



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

António Miguel Prata Lima Cardoso

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO COMPUTACIONAL
TRIDIMENSIONAL DE COMUNICAÇÃO CELULAR
BIOELÉTRICA E SUA APLICAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO
DE ORGANISMOS E INICIAÇÃO CANCERÍGENA**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Física, orientada pelo
Professor Doutor João Carvalho, apresentada no Departamento de Física da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

Setembro 2023



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

António Miguel Prata Lima Cardoso

**Desenvolvimento de um modelo computacional
tridimensional de comunicação celular
bioelétrica e sua aplicação ao desenvolvimento
de organismos e iniciação cancerígena**

Mestrado em Engenharia Física

Tese de Mestrado submetida à Universidade de Coimbra

Orientada pelo Professor Doutor João Carlos Lopes Carvalho

Setembro 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor João Carvalho, por toda a disponibilidade, ajuda, orientação e conhecimento transmitido ao longo da realização deste projeto.

Ao Jorge, ao Caramelo e à Fy, quero agradecer por terem transformado a minha rotina do último ano numa fonte de motivação para o meu trabalho. À Inês Gomes, pela amizade extraordinária e por sempre ter acreditado em mim, tanto ao longo do processo de escrita desta dissertação como nos restantes anos de universidade. À Matilde e à Mária, pelos desabafos e conversas reconfortantes que mesmo nos momentos menos bons me deram força para continuar. Ao Mamadu, ao Cabral e ao Bernardo, por entre gargalhadas me terem feito aliviar o stress de momentos mais tensos. Ao Edu, ao Pascoal e à Inês, pelos conselhos, palavras amigas e momentos de descontração que me proporcionam. Mesmo que passem longos períodos sem nos vermos, sei que vos tenho a meu lado a apoiar-me. Ao Mário, ao Mansilha e ao Gonçalo, pela ajuda a ultrapassar as dificuldades em diversas cadeiras e pelos momentos únicos que partilhámos ao longo destes últimos 5 anos. Um agradecimento especial ao Mendonça, o meu maior companheiro desde o início desta aventura.

Agradeço aos Cruzados pelo companheirismo que partilhámos durante os anos de universidade. As experiências que vivemos são verdadeiramente indescritíveis, e as memórias que guardo desse período serão para toda a vida. À minha família de praxe, em especial aos meus padrinhos e afilhados, agradeço por me terem recebido com tanto carinho e por me ensinarem a viver de maneira tão bela a tradição coimbrã. A todas as pessoas que partilharam comigo a experiência de Erasmus+, obrigado por terem feito dela a melhor experiência académica da minha vida.

Ao NEDE, quero agradecer por me ter acolhido tão bem, por demonstrar desde cedo o ambiente familiar que se vive no DF e por me ter aberto as portas do associativismo jovem. À Pollux, uma família que ajudei a criar, quero agradecer por me ter desenvolvido amplamente em vários domínios, tanto a nível pessoal como profissional. Fazer parte de algo tão especial como esta Júnior sempre me fez sentir único, e o orgulho que tenho nesta iniciativa é simplesmente incomensurável.

Ao meu grupo do secundário e aos A&L, agradeço por demonstrarem que o tempo não afeta a verdadeira amizade, apenas a revela e fortalece. Ao meu grupo de amigos do Coro HD, obrigado por me ajudarem a ser uma pessoa melhor a cada encontro, sinto-me verdadeiramente abençoado por ter pessoas como vocês na minha vida.

Por fim, deixo o meu maior agradecimento à família, em especial aos meus pais, pelo amor que sempre me transmitiram e pelos inúmeros sacrifícios e cedências que fizeram por mim. São uma fonte de inspiração e desempenharam um papel fundamental na formação da pessoa que sou hoje.

*"Apesar das ruínas e da morte,
Onde sempre acabou cada ilusão,
A força dos meus sonhos é tão forte,
Que de tudo renasce a exaltação
E nunca as minhas mãos ficam vazias."*

Sophia de Mello Breyner Andresen

Abstract

Cancer currently takes the lives of millions of people every year, establishing itself as one of the leading causes of death in the world. The fight against this disease has been the subject of significant investment, but the results have not yet reached satisfactory levels.

The traditional understanding of the origin of cancer focuses on the uncontrolled proliferation of cells due to mutations in the DNA, which gain the ability to invade tissues and avoid programmed cell death. However, there are alternative/complementary theories that can help to better understand this phenomenon. There is evidence that cancer cells tend to be electrically depolarized, while healthy cells tend to be polarized. This study aims to elucidate the relevance of this observation.

In order to study this relationship, a two- and three-dimensional computer model that describes in a realistic way the factors that determine the electric current through the cell membrane was developed, representing the bioelectric communication of cells with neighboring cells and with the extracellular environment. In addition, the models include a feedback loop between the concentration of two proteins and the bioelectricity of the cells. The simulations carried out made it possible to study the influence of cell bioelectricity on the size and shape of organisms, the achievement of homeostasis and the concentration of proteins. The behavior of the model during a random or localized cancer intervention was also evaluated.

These studies have shown that it is possible to control the shape and size of an organism by manipulating the bioelectric state of cells through changes in the conductance of ion channels. In addition, we noticed that, in our model, membrane potential has a more significant impact on protein concentration than the other way around. We also observed that when a cancerous intervention occurs, whether localized or random, the organism tends to take on a more irregular shape. The 2D and 3D computer models developed are simple but realistic, since the results obtained are in accordance with the scientific foundations presented. Some differences were noted between the 2D and 3D models, particularly in their sensitivity to different parameters and calculation time.

The study of this relationship could be proven highly relevant, especially in the treatment of cancer, since conventional treatments such as chemotherapy interfere with cell growth and division, affecting both cancerous and healthy cells. A promising approach could involve manipulating the bioelectric state of cancer cells by modulating the activity of ion channels, allowing tumor behavior to be reversed. This would prevent significant damage to healthy cells.

Keywords

Bioelectricity, Cancer, Cancer treatment, Computational model, Ion channels, Protein concentrations, Simulations.

Resumo

Atualmente, o cancro tira a vida a milhões de pessoas em cada ano, estabelecendo-se como uma das principais causas de morte globalmente. O combate a esta doença tem sido objeto de significativos investimentos, mas os resultados ainda não atingiram níveis satisfatórios.

A compreensão tradicional sobre a origem do cancro foca-se na proliferação descontrolada de células devido a mutações no DNA, que ganham a capacidade de invadir tecidos e evitar a morte celular programada. No entanto, existem teorias alternativas/complementares que podem ajudar a perceber melhor este fenómeno. Existe uma evidência de que as células cancerígenas tendem a estar despolarizadas eletricamente, enquanto células saudáveis tendem a ser polarizadas. Este estudo visa elucidar a relevância dessa observação.

Por forma a estudar esta relação, foi desenvolvido um modelo computacional bidimensional e tridimensional que descreve de forma realista os fatores que determinam a corrente elétrica através da membrana celular, representando a comunicação bioelétrica de células com as células vizinhas e com o ambiente extracelular. Além disto, os modelos incluem um ciclo de retroação entre a concentração de duas proteínas e a bioeletricidade das células. As simulações realizadas permitiram estudar a influência da bioeletricidade das células na dimensão e forma dos organismos, no alcance da homeostasia e na concentração das proteínas. Posteriormente, avaliou-se o comportamento do modelo aquando de uma intervenção cancerígena aleatória ou localizada.

Estes estudos permitiram concluir que é possível controlar a forma e dimensão de um organismo através da manipulação do estado bioelétrico das células por meio da alteração da condutância dos canais iónicos. Além disso, notámos que, no nosso modelo, o potencial de membrana exerce um impacto mais significativo na concentração das proteínas do que o contrário. Observámos ainda que quando ocorre uma intervenção cancerígena, seja ela localizada ou aleatória, o organismo tende a assumir uma forma mais irregular. Os modelos computacionais 2D e 3D desenvolvidos são simples mas realistas, já que os resultados obtidos estão em concordância com os fundamentos científicos apresentados. Foram notadas algumas diferenças entre os modelos 2D e o 3D, nomeadamente na sensibilidade aos diferentes parâmetros e tempo de cálculo.

O estudo desta relação pode vir a ser uma mais valia, principalmente no tratamento do cancro, já que tratamentos convencionais, como quimioterapia, interferem no crescimento e divisão celular, afetando tanto células cancerígenas quanto saudáveis. Uma abordagem promissora poderia envolver a manipulação do estado bioelétrico das células cancerígenas por meio da modulação de atividade dos canais iónicos, permitindo a reversão do comportamento tumoral. Isso evitaria danos significativos a células saudáveis.

Palavras-Chave

Bioeletricidade, Canais iónicos, Cancro, Concentrações das proteínas, Modelo computacional, Simulações, Tratamento do cancro.

Conteúdo

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	1
1.2 Motivação/Enquadramento	1
1.3 Estrutura da Tese	2
2 Contexto Biológico	3
2.1 Cancro e Teorias de Origem	3
2.1.1 <i>Somatic Mutation Theory</i>	3
2.1.2 <i>Tissue Organization Field Theory</i>	4
2.1.3 Proteínas reguladoras da proliferação celular	5
2.1.4 Conclusões	5
2.2 <i>Theory of Organisms</i>	5
2.2.1 O estado normal das células é a proliferação com variação e moti- lidade	6
2.2.2 O princípio da variação	6
2.2.3 O princípio da organização	7
2.2.4 Conclusões	7
2.3 Transporte Iónico	7
2.3.1 Canais iónicos	7
2.3.2 Bombas iónicas	8
2.3.3 <i>Gap Junctions</i>	8
2.3.4 Conclusões	9
2.4 Bioeletricidade Celular	10
2.4.1 Modelo de Hodgkin-Huxley	11
2.4.2 Regulação do estado bioelétrico das células	14
2.4.3 Relação com a iniciação do Cancro	16
2.4.4 Conclusões	17
3 Estado da Arte	19
3.1 Modelos computacionais	19
3.1.1 Modelo que relaciona Bioeletricidade com a Genética	19
3.1.2 Modelo que relaciona os efeitos comunitários com a reprograma- ção bioelétrica em agregados multicelulares	21
3.1.3 Modelo que relaciona a Bioeletricidade com a iniciação do cancro .	22
3.1.4 Modelo que relaciona a Bioeletricidade com a Inibição por contacto	23

3.1.5	Conclusões	25
4	Métodos	27
4.1	Autômato Celular	27
4.1.1	Vizinhança	28
4.1.2	Condições Fronteira	29
4.2	Equação de Hill	29
4.3	Formação de Padrões Espaciais por Reação e Difusão	31
4.3.1	Modelo de Turing	31
4.3.2	Modelo de Gierer-Meinhardt	32
4.4	Modelo desenvolvido	33
4.4.1	Proliferação das células e difusão das proteínas	33
4.4.2	Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de uma proteína	35
4.4.3	Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de duas proteínas	36
4.4.4	Modelação em 2D e em 3D	37
5	Testes, Resultados e Discussão	39
5.1	Modelos 2D	39
5.1.1	Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de uma proteína	39
5.1.2	Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de duas proteínas	40
5.2	Modelo 3D	54
6	Conclusão	61
6.1	Trabalho Futuro	62
	Referências	63
A	Método das diferenças finitas	67
A.0.1	Método das diferenças finitas centrais	67

Acrónimos

mV milivolts.

G_{dep}^0 condutância dos canais iônicos de despolarização.

G_{pol}^0 condutância dos canais iônicos de polarização.

V_{mem} potencial da membrana.

AC Autómato Celular.

AMPK *adenosine monophosphate-activated protein kinase*.

ATP *adenosine triphosphate*.

CBX carbenoxolona.

DNA *deoxyribonucleic acid*.

GJ *Gap Junction*.

HCN2 *hydrogen cyanide 2*.

mTOR *mammalian target of rapamycin*.

PD-L1 *programmed cell death ligand 1*.

PD-1 *programmed cell death protein 1*.

RNA *ribonucleic acid*.

SMT *Somatic Mutation Theory*.

TOFT *Tissue Organization Field Theory*.

ToO *Theory of Organisms*.

TSC1 *tuberous sclerosis complex 1*.

TSC2 *tuberous sclerosis complex 2*.

Lista de Figuras

2.1	Organização molecular e topologia esquemática de <i>Gap Junctions</i> (GJs).	9
2.2	Visão geral das unidades funcionais básicas da bioeletricidade.	10
2.3	Potencial de ação (mV) em função do tempo (milisegundos).	11
2.4	Circuito elétrico equivalente que representa a membrana celular.	13
2.5	Valores de potencial da membrana (V_{mem}) em mV associados a cada tipo de célula referenciado na figura.	15
2.6	Localização de tumores revelada através da bioeletricidade.	16
3.1	Interação genética e bioelétrica ao nível celular e respetivas equações dinâmicas do processo de transcrição e tradução.	20
3.2	Evolução temporal do conjunto multicelular para duas polarizações da zona central.	21
3.3	Imagem descritiva do estado do sistema e do estado bioelétrico das células após várias gerações.	23
3.4	Comparação de resultados experimentais, simulações realizadas e imagens do sistema após diferentes testes terem sido realizados.	24
4.1	Demonstração do Jogo da Vida.	28
4.2	Vizinhanças clássicas (caso bidimensional).	29
4.3	Transmissão do sinal da equação de Hill.	30
4.4	Exemplos de reprodução de padrões biológicos através do modelo de Turing.	31
4.5	Exemplos da simulação de padrões em matlab através do modelo de Gierer-Meinhardt proposto em [42].	32
5.1	Visualização de uma simulação padrão do modelo de difusão de uma proteína.	40
5.2	Resultado de simulações padrão no modelo de difusão de duas proteínas.	41
5.3	Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{pol-dep}^0$	43
5.4	Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{dep-pol}^0$	44
5.5	Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{pol-pol}^0$	45
5.6	Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{dep-dep}^0$	46
5.7	Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{pol-dep}^0$ e $G_{dep-pol}^0$	47
5.8	Gráficos dos testes de despolarização aleatória.	49
5.9	Gráficos dos testes de despolarização localizada.	50
5.10	Resultado de simulações com variação aleatória e localizada da concentração das proteínas.	51

5.11 Resultado de uma simulação padrão no modelo 3D de difusão de duas proteínas	54
5.12 Representação do teste 2 da tabela 5.1 no modelo 3D.	56
5.13 Representação do teste 6 da tabela 5.1 no modelo 3D.	56
5.14 Representação do teste de despolarização aleatória de 30% em 3D.	57
5.15 Representação do teste de despolarização localizada com um raio de 20 células em 3D.	58

Lista de Tabelas

4.1	Valores dos parâmetros bioelétricos usados no modelo descrito.	34
4.2	Valores dos parâmetros usados na equação de difusão da proteína.	36
4.3	Valores dos parâmetros usados nas equações de difusão das duas proteínas.	37
5.1	Testes realizados com diferentes valores de $G_{pol-dep}^0$, $G_{dep-pol}^0$, $G_{pol-pol}^0$ e $G_{dep-dep}^0$	42
5.2	Probabilidades de despolarização para os testes de despolarização alea- tória.	48
5.3	Raios de despolarização para os testes de despolarização localizada.	50
5.4	Valores médios da relação circular do organismo para os diferentes testes e respetivo desvio padrão.	53
5.5	Valores médios da relação esférica do organismo para os diferentes testes e respetivo desvio padrão.	59

Capítulo 1

Introdução

No primeiro capítulo são apresentados os objetivos do projeto (Secção 1.1), o enquadramento do mesmo e motivação para o desenvolver (Secção 1.2) e, por fim, é descrita a estrutura da dissertação (Secção 1.3).

1.1 Objetivos

Este projeto tem como objetivo, numa primeira fase, desenvolver um modelo computacional bidimensional que permita descrever, de uma forma realista, os fatores que determinam a corrente elétrica através da membrana celular, isto é, descrever a comunicação bioelétrica de células com as células vizinhas e com o ambiente extracelular. E, simultaneamente, relacionar esta comunicação bioelétrica com um modelo de difusão de proteínas simples mas realista.

Numa segunda fase, o objetivo será desenvolver um modelo computacional tridimensional com as mesmas premissas que o desenvolvido na primeira fase.

Numa terceira e última fase, o modelo desenvolvido será utilizado no estudo da evolução de um organismo, tanto num caso normal como na iniciação de um processo tumoral desencadeado pela perturbação do estado bioelétrico do tecido, permitindo depois estudar e testar estratégias para a reversão do comportamento tumoral através de terapias dirigidas aos canais iónicos celulares, abrindo novos caminhos para a prevenção, diagnóstico e terapia do cancro.

1.2 Motivação/Enquadramento

Ano após ano é feito um investimento bastante avultado no combate ao cancro e os resultados atingidos não são suficientemente satisfatórios. Se com tanto investimento não é possível chegar a soluções eficazes, talvez o investimento não esteja a ser feito no sítio certo. A teoria geralmente aceite diz que a iniciação do cancro se dá com a proliferação anormal e descontrolada de células que se convertem em cancerígenas devido a uma anomalia no seu ADN (mutação) e durante esse processo de divisão descontrolada ganham capacidade de invadir outros tecidos e de não morrer.

Mas talvez possam haver teorias alternativas/complementares que ajudem a perceber melhor este fenómeno.

Está cientificamente provado que existe uma relação entre o estado bioelétrico das células, determinado pela diferença de potencial através da membrana celular, e a iniciação do cancro [5, 26]: as células proliferativas cancerígenas são, na sua generalidade, despolarizadas enquanto que células saudáveis são polarizadas, mas não se sabe o quão significativa é esta relação. O nosso trabalho será, então, no sentido de perceber a significância da mesma.

Hoje em dia, tratamentos como quimioterapia baseiam-se na destruição das células cancerígenas, interferindo com os processos de crescimento e divisão das mesmas, podendo também afetar células saudáveis. Uma das maiores vantagens de tratamentos através da alteração do estado bioelétrico das células seria que o tratamento do cancro poderia ser feito sob forma de reversão do comportamento tumoral por manipulação de canais iónicos, não tendo interferência significativa com células saudáveis.

O trabalho será desenvolvido *in silico*, isto é, através de simulações computacionais, o que também representa benefícios em relação a estudos *in vitro* ou *in vivo*, uma vez que é mais barato, rápido e flexível.

O modelo criado será uma expansão de um modelo 2D [24] já desenvolvido e testado, sendo que a sua passagem para 3D trará novos desafios, em particular relativamente ao número de elementos a considerar, com consequências na gestão de memória e na velocidade de cálculo.

O projeto decorre no CFisUC, um centro de investigação inserido no Departamento de Física da Universidade de Coimbra, sendo orientado pelo Professor Doutor João Carvalho.

1.3 Estrutura da Tese

A presente dissertação está dividida em 6 capítulos. No capítulo 1 são descritos os objetivos do projeto, a motivação/enquadramento para o mesmo e a estrutura da dissertação. No capítulo 2 é dado o contexto biológico do projeto, sendo apresentadas as principais teorias científicas que este tem por base. No capítulo 3 são descritos modelos computacionais apresentados em artigos recentes e que serviram de base para a criação dos modelos apresentados ao longo desta dissertação. No capítulo 4 são, finalmente, descritos ao pormenor os modelos computacionais desenvolvidos neste projeto, desde a explicação dos princípios básicos para a construção dos mesmos até às expressões físicas e matemáticas usadas nos modelos. No capítulo 5 são apresentados, comentados e discutidos os testes realizados e respetivos resultados obtidos. Por fim, no capítulo 6, são tiradas algumas conclusões e reflexões sobre o desenvolvimento deste projeto e de que forma poderá ter continuidade no futuro.

Capítulo 2

Contexto Biológico

Neste capítulo são apresentados os conceitos biológicos que se encontram na base do desenvolvimento do projeto. Começa por ser dada uma visão global sobre o cancro e sobre as teorias que procuram explicar a sua iniciação e desenvolvimento, nomeadamente a *Somatic Mutation Theory* (SMT) e *Tissue Organization Field Theory* (TOFT). Ainda na mesma secção, são dados alguns exemplos de proteínas ativadoras e inibidoras da proliferação celular (secção 2.1). Depois é apresentada a *Theory of Organisms* (ToO) (secção 2.2), teoria na qual nos baseámos para simular o crescimento e desenvolvimento do nosso organismo hipotético. A seguir é explicado o funcionamento do transporte iónico através de canais iónicos, bombas iónicas e *gap junctions* (secção 2.3). É ainda explicada a bioeletricidade celular, o modelo de Hodgkin-Huxley e estudos recentes da influência da bioeletricidade em áreas como regeneração de tecidos e iniciação tumoral (Secção 2.4).

2.1 Cancro e Teorias de Origem

O cancro é um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células, formando tumores que podem afetar o funcionamento normal de um organismo. Existem diversos tipos de cancro, que podem desenvolver-se em diferentes partes do corpo. O tratamento do cancro pode variar dependendo da fase em que se encontra e da sua localização, sendo alguns tipos tratados através de cirurgia, enquanto outros respondem melhor a terapias como a quimioterapia e a radioterapia. A propagação do cancro ocorre quando as células cancerígenas deixam o tumor original e se espalham para outras partes do corpo através do sangue ou do sistema linfático, formando novos tumores em locais distantes, processo conhecido como metástase. O diagnóstico precoce e os avanços nos tratamentos têm permitido que muitas pessoas vivam vidas plenas após o tratamento do cancro [1].

2.1.1 *Somatic Mutation Theory*

A *Somatic Mutation Theory* (SMT) é uma teoria para a carcinogénese que se tornou a visão padrão para a iniciação do cancro na década de 1950. Esta teoria postula que o

cancro deriva da proliferação de uma única célula que acumulou múltiplas mutações no DNA ao longo do tempo (monoclonalidade). As suas premissas básicas são que o cancro é um defeito no controlo da proliferação celular e o estado padrão das células de metazoários (animais pluricelulares) é a quiescência [43, 44, 46].

As *hallmarks of cancer* são um conceito crucial no campo da oncologia, que foi proposto por Douglas Hanahan e Robert Weinberg. Estas *hallmarks* representam um conjunto de características biológicas fundamentais que estão presentes na maioria dos tipos de cancro e que contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença.

As seis primeiras *hallmarks*, apresentadas inicialmente em 2000 [19], descrevem os processos fundamentais pelos quais as células cancerígenas adquirem a capacidade de crescer e se espalhar descontroladamente. Estas incluem a proliferação celular descontrolada, a resistência à morte celular programada (apoptose), a evasão dos sinais que normalmente inibem a divisão celular, a capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos para nutrição (angiogénese), a ativação de metástases e a alteração do metabolismo energético.

Posteriormente, em 2011 [20], foram incluídas duas características adicionais às *hallmarks* originais. Uma delas é reprogramação do metabolismo energético, que destaca como as células cancerígenas remodelam as suas vias metabólicas para favorecer a glicólise aeróbica, impulsionando o seu crescimento contínuo. A outra é a evasão do sistema imunológico, na qual as células cancerígenas desenvolvem mecanismos para escapar ao reconhecimento e ataque pelo sistema imunológico do organismo.

Este conceito está na base da SMT e é de extrema importância para a investigação e tratamento desta doença, já que proporciona uma estrutura robusta para compreender os complexos processos biológicos subjacentes à mesma, permitindo aos cientistas identificar potenciais alvos terapêuticos e desenvolver abordagens personalizadas de tratamento. Adicionalmente, estas características têm também aplicação no diagnóstico e prognóstico, auxiliando os médicos na tomada de decisões fundamentadas sobre as melhores terapias para os pacientes.

2.1.2 *Tissue Organization Field Theory*

A *Tissue Organization Field Theory* (TOFT) é uma nova perspetiva sobre a carcinogénese que desafia a SMT. Esta teoria assenta no pressuposto de que o cancro é uma doença baseada na desorganização do tecido celular, resultante de uma perturbação nas interações recíprocas entre os diversos tipos de células do campo morfogenético. A TOFT concentra-se nas interações entre diferentes tipos de células e compartimentos, em vez de se centrar num único tipo de célula. Ao contrário da SMT, esta teoria defende que o estado padrão das células é a proliferação e que apenas restrições inibitórias podem impedir as células de continuar a proliferar [43, 47].

Esta teoria é baseada na *Theory of Organisms* (ToO), melhor explicada na secção 2.2, que inclui princípios como o da variação e da organização. Estes princípios fornecem uma base conceptual para entender o desenvolvimento normal de um organismo e as suas alterações, incluindo a iniciação de cancro, e podem ser explorados experimentalmente e modelados matematicamente.

2.1.3 Proteínas reguladoras da proliferação celular

A proliferação é um processo essencial para o crescimento e desenvolvimento de organismos multicelulares. No entanto, essa proliferação tem que ser regulada de forma a evitar desequilíbrios e doenças, como o cancro. Deste modo, existem proteínas inibidoras e ativadoras da proliferação celular para regular de forma coordenada este processo complexo. Nesta subsecção serão dados alguns exemplos concretos destas proteínas.

A proteína mTOR, uma cinase (enzimas responsáveis pela fosforilação de proteínas) crucial na regulação celular, desempenha um papel central na síntese de proteínas e no ciclo celular. A sua ativação ocorre em resposta a diversos sinais, como a presença de nutrientes e aminoácidos essenciais. Quando ativada, a mTOR estimula a síntese de proteínas e a proliferação celular, avançando o ciclo celular. Por outro lado, a inibição da mTOR pode levar à paragem do ciclo celular e até mesmo à morte celular.

A p53 é uma proteína considerada supressora de tumores devido à sua influência na prevenção do desenvolvimento do cancro. Esta proteína é ativada em resposta a danos no DNA, condições oxidativas e outros estímulos celulares, e atua como um regulador fundamental da resposta celular a esses estímulos. Esta ativação pode levar à interrupção do ciclo celular e à apoptose, evitando a proliferação celular e promovendo a morte celular [13].

Outros exemplos de proteínas ativadoras e inibidoras da proliferação celular são a PD-1, PD-L1 [18], AMPK, TSC1 e TSC2 [13].

2.1.4 Conclusões

A SMT e TOFT são teorias distintas para a explicação da carcinogénese. Enquanto que a primeira diz que a iniciação do cancro se deve à proliferação de uma única célula que sofreu sucessivas mutações no DNA, a segunda postula que a iniciação do cancro é consequência de uma desorganização do tecido celular.

Existem proteínas ativadoras e inibidoras da proliferação celular, sendo alguns exemplos apresentados nesta secção a mTOR e a p53. Este conhecimento é bastante importante visto que nos modelos computacionais desenvolvidos nesta dissertação será induzida uma dependência da concentração de proteínas à proliferação celular.

2.2 *Theory of Organisms*

Estudos no campo da biologia têm sido feitos com a ausência de uma teoria geral, sendo vagamente baseados em teorias matemáticas empíricas. A aplicação de princípios físicos sem uma análise apropriada das diferenças e compatibilidade entre situações biológicas e situações físicas tem contribuído para este problema. Exemplo destas diferenças é que, em física, uma força externa é necessária para obter uma mudança de movimento inercial, interpretada como uma propriedade de conservação fundamentada em simetrias teóricas, enquanto que, em biologia, uma célula ou um organismo

move-se espontaneamente usando forças e fluxos de energia e matéria, não necessitando de estímulos externos para se mover [27]. Porém, é essencial perceber que, embora os organismos se possam comportar de determinada forma, estes não podem violar teorias físicas, como as leis da termodinâmica, gravidade ou as propriedades quânticas das partículas que os constituem. Seria, então, necessária uma teoria que fornecesse princípios adequados para que fosse possível uma modelação matemática de propriedades e comportamentos biológicos, âmbito do nosso estudo.

Daí surge a ToO, uma teoria que assenta em três princípios fundamentais [48]: o estado normal das células é a proliferação com variação e motilidade, o princípio da variação e o princípio da organização. Esta hipótese tem sido desenvolvida por um grupo internacional e multidisciplinar de cientistas.

2.2.1 O estado normal das células é a proliferação com variação e motilidade

As células são caracterizadas pela agência (a capacidade de iniciar uma ação), normatividade (capacidade de gerar as suas próprias regras) e individuação (capacidade de mudar a própria organização). Isto leva ao conceito de estado normal, uma espécie de caso limite em que nenhuma força é aplicada sobre o sistema, à semelhança do conceito de inércia na física, que no caso das células é a proliferação com variação e motilidade [45, 49].

Após cada divisão celular (proliferação), a variação é introduzida, dado que as células formadas terão sempre características distintas umas das outras. Esta variação manifesta-se através da distribuição desigual de macromoléculas e organelos após cada divisão celular. É gerada, adicionalmente, pela estocasticidade inerente à expressão genética, o que leva à variação intrínseca de mRNA de célula para célula.

Quanto à motilidade, esta engloba os movimentos celulares e intracelulares dos tecidos e organismos, movimentos estes que são realizados consoante as restrições e constrangimentos do meio celular e, normalmente, são usados pela célula para migrar para um ambiente mais adequado.

2.2.2 O princípio da variação

Em física, os objetos são genéricos e evoluem de forma prevista e determinada à *priori*, enquanto que em biologia, estes (as células) têm características únicas e específicas e não existe uma indicação clara de como evoluirão. O princípio da variação é, basicamente, uma extensão do princípio da variação genética aleatória de Darwin. Este princípio enfatiza que a variação é uma propriedade fundamental das células e dos seres vivos, e que a mesma é influenciada tanto por mudanças aleatórias como pelo meio ambiente envolvente [45].

2.2.3 O princípio da organização

O princípio da organização é a principal fonte da estabilidade biológica. A ideia de "restrições" como meio de alcançar e manter a estabilidade foi tradicionalmente aplicada a processos intracelulares. Dizer que os sistemas biológicos são organizados quer dizer que alguns dos seus constituintes agem como "restrições" e praticam um regime de interdependência entre eles, nunca sendo suficiente analisar uma determinada "restrição" ou um determinado conjunto de "restrições" isoladamente. Por outras palavras, existem ciclos de retroação positiva e negativa que controlam a atividade celular [45].

2.2.4 Conclusões

O modelo computacional desenvolvido no estudo descrito por esta tese terá por objetivo o estudo da evolução de um organismo, tanto num caso normal como na iniciação de um processo tumoral.

Através da teoria apresentada e dos três princípios fundamentais da mesma, conseguimos descrever a organização e crescimento de um tecido celular. Isto faz com que possamos, então, basearmo-nos na mesma para o desenvolvimento do nosso modelo computacional.

2.3 Transporte Iónico

2.3.1 Canais iónicos

Um canal iónico é uma proteína que forma uma espécie de via seletiva passiva para o movimento de iões através da membrana celular, controlada pelos gradientes de concentração e potencial elétrico. Podem ser vistos como uma via hidrofílica entre o meio hidrofóbico da camada fosfolipídica da membrana. O movimento de iões através destes canais gera correntes elétricas membranares [15].

Um exemplo de canal iónico é o canal de sódio controlado pela voltagem da membrana celular, responsável pela geração e propagação de potenciais de ação em neurónios e células musculares. Quando um neurónio é estimulado, os canais de sódio dependentes do potencial abrem-se, permitindo que os iões de sódio fluam rapidamente para o interior da célula, resultando na despolarização e no início de um potencial de ação. Este sinal elétrico é então propagado ao longo do neurónio, permitindo a comunicação entre diferentes regiões do sistema nervoso.

De forma similar, os canais de potássio dependentes da diferença de potencial membranares estão envolvidos na repolarização da membrana celular após um potencial de ação, restaurando o potencial de repouso da membrana. Por outro lado, os canais de cloro desempenham um papel na estabilização dos potenciais de membrana e facilitam o movimento de sais e água através das membranas celulares.

2.3.2 Bombas iônicas

Bombas iônicas são proteínas que transportam ativamente íons através da membrana celular contra o seu potencial eletroquímico, usando energia da hidrólise de ATP ou outras fontes de energia.

Ao contrário dos canais iônicos, que permitem que os íons sejam transferidos passivamente a favor de seu gradiente eletroquímico, as bombas iônicas requerem energia para mover os íons contra seu gradiente de concentração [15].

Um exemplo bem conhecido de uma bomba iônica é a bomba de sódio-potássio, que se encontra na membrana plasmática das células animais. Esta bomba transporta ativamente três íons de sódio para o meio extracelular e dois íons de potássio para o meio intracelular por cada molécula de ATP hidrolisada. Ao fazê-lo, a bomba de sódio-potássio ajuda a estabelecer e manter os gradientes eletroquímicos de íons de sódio e potássio através da membrana celular. Estes gradientes são cruciais para garantir o funcionamento de vários processos celulares, incluindo a geração de potenciais de ação, a absorção de nutrientes e a regulação do volume celular.

Outra bomba iônica importante é a bomba de cálcio. Esta bomba é responsável por remover íons de cálcio do citoplasma e restabelecer níveis baixos de concentração de cálcio intracelular. Isto é essencial para terminar a sinalização de cálcio e prevenir uma sobrecarga deste nutriente, que pode ser prejudicial para o funcionamento celular.

Em geral, tanto os canais iônicos como as bombas iônicas desempenham papéis cruciais na regulação da excitabilidade e funcionamento celular, permitindo a transmissão eficiente de sinais elétricos e a manutenção da homeostasia iônica nas células.

2.3.3 *Gap Junctions*

Gap Junctions (GJs) são conexões intercelulares especializadas entre duas células adjacentes que permitem a troca direta e a passagem de pequenas moléculas, como íons e metabolitos, entre o citoplasma de duas células. As GJs são formadas por aglomerados de canais emparelhados chamados conexões, que são compostos por proteínas chamadas conexinas em vertebrados [12].

Na figura 2.1 podemos observar a organização molecular e a topologia esquemática de uma GJ. Basicamente, hemicanais nas membranas plasmáticas adjacentes de células vizinhas podem acoplar-se uns aos outros e formar GJs. Existem três tipos diferentes de GJs - homomérica/homotípica (1), heteromérica (2) e heterotípica (3), sendo que o que os distingue é a sua composição molecular. GJs homotípicas ou heterotípicas são compostas por dois hemicanais idênticos ou dois tipos diferentes de hemicanais, respetivamente. Hemicanais homoméricos são compostos por uma isoforma de conexina, enquanto hemicanais heteroméricos são compostos por uma ou mais isoformas de conexina (ou possivelmente pannexina). Cada hemicanal representa uma montagem de seis subunidades de proteína de conexina [41].

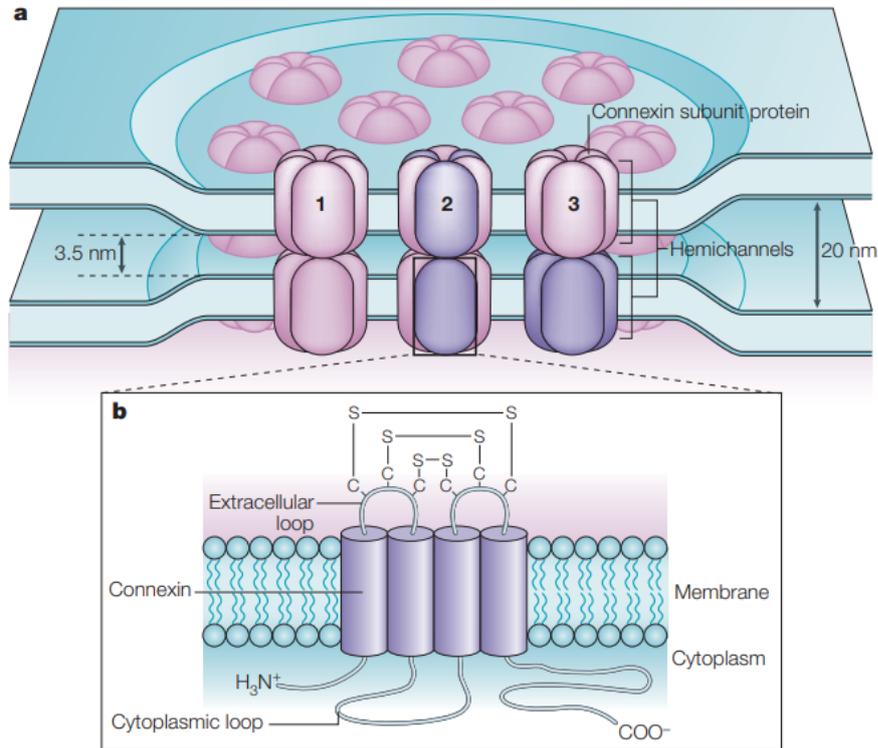


Figura 2.1: Organização molecular e topologia esquemática de GJs [41]. a) Representação de hemicanais e conexas afim de explicar como são formadas GJs. b) Representação de subunidades das conexas.

As subunidades de proteínas de conexina são proteínas da membrana celular com quatro domínios transmembranares que compartilham três resíduos de cisteína extracelulares que, por sua vez, são cruciais para o acoplamento de dois hemicanais. As subunidades variam principalmente no seu laço citoplasmático e região carboxi-terminal. A ligação S-S da figura 2.1b) representa ligações dissulfeto nos domínios extracelulares das conexas. As proteínas de pannexina têm uma sequência relacionada com a família de innexinas encontrada em invertebrados e também são capazes de formar canais GJs entre células [41].

2.3.4 Conclusões

Os canais iônicos são proteínas presentes na membrana celular que permitem a passagem seletiva de íons através da membrana, desempenhando um papel crucial na transmissão do potencial de ação em neurónios e na contração muscular. Por outro lado, as bombas iônicas são proteínas que utilizam energia para transportar íons contra o gradiente de concentração, mantendo a homeostasia celular e o equilíbrio das concentrações iônicas. Já as GJs são conexões intercelulares especializadas presentes na membrana celular de células adjacentes que permitem a comunicação direta entre elas e são essenciais para a coordenação e sincronização de atividades celulares.

O funcionamento destas estruturas é um dos focos do nosso modelo computacional na medida em que é através delas que se controla o potencial da membrana celular,

ou seja, a polarização das células, como será explicado na secção 2.4.

2.4 Bioeletricidade Celular

A bioeletricidade é a área da ciência que estuda fenómenos elétricos que ocorrem em sistemas biológicos, seja devido a campos elétricos endógenos, originados no interior dos seres vivos, ou a campos externos.

Um controlo elétrico distribuído, complementar a regulações bioquímicas e biomecânicas, também está envolvido nas interações multicelulares. A membrana celular atua como uma interface bioelétrica central entre o microambiente interno e externo, incluindo a vizinhança celular e o citoplasma envolvente. As propriedades bioelétricas das células serão determinadas pela atividade de canais e bombas iónicas (de iões como Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e Cl^-), bem como de GJs, canais de comunicação celular que permitem a passagem de iões e pequenas moléculas entre células adjacentes, criando uma conexão direta entre os seus citoplasmas, como explicado em 2.3.3. Uma vez que tanto os canais como as GJs são estruturas biológicas que controlam a passagem de corrente elétrica através das membranas celulares, estes são semelhantes a transistores, pois controlam a corrente com base na diferença de potencial.

A diferença de potencial através da membrana celular (entre o interior e o exterior da membrana) é comumente designada por V_{mem} e será assim tratada daqui para a frente. Os elementos e aspetos fundamentais dos fenómenos bioelétricos estão representados na figura 2.2. As bombas iónicas, alimentadas pelo ATP, como a bomba de iões sódio-potássio descrita na secção 2.3.2, são fundamentais na criação de gradientes eletroquímicos de Na^+ e K^+ através da membrana (figura 2.2a). O potencial V_{mem} resulta essencialmente do movimento de cargas iónicas através da membrana (figura 2.2b) [38], causando diferenças de concentração.

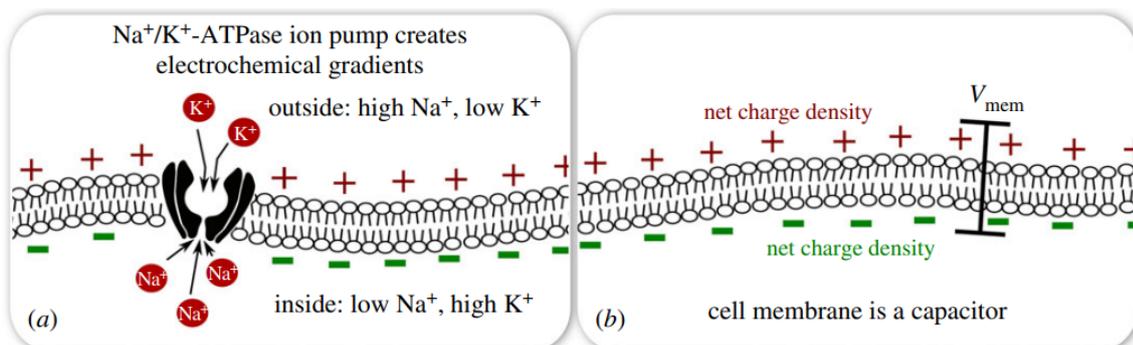


Figura 2.2: Visão geral das unidades funcionais básicas da bioeletricidade. a) As bombas iónicas geram gradientes de carga e de concentração. b) O potencial da membrana (V_{mem}) é gerado por uma diferença na densidade de carga nas regiões interna e externa da membrana plasmática da célula, onde a membrana atua como um condensador, C_{mem} [38].

As redes celulares propagam padrões complexos de estados bioelétricos de três formas principais [24]:

- Modulando as ligações através de GJs (controlando a topologia da rede), sendo que o V_{mem} depende das condutâncias das GJs que medem o quão acopladas bioelectricamente estão duas células vizinhas;
- Abrindo ou bloqueando canais iônicos, regulando o V_{mem} real de qualquer célula, dado que esta diferença de potencial é modulada pelas concentrações intra e extracelular de iões ;
- Alterando o movimento de moléculas sinalizadoras como a serotonina.

Os mecanismos bioelétricos são um aspeto fundamental do microambiente para que as células tomem decisões consoante o estado das células vizinhas e do ambiente extracelular. É importante referir que existe uma relação muito próxima entre a bioeletricidade e a genética, formando um ciclo de interdependência [9]:

- Os genes codificam os canais iônicos e as proteínas GJs que regulam a bioeletricidade celular;
- Os sinais bioelétricos influenciam a expressão genética no processo pelo qual a informação de um gene é usada para sintetizar um produto funcional, como essas mesmas proteínas.

2.4.1 Modelo de Hodgkin-Huxley

O modelo de Hodgkin-Huxley é um modelo matemático que descreve como é que os potenciais de ação nos neurónios são iniciados e se propagam. O modelo é baseado na ideia de que as propriedades elétricas dos neurónios são determinadas pelo fluxo de iões que passam através da membrana celular. Este modelo descreve o comportamento dos canais iônicos dependentes de V_{mem} que, consoante mudanças nesse mesmo potencial, se abrem ou fecham [33, 39]. Na figura 2.3 está representado um potencial de ação em função do tempo.

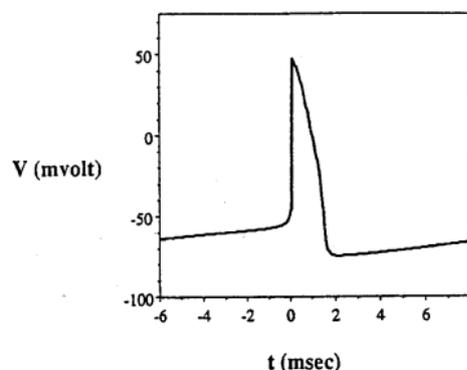


Figura 2.3: Potencial de ação (mV) em função do tempo (milisegundos) [21].

O modelo consiste num conjunto de equações diferenciais que descrevem as variações no tempo de V_{mem} e da condutância dos diferentes canais iônicos. São incluídos

três tipos de canais iônicos: canais de sódio, canais de potássio e canais de fuga. Segundo este modelo, a variação temporal de V_{mem} é descrita por [21]:

$$\frac{dV_{mem}}{dt} = \frac{I_{total}}{C_i} = \frac{-I_{Na} - I_K - I_L}{C_i} \quad (2.1)$$

em que temos a densidade total de corrente da membrana (I_{total}), a capacidade elétrica da membrana (C_i) e a variável tempo (t). As equações 2.2, 2.3 e 2.4 descrevem a corrente iônica criada pelo movimento de íons de sódio (I_{Na}), de potássio (I_K) e dos íons que se movimentam através dos canais de fuga (I_L), respetivamente.

$$I_{Na} = G_{Na} \cdot (V - E_{Na}) \quad (2.2)$$

$$I_K = G_K \cdot (V - E_K) \quad (2.3)$$

$$I_L = G_L \cdot (V - E_L) \quad (2.4)$$

Estas envolvem o potencial de equilíbrio dos canais de sódio (E_{Na}), dos canais de potássio (E_K) e dos canais de fuga (E_L), além da condutância dos canais de sódio (G_{Na}), dos canais de potássio (G_K) e dos canais de fuga (G_L). A condutância dos canais de sódio é definida da seguinte forma:

$$G_{Na} = m^3 h \bar{G}_{Na} \quad (2.5)$$

onde as funções m e h variam com o tempo de acordo com:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m m \quad (2.6)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1 - h) - \beta_h h \quad (2.7)$$

Enquanto que a condutância dos canais de potássio é descrita por:

$$G_K = \bar{G}_K n^4 \quad (2.8)$$

e a função n varia no tempo de acordo com:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n \quad (2.9)$$

em que \bar{G}_{Na} e \bar{G}_K são constantes com dimensões de condutância por cm^2 , α e β são funções que variam com V_{mem} mas não com o tempo, como podemos ver pelo exemplo das equações de α_n e β_n :

$$\alpha_n = 0.01(V + 10) / \left[\exp \frac{V + 10}{10} - 1 \right] \quad (2.10)$$

$$\beta_n = 0.125 \exp(V/80) \quad (2.11)$$

α e β representam as taxas de transferência das moléculas para dentro e fora da membrana celular, respetivamente. m representa a proporção de moléculas ativadoras dos canais de sódio do lado de dentro da membrana, $1-m$ representa a proporção de moléculas ativadoras do lado de fora da membrana, h é a proporção de moléculas inibidoras do lado de fora da membrana e $1-h$ a proporção de moléculas inibidoras do lado de dentro da membrana. Já n representa a proporção de partículas ativadoras do canal de potássio que estão numa determinada posição (por exemplo, no interior da membrana), enquanto $1-n$ representa a proporção dessas partículas que estão noutra posição (por exemplo, no exterior da membrana).

Os canais de sódio são responsáveis pela rápida despolarização do potencial da membrana durante a fase inicial do potencial de ação, enquanto os canais de potássio são responsáveis pela repolarização do potencial da membrana no final do mesmo. Os canais de fuga permitem a passagem de uma pequena quantidade de iões através da membrana.

O modelo pretende descrever o comportamento elétrico de uma membrana celular em termos de um circuito elétrico equivalente, mostrado na figura 2.4:

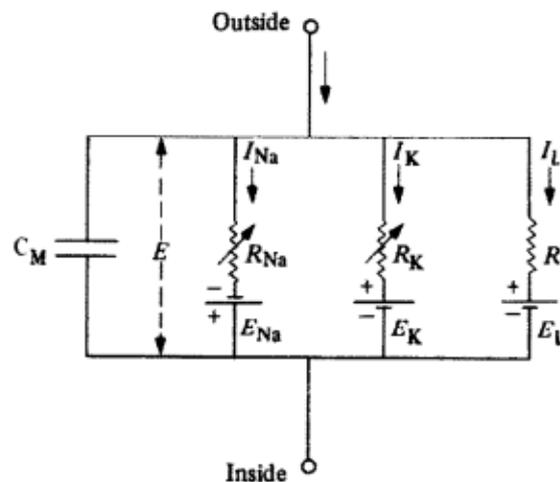


Figura 2.4: Circuito elétrico equivalente que representa a membrana celular. $R_{Na} = 1/G_{Na}$; $R_K = 1/G_K$; $R_L = 1/G_L$. R_{Na} e R_K variam com o tempo bem como o potencial de membrana. Os outros componentes são constantes. [21]

Os elementos eletrónicos representam as propriedades eletrofisiológicas da membrana:

- A capacitância da membrana (C_m) no modelo de Hodgkin-Huxley representa a capacidade da membrana celular de armazenar carga elétrica. É análoga a um

condensador num circuito elétrico e é representada por um componente capacitivo no modelo. A capacitância da membrana tem influência na velocidade das alterações no potencial da membrana.

- As resistências em paralelo (R_{Na} , R_K , R_L) representam os canais iônicos específicos presentes na membrana celular. Cada canal iônico possui uma condutância (G) associada, que determina o fluxo dos íons respetivos através da membrana.
- As correntes iônicas (I_{Na} , I_K , I_L) representam o fluxo de íons através da membrana celular.
- Os potenciais de equilíbrio (E_{Na} , E_K , E_L) representam os valores de potencial nos quais não há fluxo líquido de íons através dos canais iônicos correspondentes. O potencial de equilíbrio do sódio (E_{Na}) é o potencial para o qual não há movimento líquido de íons de sódio, o potencial de equilíbrio do potássio (E_K) é o potencial no qual não há movimento líquido de íons de potássio e o potencial de equilíbrio dos canais de fuga (E_L) é o potencial no qual não há movimento de íons através dos canais de fuga.

O modelo de Hodgkin-Huxley é um modelo complexo que requer um grande número de parâmetros a serem estimados a partir de dados experimentais. No entanto, este tem sido amplamente utilizado para estudar as propriedades elétricas dos neurónios e compreender como eles contribuem para a função cerebral.

2.4.2 Regulação do estado bioelétrico das células

Algo também conhecido é que um fator chave para a diferenciação de células estaminais é a regulação do seu estado bioelétrico. Estudos recorrendo ao uso de pequenas moléculas para controlar a atividade de canais iônicos destas células têm revelado que V_{mem} pode induzir e até substituir indutores químicos bioelétricos [26]. Os canais iônicos podem abrir e fechar após o processo de tradução do RNA, sendo que as células podem estar exatamente no mesmo estado bioelétrico apesar das suas expressões genéticas serem bastante distintas.

Muitos dos medicamentos que têm como objetivo a manipulação de canais iônicos já estão aprovados para humanos para o caso de tratamentos de arritmias cardíacas e epilepsias, e podem ser reaproveitados como eletrocêuticos em tratamentos regenerativos e antineoplásicos [4, 26, 34, 52]. No entanto, existem sérias limitações e cuidados a ter quanto a esta manipulação, já que a alteração do potencial da membrana pode ter efeitos inesperados no microambiente celular. O que quer dizer que, para casos como o do cancro, em que a bioeletricidade é um fator crítico para a progressão e metástase, a hipótese de que canais iônicos são simples alvos terapêuticos que podemos fechar e abrir é incorreta. A estratégia deverá ser focada no controlo do V_{mem} , o que pode requerer o controlo de múltiplos canais em diferentes tipos de células e microambientes.

Estudos recentes com *Xenopus laevis* têm revelado que fortes danos na estrutura e função cerebrais induzidos por teratogenes podem ser revertidos reforçando certos estados bioelétricos específicos. Surpreendentemente, mesmo os efeitos devastadores

de mutações em genes importantes da neurogênese, como o Notch, um dos principais genes que controlam a identidade celular e a comunicação entre células vizinhas, podem ser corrigidos [35] e levar a uma morfologia cerebral e capacidade de aprendizagem normal pela sobreexpressão ou ativação de canais iônicos. Estes canais, regulados por V_{mem} , agem de forma a aumentar a diferença entre os diferentes estados bioelétricos, isto é, hiperpolarizam as células polarizadas e não afetam as células despolarizadas. A capacidade criada para usar estes canais de maneira a reforçar a diferença de V_{mem} que demarca os limites de um cérebro em desenvolvimento (permitindo definir o tamanho e forma do mesmo), foi apenas possível através da construção de um modelo computacional do circuito endógeno que estabelece o pré-padrão do cérebro. Isto permite-nos não só compreender as propriedades espaciais e como estas mudam durante a teratogênese, mas também simular potenciais intervenções bioelétricas *in silico* [36].

Na figura 2.5 podemos observar um gráfico com os valores de V_{mem} para vários tipos de células diferentes.

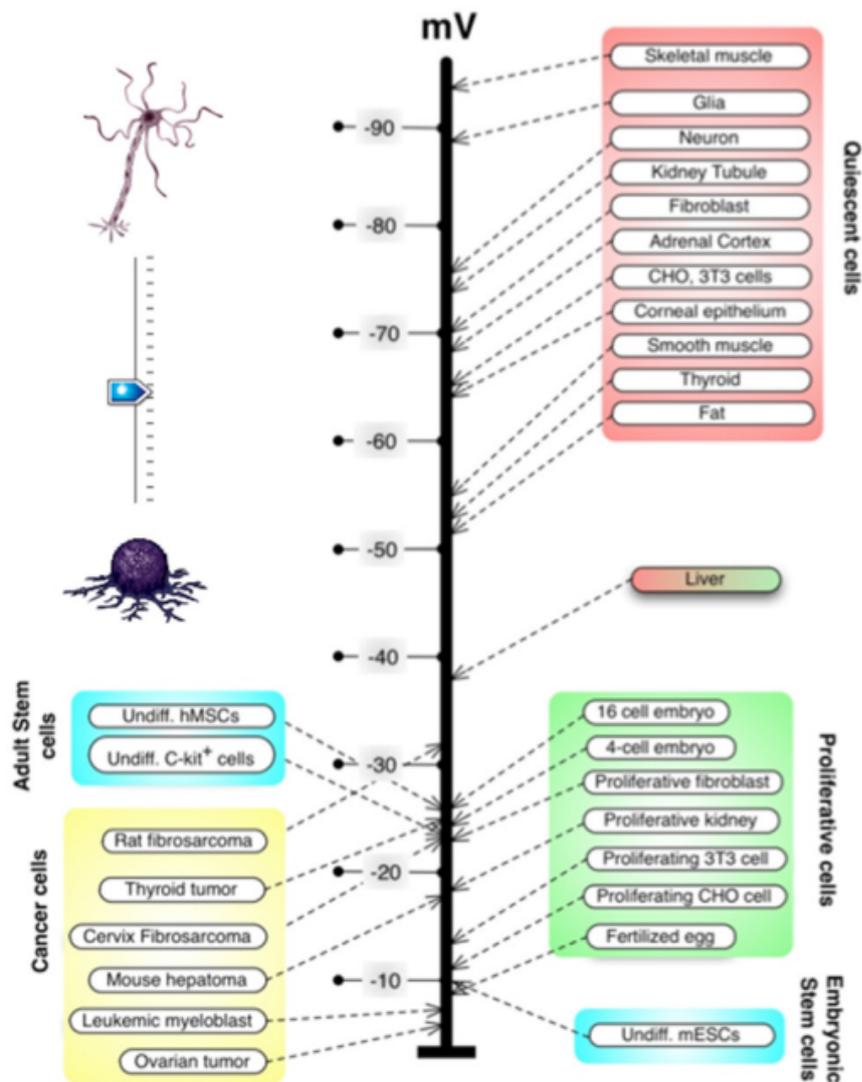


Figura 2.5: Valores de V_{mem} em mV associados a cada tipo de célula referenciado na figura [24].

A modelação computacional não torna apenas possível a identificação de medicamentos bioelétricos já aprovados que revertem graves defeitos no cérebro neste modelo de vertebrado. Explica também porque é que o efeito funciona a longo alcance (através da propagação do estado bioelétrico pelos tecidos), como no caso de células sobreexpressoras de HCN2, uma proteína transmembranar que é ativada por hiperpolarização da célula, implantadas fora do sistema nervoso.

2.4.3 Relação com a iniciação do Cancro

É sabido há bastante tempo que a tumorigénese começa com o desacoplamento bioelétrico das células da rede morfogenética somática, e um fator que pode induzir este acontecimento é a despolarização [2, 22]. Este fenómeno pode ser observado em experiências feitas com girinos onde, usando corantes sensíveis à voltagem, se revelam as localizações em que estavam a surgir tumores, como podemos ver na figura 2.6. Isto pode querer dizer que o estado bioelétrico das células é um biomarcador promissor para a deteção não-invasiva de pré-cancro e margens do tumor durante cirurgias [24].

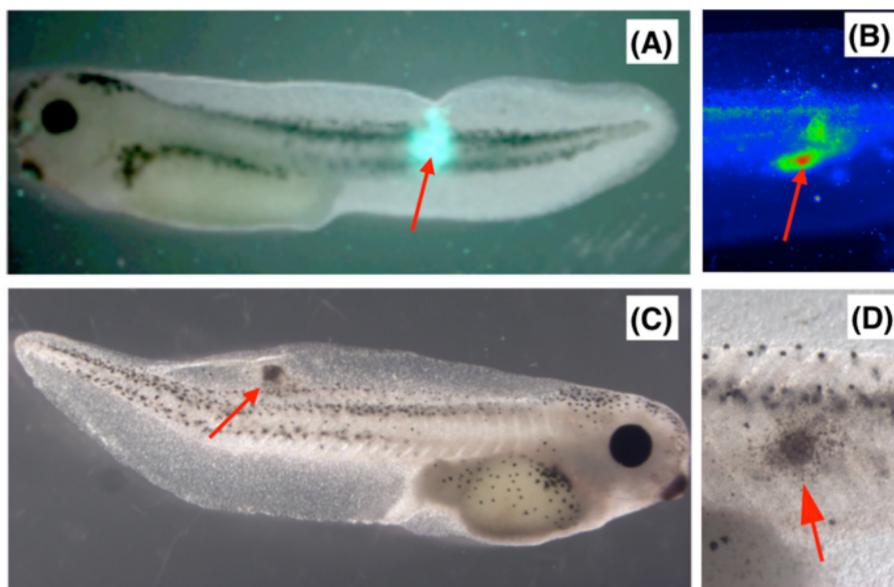


Figura 2.6: Localização de tumores revelada através da bioeletricidade. A e B) Despolarização celular observada em girinos através de corantes fluorescentes sensíveis à voltagem. C e D) localização de tumores induzidos por microinjeção de mRNA de um oncogene humano [24].

Pesquisas do estado bioelétrico dos tecidos revelam que células somáticas quiescentes tendem a ser hiperpolarizadas, isto é, com um valor absoluto alto para V_{mem} ($\approx 70 \text{ mV}$), enquanto que células embrionárias proliferativas e cancerígenas tendem a ser despolarizadas, com um valor absoluto baixo de V_{mem} ($\approx 20 \text{ mV}$) [3, 50]. Tendo isto em conta, a alteração do estado bioelétrico das células, por exemplo de polarizado para despolarizado, pode levar à proliferação descontrolada de células e consequentemente à formação de um tumor.

2.4.4 Conclusões

Um aspeto importante a reter sobre o estado bioelétrico das células é que este é determinado pelo V_{mem} , diferença de potencial através da membrana celular, sendo uma célula polarizada se tiver um valor absoluto alto de V_{mem} e despolarizada se tiver um valor absoluto baixo de V_{mem} . O fator que estabelece o valor de V_{mem} é a concentração extra e intracelular de iões positivos e negativos, e esta concentração pode ser regulada através de canais iónicos e GJs.

O modelo de Hodgkin-Huxley descreve matematicamente como é que os canais iónicos de sódio e potássio se comportam durante um potencial de ação, elucidando a dinâmica da abertura e fecho desses canais consoante as variações de V_{mem} . Este modelo serve como base matemática para o modelo computacional desenvolvido no nosso projeto.

Está cientificamente comprovado que existe uma relação entre a iniciação do cancro e a bioeletricidade das células: as células proliferativas são geralmente despolarizadas, enquanto que as quiescentes são polarizadas. A partir desta informação, uma possível vertente de estudo é de que forma se poderá manipular o valor de V_{mem} de forma a polarizar células despolarizadas retirando-lhes o seu poder proliferativo (normalizando assim o seu comportamento).

Capítulo 3

Estado da Arte

Neste capítulo damos uma visão global de alguns modelos computacionais provenientes de artigos recentes relacionados com o estudo desta dissertação. Muitas das equações e metodologias usadas nos modelos desenvolvidos para este projeto foram retiradas de artigos apresentados neste capítulo. Estes modelos relacionam a Bioeletricidade com outros campos de estudo e conceitos como a Genética, os efeitos comunitários em agregados multicelulares, a iniciação do cancro e a inibição por contacto.

3.1 Modelos computacionais

3.1.1 Modelo que relaciona Bioeletricidade com a Genética

A bioeletricidade tem surgido como um mecanismo essencial para a transmissão e processamento de sinais de um nível unicelular para um domínio multicelular. Foi apresentado no artigo [8] um modelo que descreve a interconectividade entre as células e as oscilações do seu estado bioelétrico. Este modelo relaciona a expressão genética com o estado bioelétrico de cada célula, focando-se na taxa de processos como a transcrição e tradução genéticas que regulam o potencial da membrana celular.

O modelo, representado na figura 3.1, segue uma descrição de V_{mem} simplista mas ao mesmo tempo qualitativamente útil com dois canais iónicos, controlados por V_{mem} , um canal de polarização (pol), que controla a corrente que polariza a membrana, e um outro de despolarização (dep), que controla a corrente que despolariza a membrana.

Resumidamente, as equações dinâmicas encontradas na figura 3.1, que descrevem as concentrações de mRNA intracelular (m) e de proteínas (p) de um dos canais iónicos, estão interligadas com o potencial da célula. Isto porque a distribuição espacial dos iões e moléculas que regulam as redes genéticas de transcrição e tradução dependem dos valores locais de V_{mem} . As constantes de velocidade para transcrição de mRNA (r_m^0) e tradução de proteínas (r_p) e respetivas constantes de taxas de degradação (d_m e d_p) podem depender de múltiplos passos cinéticos. Para a dependência da condutância do canal de polarização (G_{pol}) na concentração intracelular de proteína p , foi considerada uma função de Hill, indicada na figura. Temos ainda E_{pol} e E_{dep}

como os potenciais de equilíbrio de polarização e despolarização.

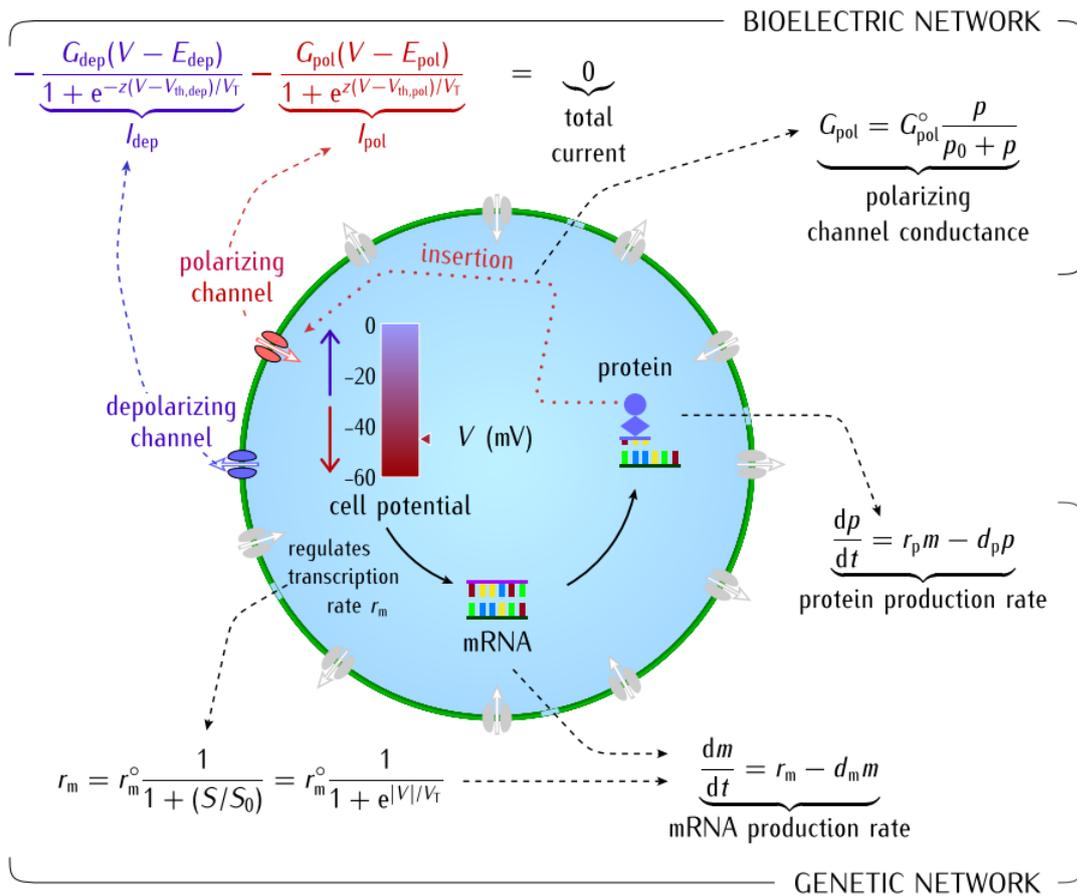


Figura 3.1: Interação genética e bioelétrica ao nível celular e respectivas equações dinâmicas do processo de transcrição e tradução [8].

O papel de um determinado canal iônico é sensível a outros canais iônicos funcionais que podem aumentar ou diminuir a sua expressão através da atividade elétrica da célula. Este mecanismo de retroação entre canais diferentes já foi confirmado experimentalmente [25, 29]. Basicamente, neste modelo, são feitas as seguintes assunções:

- A concentração p da proteína que forma o canal iônico depende do potencial V_{mem} , e o canal abrirá quando a célula estiver polarizada;
- A concentração S de um ião ou molécula de sinalização específica, dependente do potencial celular, influencia a taxa efetiva de transcrição da proteína r_m .

O potencial da membrana é regulado pelas condutâncias dos canais de polarização e de despolarização, G_{pol} e G_{dep} . Passada esta descrição em termos unicelulares, a interação entre a descrição genética e bioelétrica das células é estendida para o campo multicelular, através das GJs com uma condutância efetiva G_{ij} , acoplando a célula i à célula j .

Muitas das equações usadas neste modelo serão adaptadas para o nosso, o que quer dizer que poderemos, com base nele, descrever de forma simples o estado bioelétrico das células e a comunicação bioelétrica entre as mesmas.

3.1.2 Modelo que relaciona os efeitos comunitários com a reprogramação bioelétrica em agregados multicelulares

No modelo descrito no artigo referido nesta subsecção, o ênfase é colocado no efeito do estado bioelétrico de uma única célula na rede intercelular à volta da mesma [9]. Ao longo do artigo são conduzidas simulações multicelulares com o objetivo de descrever uma variedade de efeitos comunitários bioelétricos. Estas simulações permitem perceber quando é que uma heterogenia local composta, por exemplo, por um pequeno grupo de células polarizadas, pode ser alcançada numa região circundante despolarizada em diferentes cenários bioelétricos.

O pressuposto central do modelo é que as GJs, dependentes de V_{mem} , fazem com que um domínio de células compartilhe o mesmo estado de polarização devido às suas elevadas condutâncias, o que permite uma conectividade alta entre as células. Este modelo baseia-se também no facto de células polarizadas tenderem a ter maior acoplamento intercelular entre si que células despolarizadas [30].

Para as simulações, todas as células são definidas com parâmetros iguais para enfatizar os efeitos de comunidade no agregado. A figura 3.2 mostra um teste em que se colocou, numa primeira fase, um núcleo de células despolarizadas rodeadas por células polarizadas e, numa segunda fase, foi colocado um núcleo de células polarizadas rodeadas por células despolarizadas. Devido ao efeito de comunidade ser mais intenso nas células polarizadas do que nas despolarizadas, um conjunto de células despolarizadas não consegue resistir à conversão pelo conjunto polarizado (linha superior). Por outro lado, um conjunto central de células polarizadas consegue resistir à conversão pelo conjunto circundante despolarizado (linha inferior).

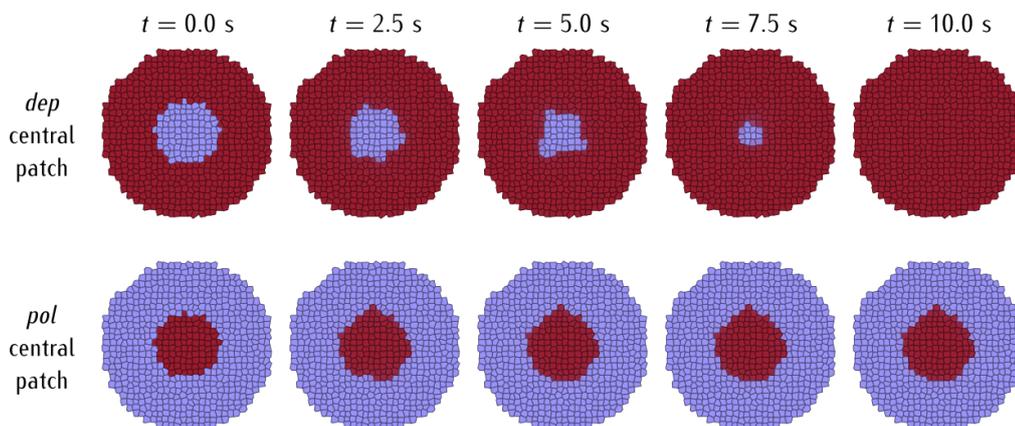


Figura 3.2: Evolução temporal do conjunto multicelular para duas polarizações da zona central [9].

Algumas conclusões tiradas neste artigo são que um grupo de células polarizado fortemente interconectado pode resistir à despolarização por um conjunto despolarizado mais fracamente interligado, o que pode representar um mecanismo bioelétrico para consolidar alterações locais de polarização. Por outro lado, o efeito oposto deve ser muito mais fraco, uma vez que o grupo polarizado fortemente interconectado tenderá a converter um grupo despolarizado fracamente interligado, o que sugere um

mecanismo para controlar grupos de células proliferativas que estejam rodeadas por células quiescentes.

3.1.3 Modelo que relaciona a Bioeletricidade com a iniciação do cancro

Podemos agora falar de um outro modelo a duas dimensões que relaciona diretamente a iniciação do cancro com o estado bioelétrico das células, apresentado num outro artigo [5], baseado noutros modelos previamente desenvolvidos [8, 9]. O principal objetivo do desenvolvimento do mesmo foi o de estudar a possibilidade de complementar a teoria geralmente aceite para a iniciação do cancro, a SMT (subsecção 2.1.1), com uma outra teoria, a TOFT (subsecção 2.1.2), que descreve a iniciação de um tumor como sendo desencadeada pela falha dos mecanismos que controlam a organização do tecido celular, levando a que haja uma proliferação descontrolada das células.

O propósito do programa computacional usado no artigo, desenvolvido em matlab, foi o de visualizar a expansão e estabilidade de um tecido celular genérico, a duas dimensões, para, assim, descrever a dinâmica e organização de um organismo hipotético. O crescimento do organismo segue a ToO explicada na secção 2.2. Para isto, o autor começou por determinar os parâmetros do modelo, baseados em resultados experimentais e em estimativas razoáveis, no sentido de os poder utilizar nas equações necessárias para descrever a dinâmica do mesmo. Estas descrevem a troca de iões a nível intercelular e com o meio extracelular.

No modelo, que é um autómato celular, foi criado um domínio, com a dimensão de 300×300 espaços, onde cada pixel pode corresponder a uma célula ou a um espaço vazio, e foi colocada uma única célula despolarizada (proliferativa) no centro do domínio (princípio de que o estado normal das células é a proliferação com variação e motilidade). O gráfico que representa este domínio tem um mapa de cores que descreve a polarização das células (figura 3.3). Em cada geração, as células têm uma probabilidade de 1% de se moverem para um espaço vazio na sua vizinhança e uma probabilidade de 10^{-4} de morrerem. À medida que as gerações vão evoluindo, as células vão proliferando, sendo que, após cada mitose, a célula muda as suas propriedades bioelétricas (princípio da variação) na direção de um estado mais polarizado (não proliferativo). As equações seguem a vizinhança de von Neuman, isto é, utilizam os quatro vizinhos mais próximos da célula central considerada. As correntes iónicas são calculadas e o potencial da membrana determinado até que, por fim, acaba por convergir quando o potencial da membrana de qualquer célula varia menos que 0.1mV entre duas gerações sucessivas.

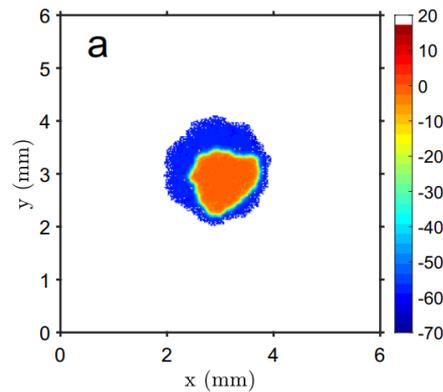


Figura 3.3: Imagem descritiva do estado do sistema e do estado bioelétrico das células após várias gerações através de um mapa de cores que indica o potencial da membrana celular em mV [5].

Algumas das conclusões e contribuições em que o estudo enunciado acima poderá ter aplicação será no tratamento do cancro, uma vez que o estado bioelétrico das células é reversível e seria possível repolarizá-las, revertendo assim o seu poder proliferativo, através, por exemplo, de medicamentos capazes de manipular canais iónicos, tal como explicado anteriormente. Outra contribuição significativa foi concluir que a forma e tamanho do organismo pode ser controlado através da polarização das células.

3.1.4 Modelo que relaciona a Bioeletricidade com a Inibição por contacto

A inibição por contacto é um fenómeno biológico que ocorre em células animais, onde estas param de se dividir ou migram quando entram em contacto com outras células. Este é um mecanismo que ajuda a regular o crescimento e a divisão celular para manter a arquitetura tecidual normal e prevenir a formação de tumores, sendo que a perda do mesmo está por vezes associada à iniciação de cancro [32, 37].

Mais recentemente, um artigo [6] partiu do pressuposto de que células na periferia do tecido celular têm uma redução da inibição por contacto, o que leva à despolarização das mesmas e consequente proliferação. Por outro lado, supôs que um aumento do contacto celular e comunicação bioelétrica via GJs leva a uma diminuição da proliferação celular devido à polarização elétrica da sua membrana. A forma como esta hipótese foi colocada no modelo foi considerando que quando a percentagem de comprimento da membrana em contacto com outras células é maior do que um dado limite definido, a célula polariza e deixa de proliferar, como esperado num ambiente mais preenchido. Então, apenas células na periferia ainda podem estar despolarizadas e manter o seu potencial de proliferação (se houver espaço livre disponível para ocorrer mitose).

Em cada passo de Monte Carlo, para cada célula é contado o número de pixéis em contacto com células vizinhas e o meio. Um ciclo sobre cada célula é então executado, onde são resolvidas as equações de forma a que as correntes de polarização e despolarização, juntamente com a corrente que passa pelas GJs, sejam calculadas. Depois

disto, é usado o método de Euler para resolver a equação que determina o novo valor de V_{mem} na membrana. Como os processos bioelétricos são muito mais rápidos do que os outros processos biológicos relevantes considerados neste modelo (como migração e proliferação), em cada etapa a simulação bioelétrica é executada de forma iterativa até que convirja (quando a máxima variação de potencial absoluto de qualquer célula entre sucessivas iterações está abaixo de 0,1 mV). Após a convergência, as células proliferativas podem sofrer mitose se tiverem um volume superior a 90% do volume alvo (típico) da célula. Se a célula se multiplicar, as duas células resultantes irão mudar ligeiramente os seus parâmetros bioelétricos para incluir, tal como em modelos descritos anteriormente, o princípio da variação.

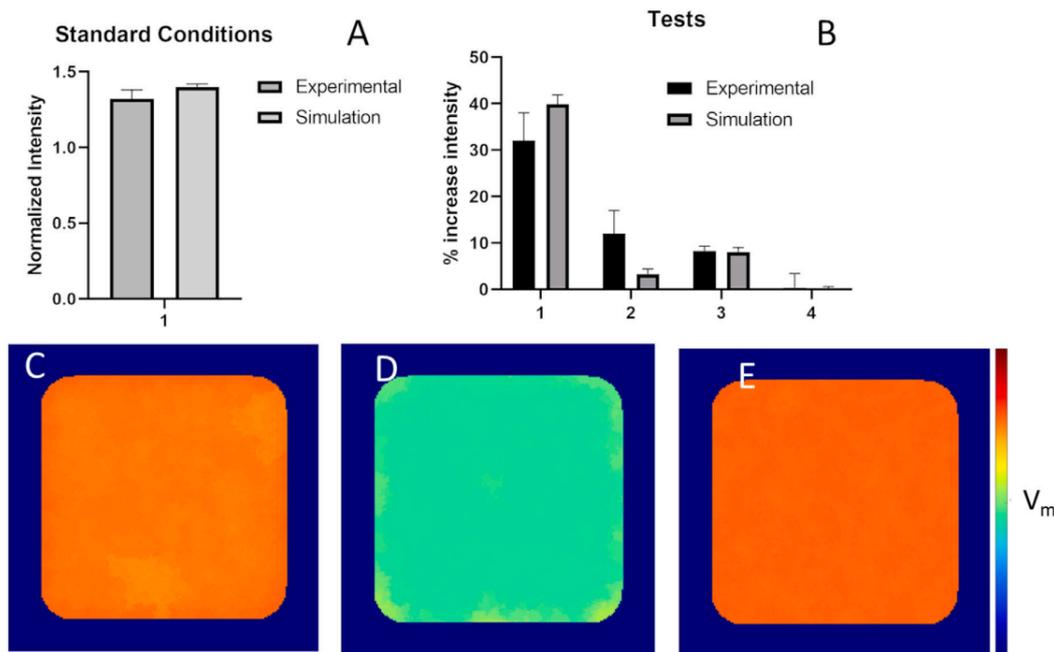


Figura 3.4: Comparação de resultados experimentais e simulações realizadas para A) a intensidade relativa da fluorescência de corantes sensíveis à voltagem, em condições padrão, para células na periferia em relação ao centro do domínio e para B) o aumento relativo na intensidade de fluorescência dos corantes sensíveis à voltagem na região periférica em relação à região central, para condições padrão (1) e para três testes de manipulação descritos no texto (2-Gramicidina, 3-carbenoxolona (CBX) e 4- E_{null}). Média do valor de polarização celular (indicada pela escala e cores) de $n=20$ experiências para C) adição de Gramicidina, D) adição de CBX e E) uso de células E_{null} que não expressam a proteína E-cadherina [6].

Muitos testes foram simulados com este modelo, desde a adição de medicamentos até à manipulação da expressão de proteínas, o que irá alterar as propriedades bioelétricas das células. Na figura 3.4 A) e B) podemos observar a comparação de resultados experimentais com as simulações realizadas. Um dos testes realizados foi a adição de Gramicidina (Fig.3.4C), um antibiótico peptídico curto, que despolariza as células por inserção na membrana plasmática, criando canais para o fluxo de iões. Isto é simulado diminuindo o parâmetro de condutância de polarização G_{pol}^0 para as células polarizadas, aumentando a importância relativa dos canais de despolarização. O efeito deste teste é o aumento da taxa de despolarização fazendo com que, no final da simulação,

todas as células fiquem despolarizadas. Um segundo teste consistiu na administração de CBX (Fig.3.4D) que bloqueia a ação de GJs. O efeito desta interrupção da comunicação é simulado diminuindo o contacto das células com as células vizinhas, de maneira a que haja menos moléculas e sinais a ser trocados entre elas. O impacto é descrito por uma diminuição do contacto da célula com o exterior (menos sensível a sinais externos) e, como consequência, as células estão, no final da simulação, todas ou quase todas polarizadas. Por fim, no teste E_{null} , foram utilizadas células que não expressam a proteína de adesão celular E-cadherina. Como a ausência desta proteína reduz o contacto entre as células e aumenta o contacto com o meio externo, isto diminui a inibição por contacto, o que faz com que no estado final todas as células fiquem despolarizadas (Fig.3.4E).

O autor do artigo refere que o modelo experimental usado pode ser estendido para 3D para assim obter uma aproximação mais fidedigna de um organismo real com uma organização do tecido celular e interação entre as células mais complexas.

3.1.5 Conclusões

Nesta secção foram apresentados 4 modelos computacionais distintos, um que relaciona a Bioeletricidade com a Genética, um que relaciona a bioeletricidade com os efeitos de comunidade presentes, outro que relaciona diretamente a Bioeletricidade com a iniciação do Cancro e, por último, um que relaciona a Bioeletricidade com o fenómeno de Inibição por contacto.

O primeiro descreve a interconectividade entre as células e o seu estado bioelétrico. Este relaciona a bioeletricidade das células com o seu material genético, estabelecendo um padrão de dependência entre as taxas de transcrição e tradução genéticas e o potencial membranar V_{mem} .

No segundo, o modelo pretende enfatizar os efeitos de comunidade que a bioeletricidade das células pode causar. Através da informação passada pelas GJs, o modelo pretende demonstrar quando é que uma heterogenia local, em que temos por exemplo um conjunto de células despolarizadas circundado por um conjunto de células polarizadas, pode ser alcançada.

No terceiro modelo, é descrito o desenvolvimento de um organismo hipotético, a duas dimensões, a partir de uma célula despolarizada (proliferativa) colocada no centro do domínio, em que cada pixel corresponde a uma célula. Deste modo, é estudado o desenvolvimento do organismo num caso normal mas também para o crescimento de um tumor.

Já no quarto modelo apresentado, também é estudado o desenvolvimento de um organismo hipotético, mas desta vez é considerado um fenómeno biológico denominado inibição por contacto, um mecanismo que ajuda a regular o crescimento celular e prevenir a formação de tumores. Este modelo pressupõe que as células na periferia do tecido celular têm uma redução da inibição por contacto fazendo com que estas células fiquem despolarizadas e, conseqüentemente, proliferem.

Algo que podemos ter perceção ao longo deste capítulo é que já existem muitos modelos a duas dimensões que relacionam a bioeletricidade das células com outras

áreas de estudo da biologia. Porém, existe uma carência de modelos a três dimensões, e conseqüentemente mais realistas e fidedignos. Esta é a principal lacuna que o estudo da nossa tese pretende colmatar, desenvolvendo um modelo a três dimensões que relacione a bioeletricidade e a sua aplicação ao desenvolvimento de organismos e iniciação tumoral. Através destes modelos previamente desenvolvidos, temos uma base para desenvolver o nosso próprio modelo computacional a três dimensões.

Uma outra limitação apresentada pelos modelos apresentados é a não consideração de fenômenos biológicos que afetam o sistema quando se trata de uma situação real, como interações mecânicas e reações bioquímicas. Uma oportunidade de melhoria para qualquer um destes modelos será ter em conta estes condicionamentos, tornando o modelo mais completo, complexo e realista.

No futuro, algumas oportunidades de investigação serão a recriação dos testes realizados aqui *in silico* para *in vitro*, para corroborar resultados obtidos.

Capítulo 4

Métodos

No presente capítulo serão apresentados os métodos utilizados no desenvolvimento dos modelos computacionais que descrevem o crescimento de um organismo hipotético a partir de uma célula proliferativa. Na secção 4.1 é descrito o funcionamento de um autómato celular e as regras que o definem, desde a vizinhança às condições fronteira. Depois, na secção 4.2, é apresentada a Equação de Hill e como nos pode ser útil na aplicação de condições a algumas variáveis do modelo desenvolvido. Na secção 4.3 é apresentado o modelo de Turing e o modelo de Gierer-Meinhardt e de que forma estes modelos conseguem reproduzir a formação de padrões espaciais em sistemas de reação-difusão. Por fim, na última secção (4.4), são descritos os modelos desenvolvidos no âmbito desta dissertação, bem como as expressões e parâmetros usados nos mesmos.

4.1 Autómato Celular

Os Autómatos Celulares (ACs) são modelos computacionais que têm vindo a ser estudados e utilizados frequentemente há mais de meio século. Foram inicialmente introduzidos por John von Neumann no final da década de 1940 com o objetivo de implementar sistemas auto-replicáveis que tivessem a capacidade de simular qualquer processo executado por um computador [23].

Os ACs consistem num conjunto de células distribuídas numa grelha onde cada célula pode estar num estado específico que evolui em passos temporais discretos (gerações) de acordo com uma série de regras determinísticas baseadas no seu estado e no da sua vizinhança. Estes modelos computacionais são geralmente usados como modelos para simular sistemas complexos, como fenómenos naturais, processos físicos, comportamento biológico e até mesmo o comportamento de sociedades humanas.

Para um melhor entendimento dos mesmos, podemos dar o exemplo de um dos mais conhecidos ACs, o Jogo da Vida. Para este caso específico, a evolução do Autómato Celular (AC) acontecerá através das seguintes regras simples [10]:

- Cada célula está num estado. O estado 0 representa uma célula 'morta' e o estado 1 representa uma célula 'viva';

- Qualquer célula viva com menos de dois vizinhos vivos morre, pois sofre de isolamento;
- Qualquer célula viva com dois ou três vizinhos vivos continua viva na próxima geração;
- Qualquer célula viva com mais de três vizinhos vivos morre, devido a sobrepopulação;
- Qualquer célula morta com exatamente três vizinhos vivos torna-se uma célula viva, ocorre proliferação.

Estas regras simples dão origem a padrões complexos e interessantes à medida que a simulação progride, como poderemos ver pela figura 4.1.

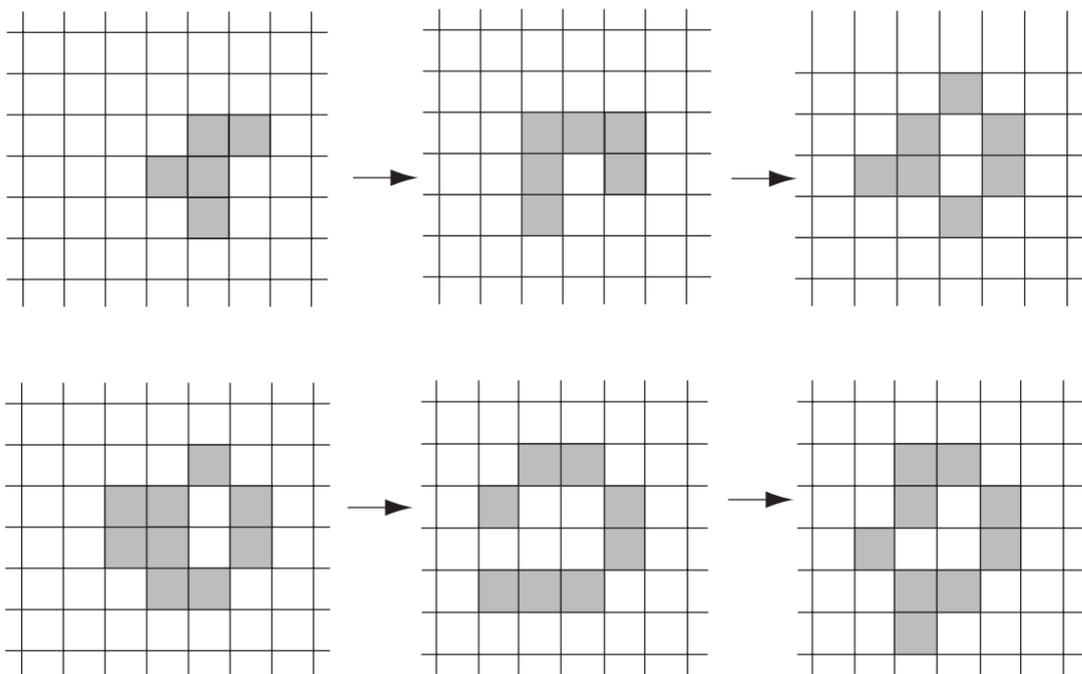


Figura 4.1: Demonstração do Jogo da Vida: evolução de uma configuração inicial de cinco células no estado 1 para nove células no estado 1 ao fim de 5 gerações [10].

4.1.1 Vizinhaça

Na teoria dos ACs, dois géneros de vizinhaça de células são comumente considerados no espaço bidimensional: a vizinhaça de von Neumann e a vizinhaça de Moore [53] (figura 4.2).

A vizinhaça de von Neumann consiste nas quatro células diretamente adjacentes (mais próximas) a uma célula central. Essas células estão localizadas do lado direito, esquerdo, em cima e em baixo da célula central.

A vizinhaça de Moore, por outro lado, inclui as oito células que cercam uma célula central. Além das quatro células na vizinhaça de von Neumann, a vizinhaça de Moore também inclui as quatro células diagonais (segundos vizinhos).

Estas definições de vizinhança podem ser generalizadas para o espaço multidimensional.

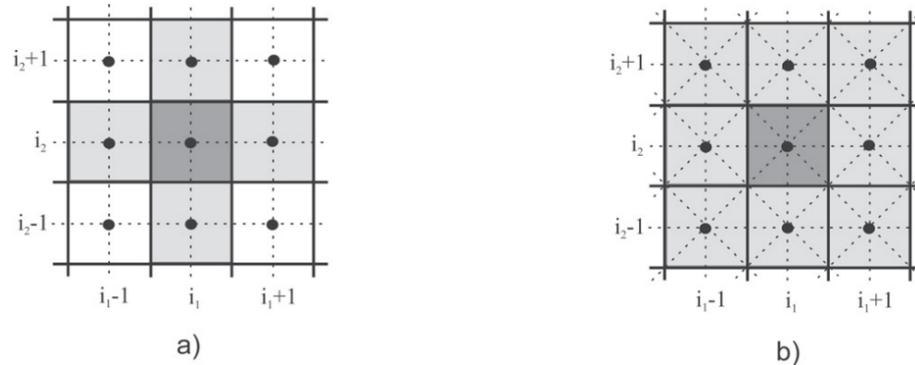


Figura 4.2: Vizinhanças clássicas (caso bidimensional): a) Von Neumann; b) Moore [53].

No caso do nosso modelo computacional, optámos por usar a vizinhança de von Neumann. Embora a vizinhança de Moore garanta um contacto com mais células vizinhas, a vizinhança de von Neumann, tendo menor densidade celular, pode ser mais útil pois resulta num menor número de interações entre as células e requer menos recursos computacionais para simular o sistema pretendido.

4.1.2 Condições Fronteira

As condições fronteira em ACs referem-se a regras que determinam o comportamento das células nos limites do domínio, isto é, como é que as células interagem com as células vizinhas nas fronteiras. Diferentes tipos de condições fronteira podem ser utilizados para modelar diferentes cenários, como um sistema com condições fronteira fechadas, em que as células nas bordas interagem apenas com as células vizinhas dentro do autómato, ou um sistema com condições fronteira abertas onde as células nos limites podem receber informações ou estímulos do ambiente externo [28].

No caso do nosso autómato celular, optámos por usar as condições fronteira periódicas, que implicam que células em lados opostos do autómato estejam em contacto, criando uma topologia toroidal que se repete periodicamente.

4.2 Equação de Hill

A equação de Hill é uma equação com três parâmetros usada para descrever uma relação não linear entre duas variáveis. No caso da equação que vamos apresentar, x (a variável independente) e y (a variável dependente). É comumente usada para descrever como a taxa de resposta de um componente biológico varia em relação ao estímulo recebido. Por exemplo, em farmacologia é usada para modelar a relação entre a concentração e o efeito de medicamentos [17]. A equação que a descreve é a seguinte:

$$y = y_{max} \frac{x^a}{c^a + x^a} \quad (4.1)$$

onde y_{max} é a resposta máxima do sistema, c é a concentração da droga que produz 50% da resposta máxima e a é o coeficiente de Hill que descreve a inclinação da curva concentração-resposta.

A equação de Hill com $a > 1$ descreve uma escala de medição log-linear-log, que é frequentemente observada em sistemas biológicos. Esse padrão de sensibilidade, caracterizado por uma sensibilidade logarítmica fraca em níveis baixos e altos de entrada e uma sensibilidade linear forte numa faixa intermédia, é encontrado em vários fenómenos biológicos [14]. A figura 4.3 representa esta função para diferentes valores do coeficiente de Hill, a .

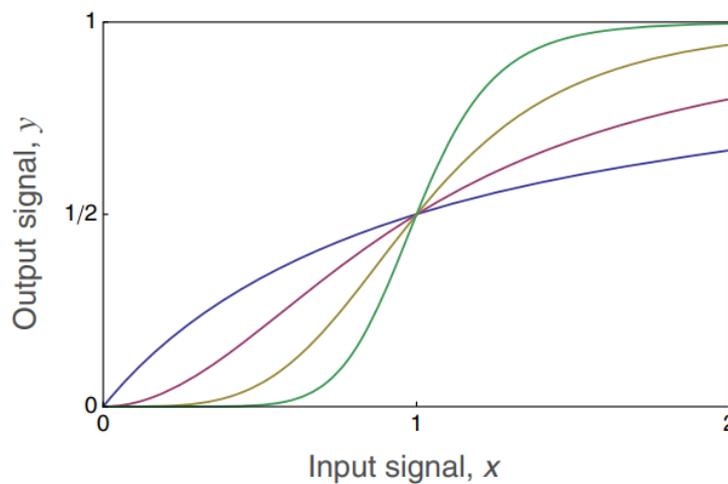


Figura 4.3: Transmissão do sinal da equação de Hill. O sinal de entrada x induz o sinal de saída y , conforme a equação 4.1. As curvas de inclinação crescente correspondem a $a = 1, 2, 4, 8$ [14].

É importante relembrar que embora a equação de Hill seja amplamente utilizada na descrição de relações de entrada-saída em sistemas biológicos, apresenta algumas limitações. Algumas delas são que a equação não explica os processos biológicos subjacentes ou os mecanismos que geram o comportamento observado, o comportamento da equação depende muito dos valores dos seus parâmetros, como o coeficiente de Hill e o nível de saturação y_{max} , além de que diferentes processos biológicos podem apresentar relações de entrada-saída que não podem ser descritas com precisão pela equação de Hill [14].

No caso do nosso modelo computacional, esta equação é usada para modelar variáveis como o potencial das células e a concentração das proteínas.

4.3 Formação de Padrões Espaciais por Reação e Difusão

4.3.1 Modelo de Turing

O modelo de Turing é um modelo matemático que descreve a formação de padrões espaciais em sistemas de reação-difusão de moléculas num meio. Foi proposto pelo matemático Alan Turing em 1952 como um mecanismo para explicar como padrões complexos, como riscas, manchas e espirais, podem surgir em sistemas biológicos.

O modelo envolve duas substâncias químicas que interagem entre si, difundindo-se num tecido com taxas de difusão diferentes. Uma dessas substâncias ativa a produção tanto dela mesma quanto da outra substância, enquanto a segunda substância inibe a sua própria produção. O modelo é baseado num conjunto de equações diferenciais parciais que descrevem como a concentração dessas substâncias químicas varia ao longo do tempo e do espaço devido à difusão e reação química.

A instabilidade de Turing é o principal fenómeno responsável pela produção de padrões. Este fenómeno ocorre quando um sistema que é homogéneo e estável num estado de equilíbrio é perturbado por uma pequena flutuação aleatória, como pequenas variações nas concentrações das substâncias químicas devido a fatores aleatórios (ex: temperatura ou pressão). Em vez de regressar ao estado de equilíbrio, o sistema pode tornar-se instável e desenvolver padrões espaciais ou temporais complexos. Concretamente, esta instabilidade pode ocorrer quando a taxa de difusão do inibidor é maior do que a do ativador, e a taxa de reação do ativador é maior do que a do inibidor. Nestas circunstâncias, pequenas variações aleatórias na concentração das substâncias podem desencadear um aumento local na concentração da substância estimuladora e uma diminuição na concentração da substância inibidora, criando uma região com atividade aumentada. Essa região de atividade pode crescer e difundir-se, resultando na formação de um padrão espacial de concentração das substâncias estimuladora e inibidora [51].

Alguns exemplos de reprodução de padrões biológicos através do modelo de Turing podem ser vistos na figura 4.4.

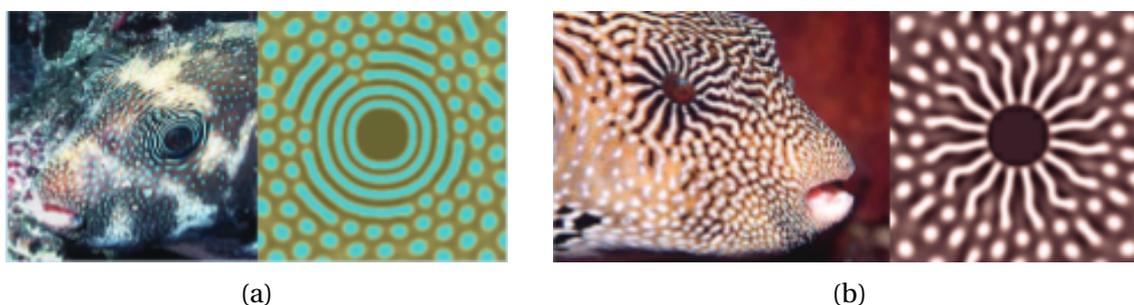


Figura 4.4: Exemplos de reprodução de padrões biológicos através do modelo de Turing. a) Simulação feita por H. Meinhardt (padrão de concha [31]). b) Simulação feita por A. R. Sandersen (padrão de peixe [40]).

4.3.2 Modelo de Gierer-Meinhardt

O modelo de Gierer-Meinhardt pode ser considerado uma expansão do modelo de Turing já que, à semelhança desse modelo, é um modelo matemático utilizado para descrever fenômenos físicos, químicos e biológicos que levam à formação de padrões espaciais. O modelo foi proposto pelos biólogos Hans Gierer e Meinhardt em 1972 e consiste num conjunto de equações diferenciais parciais que descrevem a evolução temporal e espacial das concentrações das substâncias químicas envolvidas [16].

De forma geral, o modelo consiste igualmente em duas espécies químicas, um ativador e um inibidor, que se difundem e reagem entre si. Mas, contrariamente ao que acontece no Modelo de Turing, o ativador estimula a sua própria produção, enquanto que o inibidor suprime a produção de ambas as espécies. No artigo [42] é ainda proposto um termo de saturação para o modelo para levar em conta a capacidade limitada das células de se moverem e se diferenciarem. Esse termo limita a quantidade de ativador que pode ser produzida.

O sistema produzido pelo modelo atinge um estado estacionário uniforme quando as taxas de difusão das duas espécies são semelhantes. No entanto, se a taxa de difusão do inibidor for significativamente maior do que a do ativador, o sistema pode tornar-se instável e formar padrões, ocorrendo a instabilidade de Turing, fenômeno explicado na subsecção 4.3.1.

Os padrões resultantes do modelo de Gierer-Meinhardt podem apresentar diversas formas, desde padrões com riscas até padrões semelhantes a manchas. Alguns destes exemplos podem ser observados na figura 4.5.

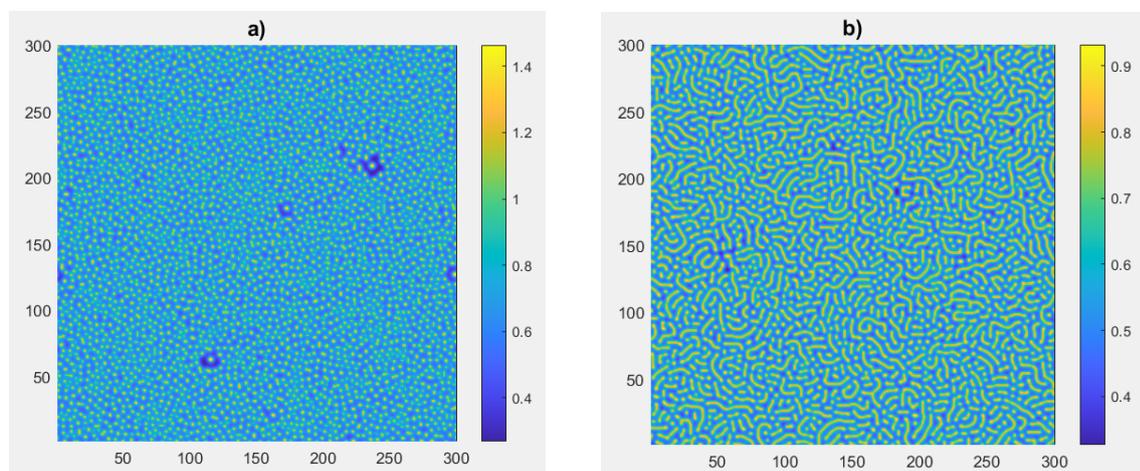


Figura 4.5: Exemplos da simulação de padrões em matlab através do modelo de Gierer-Meinhardt porposto no artigo [42]. a) Distribuição da proteína inibidora com o parâmetro $s=0.85$. b) Distribuição da proteína inibidora com o parâmetro $s= 0.785$.

4.4 Modelo desenvolvido

4.4.1 Proliferação das células e difusão das proteínas

Proliferação das células

No modelo desenvolvido as propriedades bioelétricas das células são responsáveis pela coordenação do desenvolvimento do tecido celular até que este atinja a homeostasia. Estas células podem trocar iões com o meio extracelular, através de canais iónicos de polarização e despolarização, e também com outras células através de GJs. A atividade de cada um destes componentes depende do potencial elétrico através da membrana, tal como vai ser calculado pelas equações apresentadas nesta secção. O potencial elétrico da célula i (relativamente ao exterior), V_i , varia com o tempo consoante as correntes iónicas. A sua variação ao longo do tempo é dada pela equação diferencial:

$$C_i \frac{dV_i}{dt} = -I_{pol} - I_{dep} + \sum_j^{\text{vizinhos}} G_{ij} (V_j - V_i) \quad (4.2)$$

sendo C_i a capacidade elétrica membranar, I_{pol} (I_{dep}) a corrente através dos canais iónicos de polarização (despolarização) e G_{ij} a condutância iónica através das GJs entre célula contíguas i e j .

Tanto as correntes como as condutâncias dependem do potencial elétrico da membrana da seguinte forma:

$$I_{pol} = \frac{G_{pol}^0 (V_i - E_{pol})}{1 + \exp[z(V_i + V_T)/V_T]} \quad , \quad I_{dep} = \frac{G_{dep}^0 (V_i - E_{dep})}{1 + \exp[-z(V_i + V_T)/V_T]} \quad (4.3)$$

$$G_{ij} = \frac{2G_{ij}^0}{1 + \cosh[(V_i - V_j)/V_0]} \quad (4.4)$$

com:

$$G_{ij}^0 = \frac{G_i^0 G_j^0}{G_i^0 + G_j^0} \quad , \quad G_i^0 = \frac{G_{max}^0}{1 + \exp[z(V_i - V_{1/2})/V_T]} \quad (4.5)$$

onde E_{pol} (E_{dep}) é o potencial elétrico de polarização (despolarização) da membrana, V_T é o potencial de limiar, z é a carga de controlo do canal, G_{pol}^0 (G_{dep}^0) é a condutância dos canais iónicos de polarização (despolarização), $V_{1/2}$ é o valor do potencial elétrico da membrana que reduz a condutância G_i^0 através das GJs por um fator de 2, e V_0 ajusta a largura da função de condutância da GJ. G_{max}^0 representa a condutância máxima que um canal iónico que vai formar uma GJ com outro canal iónico pode ter. As equações aqui apresentadas foram retiradas do modelo usado no artigo [5].

Os parâmetros usados para estas equações, dados na tabela 4.1, foram determinados experimentalmente e apresentados em [7–9] sofrendo apenas alguns ajustes apresentados em [5].

Tabela 4.1: Valores dos parâmetros bioelétricos usados no modelo descrito [5]. $\sigma = 1$ é usado como desvio padrão de valores que seguem uma distribuição normal à volta do valor médio (modelo estocástico).

Parâmetros	Valor médio	Desvio Padrão
C_i (pF)	100	$0.02\sigma C_i$
z	3	0.1
G_{ref}^0 (nS)	1	0
G_{pol}^0 (polar./depol.)	$2.0G_{ref}^0/0.5G_{ref}^0$	$0.02\sigma G_{pol}^0$
G_{dep}^0 (polar./depol.)	$1.7G_{ref}^0/2.0G_{ref}^0$	$0.02\sigma G_{dep}^0$
G_{max}^0 (polar./depol.)	$4.0G_{ref}^0/2.5G_{ref}^0$	$0.02\sigma G_{max}^0$
E_{dep} (mV)	0	σ
E_{pol} (mV)	-60	σ
V_T (mV)	26	σ
V_0 (mV)	24	0
$V_{1/2}$ (mV)	0	σ

No início de cada simulação usando este modelo, são inicializados diversos vetores para representar os parâmetros de cada célula referidos na tabela 4.1, sendo esses vetores sujeitos a alterações ao longo das gerações.

Além dos parâmetros explicados anteriormente, temos o parâmetro G_{ref}^0 que serve como uma referência para os valores das condutâncias. É a partir desta referência que são calculados os parâmetros G_{pol}^0 , G_{dep}^0 e G_{max}^0 tanto das células polarizadas como das células despolarizadas.

Difusão das proteínas

Foram desenvolvidos dois modelos computacionais, um em que existe a difusão de apenas uma proteína que irá afetar a bioeletricidade das células e outro em que é usado o modelo de reação-difusão de Gierer-Meinhardt (explicado na secção 4.3.2) onde existe a difusão de duas proteínas, uma ativadora que estimula a sua própria produção, e uma proteína inibidora que suprime a produção de ambas as espécies. Neste segundo modelo, a diferença de concentração entre as duas proteínas irá afetar a bioeletricidade das células. A difusão das proteínas é feita apenas na área onde existem células, sendo que no resto do domínio a sua concentração é nula.

Para o cálculo da difusão das concentrações através das células usámos o método das diferenças finitas, apresentado no apêndice A.0.1.

Os dois modelos são baseados num já existente apresentado no artigo [5].

4.4.2 Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de uma proteína

O primeiro modelo foi desenvolvido para que se simulasse a difusão de uma proteína ativadora de canais iônicos. Esta difusão afeta as propriedades bioelétricas das células e, por sua vez, a bioeletricidade das células afeta também a concentração desta proteína, formando assim um mecanismo de retroação.

O modo como implementámos estas condições no nosso código foi o seguinte: começámos por usar uma função de Hill para modular a concentração da proteína indicada, função esta apresentada a seguir.

$$he_c(x, y) = \frac{c(x, y)^{n_c}}{k_c^{n_c} + c(x, y)^{n_c}} \quad (4.6)$$

em que he_c é a função de Hill da concentração da proteína e c representa a função da concentração da proteína. k_c é o valor da função c que produz metade do valor máximo da função he_c , neste caso $k_c = 0.04$, e n_c é o coeficiente de Hill ao qual demos o valor de 3.

Depois, na proliferação, quando uma nova célula é obtida, multiplicámos o fator de polarização presente na fórmula da condutância de polarização/despolarização dos canais iônicos, fator esse que faz com que a cada proliferação as células se tornem mais polarizadas e diminuam o seu poder proliferativo, pelo valor da função de Hill da concentração da proteína em cada célula. Isto introduz uma dependência do potencial da membrana na concentração da proteína. Por outro lado, usámos também uma função de Hill para modular o potencial da membrana e, na expressão da concentração da proteína em cada célula, multiplicámos o fator de fonte (k) pelo valor obtido nesta nova função de Hill, introduzindo assim uma dependência da concentração da proteína no potencial da membrana. A função de Hill usada para modular o V_{mem} pode ser observada a seguir.

$$he_V(x, y) = \frac{[V(x, y) + 60]^{n_V}}{k_V^{n_V} + [V(x, y) + 60]^{n_V}} \quad (4.7)$$

em que he_V é a função de Hill do potencial da membrana e V representa a função do potencial da membrana. Tivemos que somar 60 ao potencial da membrana para que obtivéssemos valores positivos tanto no numerador quanto no denominador, uma vez que o valor mínimo da função V é $-60mV$. k_V é o valor da função V que produz metade do valor máximo da função he_V , neste caso $k_V = 40$, e n_V é o coeficiente de Hill ao qual demos o valor de 2.

A equação de difusão da proteína é a seguinte:

$$\frac{\partial c(x, y, t)}{\partial t} = D\nabla^2 c(x, y, t) - \alpha c(x, y, t) + k \quad (4.8)$$

em que $c(x, y, t)$ é a função da concentração da proteína em função do tempo e do espaço, D é a constante de difusão, α é a taxa de consumo da proteína e k a constante

de produção da proteína. Os valores usados para estas constantes neste modelo são dados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Valores dos parâmetros usados na equação de difusão da proteína.

Parâmetros	Valores
D	100
α	0.01
k	1

Este modelo foi usado numa fase inicial para testar um exemplo simples de retroação entre o estado bioeléctrico das células e a difusão de uma proteína. Sendo que o modelo explicado na subsecção 4.4.3 foi o mais usado nos testes pela sua maior complexidade e proximidade à realidade.

4.4.3 Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de duas proteínas

Tal como referido na secção 4.3.2, no artigo [42] simula-se a difusão de duas proteínas usando o modelo de Gierer-Meinhardt, sendo que a concentração de uma depende da concentração da outra. Através das equações de difusão de proteínas presentes nesse artigo, simulámos a proliferação de células considerando que uma das proteínas seria ativadora da proliferação e a outra inibidora desta mesma proliferação. A forma como implementámos estas condições foi fazendo, de novo, com que existisse um ciclo de retroação entre a concentração das proteínas e o potencial das membranas. Usámos um mecanismo semelhante ao explicado na secção anterior, a única diferença é que desta vez o potencial da membrana é influenciado pela diferença de concentração das duas proteínas. A função de Hill para a diferença de concentração das proteínas é dada por:

$$he_{dc}(x, y) = \frac{|u(x, y) - v(x, y)|^{n_{dc}}}{k_{dc}^{n_{dc}} + |u(x, y) - v(x, y)|^{n_{dc}}} \quad (4.9)$$

em que he_{dc} é a função de Hill da diferença de concentração entre as proteínas. As concentrações da proteína ativadora e inibidora são dadas por $u(x, y)$ e $v(x, y)$, respetivamente e a sua diferença está em módulo para que o numerador e denominador deem sempre valores positivos. k_{dc} é o valor da função da diferença de concentração das proteínas que produz metade do valor máximo da função he_{dc} , neste caso $k_{dc}=0.1$, e n_{dc} é o coeficiente de Hill ao qual demos o valor de 3.

As equações de difusão da proteína ativadora (u) e inibidora (v) são as seguintes, respetivamente:

$$\begin{cases} \frac{\partial u}{\partial t} - d_1 \Delta u = r \left[\frac{u^2}{(1+pu^2)v} - cu \right], & (x, y) \in \Omega \\ \frac{\partial v}{\partial t} - d_2 \Delta v = r (u^2 - av), & (x, y) \in \Omega \\ u(x, y, 0) > 0, \quad v(x, y, 0) > 0, & (x, y) \in \Omega \end{cases} \quad (4.10)$$

em que $\Delta = \partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2$ é o operador Laplaceano no espaço bidimensional e $\Omega = [0, L_x] \times [0, L_y]$ descreve o espaço e limites do domínio. As concentrações da proteína ativadora e inibidora são dadas por $u(x, y, t)$ e $v(x, y, t)$, respetivamente, como explicado anteriormente, com coeficientes de difusão d_1 e d_2 . O fator r relaciona a cinética química, cujo aumento modula a taxa de produção e de degradação/consumo de cada proteína. No caso deste modelo, multiplicámos o fator r pela função de Hill do potencial da membrana e o fator de polarização pela função de Hill da diferença da concentração das proteínas, como fizemos para o modelo apresentado em 4.4.2. Por fim, $a(c)$ é a taxa de degradação de primeira ordem da proteína inibidora (ativadora) e p controla o nível de saturação da reação autocatalítica. A constante p pode ser obtida através de a , c e s usando a equação 4.11.

$$p = \frac{a - c * s}{(s^3) * c} \quad (4.11)$$

Os valores das constantes referidas anteriormente são dados na tabela 4.3. Estes valores foram retirados de um dos testes realizados no artigo [42].

Tabela 4.3: Valores dos parâmetros usados nas equações de difusão das duas proteínas.

Parâmetros	Valores
$d1$	0.1
$d2$	2
c	1
a	0.9
s	0.708
r	0.5

Os valores iniciais para as concentrações u e v na célula central são distribuídos aleatoriamente e estão compreendidos entre 0 e 1.

4.4.4 Modelação em 2D e em 3D

Todas as equações apresentadas anteriormente permitem-nos obter uma representação 2D da proliferação das células e da produção, degradação e difusão das proteínas obtidas a partir das mesmas mas, tal como enunciado no capítulo 1.1, um dos principais objetivos deste projeto é desenvolver um modelo computacional que nos permita fazer uma simulação tridimensional. Como tal, para cada uma das equações foi necessário adicionar mais uma dimensão, z , sendo então necessário fazer todas as alterações no código desenvolvido neste sentido. Como seria de esperar, com a adição de mais uma coordenada, permitindo que os objetos tenham volume, criam-se estruturas mais complexas e realistas (aumenta muito o número de células a considerar, aumentando consequentemente o tempo de cálculo).

Capítulo 5

Testes, Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os testes realizados com os modelos desenvolvidos e os resultados obtidos através dos mesmos. Começaremos por apresentar os testes executados com os modelos 2D desenvolvidos (secção 5.1). Foram feitos testes onde variámos a condutância dos canais iónicos das células, afim de entender a sua influência na dimensão e forma do organismo. Fizemos também testes onde simulámos uma intervenção cancerígena aleatória e localizada. Depois apresentaremos os testes realizados com o modelo 3D (secção 5.2), idênticos aos realizados em 2D. Nesta secção discutiremos ainda os resultados obtidos à luz de todo o contexto teórico apresentado nos capítulos anteriores desta dissertação e compararemos os resultados para os mesmos testes no modelo 2D e no modelo 3D.

5.1 Modelos 2D

5.1.1 Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de uma proteína

O primeiro teste realizado foi com o modelo descrito em 4.4.2, onde é implementado um ciclo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de uma proteína ativadora de canais iónicos. Fizemos apenas um teste com os parâmetros apresentados em 4.1, uma vez que este modelo serviu apenas de base para o modelo com a difusão de duas proteínas. Na figura 5.1 observamos um exemplo de uma simulação padrão deste modelo.

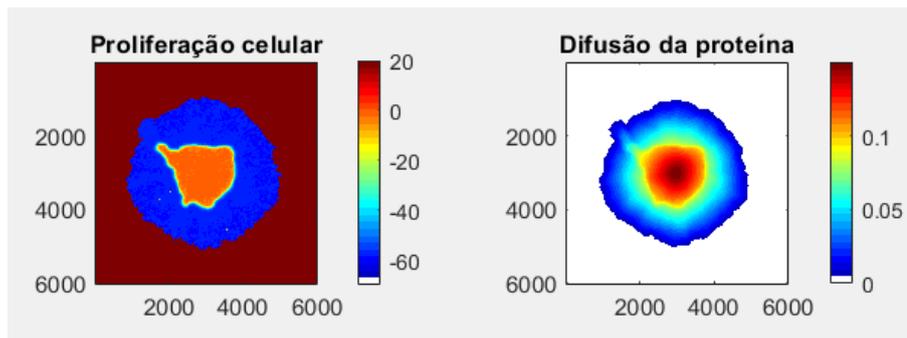
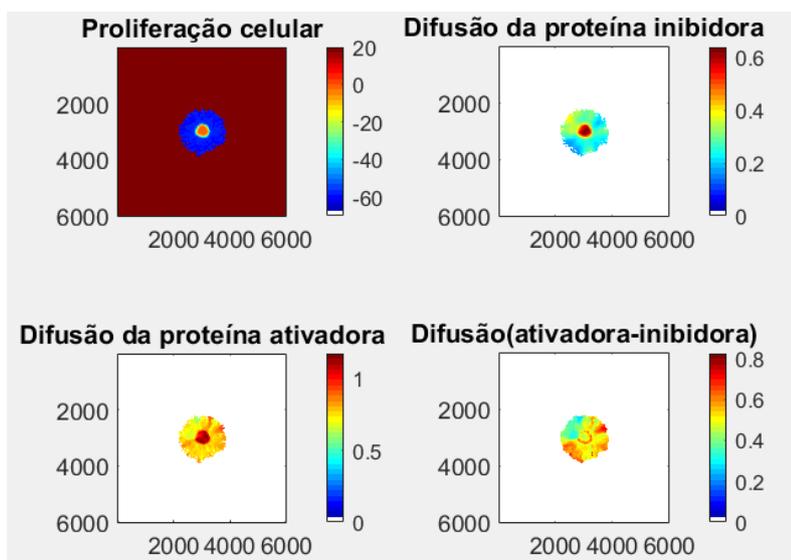


Figura 5.1: Visualização de uma simulação padrão do modelo de difusão de uma proteína em que um mapa de cores, em mV , que representa o V_{mem} de cada célula, está representado na imagem da esquerda, enquanto que o da direita representa a concentração da proteína.

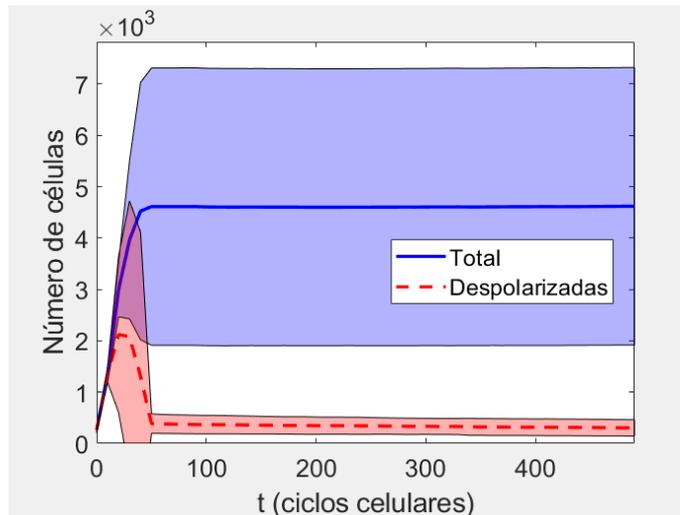
5.1.2 Modelo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de duas proteínas

Os testes realizados nesta subsecção foram realizados com o modelo descrito em 4.4.3, em que se usa o modelo de formação de padrões de Gierer-Meinhardt, explicado em 4.3.2, para implementar um ciclo de retroação entre a proliferação celular e a difusão de duas proteínas, uma ativadora e outra inibidora de canais iónicos.

Começámos por realizar um teste com os parâmetros apresentados na tabela 4.1, a referência para os resultados obtidos nos testes seguintes (figura 5.2).



(a)



(b)

Figura 5.2: a) Resultado de simulações padrão no modelo de difusão de duas proteínas. Na figura superior esquerda temos um mapa de cores em mV que representam o V_{mem} de cada célula, nos outros gráficos o mapa de cores representa a concentração das proteínas e da sua diferença. b) Gráfico que apresenta o número médio de células total e o número de células despolarizadas ao longo das gerações (de 20 simulações).

Como podemos observar através das curvas apresentadas na figura 5.2 b), nas simulações realizadas, as células despolarizadas começam por proliferar até, aproximadamente, às 25 gerações. A partir daqui, muitas das células despolarizadas começam a ficar polarizadas, o que faz com que o número de células despolarizadas diminua, como se pode verificar na figura. Esta descida acontece até cerca das 50 gerações, quando o número de células despolarizadas e o número de células total estabiliza, uma vez que as células despolarizadas ficam rodeadas por células polarizadas, não conseguindo proliferar mais devido à falta de espaço livre. O organismo alcança um estado de homeostasia exemplificado na figura 5.2 a). Algo perceptível na figura 5.2 a) é também a influência da bioeletricidade das células na difusão das proteínas, já que, tendo em conta o mapa de cores, as zonas que têm o mesmo V_{mem} são também as que têm as mesmas concentrações (mais claro no centro do organismo).

Os resultados obtidos com o modelo para estes parâmetros apresentam uma variância elevada devido à sua heterogeneidade, algo que será observado também em alguns dos próximos testes realizados.

Varição da condutância dos canais iônicos de despolarização (G_{dep}^0) e condutância dos canais iônicos de polarização (G_{pol}^0)

Variámos, separadamente, os parâmetros da condutância dos canais de polarização das células despolarizadas ($G_{pol-dep}^0$), a condutância dos canais de despolarização das células polarizadas ($G_{dep-pol}^0$), a dos canais de polarização das células polarizadas ($G_{pol-pol}^0$) e a dos canais de despolarização das células despolarizadas ($G_{dep-dep}^0$), de forma a perceber que influência estes poderiam ter na dimensão e forma finais do organismo. Para cada teste, foram feitas 20 simulações independentes. Os parâmetros usados para cada teste podem ser observados na tabela 5.1. O teste 0 representa o teste padrão demonstrado na figura 5.2.

Tabela 5.1: Testes realizados com diferentes valores de $G_{pol-dep}^0$, $G_{dep-pol}^0$, $G_{pol-pol}^0$ e $G_{dep-dep}^0$.

Teste	$G_{pol-dep}^0$	$G_{dep-pol}^0$	$G_{pol-pol}^0$	$G_{dep-dep}^0$
0	0.5	1.7	2.0	2.0
1	0.1	1.7	2.0	2.0
2	0.3	1.7	2.0	2.0
3	0.75	1.7	2.0	2.0
4	0.9	1.7	2.0	2.0
5	0.5	1.0	2.0	2.0
6	0.5	1.45	2.0	2.0
7	0.5	1.85	2.0	2.0
8	0.5	1.7	1.85	2.0
9	0.5	1.7	2.5	2.0
10	0.5	1.7	2.0	1.5
11	0.5	1.7	2.0	2.5
12	0.1	1.0	2.0	2.0
13	0.75	1.85	2.0	2.0

Começámos por variar o parâmetro $G_{pol-dep}^0$ com os valores indicados na tabela 5.1 para os testes 1 a 4.

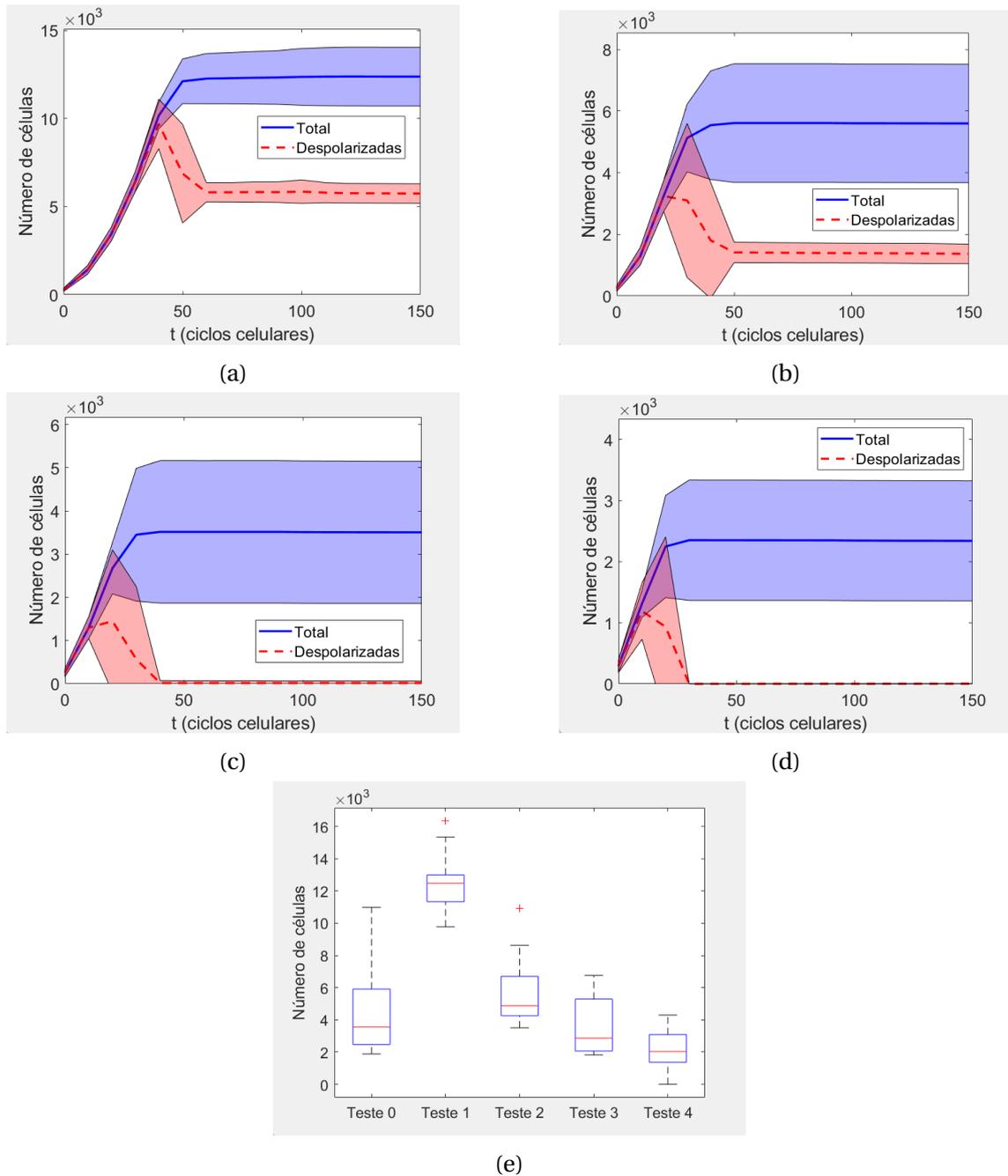


Figura 5.3: Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G^0_{pol-dep}$. a) $G^0_{pol-dep} = 0.1$; b) $G^0_{pol-dep} = 0.3$; c) $G^0_{pol-dep} = 0.75$; d) $G^0_{pol-dep} = 0.9$. e) Diagrama de caixa dos conjuntos de dados dos testes 0 a 4.

Conforme mostrado no teste 0 (figura 5.2b), o organismo alcançou a homeostasia muito antes das 500 gerações, o que também foi observado nos outros testes realizados. Por esse motivo, optamos por limitar os gráficos às primeiras 150 gerações, de forma a tornar mais perceptível a variação no número de células ao longo das gerações.

Como podemos ver pelos gráficos da figura 5.3, obtidos a partir dos testes 1 a 4 da tabela 5.1, existe uma correlação negativa entre a dimensão do organismo e o parâmetro $G^0_{pol-dep}$, já que quanto mais elevado for este parâmetro, mais pequeno é, em mé-

dia, o organismo (observando o número de células total). Este resultado era expectável já que estamos a variar a condutância dos canais de polarização das células despolarizadas, sendo que faz sentido que se aumentarmos (diminuirmos) esta condutância, mais (menos) iões passem através destes canais e, conseqüentemente, mais (menos) polarizadas fiquem as células despolarizadas, perdendo (ganhando) assim capacidade proliferativa. Se aumentarmos o valor de $G_{pol-dep}^0$ para valores como 0.75 (figura 5.3 c) ou como 0.9 (figura 5.3 d), dá-se o caso de todas as células despolarizadas se tornarem polarizadas. Como seria de esperar, com menos células proliferativas, o organismo não cresce tanto.

O diagrama de caixa da figura 5.3e) mostra mais uma vez esta correlação negativa, já que os conjuntos de valores vão sendo mais baixos com o aumento de $G_{pol-dep}^0$, tendo os conjuntos variâncias semelhantes, à exceção do teste 0, embora com distribuições distintas.

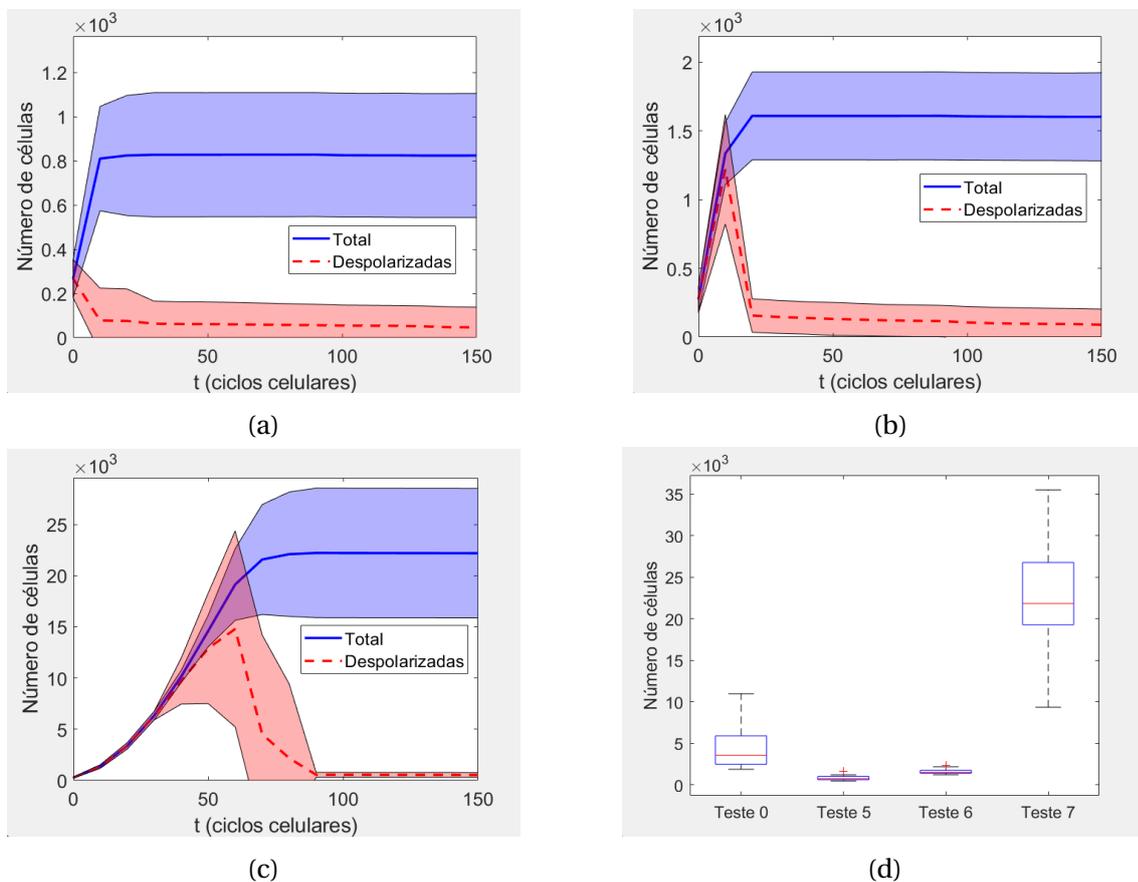


Figura 5.4: Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{dep-pol}^0$. a) $G_{dep-pol}^0 = 1.0$; b) $G_{dep-pol}^0 = 1.45$; c) $G_{dep-pol}^0 = 1.85$; d) Diagrama de caixa dos conjuntos de dados do teste 0, 5, 6 e 7.

Já para a variação de $G_{dep-pol}^0$ (testes 5 a 7 da tabela 5.1), verificamos que quando este parâmetro aumenta, a dimensão do organismo aumenta também, existindo uma correlação positiva (figura 5.4). Para este parâmetro, basta seguir um raciocínio semelhante ao do caso do parâmetro $G_{pol-dep}^0$. Se estamos a variar a condutância dos canais de despolarização das células polarizadas, faz sentido que quando aumentamos (dimi-

nuimos) esta condutância, mais (menos) iões passem através destes canais e, consequentemente, mais (menos) despolarizadas fiquem as células polarizadas, ganhando (perdendo) poder proliferativo. Quando existe maior poder proliferativo, existem mais células proliferativas e a dimensão do organismo aumenta.

O diagrama de caixa da figura 5.4d) mostra mais uma vez esta correlação positiva, uma vez que os conjuntos de valores vão sendo mais altos com o aumento de $G_{dep-pol}^0$. Os teste 5 e 6 apresentam variâncias semelhantes enquanto que o teste 7 apresenta uma variância bastante superior, o que quer dizer que os dados do conjunto são bastante heterogéneos.

Esta dispersão poderá dever-se ao facto de, à medida que o organismo alcança um estado em que há um grande número de células despolarizadas, existem cenários nos quais a polarização das células ocorre de forma mais localizada. Nestes casos, é mais fácil para as células polarizadas cercar as células despolarizadas, impedindo a sua proliferação. Por outro lado, noutras situações, essa polarização pode ocorrer de forma mais dispersa, dificultando o processo e permitindo que o organismo continue a crescer e só consiga alcançar a homeostasia mais tarde. Essa dispersão de dados é observada sempre que o organismo atinge valores semelhantes aos apresentados no conjunto de dados do teste 7, como será demonstrado em alguns testes mais à frente nesta subsecção.

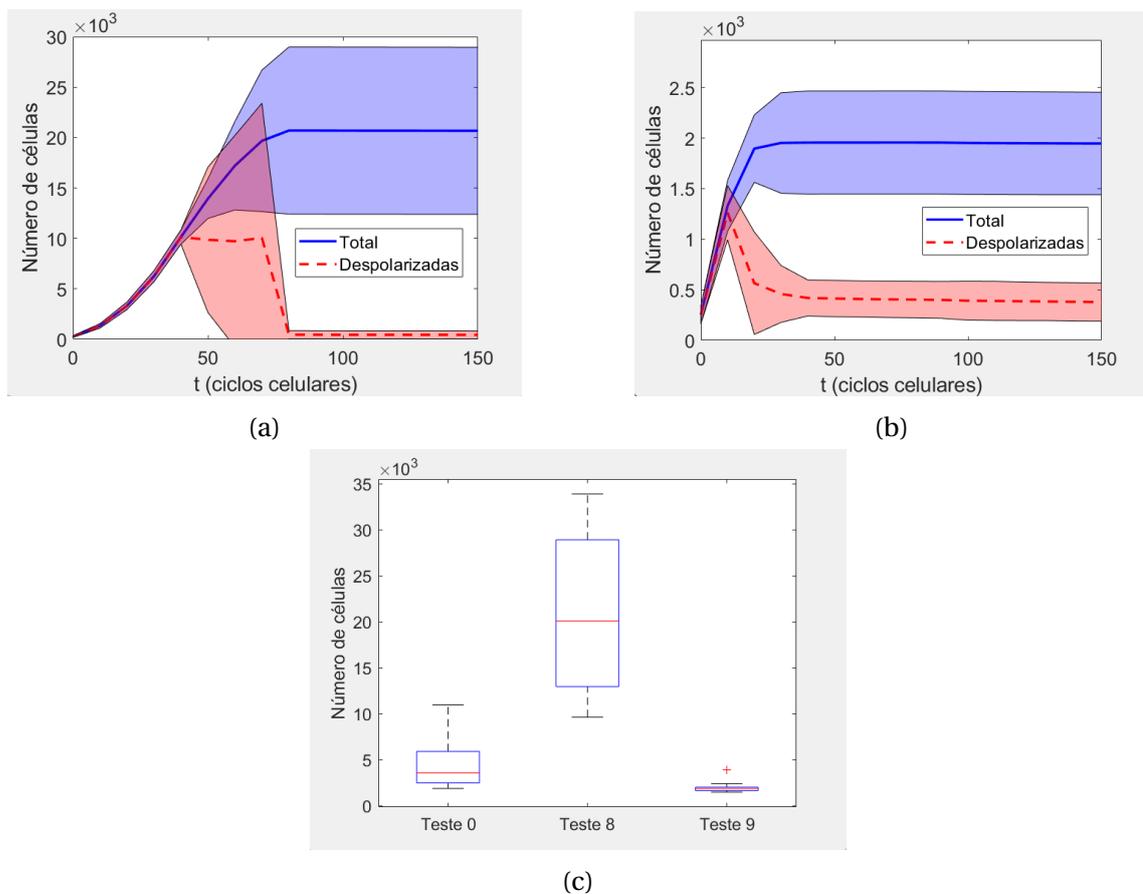


Figura 5.5: Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{pol-pol}^0$. a) $G_{pol-pol}^0 = 1.85$; b) $G_{pol-pol}^0 = 2.5$. c) Diagrama de caixa dos conjuntos de dados do teste 0, 8 e 9.

Nos gráficos da figura 5.5, obtidos a partir dos testes 8 e 9 descritos na tabela 5.1, podemos ver que com a diminuição do parâmetro $G_{pol-pol}^0$ a dimensão do sistema aumenta enquanto que com o seu aumento a dimensão do sistema diminui. Este resultado era esperado já que aumentando (diminuindo) a condutância dos canais de polarização das células polarizadas estamos a aumentar (diminuir) a sua polarização, fazendo com que mais dificilmente (facilmente) estas células se tornem despolarizadas e proliferem, diminuindo (aumentando) a dimensão do organismo.

No diagrama de caixa da figura 5.5c) a tendência para a correlação falada é notada. O teste 8 apresenta uma elevada variância à semelhança do que acontece com o teste 7 (figura 5.4d), pelas mesmas razões. Enquanto que o teste 9 apresenta uma variância muito menor.

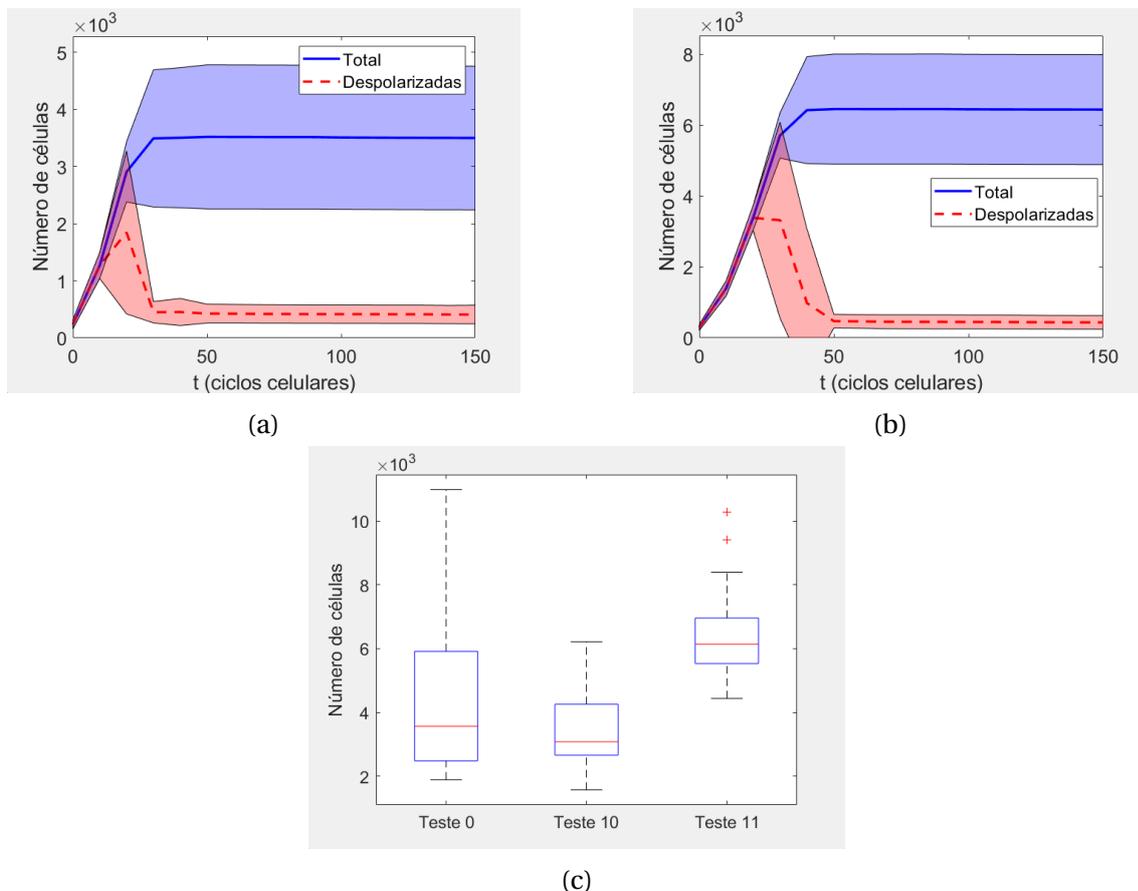


Figura 5.6: Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G_{dep-dep}^0$. a) $G_{dep-dep}^0 = 1.5$; b) $G_{dep-dep}^0 = 2.5$. c) Diagrama de caixa dos conjuntos de dados do teste 0, 10 e 11.

Nos gráficos da figura 5.6, obtidos a partir dos testes 10 e 11 descritos na tabela 5.1, podemos ver que com o aumento do parâmetro $G_{dep-dep}^0$ a dimensão do sistema aumenta enquanto que com a sua diminuição a dimensão do sistema diminui. Este resultado era mais uma vez expectável, já que aumentando (diminuindo) a condutância dos canais de despolarização das células estas terão tendência a ficar mais (menos) despolarizadas e proliferar mais (menos).

No diagrama de caixa da figura 5.6c), é visível a tendência para a correlação posi-

tiva mencionada anteriormente. No entanto, nota-se que os conjuntos de dados relativos aos três testes realizados estão próximos uns dos outros. Isso sugere que a variação deste parâmetro não causa uma alteração muito significativa na dimensão do organismo.

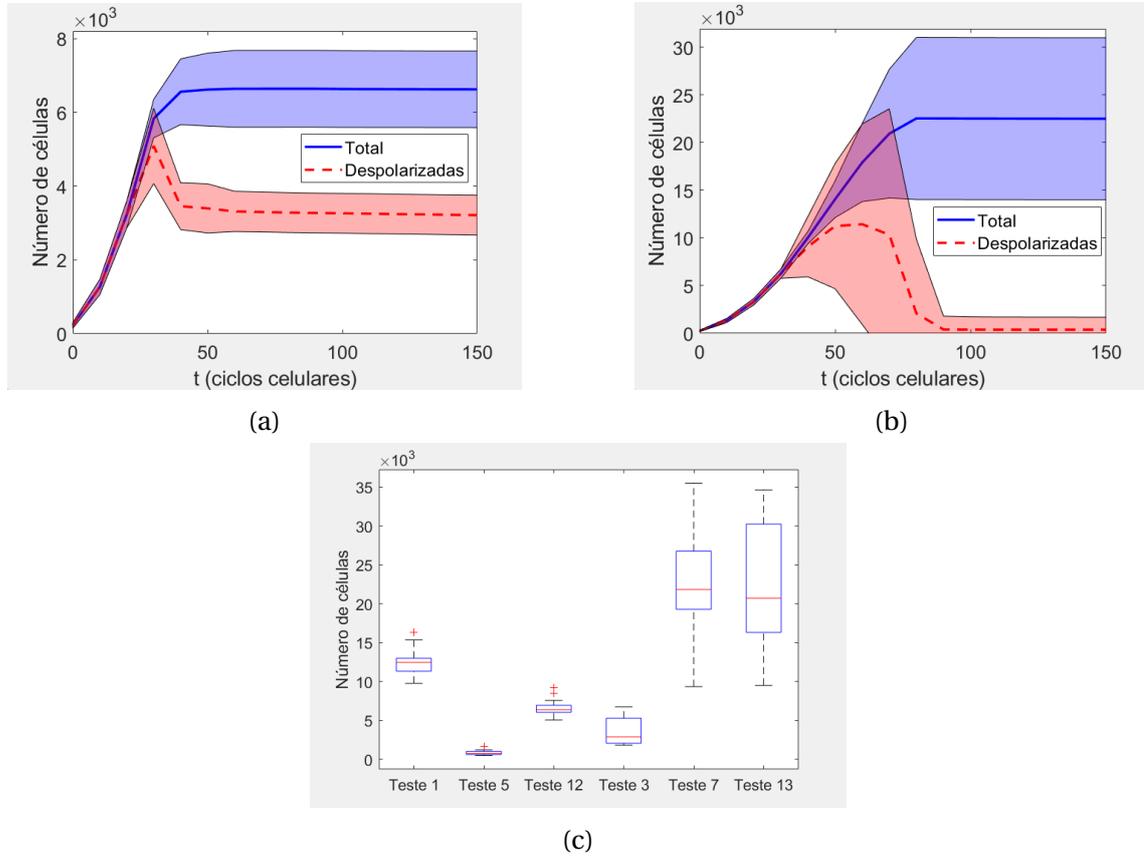


Figura 5.7: Gráficos dos testes realizados com diferentes valores de $G^0_{pol-dep}$ e $G^0_{dep-pol}$. a) $G^0_{pol-dep} = 0.1$ e $G^0_{dep-pol} = 1.0$; b) $G^0_{pol-dep} = 0.75$ e $G^0_{dep-pol} = 1.85$. c) Diagrama de caixa dos conjuntos de dados do teste 1, 5, 12, 3, 7 e 13.

Por fim, fizemos dois testes mostrados na figura 5.7 onde, no primeiro, diminuímos simultaneamente $G^0_{pol-dep}$ e $G^0_{dep-pol}$ das células e, no segundo, aumentámos $G^0_{pol-dep}$ e $G^0_{dep-pol}$ (teste 12 e 13 da tabela 5.1). Estes testes foram realizados com o propósito de avaliar o resultado da variação simultânea de dois parâmetros que, tal como visto atrás, deveriam gerar resultados opostos. Para o primeiro teste (teste 12) o número total médio de células está entre o número de células total médio do teste 1 (figura 5.3a) e do teste 5 (figura 5.4a), além de apresentar um desvio padrão mais baixo que a maioria dos outros testes realizados. Já para o segundo teste (teste 13) o número total médio de células não está entre os valores obtidos no teste 3 (figura 5.3c) e os do teste 7 (figura 5.4c).

Para fazer uma melhor comparação, fizemos mais uma vez um diagrama de caixa dos conjuntos de dados enunciados, representado na figura 5.7c). Para o teste 12, vemos que o conjunto de dados se encontra entre o conjunto de dados do teste 1 e 5. Já para o teste 13, o conjunto de valores não se encontra entre o conjunto de valores do teste 3 e 7, mas sim ao mesmo nível do conjunto de dados do teste 7, tendo a variân-

cia semelhante a este teste embora com uma distribuição distinta. Esta aproximação dos testes poderá dever-se à preponderância do valor de $G_{dep-pol}^0$ em relação ao usado para $G_{pol-dep}^0$, já que por resultados anteriores tínhamos percebido que uma variação no valor de $G_{dep-pol}^0$ igual ao usado aqui (figura 5.4c) tinha produzido muito maior impacto na dimensão do organismo que a variação do valor $G_{pol-dep}^0$ (figura 5.3c).

Nos testes realizados podemos observar que se aumentarmos (diminuirmos) as condutâncias dos canais de polarização, mais cedo (tarde) é alcançada a homeostasia, enquanto que se aumentarmos (diminuirmos) a condutância dos canais de despolarização, mais tarde (cedo) é alcançada a homeostasia.

Parte da variabilidade observada nos resultados pode ser atribuída à aleatoriedade inicial nos valores das concentrações das proteínas. Isto acontece porque as proteínas começam com valores iniciais aleatórios dentro do intervalo de 0 a 1. Esses valores iniciais de concentração diferem de simulação para simulação, o que pode contribuir para a heterogeneidade final dos resultados.

Em cada um dos testes realizados houve simulações em que o crescimento do organismo excedeu a dimensão do domínio, e estes casos não foram contabilizados para a estatística apresentada.

Despolarização aleatória de células

Tanto para este teste de despolarização aleatória como para o teste seguinte de despolarização localizada usámos os parâmetros do teste 12 da tabela 5.1 uma vez que o desvio padrão deste teste é mais baixo que na maioria dos testes realizados e a dimensão final do organismo é intermédia, considerando todos os testes.

Este teste consistiu numa despolarização aleatória de células polarizadas em todo o organismo. Para isto, após 300 gerações de simulação, foi implementado um ciclo que, ao percorrer todas as posições do domínio, verifica se existe uma célula viva em cada posição. Caso a célula esteja viva e uma condição aleatória for atendida com uma dada probabilidade, a célula é submetida a uma despolarização. Esta despolarização ocorre variando o G_{pol}^0 das células polarizadas para valores que corresponderiam a condutâncias de canais de polarização de células despolarizadas, usando o parâmetro $G_{pol-dep}^0$. Foram feitos testes com 30% e 40% de probabilidade.

Tabela 5.2: Probabilidades de despolarização para os testes de despolarização aleatória.

	Teste 14	Teste 15
Probabilidade de Despolarização (%)	30	40

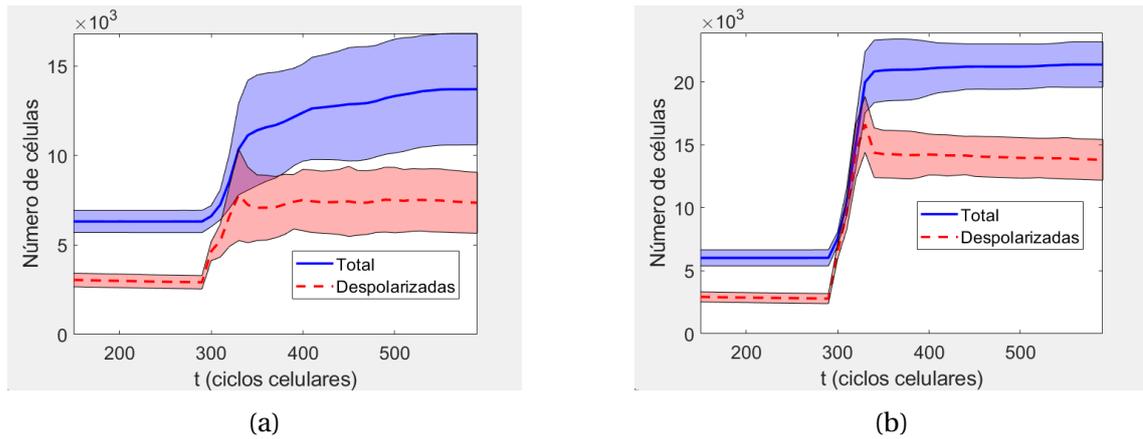


Figura 5.8: Gráficos dos testes de despolarização aleatória. Probabilidade de despolarização de: a) 30% e b) 40%.

Como podemos ver pelos gráficos da figura 5.8, o organismo cresce até alcançar a homeostasia, à semelhança do que acontecia nos testes anteriores e, quando a intervenção cancerígena aleatória ocorre, existe um crescimento do organismo até este voltar a alcançar nova homeostasia. Para a polarização aleatória de 30%, o organismo não alcançava a homeostasia até às 500 gerações. Extendemos então a simulação até às 600 gerações e, como podemos ver pela figura 5.8 a), a homeostasia é alcançada perto das 600 gerações. Quanto maior for a probabilidade de despolarização das células, maior é o crescimento do organismo, tal como seria expectável.

Foram feitos testes com 50% de probabilidade de despolarização das células mas o que acontecia para esta probabilidade era que, após a intervenção cancerígena, as células despolarizadas não variavam o seu potencial suficientemente para se tornarem polarizadas, o que fazia com que proliferassem descontroladamente, não permitindo ao organismo alcançar novamente a homeostasia.

Despolarização localizada de células

Este teste consistiu numa despolarização localizada de um determinado número de células polarizadas. Para implementar este teste, após 300 gerações, escolhe-se aleatoriamente uma posição do domínio, se esta corresponder à posição de uma célula viva e polarizada, a célula é escolhida para ser a célula central da despolarização. Seguidamente, percorremos todas as células do domínio e, caso as células se encontrem a uma distância igual ou menor do que um certo raio (medido em número de células) em relação à célula central escolhida, então essas células também são submetidas a uma despolarização. Esta despolarização ocorre, tal como explicado anteriormente, variando o G_{pol}^0 das células polarizadas para valores que corresponderiam a condutâncias de canais de polarização de células despolarizadas, usando o parâmetro $G_{pol-dep}^0$. Foram feitos testes com raios de 10, 20 e 30 células.

Tabela 5.3: Raios de despolarização para os testes de despolarização localizada.

	Teste 16	Teste 17	Teste 18
Raio de Despolarização (células)	10	20	30

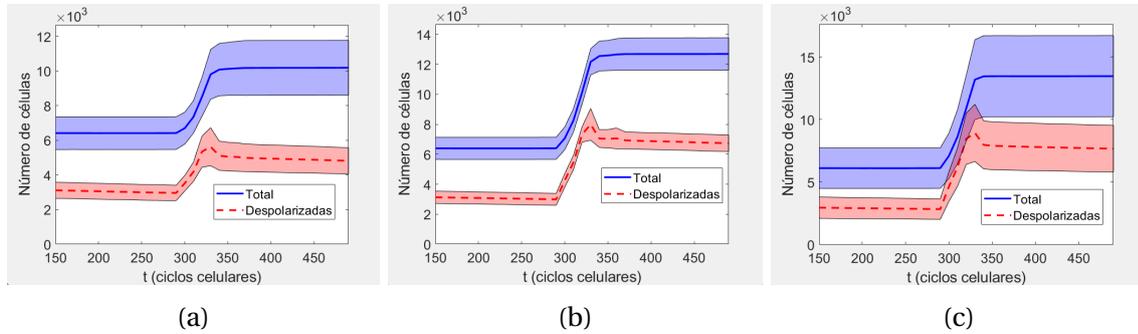


Figura 5.9: Gráficos dos testes de despolarização localizada. Raio de despolarização de: a) 10 células; b) 20 células e c) 30 células.

Tal como acontece com a intervenção cancerígena aleatória, o organismo cresce até alcançar a homeostasia e, quando ocorre a intervenção cancerígena localizada, existe um crescimento do organismo até este voltar a alcançar a homeostasia, como podemos ver na figura 5.9. Como seria de esperar, quanto maior o raio de despolarização, mais o organismo cresce.

Foram feitos alguns testes com um raio de despolarização de 35 e 40 células mas com estes raios de despolarização o organismo já não conseguia entrar em homeostasia, as células despolarizadas continuavam a proliferar até atingirem os limites do sistema.

Influência da concentração das proteínas na polarização das células

Nas subsecções anteriores percebemos a influência que a variação da bioeletricidade das células tem na dimensão e forma do organismo, e na concentração das proteínas. Agora, vamos perceber a influência que a concentração das proteínas tem na bioeletricidade das células. Para isso, vamos fazer dois testes semelhantes a dois já realizados, o teste 15 da tabela 5.2 e o teste 18 da tabela 5.3 mas, desta vez, em vez de fazermos uma despolarização aleatória e localizada após 300 gerações, vamos variar a concentração das proteínas após 300 gerações. Uma vez que a condutância dos canais iónicos depende da diferença de concentração entre as duas proteínas, variámos a concentração de u para 0.1 e a de v para 0.9, criando assim uma diferença de 0.8 entre as duas.

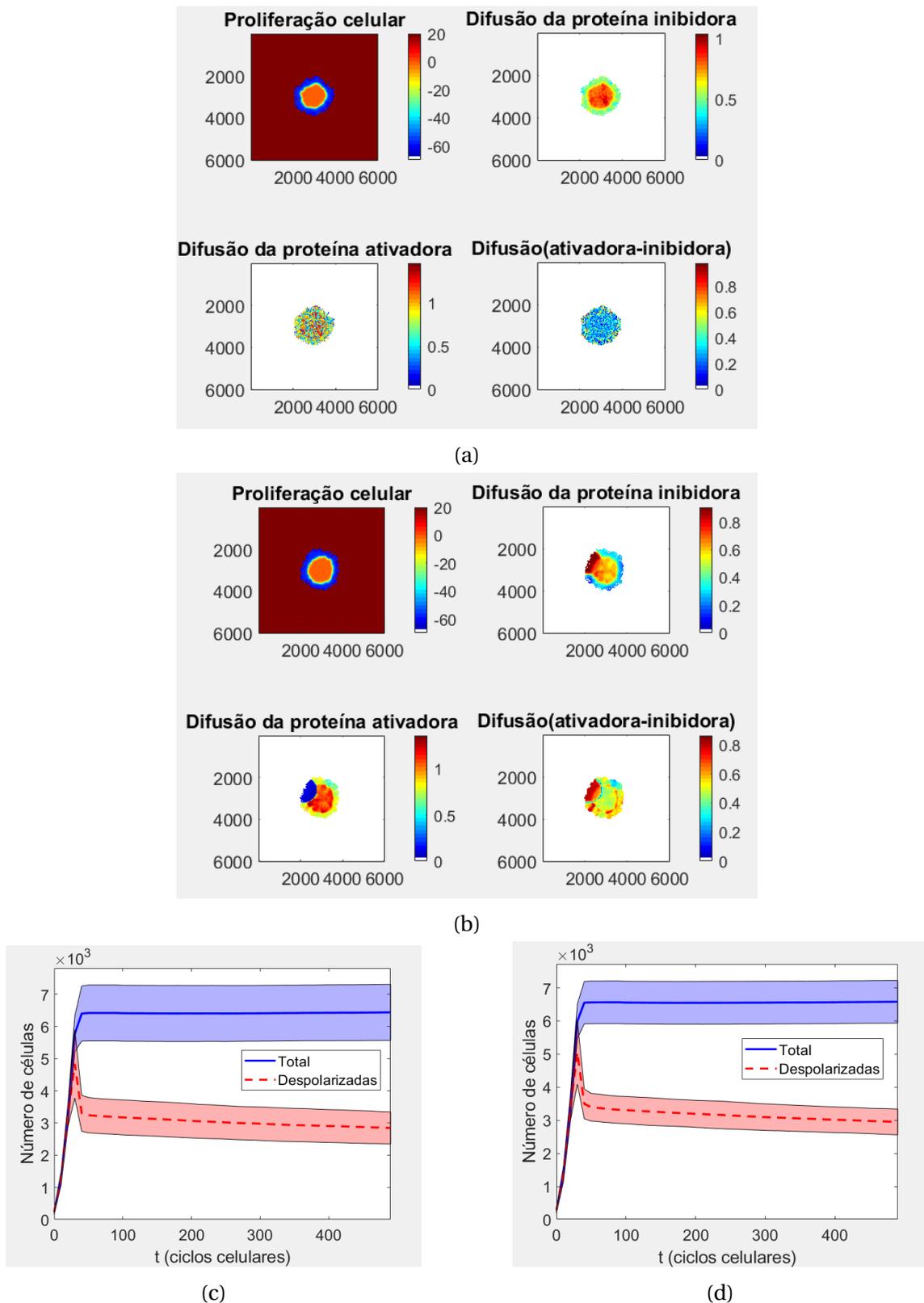


Figura 5.10: Resultado de simulações com variação aleatória e localizada da concentração das proteínas. a) e c) Imagem do autômato celular após a variação da concentração para 40% das células escolhidas aleatoriamente e respectivo gráfico do número de células. b) e d) Imagem do autômato celular com variação da concentração para as células localizadas a 30 ou menos células de distância de uma célula central polarizada, aleatoriamente escolhida, e correspondente gráfico do número de células em função das gerações.

Pela figura 5.10 conseguimos perceber que a variação das concentrações não induz uma variação significativa no valor de V_{mem} das células. Isto é visível tanto pelos gráficos estatísticos (Figura 5.10 c e d) que se assemelham ao teste 12 (figura 5.7a), o que quer dizer que não houve uma variação na bioeletricidade após a alteração das concentrações, como nas imagens representativas do autômato (Figura 5.10 a e b), em que se vê as regiões onde existiu a alteração das concentrações mas não do V_{mem} . Isto quer então dizer que, no modelo desenvolvido, a influência criada pelo V_{mem} na concentração das proteínas é maior que a influência das concentrações em V_{mem} .

Isto poderá dever-se ao facto de a diferença de concentração das proteínas afetar apenas a polarização de novas células geradas, fazendo com que estas fiquem mais ou menos polarizadas. No entanto, o V_{mem} afeta a produção e degradação das proteínas durante a sua difusão por todo o organismo, tendo uma influência preponderante na sua concentração. Portanto, enquanto a diferença de concentração das proteínas está fundamentalmente relacionada com a polarização inicial das células, o V_{mem} exerce uma influência abrangente, afetando continuamente processos celulares mais amplos e a dinâmica das proteínas em todo o organismo.

Avaliação da forma final do organismo

Avaliámos, comparando os vários testes, a forma que o organismo assumia no final de cada simulação, ou seja, ao fim de 500 gerações. O método que usámos para esta avaliação foi comparar a forma do organismo com a forma de um círculo. Sabendo que o perímetro do círculo é dado por $P = 2 * \pi * r$ e a área do círculo por $A = \pi * r^2$, podemos obter uma constante adimensional como uma razão, elevando o perímetro ao quadrado e dividindo pela área:

$$\frac{P^2}{A} = \frac{(2 * \pi * r)^2}{\pi * r^2} = \frac{4 * \pi^2 * r^2}{\pi * r^2} = 4 * \pi \quad (5.1)$$

e, seguidamente, comparar esta constante com a razão P^2/A final para cada organismo. No que diz respeito ao seu perímetro, o nosso método consistiu em contar todas as células que se encontravam na sua periferia. Para realizar esta contagem considerámos as células que tinham, no mínimo, 7 células vizinhas vazias tendo em conta a primeira e a segunda vizinhança de Moore, ou seja, considerando as 24 células mais próximas da célula central escolhida. Existem casos em que isto não é verdade, já que existem células com 7 ou mais células vizinhas vazias e não pertencem à periferia mas, como são casos raros, não afetaram substancialmente a nossa aproximação. Especificamente para esta contagem, foram preenchidos espaços vazios no interior do organismo (sempre que têm pelo menos 7 células vizinhas vivas, usando a primeira vizinhança de Moore), provenientes da morte de células e que não voltam a ser preenchidos porque as células à sua volta estão polarizadas. Desta forma, garantimos que não contabilizávamos células próximas destes espaços na contagem das células da periferia.

Já para a área do organismo, a ideia seria contar todas as células no interior do organismo, para isto fizemos simplesmente a contagem de células vivas no sistema.

Efetuímos a divisão das razões obtidas em cada teste pela constante 4π para com-

parar os dois valores. Quanto mais próxima esta razão estiver do valor 1, mais o organismo se assemelha a um círculo.

Tabela 5.4: Valores médios da relação circular do organismo para os diferentes testes e respetivo desvio padrão.

	Relação Circular	σ
Teste 0	1.78	0.15
Teste 1	1.92	0.18
Teste 2	1.85	0.10
Teste 3	1.89	0.07
Teste 4	1.83	0.07
Teste 5	1.82	0.10
Teste 6	1.87	0.14
Teste 7	1.75	0.08
Teste 8	1.90	0.07
Teste 9	1.69	0.09
Teste 10	1.67	0.17
Teste 11	1.82	0.10
Teste 12	1.90	0.11
Teste 13	1.82	0.09
Teste 14	2.38	0.28
Teste 15	2.14	0.29
Teste 16	2.11	0.15
Teste 17	2.27	0.09
Teste 18	2.18	0.12

Como podemos ver pela tabela 5.4, os valores desta relação são semelhantes para vários testes, existindo apenas uma diferença significativa entre os testes onde não existiu intervenção cancerígena e os testes em que existiu, ou seja, entre os testes anteriores ao 14 e os posteriores. Isto quer dizer que existe uma mudança substancial na forma do organismo em resposta às intervenções cancerígenas. Este resultado seria expectável uma vez que o organismo fica com uma forma mais irregular após estas intervenções.

5.2 Modelo 3D

Conforme explicado na secção 4.4.4, baseamo-nos nos modelos bidimensionais previamente desenvolvidos para criar um modelo tridimensional. No âmbito deste modelo 3D, procurámos replicar alguns dos resultados obtidos no contexto do modelo 2D. A nossa atenção centrou-se, em particular, tanto na simulação do desenvolvimento do organismo num caso normal como na iniciação de um processo tumoral desencadeado pela perturbação do estado bioeléctrico do tecido.

Na figura 5.11 temos uma imagem de uma representação 3D do organismo e outra imagem de um corte 2D em $X=150$, definindo um plano yz. Esta escolha deve-se ao facto das dimensões do sistema serem de $300 \times 300 \times 300$ espaços, o que faz com que o corte fique a meio do sistema no eixo X. Adicionalmente, apresentamos um gráfico que ilustra a evolução do número total de células e das células despolarizadas ao longo das gerações, seguindo uma abordagem semelhante à anteriormente apresentada.

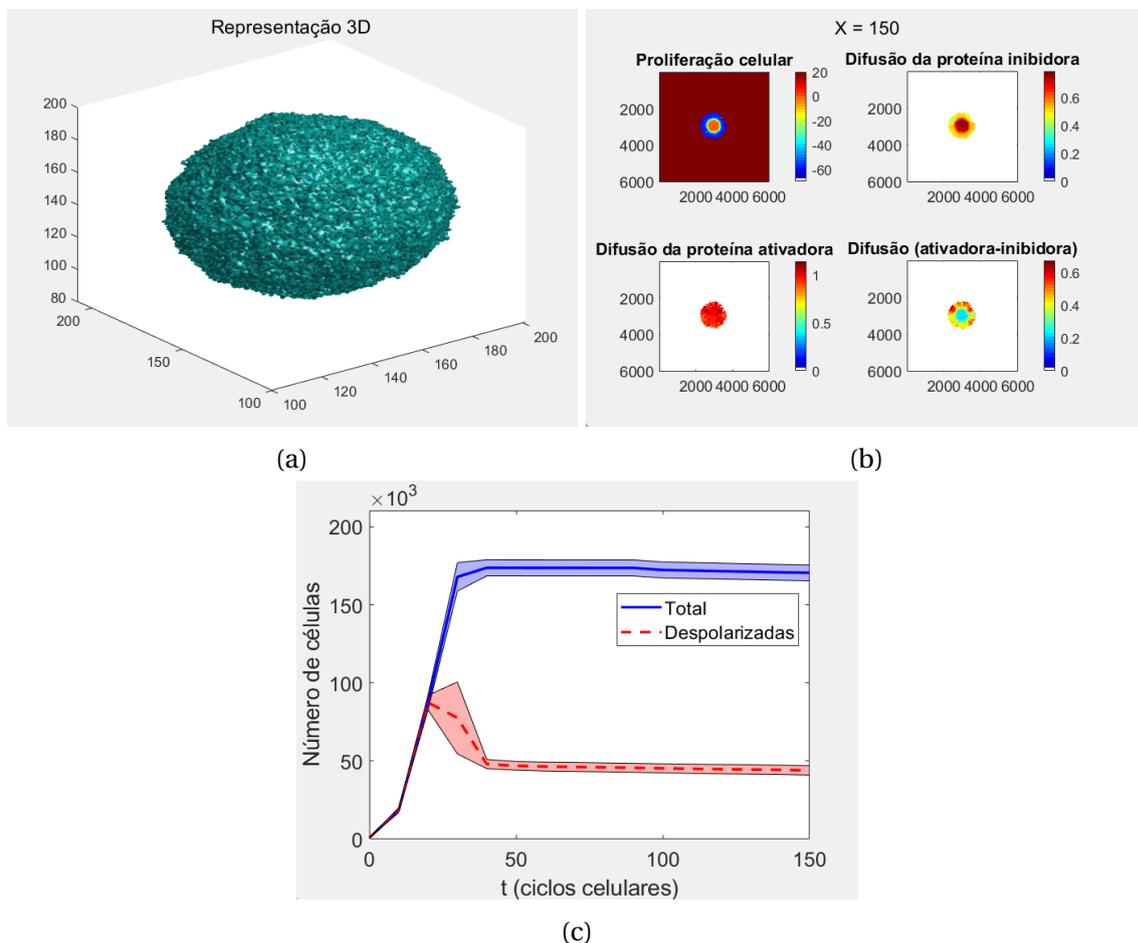


Figura 5.11: a) Resultado de uma simulação padrão no modelo de difusão de duas proteínas em 3D. b) Corte 2D em $X = 150$. c) Gráfico representativo do número de células despolarizadas e total ao longo das gerações (média de $n = 5$ simulações).

Neste teste, utilizámos como base os parâmetros do teste 12 da tabela 5.1 dado que, no modelo 2D, este teste evidenciou um desvio padrão inferior à maioria dos outros testes. Realizámos um total de 5 simulações. Fizemos um número menor de

simulações neste teste devido ao facto de que o modelo em 3D consome um tempo de cálculo consideravelmente mais alto em comparação com o modelo 2D, o que era esperado. Essa diferença no tempo de cálculo é uma consequência da maior complexidade do modelo tridimensional, que envolve um número significativamente maior de elementos a serem considerados, afetando a gestão de memória e a velocidade de cálculo.

Como podemos observar na figura 5.11a), o organismo simulado assume uma forma aproximada a uma esfera na sua morfologia. Além disso, ao analisarmos os cortes 2D em $X=150$ (conforme ilustrado na figura 5.11b), podemos notar que a morfologia se assemelha aos gráficos apresentados na secção anterior (secção 5.1.2), assemelhando-se a um círculo. Isso sugere uma coerência entre os resultados obtidos em 2D e 3D, apesar das diferenças inerentes aos modelos.

Para uma análise mais detalhada, examinámos o gráfico representativo do número de células polarizadas e do número total de células ao longo das gerações (figura 5.11c). Os resultados demonstram uma dinâmica semelhante em ambos os modelos (2D e 3D). Inicialmente, o organismo formado exclusivamente por células despolarizadas cresce até cerca das 20 gerações, momento em que as células da periferia começam a polarizar, resultando numa diminuição do número de células polarizadas. A partir das 40 gerações, observamos que o organismo estabiliza, alcançando a homeostasia.

Influência de G_{dep}^0 e G_{pol}^0 na dimensão do organismo

Com o objetivo de compreender como é que os parâmetros $G_{pol-dep}^0$, $G_{dep-pol}^0$, $G_{pol-pol}^0$ e $G_{dep-dep}^0$ afetam a dimensão e a forma do organismo, repetimos os testes que já tinham sido feitos no modelo 2D. Pretendíamos verificar se os resultados seriam semelhantes e se o organismo se comportaria de forma análoga para as mesmas variações.

Na maioria dos casos observámos que, para testes onde a dimensão do organismo é mais baixa, os resultados foram semelhantes aos obtidos no modelo 2D. No entanto, em testes em que o organismo aumenta de tamanho, notámos que a dimensão do organismo cresce de forma mais pronunciada no modelo 3D. Em muitos dos testes em que, no modelo 2D, o organismo crescia mais e alcançava a homeostasia, no modelo 3D, as células continuam a proliferar até atingirem os limites do sistema, não conseguindo alcançar a homeostasia na dimensão considerada para o sistema.

Nas figuras 5.12 e 5.13 damos dois exemplos de testes realizados com os mesmos parâmetros que os realizados no modelo 2D, onde poderemos verificar as observações, feitas no parágrafo anterior. Estes testes correspondem ao teste 2 e ao teste 6 (tabela 5.1).

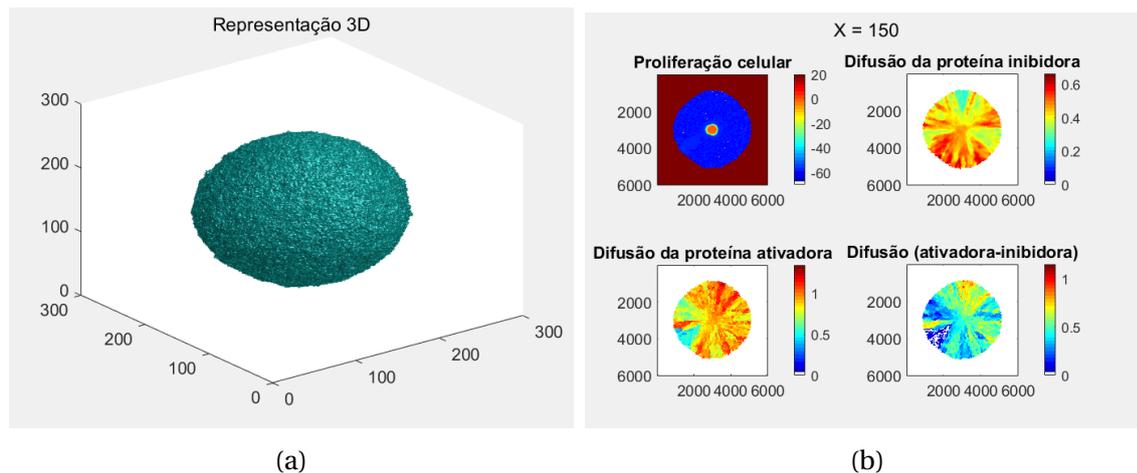


Figura 5.12: a) Representação do teste 2 da tabela 5.1 no modelo 3D. b) Corte 2D em $X = 150$.

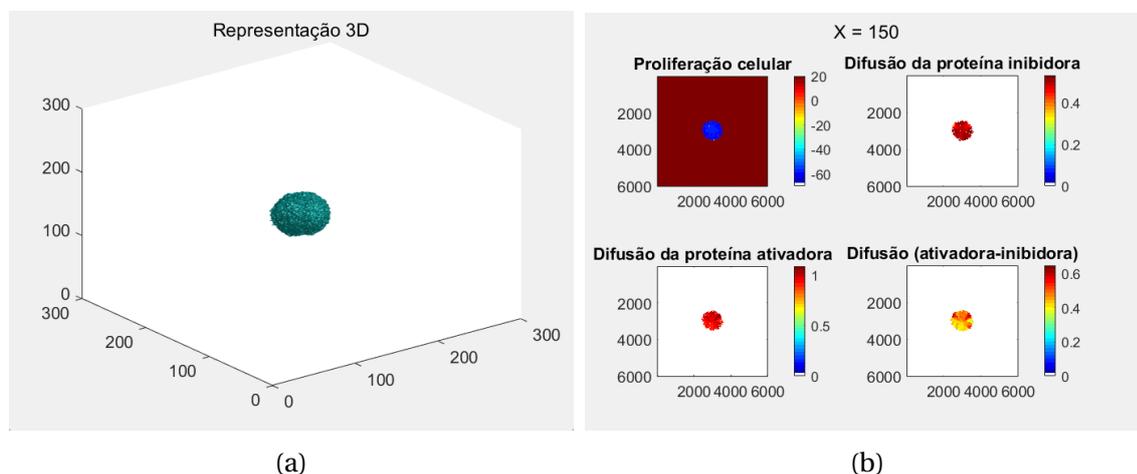


Figura 5.13: a) Representação do teste 6 da tabela 5.1 no modelo 3D. b) Corte 2D em $X = 150$.

Para o teste 2 (conforme ilustrado na figura 5.12), em comparação com o teste realizado no modelo 2D, é perceptível que o organismo atinge uma dimensão significativamente maior no contexto 3D, devido à proximidade das extremidades do organismo em relação às fronteiras do sistema. Isto indica uma sensibilidade diferente do modelo às variações deste parâmetro no ambiente tridimensional. Por outro lado, para o teste 6 (conforme representado na figura 5.13), a dimensão do organismo é semelhante àquela alcançada no modelo 2D.

Já seria de esperar que existissem algumas diferenças nos resultados ao passar do modelo bidimensional para o tridimensional. A introdução de uma dimensão adicional no espaço de simulação no modelo 3D torna a complexidade espacial substancialmente maior, permitindo expansão em seis direções em vez de quatro. Essa complexidade tridimensional afeta a geometria do ambiente, influenciando as interações entre células e a difusão de proteínas de maneira diferente em relação ao modelo 2D.

Apesar do modelo demonstrar uma sensibilidade distinta em relação aos parâme-

tros quando comparado com o modelo 2D, a relação entre as condutâncias dos canais de despolarização e polarização e a dimensão do organismo mantém-se inalterada. Ou seja, quando aumentamos (diminuímos) o valor de G_{pol}^0 , a dimensão do organismo diminui (aumenta), e quando aumentamos (diminuímos) o valor de G_{dep}^0 , a dimensão do organismo aumenta (diminui), tal como era esperado e foi explicado no modelo 2D.

Despolarização aleatória de células

Assim como fizemos no cenário 2D, realizámos um teste de despolarização aleatória das células. Mas, ao contrário do que foi feito anteriormente, procedemos à despolarização após 150 gerações, tendo em conta o número significativamente maior de elementos a serem considerados. Após estas 150 gerações foi implementado um ciclo que, ao correr sobre todas as células do sistema, fazia com que cada uma tivesse 30% de probabilidade de despolarizar. A despolarização foi feita variando o valor de G_{pol}^0 das células polarizadas para valores que corresponderiam a condutâncias de canais de polarização de células despolarizadas, aplicado ao parâmetro $G_{pol-dep}^0$.

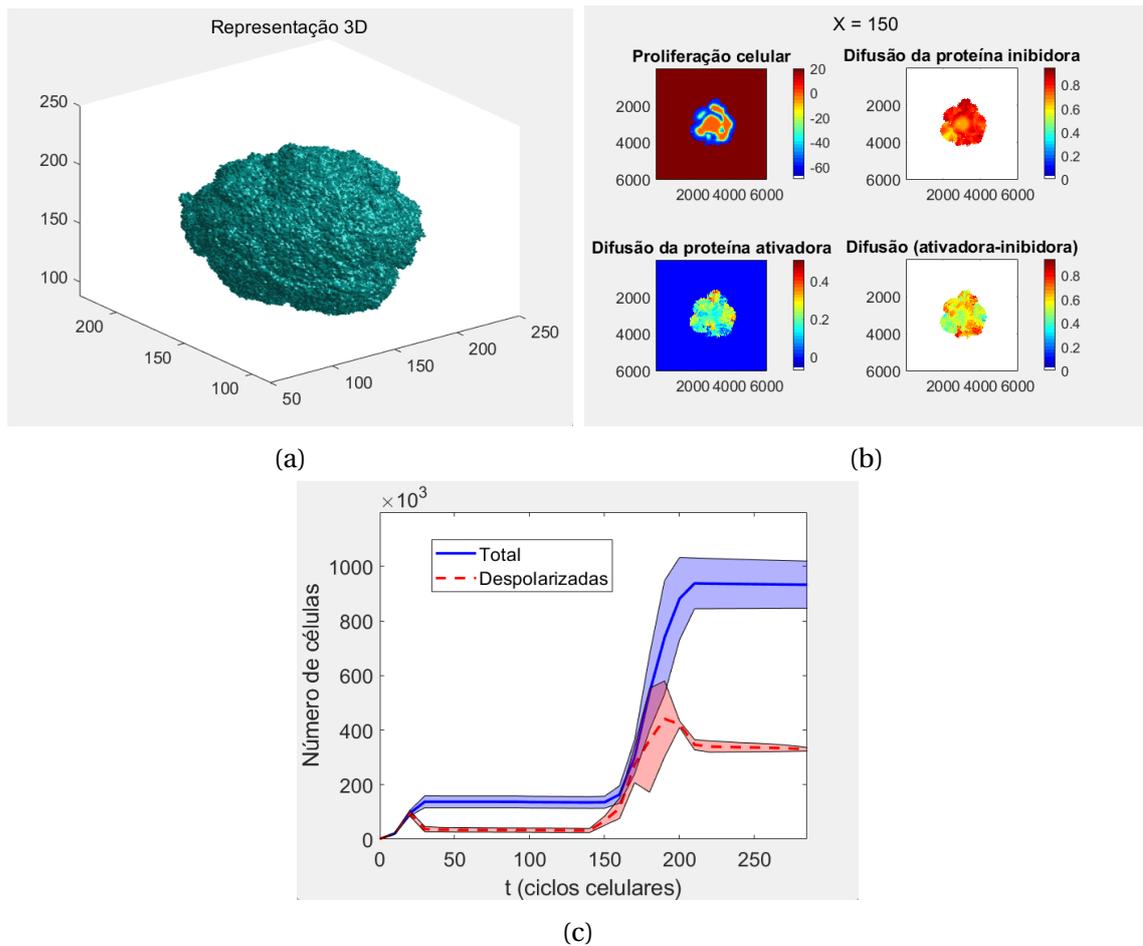


Figura 5.14: a) Representação do teste de despolarização aleatória de 30% em 3D. b) Corte 2D em $X = 150$. c) Gráfico representativo do número de células despolarizadas e total ao longo das gerações (média de $n = 5$ simulações).

Os resultados obtidos são semelhantes aos obtidos para o modelo 2D no mesmo teste. Conforme podemos observar no gráfico da figura 5.14 c), o organismo cresce até atingir a homeostasia e, quando ocorre uma intervenção cancerígena aleatória, há um aumento no tamanho do organismo até que ele retorne a uma nova homeostasia. Pelos gráficos 5.14 a) e b), conseguimos perceber de que maneira a despolarização aleatória de células afeta a forma do organismo.

Despolarização localizada de células

Já para a despolarização localizada, escolhe-se aleatoriamente uma célula polarizada após 150 gerações. Todas as células que se encontrem à distância de um raio de 20 células desta célula central diminuem o valor do parâmetro G_{pol}^0 de forma a ficarem despolarizadas. Desta vez, como se trata de um modelo tridimensional, usamos a equação da esfera para perceber quais as células se encontravam num raio de 20 células ou menos. Mais uma vez, a despolarização foi feita variando o valor de G_{pol}^0 das células polarizadas para valores que corresponderiam a condutâncias de canais de polarização de células despolarizadas, usando o parâmetro $G_{pol-dep}^0$.

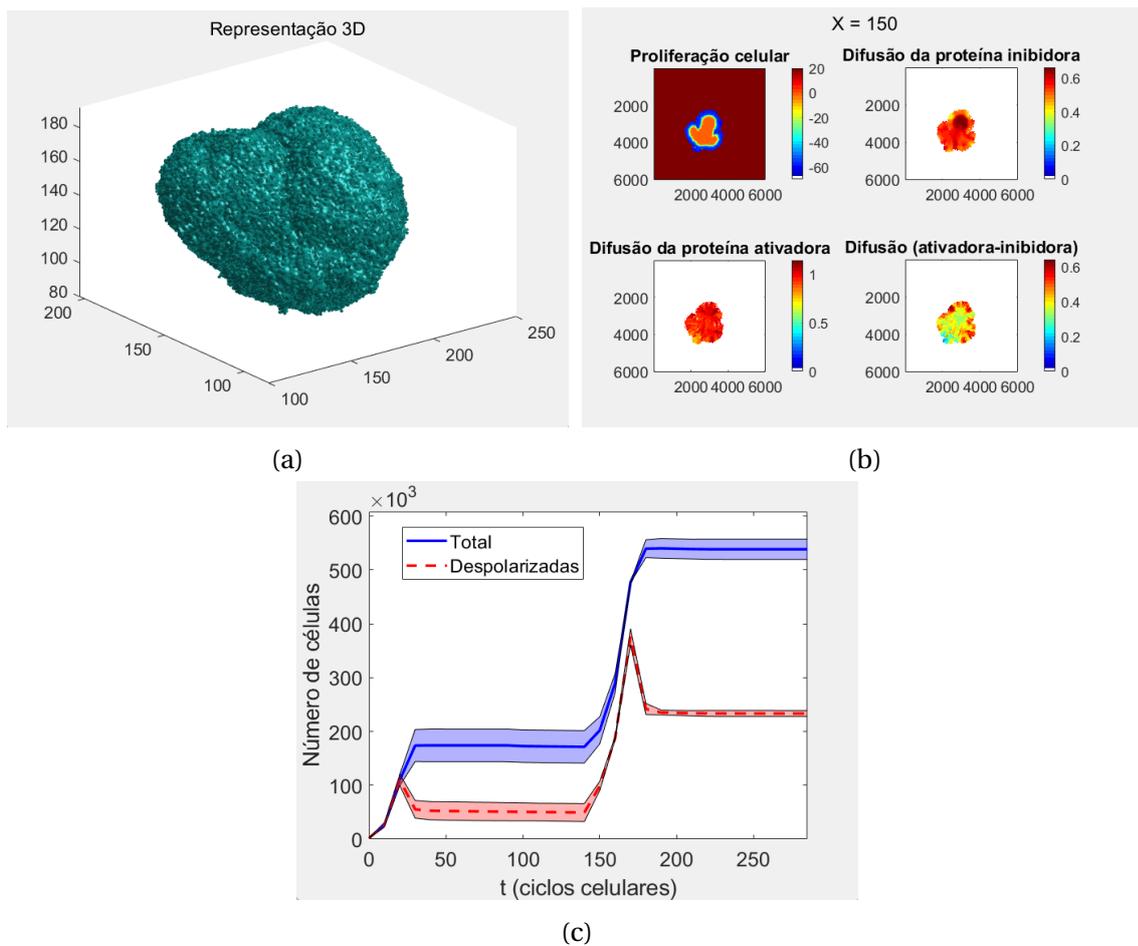


Figura 5.15: a) Representação do teste de despolarização localizada com um raio de 20 células em 3D. b) Corte 2D em $X = 150$. c) Gráfico representativo do número de células despolarizadas e total ao longo das gerações (média de $n = 5$ simulações).

Assim, como no caso da intervenção cancerígena aleatória, o organismo cresce até atingir a homeostasia. Quando ocorre a intervenção cancerígena localizada, observamos um aumento no tamanho do organismo até que ele retorne à homeostasia, conforme ilustrado na figura 5.15 c). A partir dos gráficos apresentados na figura 5.15 a) e b), podemos identificar claramente onde ocorreu a intervenção cancerígena localizada e como essa intervenção afetou a forma do organismo.

Avaliação da forma final do organismo

Tal como para os testes a duas dimensões, avaliámos a forma final do organismo. Mas, desta vez, comparámos a forma do organismo à forma de uma esfera. Para isto, sabendo que a área da superfície esférica é dada por $A = 4 * \pi * r^2$ e que o volume da esfera é dado por $V = (4/3) * \pi * r^3$, podemos obter uma constante adimensional como razão, elevando a área da superfície esférica a 3/2 e dividindo pelo volume:

$$\frac{A^{(3/2)}}{V} = \frac{(4 * \pi * r^2)^{(3/2)}}{\frac{4}{3} * \pi * r^3} = 6 * \sqrt{\pi} \quad (5.2)$$

e, em seguida, comparar esta constante com a razão $A^{3/2}/V$ final de cada organismo.

Para a área da superfície esférica, a ideia seria contar todas as células da periferia, à semelhança do que foi feito para o perímetro no caso 2D. A forma aproximada como foi feita esta contagem foi contando as células que tinham 6 ou mais células vizinhas vazias tendo em conta a vizinhança de Moore em 3D, ou seja, as 26 células mais próximas dessa célula. Para esta contagem, preenchamos os espaços vazios no interior do organismo provenientes da morte de células (sempre que têm pelo menos 20 células vizinhas vivas, usando a vizinhança de Moore em 3D), para que não fossem contabilizadas células próximas desses espaços para a contagem das células da periferia. Para o volume do organismo, fizemos a contagem de todas as células vivas no sistema.

Dividimos as razões obtidas para cada teste pela razão $6 \sqrt{\pi}$ afim de os comparar com a forma de uma esfera e quanto mais próxima de 1 estiver esta divisão, mais o organismo se assemelha a uma esfera.

Tabela 5.5: Valores médios da relação esférica do organismo para os diferentes testes e respetivo desvio padrão.

	Relação Esférica	σ
Teste 2 (3D)	1.11	0.04
Teste 6 (3D)	1.13	0.03
Teste 12 (3D)	1.07	0.03
Teste 14 (3D)	1.30	0.04
Teste 17 (3D)	1.19	0.03

Como seria de esperar, a relação esférica para os testes onde não existiu intervenção cancerígena (teste 2, 6 e 12) é mais próxima de 1 que a dos testes onde existiu (teste 14 e 17).

Capítulo 6

Conclusão

Dados os objetivos inicialmente delineados para o desenvolvimento deste projeto, podemos concluir que os mesmos foram alcançados com sucesso. Desenvolvemos um modelo computacional bidimensional, baseado num modelo já existente, que descreve a comunicação bioelétrica das células, tanto entre si como com o ambiente extracelular, e estabelecemos uma relação entre essa comunicação bioelétrica e um modelo de difusão de proteínas simples mas realista. Posteriormente, expandimos este modelo para uma representação tridimensional, partindo do modelo anteriormente desenvolvido, e procedemos à sua análise simulando tanto o crescimento normal de um organismo hipotético como a iniciação de um processo tumoral desencadeado pela perturbação do estado bioelétrico do tecido.

Considerando os testes realizados e os resultados apresentados no capítulo 5 é possível extrair várias conclusões significativas. Primeiramente, podemos inferir que através da manipulação do estado bioelétrico das células podemos controlar o crescimento do organismo e a sua forma. Esta manipulação pode ser feita através da alteração da condutância dos canais iónicos e, como percebemos pelos testes feitos nesta dissertação, se aumentarmos (diminuirmos) a G_{dep}^0 a dimensão do organismo aumenta (diminui), enquanto que se aumentarmos (diminuirmos) a G_{pol}^0 a dimensão do organismo diminui (aumenta), tal como seria esperado.

Outra conclusão relevante que podemos tirar do modelo desenvolvido é que a retroação entre a concentração das duas proteínas e o V_{mem} não tem o mesmo impacto nos dois sentidos, isto é, V_{mem} afeta mais a concentração das duas proteínas que a concentração das duas proteínas afeta o valor de V_{mem} .

Além disso, podemos concluir que, quando ocorre uma intervenção cancerígena, seja ela localizada ou aleatória, o organismo tende a assumir uma forma mais irregular.

Comparando os resultados obtidos para os modelos bidimensional e tridimensional, podemos concluir que estes resultados estão em concordância com as expectativas, já que o organismo apresenta um comportamento semelhante quanto às relações enunciadas nos parágrafos anteriores. No que diz respeito à sensibilidade dos modelos aos parâmetros, observamos que o modelo tridimensional demonstrou ser mais sensível do que o modelo bidimensional. Isto significa que uma mesma variação nos parâmetros resulta num impacto mais significativo no modelo tridimensional em comparação com o modelo bidimensional. Para o modelo tridimensional o tempo de

cálculo demonstrou ser bastante superior, como seria expectável.

Estas conclusões fornecem contribuições valiosas para a compreensão da influência das variáveis bioelétricas, da difusão de diferentes proteínas e da intervenção cancerígena no organismo, abrindo caminho para pesquisas futuras e aplicações potenciais no controlo do crescimento e da forma do organismo em contextos médicos e terapêuticos.

6.1 Trabalho Futuro

Qualquer modelo computacional desenvolvido pode ser melhorado para se tornar mais eficiente, e até mais especializado, tendo em conta o estudo que se pretende realizar através dele. O modelo desenvolvido nesta dissertação não é exceção, sendo que é um modelo simplista e genérico mas ao mesmo tempo realista e com uma boa base científica.

Existem várias abordagens que poderiam melhorar o nosso modelo. Uma delas seria a incorporação de componentes como interações mecânicas e reações bioquímicas, que são fundamentais para uma representação mais fiel da realidade. Outra está relacionada com o facto de sabermos que os canais iónicos têm diversas funções, como a transmissão sináptica e a regulação da excitabilidade celular, sendo que se os manipularmos com o objetivo apenas de controlar V_{mem} iremos afetar outras funções dos canais. Como tal, uma melhoria do modelo poderia ser ter as outras funções dos canais iónicos em conta aquando a sua manipulação. A aplicação de uma manipulação de canais iónicos teria de ser necessariamente local para evitar efeitos nefastos noutros órgãos e sistemas, nomeadamente os sistemas nervoso e cardíaco.

Outra componente passível de ser considerada seria tentar introduzir uma maior dependência da concentração das proteínas em V_{mem} , uma vez que se verificou que a variação da concentração destas proteínas influenciava pouco o valor de V_{mem} . Como mencionado no subcapítulo 5.1.2, existiam casos de simulações para todos os testes em que o crescimento do organismo excedia a dimensão do domínio, o que não era desejável. Uma melhoria poderia ser fazer uma reavaliação dos parâmetros usados para o modelo e tentar perceber de que forma isto poderia ser evitado. Mais especificamente, pensando agora no código elaborado, este poderia ser ainda mais otimizado afim do tempo de cálculo computacional ser menor, tentando reduzir o número de ciclos utilizados.

Alguns do trabalho futuro que poderia ser feito seria ainda a adição de uma componente experimental, por exemplo *in vitro*, que testasse a veracidade dos parâmetros utilizados na simulação e corroborasse os resultados obtidos.

Referências

- [1] "understanding cancer: What is cancer?". <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/what-is-cancer.html>. Accessed: July 19, 2023.
- [2] Trond Aasen, Malcolm B Hodgins, Michael Edward, and Sheila V Graham. The relationship between connexins, gap junctions, tissue architecture and tumour invasion, as studied in a novel in vitro model of hpv-16-associated cervical cancer progression. *Oncogene*, 22(39):7969–7980, 2003.
- [3] Richard Binggeli and Roy C Weinstein. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *Journal of theoretical biology*, 123(4):377–401, 1986.
- [4] Dana M Cairns, Jodie E Giordano, Sylvia Conte, Michael Levin, and David L Kaplan. Ivermectin promotes peripheral nerve regeneration during wound healing. *ACS omega*, 3(10):12392–12402, 2018.
- [5] Joao Carvalho. A computational model of organism development and carcinogenesis resulting from cells' bioelectric properties and communication. *Scientific Reports*, 12(1):9206, 2022.
- [6] Joao Carvalho. A computational model of cell membrane bioelectric polarization and depolarization, connected with cell proliferation, in different tissue geometries. *Journal of Theoretical Biology*, 557:111338, 2023.
- [7] Javier Cervera, Salvador Meseguer, and Salvador Mafe. The interplay between genetic and bioelectrical signaling permits a spatial regionalisation of membrane potentials in model multicellular ensembles. *Scientific reports*, 6(1):35201, 2016.
- [8] Javier Cervera, Salvador Meseguer, and Salvador Mafe. Intercellular connectivity and multicellular bioelectric oscillations in nonexcitable cells: A biophysical model. *ACS omega*, 3(10):13567–13575, 2018.
- [9] Javier Cervera, Patricio Ramirez, Michael Levin, and Salvador Mafe. Community effects allow bioelectrical reprogramming of cell membrane potentials in multicellular aggregates: Model simulations. *Physical Review E*, 102(5):052412, 2020.
- [10] A.K. Dewdney. *Cellular automata*. 2008.
- [11] Stanley Dunn, Alkis Constantinides, and Prabhas V Moghe. *Numerical methods in biomedical engineering*. Elsevier, 2005.

- [12] W Howard Evans and Patricia EM Martin. Gap junctions: structure and function. *Molecular membrane biology*, 19(2):121–136, 2002.
- [13] Zhaohui Feng, Haiyan Zhang, Arnold J Levine, and Shengkan Jin. The coordinate regulation of the p53 and mtor pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23):8204–8209, 2005.
- [14] Steven A Frank. Input-output relations in biological systems: measurement, information and the hill equation. *Biology direct*, 8(1):1–25, 2013.
- [15] David C Gadsby. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(5):344–352, 2009.
- [16] Alfred Gierer and Hans Meinhardt. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik*, 12:30–39, 1972.
- [17] Sylvain Goutelle, Michel Maurin, Florent Rougier, Xavier Barbaut, Laurent Bourguignon, Michel Ducher, and Pascal Maire. The hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental & clinical pharmacology*, 22(6):633–648, 2008.
- [18] Yanyan Han, Dandan Liu, and Lianhong Li. Pd-1/pd-l1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10(3):727, 2020.
- [19] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1):57–70, 2000.
- [20] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5):646–674, 2011.
- [21] Alan L Hodgkin and Andrew F Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4):500, 1952.
- [22] Mustapha Kandouz and Gerald Batist. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 14(7):681–692, 2010.
- [23] Jarkko Kari. Theory of cellular automata: A survey. *Theoretical computer science*, 334(1-3):3–33, 2005.
- [24] Michael Levin. Bioelectrical approaches to cancer as a problem of the scaling of the cellular self. *Progress in biophysics and molecular biology*, 165:102–113, 2021.
- [25] Michael Levin, Giovanni Pezzulo, and Joshua M Finkelstein. Endogenous bioelectric signaling networks: exploiting voltage gradients for control of growth and form. *Annual review of biomedical engineering*, 19:353–387, 2017.
- [26] Michael Levin, John Selberg, and Marco Rolandi. Endogenous bioelectrics in development, cancer, and regeneration: drugs and bioelectronic devices as electroceuticals for regenerative medicine. *Isience*, 22:519–533, 2019.
- [27] Giuseppe Longo, Maël Montévil, Carlos Sonnenschein, and Ana M Soto. In search of principles for a theory of organisms. *Journal of biosciences*, 40:955–968, 2015.

-
- [28] Brian J LuValle. The effects of boundary conditions on cellular automata. *Complex Systems*, 28(1), 2019.
- [29] Juanita Mathews and Michael Levin. Gap junctional signaling in pattern regulation: physiological network connectivity instructs growth and form. *Developmental neurobiology*, 77(5):643–673, 2017.
- [30] Harold M McNamara, Rajath Salegame, Ziad Al Tanoury, Haitan Xu, Shahinoor Begum, Gloria Ortiz, Olivier Pourquie, and Adam E Cohen. Bioelectrical domain walls in homogeneous tissues. *Nature physics*, 16(3):357–364, 2020.
- [31] Hans Meinhardt. *The algorithmic beauty of sea shells*. Springer Science & Business Media, 2009.
- [32] Alisha M Mendonsa, Tae-Young Na, and Barry M Gumbiner. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, 37(35):4769–4780, 2018.
- [33] Denis Noble. Applications of hodgkin-huxley equations to excitable tissues. *Physiological Reviews*, 46(1):1–50, 1966.
- [34] Nurdan Özkucur, Kyle P Quinn, Jin C Pang, Chuang Du, Irene Georgakoudi, Eric Miller, Michael Levin, and David L Kaplan. Membrane potential depolarization causes alterations in neuron arrangement and connectivity in cocultures. *Brain and behavior*, 5(1):e00295, 2015.
- [35] Vaibhav P Pai, Joan M Lemire, Jean-François Paré, Gufa Lin, Ying Chen, and Michael Levin. Endogenous gradients of resting potential instructively pattern embryonic neural tissue via notch signaling and regulation of proliferation. *Journal of Neuroscience*, 35(10):4366–4385, 2015.
- [36] Vaibhav P Pai, Alexis Pietak, Valerie Willocq, Bin Ye, Nian-Qing Shi, and Michael Levin. Hcn2 rescues brain defects by enforcing endogenous voltage pre-patterns. *Nature communications*, 9(1):998, 2018.
- [37] Mariana Pavel, Maurizio Renna, So Jung Park, Fiona M Menzies, Thomas Ricketts, Jens Füllgrabe, Avraham Ashkenazi, Rebecca A Frake, Alejandro Carnicer Lombarte, Carla F Bento, et al. Contact inhibition controls cell survival and proliferation via yap/taz-autophagy axis. *Nature communications*, 9(1):2961, 2018.
- [38] Alexis Pietak and Michael Levin. Bioelectric gene and reaction networks: computational modelling of genetic, biochemical and bioelectrical dynamics in pattern regulation. *Journal of The Royal Society Interface*, 14(134):20170425, 2017.
- [39] Martin Pospischil, Maria Toledo-Rodriguez, Cyril Monier, Zuzanna Piwkowska, Thierry Bal, Yves Frégnac, Henry Markram, and Alain Destexhe. Minimal hodgkin–huxley type models for different classes of cortical and thalamic neurons. *Biological cybernetics*, 99:427–441, 2008.
- [40] Allen R Sanderson, Robert M Kirby, Chris R Johnson, and Lingfa Yang. Advanced reaction-diffusion models for texture synthesis. *Journal of Graphics Tools*, 11(3):47–71, 2006.

-
- [41] Goran Söhl, Stephan Maxeiner, and Klaus Willecke. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nature reviews neuroscience*, 6(3):191–200, 2005.
- [42] Yongli Song, Rui Yang, and Guiquan Sun. Pattern dynamics in a gierer–meinhardt model with a saturating term. *Applied Mathematical Modelling*, 46:476–491, 2017.
- [43] Carlos Sonnenschein and Ana M Soto. Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Molecular carcinogenesis*, 29(4):205–211, 2000.
- [44] Carlos Sonnenschein and Ana M Soto. Over a century of cancer research: Inconvenient truths and promising leads. *PLoS biology*, 18(4):e3000670, 2020.
- [45] Ana Soto, Giuseppe Longo, and Denis Noble. From the century of the genome to the century of the organism: New theoretical approaches. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 122(1), 2016.
- [46] Ana M Soto and Carlos Sonnenschein. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *Bioessays*, 26(10):1097–1107, 2004.
- [47] Ana M Soto and Carlos Sonnenschein. The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. *Bioessays*, 33(5):332–340, 2011.
- [48] Ana M Soto, Giuseppe Longo, Paul-Antoine Miquel, Maël Montévil, Matteo Mosio, Nicole Perret, Arnaud Pocheville, and Carlos Sonnenschein. Toward a theory of organisms: Three founding principles in search of a useful integration. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 122(1):77–82, 2016.
- [49] Ana M Soto, Giuseppe Longo, Maël Montévil, and Carlos Sonnenschein. The biological default state of cell proliferation with variation and motility, a fundamental principle for a theory of organisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 122(1):16–23, 2016.
- [50] Pranjal Srivastava, Anna Kane, Christina Harrison, and Michael Levin. A meta-analysis of bioelectric data in cancer, embryogenesis, and regeneration. *Bioelectricity*, 3(1):42–67, 2021.
- [51] Alan Mathison Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of mathematical biology*, 52:153–197, 1990.
- [52] Jack Tuszynski, Tatiana M Tilli, and Michael Levin. Ion channel and neurotransmitter modulators as electroceutical approaches to the control of cancer. *Current pharmaceutical design*, 23(32):4827–4841, 2017.
- [53] Dmitry A Zaitsev. A generalized neighborhood for cellular automata. *Theoretical Computer Science*, 666:21–35, 2017.

Apêndice A

Método das diferenças finitas

O método das diferenças finitas é um conceito bastante importante e usado na área da matemática e da computação numérica. É utilizado para aproximar as derivadas de funções contínuas, usando diferenças entre valores próximos da função em pontos específicos.

A ideia base deste método é que, ao invés de se calcular a derivada de uma função usando diretamente o conceito de limite, podemos aproximar o valor dessa mesma derivada usando uma diferença finita entre os valores da função em pontos próximos do ponto selecionado. Para isto, usa-se a expansão em série de Taylor para a frente e para trás, com passos de diferentes dimensões para assim aproximar o valor da derivada. A escolha do passo é de extrema importância visto que se este for demasiado grande leva a um erro elevado devido à truncagem da série e caso seja demasiado pequeno leva a erros de arredondamento [11].

Existem diversos tipos de expressões para calcular as diferenças finitas, sendo algumas delas as diferenças finitas para a frente, diferenças finitas para trás e as diferenças finitas centrais. No modelo desenvolvido nesta dissertação iremos usar essencialmente o método das diferenças finitas centrais.

A.0.1 Método das diferenças finitas centrais

O Método das diferenças finitas centrais é uma combinação do método das diferenças finitas para a frente e para trás e é utilizada para obter uma melhor precisão na aproximação da derivada. A expressão geral para a diferença central de primeira ordem é dada por:

$$y'(x) = \frac{y(x+h) - y(x-h)}{2h} \quad (\text{A.1})$$

Enquanto que a de segunda ordem é dada por:

$$y''(x) = \frac{y(x+h) - 2y(x) + y(x-h)}{h^2} \quad (\text{A.2})$$

sendo h o passo escolhido para as diferenças finitas (a distância entre os pontos vizinhos).

