidade de obtenção resultados, fator que teve uma influência limitante na quantidade de estudos tratados ao longo deste projeto.

Por fim, estender as alterações feitas para o modelo tridimensional desenvolvido por Margarida [17] também seria um ponto interessante a seguir, conduzindo os resultados para versões mais realistas do processo de angiogénese.

Apêndice A

Dedução das Equações (1) e (2)

[8,17]

A Equação (1) modela a evolução do fator angiogénico T interveniente na angiogénese.

Sabendo que uma equação de continuidade descreve a alteração na densidade de qualquer parte integrante de um sistema devida à entrada ou saída de partículas do sistema, então pode partir-se da seguinte equação para modelar a evolução de T_i :

$$\frac{\partial T_i}{\partial t} = -\nabla \cdot \vec{J}_i, \quad (14)$$

onde \vec{J}_i é o fluxo de partículas em difusão.

Conhecendo a Lei de Fick a duas dimensões $\vec{J}_i = -D_i(r) \nabla T_i(\vec{r}, t)$, a Equação (14) pode ser reescrita na forma:

$$\frac{\partial T_i}{\partial t} = -\nabla \cdot (-D_i(r) \nabla T_i(\vec{r}, t)). \quad (15)$$

Considerando $D_i(r) \equiv D$ uma constante, como se faz para obter a Equação (2), então a constante de difusão pode ser “movida” para fora dos parênteses. Daqui, resulta a aplicação do operador divergente ao gradiente de T , que corresponde ao seu Laplaciano:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = D \nabla^2 T. \quad (16)$$

A Equação (2) fica completa com a adição a $D \nabla^2 T$ do termo que descreve o consumo dos fatores angiogénicos. Este termo é composto pela taxa de consumo do fator angiogénico $\alpha_T(T)$, pelos valores do parâmetro de ordem ϕ e pela função de Heaviside, obtendo-se:

$$\partial_t T = \nabla \cdot (D \nabla T) - \alpha_T T \phi \Theta(\phi)$$

Apêndice B

Dedução da Equação (3) [8,17]

A Equação (3) descreve a evolução do parâmetro de ordem ϕ que caracteriza as fases do sistema. Travasso *et al.* considera a existência de dois grandes domínios, sendo um deles o interior dos capilares e o outro a região fora deles. Dentro do capilar $\phi = 1$ e fora dele $\phi = -1$. As duas zonas são separadas por uma interface, para a qual $\phi = 0$.

À evolução dos valores de ϕ está associada a energia livre do sistema, devendo ser penalizados com energia todos aqueles valores de ϕ diferentes dos que caracterizam os grandes domínios, $\phi = -1$ e $\phi = 1$. Neste modelo em concreto, considerou-se a energia livre funcional Ginzburg-Landau – Equação (17):

$$F[\phi] = \int \left[f(\phi) - \frac{\epsilon}{2} |\nabla\phi|^2 \right] dr, \quad (17)$$

em que $f(\phi) = -\frac{\phi^2}{2} + \frac{\phi^4}{4}$ é uma função composta de duas parábolas, capaz de resolver o problema de penalização dos valores de ϕ diferentes de $\phi = -1$ e $\phi = 1$.

Para o demonstrar, resolve-se $\frac{\partial f}{\partial \phi} = 0 \leftrightarrow -\phi + \phi^3 = 0$, obtendo-se $\phi = 0 \vee \phi = -1 \vee \phi = 1$ como extremos da função $f(\phi)$. Prosseguindo, pela segunda derivada de $f(\phi)$, $\frac{\partial^2 f}{\partial^2 \phi} = -1 + 3\phi^2$ sabe-se que dos extremos encontrados, apenas $\phi = -1 \vee \phi = 1$ são valores mínimos de $f(\phi)$, correspondendo a zonas de grande equilíbrio no sistema. O contrário acontece com a interface capilar, descrita por $\phi = 0$, e que constitui um máximo da função. Sendo uma zona de transição entre duas fases, caracteriza-se como uma zona de instabilidade, sendo-lhe portanto atribuída uma penalização energética, descrita pelo termo $\frac{\epsilon}{2} |\nabla\phi|^2$. ϵ representa a largura da interface capilar.

Quando o parâmetro de ordem ϕ não é conservado, uma equação apropriada para a sua evolução temporal é:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = - \frac{\delta F}{\delta \phi} \quad (18)$$

na qual o sinal negativo é devido à evolução do sistema com vista à minimização da energia livre. No caso de ϕ ser um valor grande e fizer baixar a energia, tem-se

que o funcional $\frac{\delta F}{\delta \phi} < 0$, o que se traduz numa diminuição de ϕ ao longo do tempo, devido à existência do sinal negativo.

No caso particular de o parâmetro de ordem ϕ ser conservado, então a sua evolução temporal é governada pela seguinte equação de continuidade:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = -\nabla \cdot \vec{j}, \quad (19)$$

com $\vec{j} = M(-\nabla\mu)$, onde μ é o potencial químico dado por:

$$\mu = \frac{\delta F[\phi]}{\delta \phi}. \quad (20)$$

Desta forma, demonstra-se que a evolução temporal do parâmetro de ordem ϕ depende da constante M que representa a mobilidade das ECs:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = M \left(\nabla^2 \frac{\delta F[\phi]}{\delta \phi} \right). \quad (21)$$

Sabendo da seguinte propriedade das derivadas funcionais, a equação anterior pode ser reescrita:

$$F[\phi + \delta\phi] - F[\phi] = \int \frac{\delta F[\phi]}{\delta \phi} \delta\phi \, dr. \quad (22)$$

Para tal, recorre-se à Equação (17) para obter:

$$F[\phi + \delta\phi] = \int \left[-\frac{(\phi + \delta\phi)^2}{2} + \frac{(\phi + \delta\phi)^4}{4} - \frac{\epsilon}{2} [\nabla\phi + \nabla\delta\phi]^2 \right] dr. \quad (23)$$

Resolvendo a equação anterior, tem-se:

$$F[\phi + \delta\phi] = \int \left[-\frac{\phi^2 + 2\phi\delta\phi + (\delta\phi)^2}{2} + \frac{\phi^4 + (\delta\phi)^4 + 6\phi^2(\delta\phi)^2 + 4\phi^3\delta\phi + 4\phi(\delta\phi)^3}{4} - \frac{\epsilon}{2} [(\nabla\phi)^2 + 2\nabla\phi\nabla\delta\phi + (\nabla\delta\phi)^2] \right] dr \quad (24)$$

A Equação (24) pode ser simplificada ao serem desprezados todos os termos $\delta\phi$ de ordem superior a 1:

$$F[\phi + \delta\phi] = \int \left[-\frac{\phi^2 + 2\phi\delta\phi}{2} + \frac{\phi^4 + 4\phi^3\delta\phi}{4} - \frac{\epsilon}{2} [(\nabla\phi)^2 + 2\nabla\phi\nabla\delta\phi] \right] dr. \quad (25)$$

Assim e recorrendo mais uma vez à Equação (17), a Equação (22) pode ser reescrita na forma:

$$F[\phi + \delta\phi] - F[\phi] = \int [-\phi\delta\phi + \phi^3\delta\phi - \epsilon\nabla\phi\nabla\delta\phi] dr. \quad (26)$$

Sendo que o termo que se pretende deduzir é $\frac{\delta F[\phi]}{\delta\phi}$ então é necessário primitivar por partes o termo $\epsilon\nabla\phi\nabla\delta\phi$ e de seguida colocar o termo $\delta\phi$ em evidência. Efetuando estes passos, obtém-se:

$$F[\phi + \delta\phi] - F[\phi] = \int [(-\phi + \phi^3 - \epsilon\nabla^2\phi)\delta\phi] dr. \quad (27)$$

Daqui, comparando com a Equação(22), resulta que

$$\frac{\delta F[\phi]}{\delta\phi} = -\phi + \phi^3 - \epsilon\nabla^2\phi. \quad (28)$$

Esta expressão pode ser substituída na Equação (21), resultando em:

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = M(\nabla^2(-\phi + \phi^3 - \epsilon\nabla^2\phi)) \quad (29)$$

O termo $M(\nabla^2(-\phi + \phi^3 - \epsilon\nabla^2\phi))$ da equação anterior é o primeiro termo da segunda equação do modelo e descreve a dinâmica da interface entre o capilar e o meio que o envolve.

A segunda equação (Equação (3)) do modelo fica completa ao considerar-se um termo de proliferação celular endotelial, composto pela taxa de proliferação $\alpha_p(T)$, pelos valores do parâmetro de ordem ϕ e pela função de Heaviside:

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = M\nabla^2(-\phi + \phi^3 - \epsilon\nabla^2\phi) + \alpha_p(T)\phi \theta(\phi).$$

Referências

- 1 Pries, a R and Secomb, T W (2000) "Microcirculatory network structures and models." *Annals of Biomedical Engineering*, 28(8), pp. 916-21. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646294>
- 2 Karkkainen, M J and Petrova, T V (2000) "Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." *Oncogene*, 19(49), pp. 5598-605. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114740>
- 3 Adair, Thomas H. and Montani, Jean-Pierre (2010) *Angiogenesis*, Morgan & Claypool Publishers. [online] Available from: <http://www.morganclaypool.com/doi/abs/10.4199/C00017ED1V01Y201009ISP010> (Accessed 30 June 2012)
- 4 Carmeliet, Peter (2005) "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature*, 438(7070), pp. 932-6. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355210> (Accessed 1 March 2012)
- 5 Angiogenesis Foundation (2011) "Understanding Angiogenesis." [online] Available from: <http://www.angio.org/understanding/disease.php> (Accessed 3 July 2012)
- 6 Buschmann, I. and Schaper, W. (1999) "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth." *News in physiological sciences*, 14(June), pp. 121-125. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390835>
- 7 Tímár, J, Döme, B, Fazekas, K, Janovics, a and Paku, S (2001) "Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy." *Pathology oncology research : POR*, 7(2), pp. 85-94. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458270>
- 8 Travasso, Rui D M, Corvera Poiré, Eugenia, Castro, Mario, Rodríguez-Manzaneque, Juan Carlos, et al. (2011) "Tumor angiogenesis and vascular patterning: a mathematical model." *PloS one*, 6(5), p. e19989. [online] Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3103509&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> (Accessed 15 March 2012)
- 9 Fundação para a Ciência e Tecnologia (2009) "Consulta de projectos homologados." [online] Available from: http://www.fct.pt/apoios/projectos/consulta/vglobal_projecto?idProjecto=110354&idElemConcurso=3595 (Accessed 3 July 2012)
- 10 Anon (2010) "Novo modelo computacional descreve crescimento de redes vasculares." *Ciência Hoje*. [online] Available from: <http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=45674&op=all> (Accessed 27 June 2012)

- 11 Anon (n.d.) "Aula de Fisiologia." [online] Available from:
<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA3RkAA/fisiologia-sistema-cardiovascular>
- 12 Köhn-Luque, Alvaro, de Back, Walter, Starruss, Jörn, Mattiotti, Andrea, et al. (2011) "Early embryonic vascular patterning by matrix-mediated paracrine signalling: a mathematical model study." *PloS one*, 6(9), p. e24175. [online] Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3176223&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> (Accessed 8 March 2012)
- 13 Graça, Bruno, Lunet, Carla, Coelho, A N A Sofia, Monteiro, Gisela, et al. (2004) "Angiogénese e Cancro - da biopatologia à terapêutica." *Acta Médica Portuguesa*, pp. 76-93. [online] Available from:
<http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2004-17/1/076-093.pdf>
- 14 Centre for Advanced Biomedical Imaging (2012) "Vascular network analysis." [online] Available from:
<http://www.ucl.ac.uk/cabi/imaging/researchareas/cancerImaging/vascularNetworkAnalysis> (Accessed 30 June 2012)
- 15 Jain, By Rakesh K (2007) "Normalization of Tumor." , pp. 412-417.
- 16 Ferrara, Napoleone (2008) "Overview and Clinical Applications of VEGF-A," in pp. 345-352.
- 17 Guerra, Maria Margarida Dias Soares Quinas (2011) "Novel approach to vascular network modeling in Maria Margarida Dias Soares Quinas Guerra Project oriented by Professor Rui Travasso Center for Computational Physics."
- 18 Kume, Tsutomu (2009) "Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation." *Journal of angiogenesis research*, 1, p. 8. [online] Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2794854&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> (Accessed 9 August 2012)
- 19 Plank, M J, Sleeman, B D and Jones, P F (2004) "A mathematical model of tumour angiogenesis, regulated by vascular endothelial growth factor and the angiopoietins." *Journal of Theoretical Biology*, 229(4), pp. 435-54. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246783> (Accessed 18 March 2012)
- 20 Milde, Florian, Bergdorf, Michael and Koumoutsakos, Petros (2008) "A hybrid model for three-dimensional simulations of sprouting angiogenesis." *Biophysical journal*, 95(7), pp. 3146-60. [online] Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2547461&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> (Accessed 22 March 2012)
- 21 Edgar, Lowell T, Sibole, Scott C, Underwood, Clayton J, Guilkey, James E and Weiss, Jeffrey a (2012) "A computational model of in vitro angiogenesis based on extracellular matrix fibre orientation." *Computer Methods in Biomechanical*

and *Biomedical Engineering*, pp. 1-12. [online] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22515707>

- 22 Levine, Howard a., Pamuk, Serdal, Sleeman, Brian D. and Nilsen-Hamilton, Marit (2002) "Mathematical Modelling of Tumour Angiogenesis and the Action of Angiostatin as a Protease Inhibitor." *Journal of Theoretical Medicine*, 4(2), pp. 133-145. [online] Available from:
<http://www.hindawi.com/journals/cmml/2002/506528/abs/> (Accessed 8 July 2012)
- 23 Chaplain, M a (2006) "Mathematical modelling of angiogenesis and Vascular adaptation." *Journal of neuro-oncology*, 50(1-2), pp. 37-51. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619562>
- 24 Chaplain, M A J, Giles, Susan M, Sleeman, B D and Jarvis, R J (1995) "A mathematical analysis of a model for tumour angiogenesis." *Journal of Mathematical Biology*, 33, pp. 744-770.
- 25 Mantzaris, Nikos V, Webb, Steve and Othmer, Hans G (2004) *Mathematical Biology*,
- 26 Byrne, H M and Chaplain, M A J (1995) "Mathematical Models for Tumour Angiogenesis : Numerical Simulations and Nonlinear Wave Solutions." *Bulletin of mathematical biology*, 57, pp. 461-486.
- 27 McDougall, S R, Anderson, a R a, Chaplain, M a J and Sherratt, J a (2002) "Mathematical modelling of flow through vascular networks: implications for tumour-induced angiogenesis and chemotherapy strategies." *Bulletin of mathematical biology*, 64(4), pp. 673-702. [online] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216417> (Accessed 3 April 2012)
- 28 Anderson, a.R.a. and Chaplain, M.a.J. (1998) "A mathematical model for capillary network formation in the absence of endothelial cell proliferation." *Applied Mathematics Letters*, 11(3), pp. 109-114. [online] Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089396599800041X>
- 29 Sun, Shuyu, Wheeler, Mary F, Obeyesekere, Mandri and Patrick, Charles W (2005) "A deterministic model of growth factor-induced angiogenesis." *Bulletin of mathematical biology*, 67(2), pp. 313-37. [online] Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710183> (Accessed 29 July 2012)
- 30 Sceats, By Emma (n.d.) "In Vitro Tissue Models : Working in the Third Dimension."
- 31 Chen, Long-Qing (2002) "Phase-Field Models for Microstructure Evolution." *Annual Review of Materials Research*, 32(1), pp. 113-140. [online] Available from:
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.matsci.32.112001.132041> (Accessed 9 March 2012)
- 32 Hoppensteadt, Frank C. and Peskin, Charles S. (2010) *Modeling and Simulation in Medicine and the Life Sciences*,

- 33 OpenStax College (2012) "Viscosity and Laminar Flow; Poiseuille's Law," in *College Physics*, Houston, Texas. [online] Available from: <http://cnx.org/content/m42209/latest/?collection=col11406/latest> (Accessed 2 September 2012)
- 34 Fiolhais, Manuel (2010) "Apontamentos das aulas de Física II."
- 35 Liu, Jie and Agarwal, Sudha (2010) "Mechanical signals activate vascular endothelial growth factor receptor-2 to upregulate endothelial cell proliferation during inflammation." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(2), pp. 1215-21. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20548028> (Accessed 14 July 2012)
- 36 Haigh, Jody J, Morelli, Paula I, Gerhardt, Holger, Haigh, Katharina, et al. (2003) "Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling." *Developmental Biology*, 262(2), pp. 225-241. [online] Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160603003567> (Accessed 18 September 2012)