

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE FÍSICA

Análise da Segregação Celular: Modelos Estatísticos e Simulações

Carine Priscila Beatrici

Tese realizada sob a orientação do professor Leonardo Gregory Brunnet, apresentada ao Instituto de Física da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Física.

Porto Alegre, 26 de novembro de 2014

Trabalho financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), Capes, Fapergs, Propesq-UFRGS.

Resumo

O fenômeno de segregação celular ocorre tanto na estruturação inicial dos organismos (morfogênese) quanto durante a regeneração de tecidos danificados. O reordenamento celular ocorre através do agrupamento de células de um mesmo tipo. A evolução do tamanho destes agregados é objeto de experimentos e de simulações relatados na literatura há mais de vinte anos. Os resultados encontrados, no entanto, são controversos. Ao simular a segregação celular pode-se obter uma lei de potência ou uma dependência logarítmica para a evolução do tamanho desses agregados. Por outro lado, dentro de certos intervalos, os experimentos podem ser ajustados com leis de potência, mas os expoentes obtidos diferem dos sugeridos nas simulações, deixando obscura a compreensão do problema. Para entender a origem física deste fenômeno estendemos os modelos de simulações baseados em diferença de adesão para incluir as hipóteses: de diferença de velocidades, de reconhecimento celular e de motilidade de grupo. Verificamos que as proporções de células de cada tecido são determinantes na distribuição espacial final do agregado e mapeamos isto em um diagrama. Para estudar a evolução do crescimento de agregados utilizamos dois métodos: a aproximação de agregado médio e a abordagem através da equação de coagulação-fragmentação de Smoluchowski. Em ambas abordagens supomos que as células formam agregados com simetria esférica e que o mecanismo principal responsável pela segregação é a fusão binária de agregados. Usando o primeiro método obtivemos resultados analíticos que mostram os efeitos de tamanho finito tanto das células individuais quanto do tamanho do sistema sobre as leis de evolução temporal. Além disso, a partir do ajuste de dados experimentais, mostramos que os expoentes corretos das leis de potência só podem ser obtidos redefinindo-se a dependência da constante de difusão dos agregados com sua massa. Para levar em conta o efeito da flutuação de tamanho dos agregados, uma equação de Smoluchowski generalizada é proposta. A distribuição de tamanhos de agregados é obtida integrando-se esta equação e, após, esse resultado é comparado com experimentos e simulações.

Abstract

The cellular segregation happens both in the initial organism structuration (morphogenesis) and in tissue regeneration. Cell sorting happens by grouping of cells of the same kind. The size evolution of these clusters has been reported in experiments and simulations in the literature in the last twenty years. The results found are, nevertheless, controversial. When simulating cell segregation one may obtain a power law or a logarithmic dependency for their evolution. On the other hand, within a limited range, the experiments suggest a power law, however the exponents differ from those obtained by simulations, leaving the problem undefined. In order to understand the physical origin of this phenomenon we have extended the simulations models based on differential adhesion to include the hypotheses of differential velocities, cell recognition and differential group motilities. We have verified that different cell type proportions determine different final cell spatial distribution and mapped this in a diagram. In order to study the evolution of cluster growth we have used two methods: the mean cluster approach and the Smoluchowski coagulation-fragmentation equation approach. In both cases we suppose that the cells form spherical clusters and that the primary aggregating mechanism is through binary cluster fusion. Using the first method we obtain analytic results showing the effects produced by the finite size of the individual cells and of the finite size of the system on the evolution laws. Besides, from the experimental data fitting, we have shown that the correct exponent for the power laws is obtained only if we redefine the diffusion constant dependency with the cluster mass. In order to consider the cluster size fluctuation effect, a generalized Smoluchowski equation is proposed. The system cluster size distribution is obtained integrating this equation and, then, this result is compared with experiments and simulations.

Sumário

Tabela de Símbolos e Abreviações	p. 8
Simulação com Modelo de Animóides	p. 8
Modelo de Glazier Graner e Hogeweg	p. 9
Modelo de Agregado Médio	p. 10
Equação de Smoluchowski	p. 11
Abreviações	p. 12
1 Introdução	p. 13
1.1 Organização dos Conteúdos	p. 21
2 Histórico Experimental e Referencial Teórico	p. 22
2.1 Primórdios do Problema Biológico	p. 22
2.2 Hipóteses	p. 23
2.3 Velocidade Diferenciada	p. 24
2.4 Fusão de Agregados Celulares	p. 26
3 O Modelo de Animóides	p. 30
3.1 O Modelo de Vicsek	p. 31
3.2 A adaptação de Grégoire	p. 33
3.3 Animóides e Segregação Celular - Hipótese de Adesão Diferencial	p. 36
3.3.1 Adaptação Utilizada neste Trabalho	p. 38
3.3.2 Medidas da Segregação Celular	p. 40
3.4 Medida de Movimento Coletivo	p. 45

3.5	Simulação Numérica	p. 45
3.5.1	Método das Caixas	p. 46
3.6	Simulações em GPU	p. 48
4	Resultados da HVD com o Modelo de Animóides	p. 50
4.1	Resultados na Ausência de Movimento Coordenado	p. 51
4.1.1	Arredondamento	p. 51
4.1.2	Proporção entre Células de Tecidos Distintos	p. 52
4.1.3	Influência do Número Total de Células	p. 53
4.1.4	Visualização da Segregação	p. 55
4.2	Resultados com Movimento Coordenado	p. 56
4.2.1	As Normalizações Adotadas para o Movimento Coletivo	p. 58
4.2.2	Comparação entre as Normalizações	p. 60
5	O Mecanismo de Reconhecimento	p. 67
5.1	Simulação no Modelo de Animóides	p. 67
5.2	Padrões Finais de segregação	p. 68
6	O Modelo de Glazier Graner Hogeweg	p. 73
6.1	Adaptação Adotada	p. 75
7	Resultados com o Modelo GGH	p. 78
7.1	Equivalência entre Parâmetros de Medida da Segregação	p. 78
7.2	Resultados na Hipótese da Velocidade Diferenciada	p. 79
7.3	Padrões Finais com o Mecanismo de Reconhecimento	p. 80
8	Modelo de Agregado Médio	p. 82
8.1	Os Experimentos de Méhes	p. 85

9	Resultados com Modelo de Agregado Médio	p. 87
9.1	Aproximação de Sistema Infinito	p. 88
9.2	Limites Finitos Superior e Inferior	p. 89
9.3	Evolução do Tamanho do Agregado Médio	p. 89
9.4	Comparação com Simulações e Experimentos	p. 91
9.5	Hipótese da Motilidade de Grupo Diferenciada	p. 93
10	Equação de Smoluchowski	p. 96
10.1	Equação de Coagulação-Fragmentação de Smoluchowski	p. 98
10.1.1	Fragmentação Constante	p. 99
10.1.2	Fragmentação Exponencial	p. 100
10.2	Medida de Segregação Celular	p. 100
11	Resultados com a Equação de Smoluchowski	p. 102
11.1	Resultados com o Núcleo de Coagulação	p. 103
11.2	Resultados com Fragmentação	p. 104
11.2.1	Fragmentação Constante	p. 105
11.2.2	Fragmentação Térmica	p. 105
11.3	Comparação com Simulações e Experimentos	p. 106
12	Discussão	p. 110
12.1	A Velocidade Diferenciada e o Modelo de Animóides	p. 111
12.2	O mecanismo de Reconhecimento e o Modelo de Animóides	p. 113
12.3	O Modelo de GGH e os Padrões Finais de Segregação	p. 114
12.4	O Modelo de Agregado Médio	p. 114
12.5	A Equação de Smoluchowski	p. 115
12.6	A Hipótese da Motilidade de Grupo Diferenciada	p. 116
12.7	Perspectivas	p. 117

Apêndice A – Soluções do Modelo de Agregado Médio	p. 119
A.1 Tamanho Máximo de Agregação	p. 119
A.2 Tamanho Mínimo de Agregação	p. 121
A.3 Limites Finitos Superior e Inferior	p. 121
Apêndice B – Os Limites das Soluções	p. 123
B.1 Limites em Sistemas Bidimensionais	p. 123
B.1.1 Limite Tamanho Máximo de Agregado Tendendo ao infinito	p. 123
B.1.2 Tamanho Efetivo de Coagulação	p. 124
B.1.3 Tamanhos Mínimo e Máximo	p. 124
B.2 Limites em Sistemas Tridimensionais	p. 125
Referências Bibliográficas	p. 127

Tabela de Símbolos e Abreviações

Simulação com Modelo de Animóides

Apresentamos os símbolos referentes às equações dos capítulos 3, 4 e 5.

L	lado do espaço do sistema
N	número total de partículas/células do sistema
t	tempo, em passos de animóides
t^*	tempo de saturação, onde o sistema atinge estado assintótico
\vec{x}_i	vetor posição da i -ésima partícula
θ_i	direção do deslocamento da i -ésima partícula
\vec{v}_i	velocidade da i -ésima partícula
v_0	velocidade das células mais lentas do sistema
$\alpha_{i,j}$	parâmetro de movimento coletivo
$\beta_{i,j}$	adesão entre células do tecido i e tecido j
η	parâmetro do ruído
\vec{u}_i	vetor unitário aleatório, responsável pelo ruído vetorial
γ	parâmetro de medida de segregação celular
γ^*	parâmetro de segregação celular de saturação
$n_{=}$	número de vizinhos iguais de uma célula
n_{\neq}	número de vizinhos diferentes de uma célula
n_1	número de vizinhos do tipo 1
n_2	número de vizinhos do tipo 2
δ_i	razão entre a velocidade de i -ésima célula e a velocidade das células lentas

δ	razão entre as velocidades das células
$f_{i,j}$	força entre partículas i e j
$r_{i,j}$	distância entre partículas i e j
r_c	distância impenetrável da célula
r_{eq}	distância de equilíbrio entre as células
r_{har}	distância máxima onde a força é harmônica
r_{alc}	distância de alcance da força e de vizinhança
$\vec{e}_{i,j}$	vetor que na direção da partícula i a j
ϕ	parâmetro de alinhamento das partículas global
λ	expoente da evolução de γ .
μ	expoente do tempo de saturação contra o tamanho do sistema
ν	expoente do γ de saturação contra o tamanho do sistema
f	fração da adesão entre ligações heterotípicas e homotípicas
$\beta_{=}$	adesão entre células iguais
β_{\neq}	adesão entre células diferentes

Modelo de Glazier Graner e Hogeweg

Apresentamos os símbolos referentes às equações dos capítulos: 6 e 7.

P	probabilidade de troca de valor entre dois sítios
T	temperatura efetiva do sistema
K_B	constante de Boltzmann
H	energia (custo) de troca de células
id	identificação do sítio da rede de Potts
$\sigma(id)$	índice que identifica a célula
$\tau(\sigma(id))$	tipo da célula σ ;
$J(\tau, \tau')$	energia superficial, ou adesão, entre células do tipo τ e τ' ;

λ_S multiplicador de Lagrange associado à conservação de área;

$S(\sigma)$ a área da célula σ ;

S_T a área ideal (surface target) da célula do tipo σ ;

$H_{químico}$ potencial químico genérico

λ_α multiplicador de Lagrange associado ao movimento ativo da célula

$\alpha(\sigma, \sigma')$ tendência da célula do tipo σ de seguir, sua vizinha, do tipo σ'

α_A auto-persistência da célula

α_R parâmetro de movimento ativo aleatório

$\Delta\vec{CM}$ deslocamento do centro de massa da célula

$\Delta\vec{CM}_T$ deslocamento ideal do centro de massa da célula

γ parâmetro de segregação celular

S superfície total entre os tecidos diferentes

N número total de células do sistema

Modelo de Agregado Médio

Apresentamos os símbolos referentes às equações dos capítulos: 8 e 9.

m massa/tamanho do agregado médio

m_0 tamanho inicial de agregado

τ tempo característico de encontro de agregados

$D(m)$ constante de difusão, depende da massa do agregado

α expoente da difusão contra a massa

L distância média entre agregados

V volume, em 3d, ou área, em 2d, total do sistema

ρ densidade de agregados no sistema

n número total de agregados do sistema

M_0 massa total do sistema

d	dimensão do sistema
F	dimensão fractal do agregado
a	constante que define a escala de tempo
b	tamanho máximo de agregado
c	tamanho mínimo de agregado
$G(m)$	parte da solução analítica transcendental, que depende de m
$G(m_0)$	parte constante da solução analítica transcendental, inicial, em termos de m_0
${}_2F_1$	função hipergeométrica de Euler

Equação de Smoluchowski

Apresentamos os símbolos referentes às equações dos capítulos: 10 e 11.

k	tamanho/massa do agregado
n_k	densidade de agregados de tamanho k
$K_{i,j}$	núcleo de coagulação
$F_{i,j}$	núcleo de fragmentação
α	expoente que relaciona a difusão com a massa do agregado
β	parâmetro que pesa a importância da seção de choque no núcleo de coagulação
d	dimensão do espaço
k'	constante de coagulação
f	constante de fragmentação
$\langle k \rangle$	tamanho/massa média de agregado
c	tamanho mínimo de agregação

Abreviações

GGH	Graner Glazier e Hogeweg
HVD	Hipótese da Velocidade Diferenciada
HAD	Hipótese da Adesão Diferenciada
REC	Mecanismo de Reconhecimento Celular
HMGD	Hipótese da Motilidade de Grupo Diferenciada
DM	Dinâmica Molecular
GPU	<i>Graphic Processor Unit</i>
CUDA	<i>Compute Unified Device Architecture</i>
MCS	Passo de Monte Carlo <i>Monte Carlo Step</i>
MAM	Modelo de Agregado Médio

1 Introdução

Existem diversos conjuntos de células que, quando em misturas binárias, podem se separar ou reorganizar em camadas formando os tecidos. Isto pode ocorrer por rediferenciação (células diferenciadas que alteram suas propriedades, como células tronco), ou por troca de posição das células dentro do agregado celular. Neste trabalho vamos estudar o caso no qual as células se reorganizam sem passar por diferenciação. Do ponto de vista da física, podemos estudar a segregação celular por pelo menos duas formas: por modelos matemáticos, que descrevem a evolução de alguma medida da segregação a partir de hipóteses estatísticas ou por modelos de simulação computacional, onde elementos físicos ou químicos mínimos, considerados essenciais, são mapeados em representações computacionais de células. Para explicar a segregação, existem diversas hipóteses, onde cada uma delas podendo ser simulada em computador. Também podemos relacionar os resultados das simulações com os modelos matemáticos que descrevem a segregação celular. Todas essas relações foram exploradas neste trabalho, com algumas hipóteses, dois modelos matemáticos e dois modelos de simulação, como mostrado na figura 1.1.

As células podem ter vantagens ao viver em grupos. Ao formar um ser vivo multicelular as células podem se locomover mais rápido e a distâncias maiores, se proteger de danos, assim como fazer trocas de substâncias. Estas vantagens são obtidas apenas pela união das células. As células podem ainda ter vantagens adicionais caso se especializem em algumas funções, e.g., algumas células podem interagir com o meio protegendo as demais, outras podem digerir alimentos. Com isso, se tornam eficientes em alguns processos. A diferenciação celular é parte essencial na morfogênese, processo que ocorre na maioria dos seres pluricelulares em fases embrionárias, mas que também pode ocorrer em alguns tipos de células fora do desenvolvimento embrionário (conhecidas como células tronco). No início do desenvolvimento embrionário de seres pluricelulares diblásticos (dois tecidos embrionários) e triblásticos (três tecidos embrionários) o futuro ser é um agregado composto por várias células idênticas que se dividem e, em determinado momento, se diferenciam. Ou seja, suas características se alteram permitindo que tenham um nível maior de especialização. Este processo, chamado de diferen-

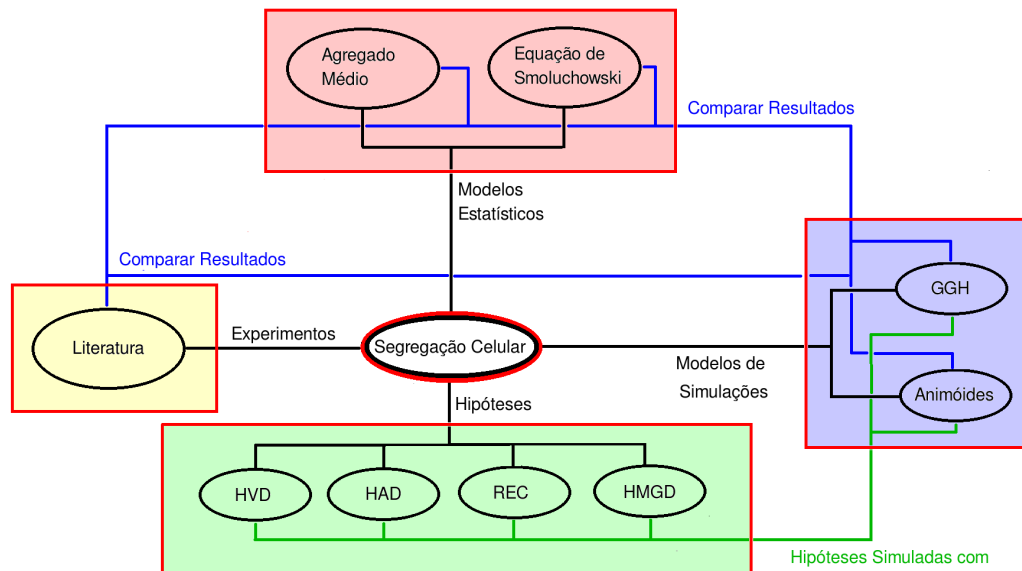


Figura 1.1: No centro a segregação celular, mostrando como podemos relacionar as hipóteses mais importantes [1, 2] para o mecanismo responsável pela reorganização, com os modelos de simulação adotados neste trabalho [3, 4], com os modelos matemáticos que descrevem a evolução do tamanho médio de agregado [5].

ciação celular, possibilitará execução de funções específicas no indivíduo formado. Nesta fase do desenvolvimento as células recebem sinais bioquímicos que podem vir do ambiente ou das células vizinhas. Partindo destes sinais e de sua relação com o material genético a célula pode modificar suas características: número de divisões celulares, o movimento celular, o tamanho, morte celular e propriedades da membrana celular. Modificações nas células produzem diferentes tipos de tecidos, algumas destas modificações alteram propriedades físicas como o tamanho, movimentação e adesão da membrana celular [6].

Antes da diferenciação as células aderem igualmente em todas as suas vizinhas, mas após a diferenciação algumas de suas propriedades podem ser alteradas, possibilitando que tenham ligações preferenciais com algum tipo específico de célula para, então, formar as estruturas complexas necessárias. A diferenciação celular e a formação das primeiras estruturas de um ser vivo fazem parte de um processo extremamente importante, chamado morfogênese, que é amplamente estudado na biologia. Durante a morfogênese o embrião passa de um ser aproximadamente esférico, sem estrutura interna e com células iguais, para um ser com formato característico, contendo células diferenciadas e organizadas em uma estrutura própria [6]. Estamos interessados no processo de organização celular, mais especificamente, queremos entender como células já diferenciadas encontram suas posições dentro de um agregado composto por

diferentes tipos de células. Ou seja, como ocorre a transição de um grupo de células isoladas, unidas apenas pela adesão, para células se comportando como parte integrante de um ser complexo. Neste caso, a sobrevivência do ser vivo é mais importante do que a sobrevivência da célula individual e mecanismos de apoptose (morte celular) passam a ter um papel importante.

Na morfogênese temos a transição para células especializadas que formam grupos funcionais específicos. Mas existe também a transição oposta, caso do câncer, quando células que estão completamente formadas e vivendo como um conjunto, cumprindo suas funções coletivas, alteram profundamente seu metabolismo. Essas células cancerosas possuem características diferentes daquelas do tecido ao qual faziam parte antes de se transformarem. Elas se reproduzem mais rapidamente, podem entrar em estado quiescente, de baixíssimo consumo energético e não fazem mais apoptose. As células de câncer perdem o mecanismo de preservação da vida do ser como prioridade em relação a vida das células, a apoptose. Enquanto estiverem confinadas ao câncer, as células não possuem alta motilidade, porém nos casos da metástase, algumas células sofrem uma transformação que atribui grande motilidade permitindo a migração para fora do tecido, conseqüentemente, se espalhando por todo o organismo. Estas células podem se formar na superfície do câncer, ou talvez em um ponto qualquer do tecido alterado migrando para fora e se desprendendo, para depois se espalharem. De qualquer forma, caso se movam aleatoriamente, para que possam sair do tumor e se espalhar pelo organismo, devem primeiro passar por um processo de segregação.

Além dos processos típicos de seres pluricelulares mencionados acima podemos estudar a segregação celular do ponto de vista evolutivo, pois em algum momento de sua evolução, os seres vivos unicelulares começaram a se organizar e viver em conjunto e, posteriormente, formarem os seres pluricelulares propriamente ditos. Na evolução dos seres vivos existem algumas transições particularmente importantes. Por exemplo, temos a transição entre seres vivos procariontes, unicelulares sem núcleo celular, para seres eucariontes, com núcleo celular. Outra transição notável surgiu mais tarde quando seres eucariontes passaram a se agrupar. Estas células começaram a viver em grupos formando os seres pluricelulares. Este último passo evolutivo ocorreu há cerca de 600 milhões de anos, mas ainda hoje encontramos espécies na vizinhança dessa transição e que são bastante estudadas na literatura recente: *Hydra vulgaris* (hidra) e *Dictyostelium discoideum* [7]. De fato, essas espécies se apresentam em lados diferentes desta transição: a *Dictyostelium discoideum* é um ameboide unicelular que, em condições extremas se transforma em um ser pluricelular. Na falta de alimento, passa a emitir um sinal químico oscilante que induz um procedimento semelhante. Uma vez estabelecido um campo químico, as amebas passam a se deslocar na direção positiva do gradiente desse campo, o que as leva a um agregado pluricelular, chamado de lesma. Essa união é temporária; quando esta lesma encontra

um local adequado, parte das células se espalha e elas voltam a viver como seres unicelulares. As hidras, por sua vez, são seres pluricelulares que em condições específicas de laboratório podem ter suas células separadas umas das outras. Embora não apresentem todas as funções necessárias para a sobrevivência, elas passam a se comportar como seres unicelulares. Novamente esta fase é temporária, pois as células da hidra podem se reorganizar formando novamente uma hidra pluricelular.

A espécie *Hydra vulgaris*, ver fig.1.2, faz parte da classe *hydrozoa*, possui dois tipos principais de tecidos celulares e grande capacidade regenerativa. As células da hidra são de dois tipos: endoderme e ectoderme. A endoderme se localiza internamente e é responsável pela digestão, a ectoderme se localiza externamente e é responsável pelas trocas com o ambiente. Existem ainda algumas células neurais espalhadas pelo tronco da hidra, células de fixação na base e também células com substância urticante nos tentáculos para aprisionar alimento. Neste trabalho desconsideramos estes tipos de tecidos secundários pois eles são eliminados pelos protocolos de experimento [8] de segregação, que cortam os tentáculos e as células de fixação na base da hidra e os banhos químicos eliminam a grande maioria das células nervosas.

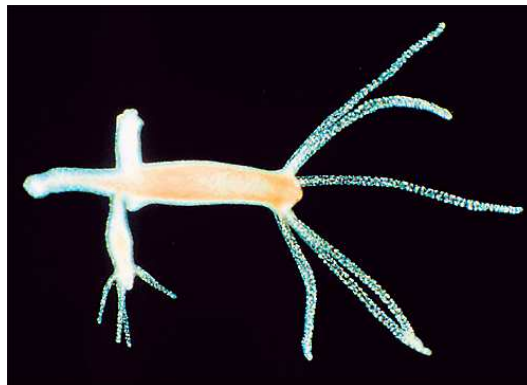


Figura 1.2: Foto de uma *Hydra vulgaris* com possui dois brotos resultado de reprodução assexuada. Nos experimentos, os brotos precisam ser descartados.

O interesse nas hidras deve-se ao seu enorme potencial de regeneração: suas células, quando separadas umas das outras e misturadas aleatoriamente, se reorganizam em um ser completo. A primeira parte desse processo é a da reorganização dos tecidos: as células migram dentro do agregado até as posições corretas e, como são apenas dois tecidos, a configuração final é um tecido localizado internamente e outro externamente no agregado. Esta etapa da regeneração é chamada de segregação celular (figura 1.3) e é nessa fase que muitos pesquisadores se perguntam a respeito dos mecanismos existentes para explicar como as células encontram as posições corretas no agregado [9, 10, 1, 11, 12].

Os estudos com a segregação celular começaram com Wilson [13], que estudou misturas de

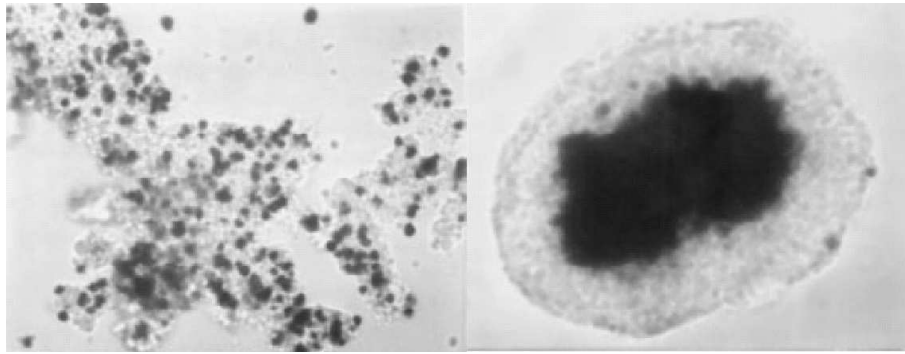


Figura 1.3: Experimento de segregação celular com células de embrião de pinto: mistura aleatória à esquerda e o estado segregado ou saturado à direita. Imagem retirada do artigo [12].

células de esponja e observou sua regeneração completa destas esponjas. Entretanto, com este experimento não era possível diferenciar os tecidos pois eles são muito parecidos visualmente a tecnologia de microscopia da época não permitia grande resolução. Então não se sabia se a segregação ocorria devido à rediferenciação celular, ou se as células migravam dentro do agregado até atingir suas posições adequadas. Isto foi esclarecido pelo experimento de Holtfreter [14], que pode observar a migração de grupos de células dentro do agregado ao utilizar células de vertebrados que possuem pigmentação diferenciada por tecido. Ou seja, a segregação ocorre pela migração de células dentro do agregado, indicando a presença de fatores físico-químicos para explicá-la.

Resta então entender qual ou quais são os mecanismos físico-químicos responsáveis pela segregação celular. Vários foram propostos, entre eles a Hipótese da Adesão Diferenciada (HAD) [1] que é a mais difundida para explicar como as células se reorganizam. Nela as células mais aderentes tendem a ocupar o centro do agregado. É uma hipótese bastante estudada através de experimentos e simulações [1, 4, 15]. Há também a Hipótese da Velocidade Diferenciada (HVD), proposta em um trabalho experimental [2]. Nesta, as células se reorganizam devido à diferença nas motilidades dos diferentes tecidos, as células mais rápidas se encontram mais facilmente formando o tecido central do agregado, enquanto as mais lentas ficam ao redor. Porém, este é um resultado contraintuitivo: se pensarmos, por exemplo, em dois líquidos, o resultado esperado seria com o mais energético tendendo a migrar para fora. Os autores propuseram um segundo mecanismo responsável pela origem da segregação, o mecanismo de reconhecimento. O resultado de Jones e colaboradores é tão inesperado que ele foi erroneamente citado na literatura [16]. Nesta citação os autores dizem que as células mais lentas ocupariam o interior do agregado, justamente o oposto do resultado encontrado. Vamos analisar esta hipótese com cuidado, isolando totalmente outros fatores, para, então, inserir o segundo mecanismo proposto no trabalho original, sem dar preferência a qualquer padrão final, pois este ainda é controverso. A

melhor forma de obter tal isolamento de parâmetros é com uma simulação numérica, pois nela podemos facilmente fixar parâmetros garantindo que as células sejam idênticas exceto pelas suas motilidades, e, mais tarde, pelo mecanismo de reconhecimento.

Após a modelagem estatística da segregação celular, um novo mecanismo gerador de reorganização será definido, pois quando analisamos os resultados experimentais de Méhes [17], nenhuma das hipóteses testadas gera a mesma evolução da segregação. De acordo com nossos modelos estatísticos, o grau de coletividade das células se torna importante e surge então a hipótese da motilidade de grupo diferenciada (HMGD), onde as células se separam de acordo com o grau de coletividade entre os tecidos, um tecido onde as células acompanham o movimentos das vizinhas iguais mais fortemente, tende a formar agregados, criando a endoderme. Isto fica claro ao analisar a dependência da difusão com a massa dos agregados.

A HAD foi analisada por simulações com o modelo de Glazier, Graner e Hogeweg (GGH) [4] onde foi encontrada uma lei logarítmica para a evolução do tamanho da interface entre endoderme e ectoderme. Esta mesma hipótese foi simulada usando-se o modelo de animóides [15], encontrando-se tanto uma lei logarítmica quanto uma lei de potência, dependendo dos parâmetro utilizados. No presente trabalho, utilizamos o modelo de animóides para explorar a segregação celular dentro da hipótese HVD, explorando brevemente o modelo GGH para a HVD. Uma parte deste estudo já foi realizada durante o trabalho de mestrado [18].

Com o intuito de construir um modelo teórico simples, vamos considerar que o sistema não seja mais composto por dois tipos de células, mas por um tipo único de célula (a endoderme) e o meio, que substitui o segundo tipo (a ectoderme). Então abordaremos a segregação como um problema de fusão de agregados. Nossa primeira aproximação é considerar que todos os agregados possuem a mesma massa em cada instante de tempo. Essa ideia é baseada no trabalho de Kolb [19], que considera um sistema onde há fusão irreversível de agregados fractais que difundem no espaço. Kolb obtém leis de potência para a evolução da massa do agregado, mas esta lei de escala somente é válida se a massa do agregado for muito maior que a unidade e muito menor que a massa total dispersa inicialmente. Essa equação foi desenvolvida para tratar de agregados fractais que se fundem e depois de unidos não alteram sua estrutura interna. Pretendemos obter equações que descrevam o sistema para qualquer valor de massa do agregado. Alteramos as equações incluindo limite máximo de tamanho e, também, tamanho mínimo de agregado. Nessa parte do trabalho comparamos as soluções obtidas analiticamente com experimentos e com simulações do modelo de animóides.

Outra abordagem adotada é a equação de coagulação-fragmentação de Smoluchowski [5]. Esta também trata de sistemas compostos por apenas um tipo de partícula (endoderme) e o meio

que as cercam (ectoderme). Estas partículas podem se unir formando agregados de tamanhos variados a cada instante de tempo. Esta abordagem tem vantagens sobre a anterior pois permite flutuações na distribuição instantânea de tamanho dos agregados. A equação de Smoluchowski também permite maior liberdade de parâmetros, pois permite definir o núcleo (*kernel* na versão inglesa) de coagulação e o núcleo de fragmentação de acordo com as características do sistema. O problema é a complexidade desta equação que possui solução analítica em apenas alguns casos. Os demais incluindo o nosso, devem ser resolvidos numericamente.

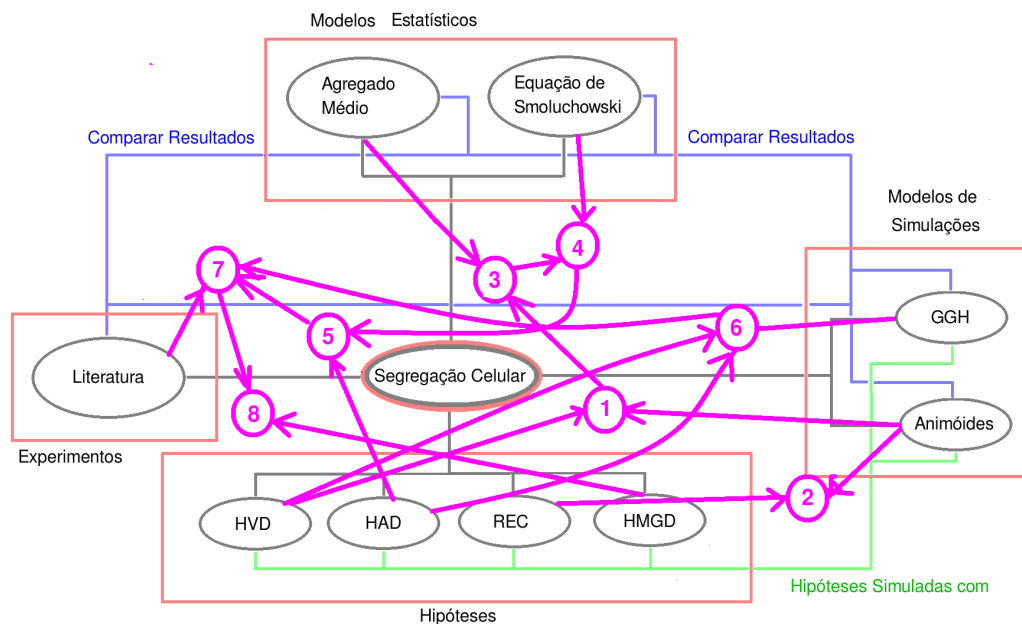


Figura 1.4: A evolução do estudo da segregação, mostrando como ao longo do tempo desviamos o enfoque da análise.

Na figura 1.4 mostramos o fluxo do estudo.

1. No início deste trabalho relacionamos a hipótese de velocidade diferenciada (HVD) com um modelo de simulação, o modelos de animóides pois a mesma relação já estava disponível na literatura com a hipótese da adesão diferenciada (HAD) [15]. O objetivo era testar a viabilidade da HVD, sua robustez, e, também comparar a forma funcional da segregação entre as hipóteses.
2. Depois de obtidos os resultados da HVD, procuramos explorar a hipótese de que as células possam se reconhecer. Elas aderem mais as vizinhas iguais do que as diferentes e possuem motilidades diferentes. Note que este não é o caso da adesão diferenciada pois nela a endoderme precisava ser mais adesiva do que a ecto, chamamos este de mecanismo de reconhecimento (REC).

3. Partimos, então, para a análise estatística dos dados de segregação celular, na HVD, considerando que as células de endoderme se agregam e a ectoderme perde importância servindo apenas como o meio de movimento. A nossa principal aproximação é considerar que apenas um tamanho de agregado domina a dinâmica. Comparamos os resultados com a HVD.
4. Com os resultados já obtidos no modelo de agregado médio, decidimos estender a análise para agregados de tamanhos diversos, para isto utilizamos a equação de Smoluchowski, que relaciona a probabilidade de dois agregados se fundirem e também de se fragmentarem. Nós definimos estes núcleos com as probabilidades, para a segregação celular e comparamos os resultados com o modelo de agregado médio e com a HVD.
5. Fizemos simulações com a hipótese da adesão diferenciada (HAD) para comparar os resultados com a HVD e os dois modelos estatísticos. Executamos as simulações para obter os dados da segregação em termos do número de partículas médio do agregado.
6. Com o mecanismo de reconhecimento celular e diferentes proporções de tecidos obtemos alguns padrões finais de segregação com o modelo de animóides, neste momento vamos procurar os mesmos padrões no modelo de Glazier Graner e Hogeweg (GGH). Anteriormente varremos o espaço de parâmetros buscando quais valores geram cada padrão final. Entretanto, com este modelo vamos nos restringir apenas à geração do padrão, sem verificar sua robustez. Neste momento foram publicados na literatura resultados experimentais comparáveis com nossas simulações e modelos, então, mudamos novamente o enfoque deste trabalho.
7. Com os dados experimentais disponíveis fizemos a comparação com os resultados anteriores, com HVD, HAD, com os modelos estatísticos do agregado médio e da equação de Smoluchowski.
8. Os resultados das comparações do item anterior sugerem uma nova hipótese de segregação celular, que é muito mais rápida do que a segregação gerada pelas outras hipóteses, a Hipótese de Motilidade de Grupo diferenciada HMGD, onde as células reconhecem as vizinhas como iguais ou diferentes e as células da endoderme tendem a seguir as vizinhas muito mais fortemente do que as outras.

1.1 Organização dos Conteúdos

No capítulo 2 faremos uma revisão dos experimentos e modelos de segregação celular, em especial o trabalho de Jones com a HVD, além disso revisamos na literatura os modelos de crescimento de agregados com ênfase nos trabalhos de Kolb e Smoluchowski.

No capítulo 3 descrevemos o modelo GGH, posteriormente detalhamos o modelo de animóides e as aproximações utilizadas para adaptá-lo para o problema de segregação celular. Além disso especificamos as medidas a serem tomadas nas simulações bem como os métodos numéricos. No capítulo 4 vamos apresentar os resultados obtidos com simulações nos modelos GGH e de Animóides para vários casos, além dos resultados com a HVD acrescida do mecanismo de reconhecimento proposto por Jones.

No capítulo 5 apresentamos o modelo de agregado médio, com os casos sistema infinito e as limitações de tamanho propostas, no capítulo 6 apresentamos as soluções analíticas referentes aos casos apresentador no capítulo anterior, falamos brevemente da comparação de valores de expoentes característicos encontrados no modelo e nas simulações de segregação celular.

No capítulo 7 apresentamos um outro modelo teórico para a segregação celular a equação de Smoluchowski, temos algumas variantes desta equação onde consideramos diferentes tipos de fragmentação de grupos de células. No capítulo 8 apresentamos os resultados referentes a este modelo, novamente comparamos brevemente os valores de expoentes obtidos neste modelo com os obtidos no modelo de agregado médio e nas simulações.

No capítulo 9 comparamos os resultados obtidos no modelo de agregado médio, com a equação de Smoluchowski, com as nossas simulações, com as simulações em HAD e, o mais importante, com experimentos de segregação celular em células de Méhes.

2 Histórico Experimental e Referencial Teórico

2.1 Primórdios do Problema Biológico

Desde o início da humanidade tenta-se obter métodos eficientes para curar diversos ferimentos. Para desenvolver tais métodos, é preciso compreender como ocorre a regeneração de tecidos. O estudo de segregação celular tem seu início em 1740, quando Trembley [20] cortou uma hidra ao meio e observou que algumas horas depois havia duas hidras regeneradas a partir dos pedaços da original. Apesar de ser uma experiência de regeneração sem segregação celular, esta foi a precursora na obtenção da segregação propriamente dita. O próximo passo importante foi dado em 1886 quando Shiefferdecker [9] conseguiu separar dois tecidos celulares vivos, colocando-os em um extrato pancreático. Finalmente, em 1907, Wilson [13] fez uma das primeiras experiências de segregação: misturou células de diferentes tecidos de uma esponja que após algum tempo regenerou-se completamente. Contudo, como ambos tecidos tinham mesma coloração não era possível diferenciar as células de cada um dos tecidos nem, por consequência, determinar que mecanismo era responsável pela reorganização celular.

Do experimento de Wilson surgiram duas principais hipóteses para explicar a segregação celular:

- **Transformação Citológica:** as células recebem informação do ambiente ou das células ao redor e se transformam no tipo de tecido que deveria estar no local considerado, como idealmente ocorre nas células tronco ao serem inseridas em um dado tecido.
- **Difusão:** as células trocam de posição dentro do agregado até atingir posições corretas, de forma a separar os dois tecidos. Mas não está definido como as células são capazes de determinar se estão ou não em uma posição correta.

Essa questão foi resolvida por Holtfreter [14], em 1944, que repetiu o experimento de Wilson, mas desta vez em células de anfíbios. Estas células são pigmentadas de forma diferente

dependendo do tecido ao qual pertencem. Ele pode observar o movimento das células dos diferentes tecidos e mostrou que existe difusão na segregação celular. Este experimento resolveu o problema em parte, pois mostra que o mecanismo não é uma transformação citológica, mas não explica qual mecanismo, físico ou químico, na difusão celular poderia separar dois ou mais tecidos distintos.

2.2 Hipóteses

O experimento de Holtfreter comprovou que a difusão é o agente separador de tecidos, mas não explicou qual ou quais mecanismos são responsáveis pela organização dos tecidos. Surgiram então hipóteses para explicar este problema, sendo as principais:

- Quimiotaxia [21]: Sugerida por Turing em 1952, essa hipótese defende que as células dos diferentes tecidos se reorganizam de acordo com sinais químicos emitidos do ambiente em torno das células, ou por elas próprias;
- Adesão Diferenciada [1] (HAD): Proposta por Steinberg em 1962, segundo ela os diferentes tecidos possuem graus diferentes de adesão entre si devido a alguma substância em suas membranas, as células mais adesivas formam um agregado central, com as células do tecido menos adesivo em torno [15, 4];
- Adesão Temporal [22]: proposta por Curtis em 1961, esta teoria defende que os padrões de reorganização se devem aos diferentes tempos que as células de tecidos diferentes levam para se aderirem. As células que se aderem mais rapidamente formam um agregado central enquanto as que levam mais tempo ficam na superfície desta.
- Contração Superficial [23]: sugerida por Harris, essa teoria afirma que quanto menos contrativa é uma célula em relação à sua superfície exposta, mais internamente ela deve se posicionar dentro do agregado;
- Velocidade Diferenciada [2] (HVD): esta hipótese foi proposta para explicar o experimento de Jones, Evans e Lee, publicada em 1989, onde atribuiu à reorganização celular à diferença das velocidades de difusão das células dos diferentes tecidos.
- Custo de Coexistência[24]: nesta hipótese as células que secretam um exopolissacarídeo (EPS), células cooperativas, se separam das células que não o produzem, não cooperativas. Este EPS trás benefícios ao grupo porém tem custo associado a produção. Esta hipótese foi utilizada para descrever a segregação celular em biofilmes bacterianos. Nota,

esta hipótese se difere das demais pois ela considera um sistema com células se reproduzindo.

Como veremos no capítulo 8 a segregação celular pode ser rápida demais para ser explicada pela HVD ou pela HAD, indicando a importância da capacidade das células de se reconhecerem como iguais e se movimentarem coletivamente. Este grau de alinhamento preferencial pode ser um mecanismo responsável pela segregação celular. A nova hipótese considera que se as células forem idênticas, exceto pela tendência a seguir as vizinhas, elas irão segregar. Chamamos esta de hipótese da motilidade de grupo diferenciada (HMGD) e ela possibilita uma segregação rápida.

É importante ressaltar que todas essas hipóteses não se excluem mutuamente, então, mesmo comprovando que algum destes mecanismos tem participação no processo de separação de tecidos, não podemos descartar os demais. Temos de considerar que todos os mecanismos propostos também podem estar presentes em diferentes seres vivos, pois em espécies de animais diferentes, as células podem ter características muito distintas, levando à segregação celular por outros processos físicos. O mais provável é que as hipóteses, acima descritas, tenham cada uma sua participação na segregação celular, com proporções diferentes, dependendo também dos tecidos envolvidos na segregação.

2.3 Velocidade Diferenciada

A velocidade diferenciada foi analisada experimentalmente em 1989 por Jones e colaboradores, estes trabalharam com células de embrião de frango, mediram as velocidades de difusão de três tipos de células (fígado, músculo e retina neural) e obtiveram velocidades diferentes para cada tipo de tecido. As motilidades tem a seguinte hierarquia: músculo > fígado > retina. O resultado obtido é a disposição final destes tecidos quando dispostos dois a dois (ver figs. 2.1, 2.2, 2.3) [2] formando um agregado celular, onde em cada caso o tecido mais difusivo ocupou o centro do agregado com o tecido com menor motilidade ao redor. Para explicar este padrão final pouco intuitivo, Jones et al. atribuíram um segundo mecanismo: de acordo com o qual, as células podem de alguma forma se reconhecer, ou seja, tem informação da vizinhança sabendo se as demais células ao redor são iguais a ela ou não, e com essa informação a célula regula suas funções internas para se aderir mais ou menos.

A discussão sobre qual das hipóteses explica a segregação celular continua em aberto e a velocidade diferenciada é citada como uma possibilidade. Em artigo de 1996, Steinberg [16] menciona a velocidade diferenciada como uma das explicações possíveis para a separação de

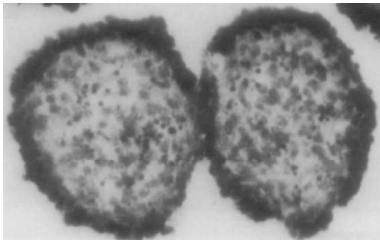


Figura 2.1: Agregado heterotípico de células de músculo e retina de frango obtido por Jones et al., as células de retina foram marcadas e aparecem escuras. Retirada do artigo [2].

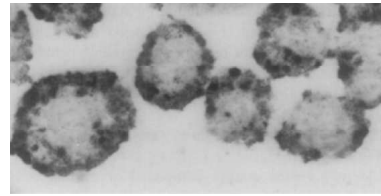


Figura 2.2: Agregado heterotípico de células de retina e fígado de frango obtido por Jones et al., as células de fígado foram marcadas e aparecem escuras. Retirada do artigo [2].

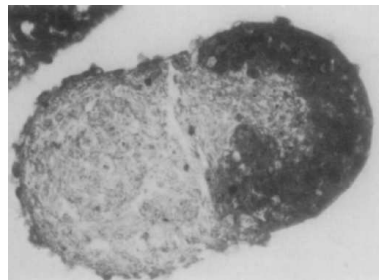


Figura 2.3: Agregado heterotípico de células de músculo e fígado de frango obtido por Jones et al., as células de fígado foram marcadas e aparecem escuras. Retirada do artigo [2].

tecidos. O surpreendente é que cita o experimento de Jones et al. de forma invertida: para Steinberg as células mais lentas ocupariam o centro da mistura e as mais rápidas o contorno.

Temos então uma situação bastante interessante, pois a mesma hipótese foi usada para obter estados finais diferentes. Certamente a situação é contraditória e, provavelmente, elementos chave estão sendo ignorados em algum dos casos.

A hipótese da velocidade diferenciada atribui a reorganização celular, ou seja, o padrão final para os tecidos posicionados interna ou externamente no agregado, somente a diferenças nas velocidade de difusão celular. Dessa forma cada tecido é caracterizado por conter células com uma dada motilidade, estas, ao se moverem dentro do agregado, trocam diversas vezes de posição umas com as outras e, com o passar do tempo, um dos tecidos se posiciona dentro do agregado e o outro na sua superfície. Na sua versão original essa hipótese não indica qual destes tecidos será o interno. Nesse trabalho fazemos simulações para encontrar as condições necessárias para gerar os possíveis padrões finais para a segregação gerada pela velocidade diferenciada.

Esperamos na simulação de velocidade diferenciada obter a hierarquia da organização de tecidos: se um primeiro tecido envolve um segundo, e este envolve um terceiro, então, o primeiro

envolverá o terceiro (veja fig. 2.4). Esse tipo de estruturação foi observado nos experimentos de Jones. Finalmente, mesmo que a distribuição espacial inicial de células seja não circular, esperamos que a forma final seja aproximadamente circular, minimizando a tensão superficial.

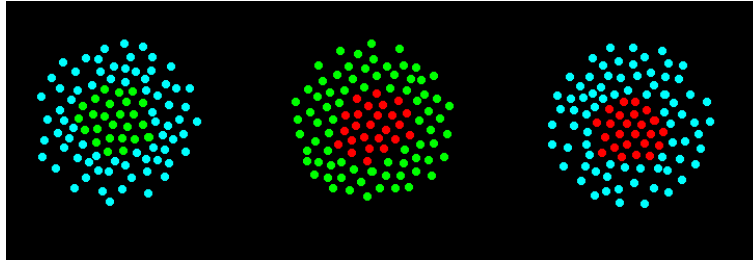


Figura 2.4: Representação da previsão da hierarquia de tecidos. Se um tecido a envolve o tecido b e este, por sua vez, envolve o tecido c, então, o tecido a deverá envolver o tecido c.

2.4 Fusão de Agregados Celulares

A evolução da segregação celular foi estudada através de simulações, com os modelos de Glazier, Graner e Hogeweg (GGH), de animóides [4, 15] e experimentos [17]. Nesses estudos podemos obter duas formas funcionais para o parâmetro que mede a segregação, uma lei de potência ou uma curva logarítmica. No caso de leis de potência espera-se que os expoentes sejam semelhantes, independente da hipótese de segregação. Ainda não se tem claro a origem física deste valor do expoente, entretanto sabemos que ele é o mesmo, pelo menos, em simulações de duas hipóteses diferentes para a segregação celular. Então qualquer que seja a causa deste expoente, este deve ser mais ampla do que alguma característica abordada nas duas hipóteses previamente analisadas, ou as duas são equivalentes. Finalmente para estudar as células do ponto de vista físico, precisamos de abordagens adaptáveis às propriedades celulares, uma possibilidade seria usar a física de evolução de misturas binárias, mas como veremos abaixo este não é um modelo adequado.

Primeiro analisamos como o estudo físico de crescimento de grãos (*domain growth* ou *coarsening* em inglês) pode ser adaptado à realidade de células. Esta técnica é bastante utilizada para descrever sistemas binários de origens muito variadas, desde redes de *spins*, modelo de Ising, até misturas como água e óleo [25]. Usualmente são classificados em dois tipos: sistemas que conservam o parâmetro de ordem e sistemas que não o conservam. No primeiro caso, as duas entidades presentes no sistema tem suas quantidades conservadas, pois não podem se transformar uma na outra, como, por exemplo, a mistura de água com óleo. Na segunda, as duas entidades podem se transformar uma na outra, não havendo conservação da quantidade de cada

uma delas. Um exemplo, é uma rede de *spins*, pois os spins podem trocar de valor de acordo com a vizinhança. Porém, no caso de mapear ligas binárias ao modelo de Ising deve se tomar a versão conservativa do modelo, o que vai levar ao crescimento mais lento do parâmetro de ordem [26, 27].

Nos experimentos típicos de segregação celular não há transformação citológica das células, ou seja, as células não podem mudar de tecido, por exemplo, uma célula de endoderme continua sendo endoderme, então, esperaríamos expoentes mais próximos do caso onde o parâmetro de ordem é conservado, porém o mecanismo responsável pelo crescimento dos grãos é a diferença nas tensões superficiais dos grupos que fazem uma partícula conseguir se libertar de um grupo e, então, difundir isoladamente, até atingir outro [25], o que não ocorre na segregação celular. Nesta, temos grupos de células de endoderme que se movimentam e, então, se fundem formando grupos maiores.

Um experimento de segregação celular [17, 2] é caracterizado pela existência de dois tecidos diferentes, com suas células inicialmente misturadas ao acaso e que, no estado final, um deles envolve completamente o outro. Isso significa que os tecidos devem possuir características que permitam a formação de grupos de um dos tecidos dentro do outro. Assim descrita, a segregação pode estar de acordo com uma ou mais das hipóteses vistas anteriormente, por exemplo um dos tecido pode ser mais móvel (HVD) ou ser menos aderente (HAD). As células do tecido interno (endoderme) precisam difundir dentro do agregado formando grupos, esses grupos por sua vez se difundem formando grupos maiores, até que exista apenas um único grupo, de células de endoderme, cercado por células de ectoderme. Podemos, então, analisar o movimento destes grupos, desprezando os efeitos das células de ectoderme, considerando que elas formam o meio onde os grupos de endoderme se difundem. Isto significa que nos focaremos na descrição da dinâmica das células de endoderme, ou seja, abordaremos a segregação celular do ponto de vista somente dessas células.

Passamos, então, a ver a segregação celular como se fosse composto por um único tipo de partícula difusiva, as células de endoderme e o meio que as cercam, a ectoderme. É como se as células da ectoderme apenas alterassem a constante de difusão dos grupos de células de endoderme. Com esta aproximação se torna mais intuitivo abordar o sistema pelas equações de agregação que usaremos a seguir.

O crescimento de agregados pode por acreção de partículas ou por fusão de agregados. No crescimento por acreção, partículas são dispersas uma a uma no meio, se movimentam como caminhantes aleatórios e eventualmente se unem ao agregado, permanecendo fixas na posição em que entraram em contato com ele, ou seja, não há evolução da estrutura interna do agregado.

É interessante notar que este tipo de dinâmica gera agregados com interface fractal [28]. Em trabalhos com fusão de agregados [29, 30, 31], o sistema é originalmente composto por partículas isoladas que se difundem, ao entrarem em contato se unem permanentemente e continuam a difundir e se agregar formando agregados cada vez maiores. Isto é muito semelhante à dinâmica da segregação celular, porém os agregados devem poder evoluir internamente, ou seja, depois de agregar um outro grupo de partículas o agregado deve arredondar, isto é parcialmente abordado no trabalho de Julien e colaboradores [31], mas a evolução interna é limitada.

Com a fusão de agregados são obtidas leis de potência para o tamanho dos agregados em função do tempo. Podemos comparar os expoentes obtidos com os de segregação celular. Mas, como foi afirmado anteriormente, estes expoentes são obtidos para agregados sem evolução interna, então podem-se atribuir eventuais erro a essa diferença. Como mostraremos adiante, propusemos equações para descrever este tipo de dinâmica de crescimento de agregados a partir de hipóteses simples baseadas nas observações descritas acima.

A equação de Smoluchowski, que fora citada nas referências anteriores sobre agregação [29, 30, 31], descreve a evolução das densidades de grupos de partículas que se fundem ou fragmentam. Essencialmente ela parte do princípio que a probabilidade de um agregado de tamanho N se formar é diretamente proporcional ao produto das densidades dos agregados cuja soma de partículas resultará em N . Lógica semelhante é aplicada para a fragmentação. A proporcionalidade é transformada em igualdade quando se leva em conta características físicas tais como a difusão e a seção de choque dos agregados. Estas são descritas através de dois núcleos, o primeiro associado à fusão (coagulação) de agregados e o segundo associado à fragmentação em dois agregados menores [32, 5]. Esta equação tem solução analítica para alguns casos simples, envolvendo apenas o núcleo de coagulação, os demais precisam ser calculados numericamente. Esta equação é genérica podendo ser aplicada a diversos problemas físicos, químicos e biológicos onde o mecanismo responsável pela evolução seja fusão/fragmentação de agregados. No nosso problema a divisão celular é desprezível, então procuramos núcleos que conservem massa.

No próximo capítulo vamos descrever o primeiro modelo matemático utilizado para a análise da dinâmica celular, suas características principais, algumas aplicações e suas vantagens e desvantagens na simulação da velocidade diferenciada, no capítulo seguinte mostramos os resultados obtidos com este modelo. Depois vamos abordar o segundo modelo matemático que foi menos explorado neste trabalho por ser de difícil adaptação à hipótese estudada, mas possui células que não são apenas pontos. A seguir chegamos na parte do estudo da fusão de agregados, e às adaptações necessárias aos modelos originais para representar adequadamente

o comportamento celular.

3 *O Modelo de Animóides*

Ao analisar um problema biológico do ponto de vista da física teórica. Portanto, é necessário utilizar modelos matemáticos simplificados mas que contenham as principais características das células e como em todo modelo, tratamos de aproximações. Para isto precisamos de um modelo que contemple todas as características para descrever as células adequadamente. Existem diversas abordagens para simular agregados celulares, derivadas de dois modelos: o de Glazier, Graner, Hogeweg (GGH) [4] e o de animóides. Utilizamos ambas modelagens, cada uma com seus pontos fortes e fracos para analisar a segregação celular. A mais explorada é o modelo de animóides pois este permite a implementação direta da hipótese da velocidade diferenciada, mas também trabalhamos com o modelo GGH para confirmar os resultados obtidos, em um sistema onde as células tenham estrutura.

O modelo de animóides foi concebido em 1987 com intuito de representar no cinema o movimento de bandos de animais, por exemplo morcegos, pássaros e peixes. No trabalho original de Reynolds [33], cada elemento (animóide) se movimenta seguindo três regras (ver figura 3.1):

1. manter uma certa separação dos vizinhos para evitar colisões;
2. alinhar-se de acordo com o movimento dos vizinhos;
3. aproximar-se dos demais caso se afaste muito do bando.

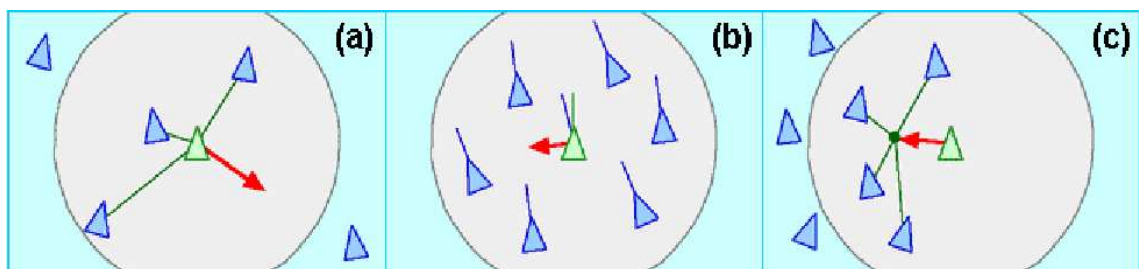


Figura 3.1: Regras de movimentação de animóides [15]. (a) Separação dos animoides; (b) alinhamento com vizinhos; (c) coesão com o bando;

Formalizando matematicamente essas regras de movimento, incluindo ruído e adaptando-as para dinâmica de células obteremos um modelo que permite introduzir facilmente a diferença de velocidades entre elas. Da mesma forma, como veremos, é simples implementar movimento coordenado, pois ele é a base do modelo de Vicsek, que basicamente consiste numa formulação matemática do modelo de Reynolds.

3.1 O Modelo de Vicsek

Somente em 1995, 8 anos após o trabalho de Reynolds, o grupo liderado por T. Vicsek [3] fez um estudo sistemático desse modelo. O objetivo era compreender com mais detalhes as condições necessárias para o surgimento do movimento coletivo sem líderes e na ausência de forças externas como ocorre, por exemplo, em bandos de pássaros e cardumes.

A essência da formulação de Vicsek é de que a direção da velocidade dos animóides depende das interações com seus vizinhos e o seu módulo permanece constante. Assim, em duas dimensões, a posição do i -ésimo animóide no tempo $t + \Delta t$ é dada por:

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \vec{v}_i(t)\Delta t \quad (3.1)$$

com a direção, θ_i , da velocidade $\vec{v}_i(t + \Delta t)$ do i -ésimo animóide, definida por:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j \sim \langle i \rangle} \vec{v}_j(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right], \quad (3.2)$$

onde $\arg(\vec{v})$ indica que está sendo tomado o ângulo associado ao vetor (\vec{v}); α determina a contribuição à direção de movimento devida aos animóides vizinhos; η determina o peso do ruído, representado por $\vec{u}_i(t)$, um vetor aleatório de módulo unitário e $\Delta t = 1$. São considerados vizinhos os animóides que estiverem dentro de um raio r_0 finito, ver fig.3.2. Nota, não estamos usando a mesma notação utilizada por Vicsek em seu artigo original para manter a coerência com a notação adotada neste trabalho.

Assim, a cada passo de tempo, o módulo da posição sempre varia de uma quantidade fixa e o animóide move-se em uma direção definida pela configuração dos vizinhos. Usualmente o sistema é simulado com dimensões fixas, $L \times L$ e com condições de contorno periódicas.

Para analisar a transição entre as fases não movente e movente foi definido o parâmetro de ordem:

$$\phi = \left\langle \frac{1}{Nv_0} \left| \sum_j \vec{v}_j \right| \right\rangle, \quad (3.3)$$

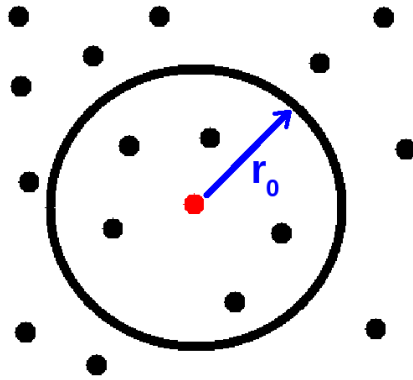


Figura 3.2: Representação da vizinhança de um animóide, onde o círculo de raio r_0 limita a área de vizinhança do animóide marcado em vermelho.

sendo N o número de animóides e v_0 o módulo da velocidade de cada um. Com essa definição φ pode assumir valores no intervalo $[0, 1]$ e os casos limites possuem o seguinte significado:

- $\varphi = 1 \rightarrow$ todos animóides estão se movendo na mesma direção, o movimento é totalmente ordenado;
- $\varphi = 0 \rightarrow$ todos animóides se movem aleatoriamente, o movimento é totalmente desordenado.

Um resultado importante do trabalho de Vicsek et al.[3] é uma transição ordem-desordem no sistema, ver fig. 3.3. Essa transição pode ser induzida tanto pela variação da densidade de animóides, quanto pela variação relativa dos pesos α e η . É importante salientar que esse é um sistema fora do equilíbrio, pois as partículas interagem, mas se movem com energia cinética constante. Trata-se, portanto, de uma transição de fase fora do equilíbrio. Em seu trabalho original Vicsek sugere que a transição é de segunda ordem, mas a literatura a respeito permanece controversa [34, 35, 36, 37].

No que se refere aos objetivos de nosso trabalho, esse modelo permite que se especifique a velocidade de cada tipo de partícula. Porém, a modelagem de uma célula não está completa e precisamos ainda atribuir volume às células e definir como interagem entre si. Na próxima seção veremos como fazê-lo.

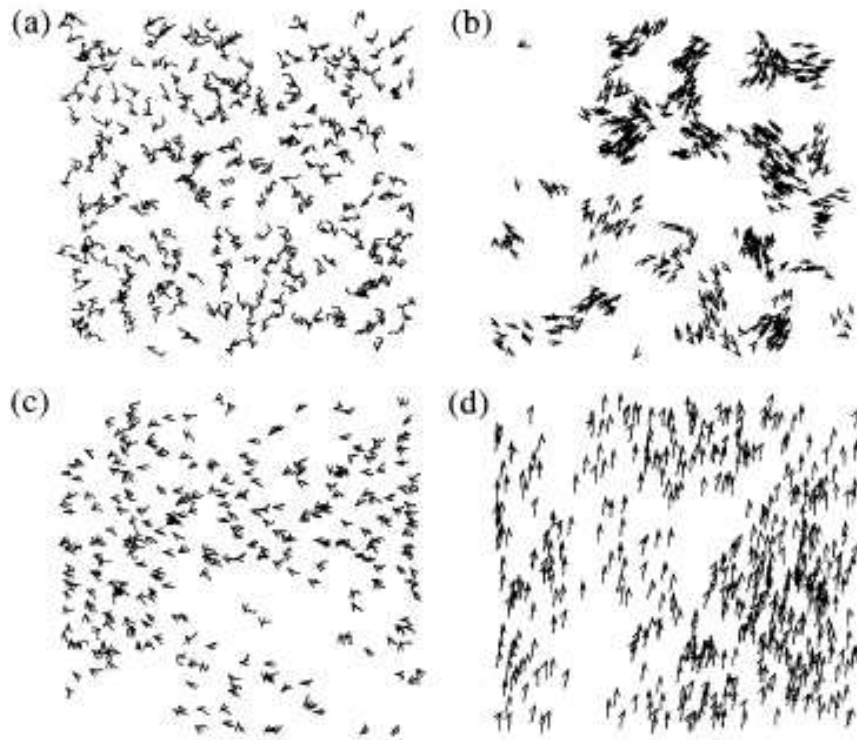


Figura 3.3: Evolução de animóides sob a dinâmica do modelo de Vicsek. Uma sequência de 20 passos de cada animóide é mostrada para diferentes parâmetros. Em todos os casos, $N=300$. a) $t = 0$, $L = 7$, $\eta = 2.0$; b) para densidade e ruído pequenos temos a formação de grupos, $L = 25$ e $\eta = 0.1$; c) depois de algum tempo o sistema apresenta alguma correlação, $L = 7$, $\eta = 2.0$; d) para densidades maiores e ruído pequeno o movimento é ordenado, $L = 5$ e $\eta = 0.1$. Imagem retirada do artigo [3].

3.2 A adaptação de Grégoire

Com o intuito de modelar grupos de animais, Grégoire [38] incluiu um termo de força entre eles, atribuindo-lhes características não contempladas pelo modelo original de Vicsek. Deve-se mencionar, no entanto, que há uma publicação posterior de Vicsek abordando sistemas celulares [39]. A força proposta por Grégoire possui quatro partes distintas, dependendo da distância entre os centros dos animóides interagentes (logo a seguir a detalharemos). Por ser diretamente derivado do modelo de Vicsek, a velocidade de cada animóide continua possuindo módulo fixo, variando somente sua direção de movimento que será dada pela soma vetorial de três termos: os dois termos originais de Vicsek (tendência a seguir vizinhos e ruído) e um novo termo associado à força de interação entre animóides. Assim, a expressão para a direção da velocidade do i -ésimo animóide fica:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\sum_{j \sim \langle i \rangle} \alpha_{i,j} \vec{v}_j(t) + \sum_j \beta_{i,j} \vec{f}_{ij}(t) + N_i \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.4)$$

onde,

- $\alpha_{i,j}$ é o parâmetro de movimento coordenado;
- \vec{v}_j é a velocidade dos vizinhos da i -ésima célula;
- $\beta_{i,j}$ regula a intensidade da força de contato entre as células i e j ;
- \vec{f}_{ij} é a força de contato entre as células i e j ;
- \vec{u}_i é o vetor unitário aleatório, responsável pelo ruído;
- η determina a contribuição relativa do ruído;
- N_i é o número de vizinhos da i -ésima célula;

Células vizinhas são todas as células dentro do raio de alcance da força (ver fig. 3.4). A força \vec{f}_{ij} é composta por quatro termos: para distâncias menores que um raio r_c é infinita (de repulsão), caracterizando o volume do animóide; para distâncias em torno de r_{eq} é do tipo linear restauradora (o animóide tende a permanecer numa posição de equilíbrio); para distâncias entre r_{har} e r_{alc} é atrativa e constante (o animóide procura não se distanciar do bando); para distâncias maiores que r_{alc} é nula, o animóide se perdeu do bando.

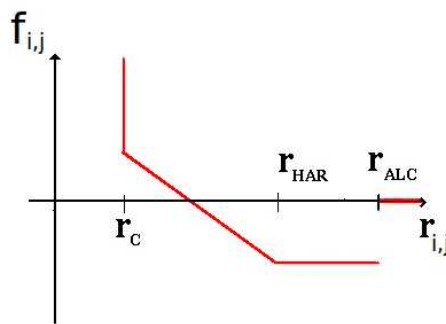


Figura 3.4: Dependência da força com a distância entre as partículas na adaptação de Grégoire.

$$\vec{f}_{ij} = \vec{e}_{ij} \begin{cases} +\infty & ; r_{ij} \leq r_c \\ 1 - \frac{r_{ij}}{r_{eq}} & ; r_c < r_{ij} < r_{har} \\ 1 - \frac{r_{har}}{r_{eq}} & ; r_{har} \leq r_{ij} < r_{alc} \\ 0 & ; r_{ij} \geq r_{alc} \end{cases}$$

onde

- \vec{e}_{ij} é o vetor unitário na direção da partícula i para j ;
- r_{ij} é a distância entre as células i e j ;
- r_{eq} é a distância de equilíbrio entre duas células;
- r_{alc} é a distância de alcance da força;
- r_c é o raio do volume mínimo da célula, o cerne;
- r_{har} é a distância máxima onde a força ainda está no regime harmônico;

Esta força foi modelada para animais em bandos. No caso de células precisamos modificá-la sutilmente, entre outras alterações, temos partículas com volume. Com esta inclusão, as partículas deixam de ser pontuais e, como ocorre no gás de Van der Waals [40], esperam-se transições para fases condensadas líquida e sólida a baixas temperaturas, ou seja, a baixos níveis de ruído. Além disso, como mostrado no diagrama 3.5, a fase móvel presente no modelo de Vicsek continua existindo, ou seja, agora teremos uma versão móvel correspondendo às fases gasosa, líquida e sólida.

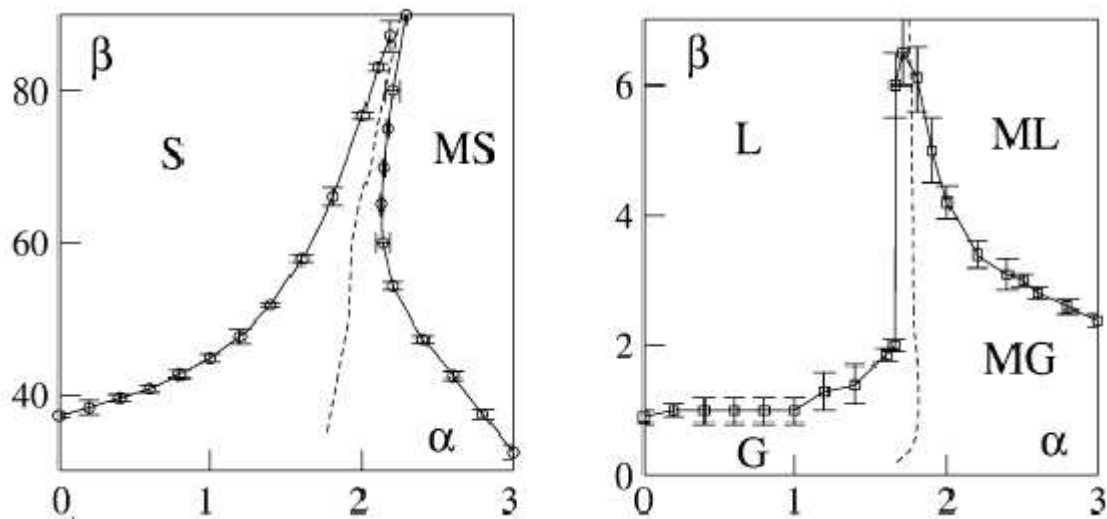


Figura 3.5: Diagrama de fases para densidade, ρ , não nula e tamanho finito, dimensão igual a 180, $\eta = 1.0$, $\rho = 1/16$, $N = 2025$. Nas figuras vemos as três fases: sólida, líquida e gasosa, representadas respectivamente por: S, L e G, em qualquer das fases o sistema pode possuir movimento coletivo, nesse caso as fases moventes são representadas acrescentando M ao símbolo da fase original. Imagem retirada da ref. [38].

3.3 Animóides e Segregação Celular - Hipótese de Adesão Diferencial

Até este momento mostramos como foi o desenvolvimento e aprimoramento do modelo de animóides, que foi projetado para simular movimento de bandos de animais de forma organizada. A partir de agora retornamos ao problema original que é a segregação celular, então mostramos as adaptações feitas no modelo de Grégoire para simular o comportamento dinâmicos de células. Este modelo, juntamente com estas adaptações descritas, foi utilizado para modelar a hipótese da adesão diferencial (HAD) [1, 15].

Antes de apresentar as adaptações ao modelo apresentamos rapidamente a hipótese da adesão diferencial, no artigo original que propôs a HAD [1] foram descritos os padrões finais para a segregação celular e as condições para obtê-los em termos dos valores relativos das adesões entre pares de células partindo do equilíbrio termodinâmico e considerando o trabalho por área realizado para manter as células unidas. A notação do Steinberg trata de trabalho entre células dos tecidos a e b , o trabalho W_a entre duas células do tecido a que é mais aderente formando a endoderme, W_b entre duas células do tecido b que é menos aderente e pode formar a ectoderme e finalmente W_{ab} , que representa a interação entre células de tecidos diferentes. Podemos ver na fig. 3.6 as condições que levam a cada padrão final, neste trabalho vamos procurar os padrões de segregação possíveis para a HAD.

Ao trabalhar com a HAD temos quatro padrões finais possíveis, ver fig. 3.6: no primeiro o sistema não apresenta segregação, as células dos diferentes tecidos ficam misturadas (Caso 1); no segundo temos segregação completa (Caso 2), um tecido envolve o outro completamente; no terceiro caso (Caso 3) também ocorre segregação, mas sem envolvimento ou com envolvimento parcial.

Então, de acordo com esta hipótese, as células possuem adesão variada dependendo somente dos tecidos aos quais as células interagentes pertencem, o que no artigo do Steinberg era o trabalho W , agora será diretamente relacionado a adesão entre células. É necessário adequar dois aspectos do modelo anterior: o parâmetro $\beta_{i,j}$, que contempla a intensidade nas forças de adesão dos tecidos i e j ; a dependência da força com a distância, para se levar em consideração características celulares, já que o modelo anterior tratava de animais macroscópicos, tais como pássaros e peixes.

O parâmetro $\beta_{i,j}$ é alterado para estabelecer correspondência com as adesões distintas decorrentes da hipótese de adesão diferencial: i) $\beta_{1,1}$ entre duas células da endoderme; ii) $\beta_{2,2}$ entre duas células da ectoderme; iii) $\beta_{1,2}$ entre duas células de tecidos diferentes, define-se

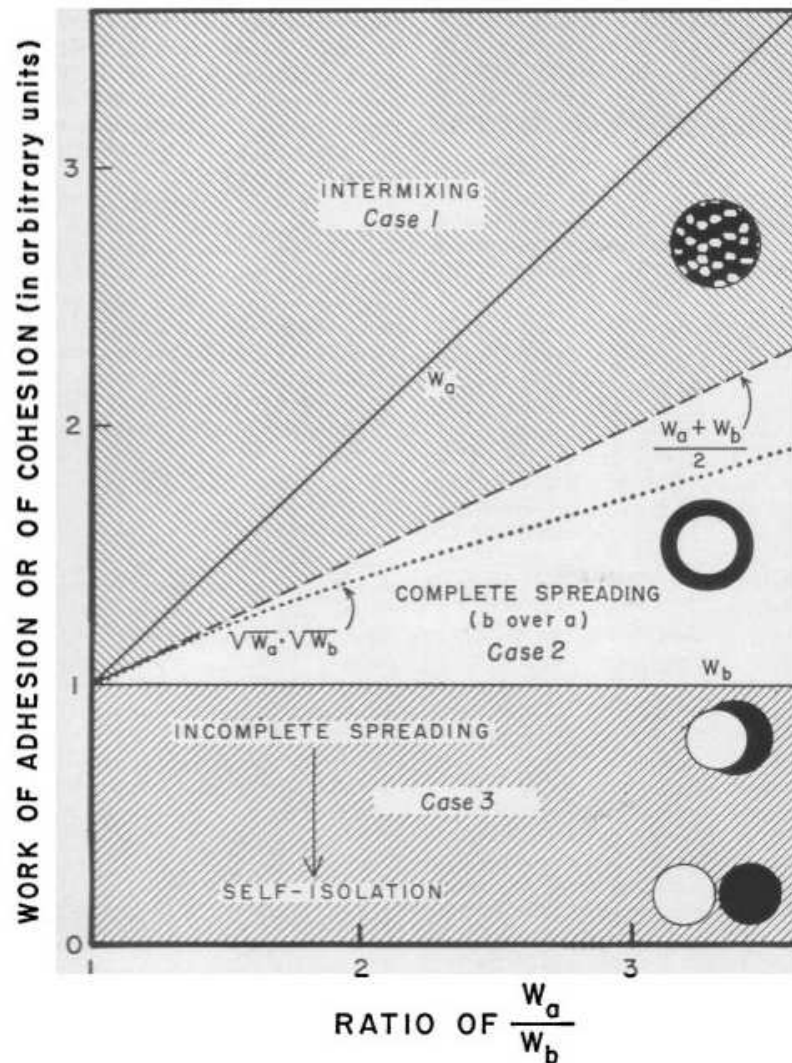


Figura 3.6: Temos $W_{ab} \times W_a / W_b$ se a adesão entre tecidos diferentes for muito pequena, os tecidos se separam completamente. Se for muito grande, os tecidos não segregam. Figura retirada do artigo [1].

$\beta_{2,1} = \beta_{1,2}$. Para a HAD temos uma hierarquia entre os níveis de adesividade: $\beta_{1,1} > \beta_{1,2} > \beta_{2,2}$. No caso de diferenças nas velocidades o parâmetro $\beta_{i,j}$ será o mesmo para todas as células, $\beta_{1,1} = \beta_{1,2} = \beta_{2,2}$. Para simular o mecanismo de reconhecimento celular, teremos dois níveis de adesão, ligações entre células iguais são mais fortes do que ligações entre células diferentes, $\beta_{1,1} = \beta_{2,2} \geq \beta_{1,2}$.

A dependência da força com a distância é alterada para representar forças de contato entre células e passa a ter três termos (ver fig.3.7): o primeiro representa um cerne impenetrável que tem alcance r_C , responsável pelo volume celular; o segundo é um termo harmônico, representando uma força linear em torno de um raio de equilíbrio r_{eq} e alcance r_{alc} ; o terceiro termo é de força nula, definida partir desse raio de alcance até o infinito. O regime de força constante

não nula não mais existe, os animais podem ver o bando a distâncias maiores porém as células perdem contato com as vizinhas mais facilmente pois elas mantêm contato através de ligações químicas, que são de curto alcance. Detalhamos a nova força abaixo:

$$f_{i,j} = \begin{cases} 0 & ; r_{nm} \geq r_{alc} \\ 1 - \frac{r_{nm}}{r_{eq}} & ; r_c < r_{nm} < r_{alc} \\ +\infty & ; r_{nm} \leq r_c \end{cases}$$

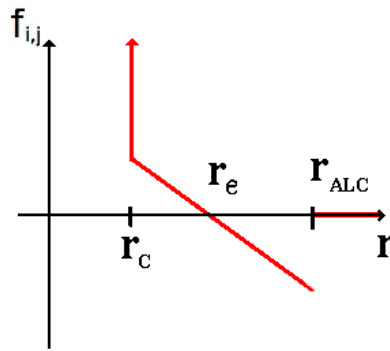


Figura 3.7: Dependência da força com a distância entre as partículas no modelo de Belmonte e colaboradores.

A última adaptação foi inserida na formulação de θ no termo de ruído, retirando a dependência deste com o número de vizinhos. Nos trabalhos com bandos de animais é fácil perceber os motivos da dependência do fator aleatório com o número de vizinhos, pois um indivíduo, ao estimar a posição dos demais, pode incorrer em erros que aumentam com o número de leituras a serem realizadas por passo de tempo. Mas para células, que estão em contato físico, não há sentido atribuir tal erro, pois este termo estocástico está ligado às flutuações de membrana da própria célula e não a erros de leitura. Dadas estas alterações, a direção de movimento assume a seguinte forma:

$$\theta_i^{t+1} = \arg \left[\sum_{j \sim i} \left(\alpha_{i,j} \frac{\vec{v}_j^t}{v_0} + \beta_{i,j} f_{i,j}^t \vec{e}_{i,j}^t \right) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.5)$$

3.3.1 Adaptação Utilizada neste Trabalho

A aplicação da versão do modelo de animóides ao caso de células deve levar em consideração as diferenças entre movimentos de animais em bandos e células dentro de um agregado, para isto fazemos algumas adaptações.

A hipótese da velocidade diferenciada (HVD) pressupõe diferentes velocidades para células de diferentes tecidos. Atribui-se a velocidade v_0 às células mais lentas e δv_0 às demais células. Dessa forma, δ é a razão entre as duas velocidades presentes no sistema. Mas é preciso ressaltar a diferença para a hipótese de adesão diferenciada (HAD). Na HAD as diferenças entre as células são modeladas através do parâmetro $\beta_{i,j}$, o que influencia somente a direção de movimento celular. Na HVD as diferenças estão presentes em ambas as equações de movimento, como vemos a seguir:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\sum_{j \langle viz \rangle} \alpha_{ij} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.6)$$

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \vec{v}_i(t) \Delta t \quad (3.7)$$

note que trabalhamos com o mesmo parâmetro β para todas as células envolvidas na interação. A HVD é simulada com o módulo de $\vec{v}_i(t)$ dependendo do tipo de tecido ao qual a i -ésima célula pertence. Adotamos como padrão $\Delta t = 1$ para todas as simulações.

Nesse ponto é importante ressaltar que todos os modelos explorados até aqui foram desenvolvidos apenas para sistemas com uma única velocidade de partícula. Ao estendermos a modelagem para sistemas com mais de uma velocidade surgem várias possibilidades de normalização no termo de alinhamento com a vizinhança. Nesse trabalho tratamos com três casos:

1. normalização pela velocidade mínima,

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j \langle viz \rangle} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.8)$$

com essa escolha haverá uma contribuição maior ao termo de movimento coletivo originada das vizinhas mais rápidas.

2. normalização dependente do tecido da própria célula,

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j \langle viz \rangle} \frac{\vec{v}_j(t)}{|\vec{v}_i|} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.9)$$

nesse caso as partículas mais rápidas teriam uma contribuição menor ao termo de movimento coletivo do que as mais lentas.

3. normalização pela velocidade da vizinha,

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j < viz >} \frac{\vec{v}_j(t)}{|\vec{v}_j|} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.10)$$

assim o termo de movimento coletivo é independente do tipo de células envolvidos.

Se interpretarmos o termo de movimento coletivo como associado à viscosidade do sistema, o primeiro caso atribuiria maior viscosidade às células mais rápidas, o segundo às células mais lentas e o terceiro iguala todas as células em viscosidade.

Em suma, modelamos células com as seguintes características: a) simetria radial; b) impenetráveis para distâncias entre centros menores que r_C ; c) interagem elasticamente para distâncias entre centros no intervalo $r_c < r < r_{alc}$; d) movem-se com velocidades idênticas em módulo; e) modificam a direção de movimento de acordo com a distância das vizinhas através da força \vec{f}_{ij} , modulado pelo parâmetro β ; f) também modificam a direção de movimento de acordo com as direções das velocidade das vizinhas, termo modulado pelo parâmetro de movimento coordenado α ; g) finalmente possuem um termo aleatório, o ruído \vec{u}_i controlado por η , que igualmente muda apenas a direção da velocidade.

As normalizações somente são diferentes quando tratamos de sistemas com movimento coordenado, serão idênticas se este parâmetro for nulo, $\alpha = 0$. Dessa forma analisaremos primeiramente o caso sem movimento coordenado, $\alpha = 0$, com o objetivo de encontrar valores dos demais parâmetros que gerem segregação celular. Ao encontrar tais valores, analisaremos as diferenças entre as normalizações discriminadas acima e o modelo sem movimento coordenado. Outro fator que devemos também considerar é que, por construção, pode ocorrer movimento em conjunto em uma determinada direção, neste caso o tecido se encontraria na fase movente.

3.3.2 Medidas da Segregação Celular

Precisamos medir o nível de organização dos tecidos ao longo do tempo, para isto existem diversas medidas alternativas. Por exemplo, à medida que as células de endoderme se aglutinam, crescem o número de células em cada grupo cresce, o número médio de células por agregado a área dos grupos de células enquanto que a superfície total da endoderme diminui.

Em trabalhos anteriores, vemos duas formas de medir a segregação celular:

1. O parâmetro de Segregação celular, γ , definido no trabalho de HAD [15], e também adotado em trabalho experimental [17].

2. O diâmetro médio dos agregados de endoderme, que é adotado também no trabalho de Vicsek [17]. Essa medida é proporcional ao raio médio dos agregados e trivialmente convertido na área ou volume do agregado, que é equivalente ao número de células do agregado considerando as células como iguais em massa e tamanho.

O Parâmetro de Segregação Celular

Para estudar a evolução temporal da segregação celular, Belmonte et al. definiram um parâmetro relacionado à ordem espacial das células. Nesta definição escolhem-se as células de um tipo de tecido, j , e calcula-se a média aritmética da fração de vizinhos de tipo diferente em torno de cada célula de j . Onde, as vizinhas são todas as células dentro do raio de alcance da força, r_{alc} . Define-se, então, a medida de segregação da seguinte forma:

$$\gamma_j = \left\langle \frac{n_{\neq}}{n_{=} + n_{\neq}} \right\rangle \quad (3.11)$$

onde,

- $\langle \rangle$ indica a média sobre as células tipo j ;
- j assume dois valores: 1 para endoderme, 2 para ectoderme;
- n_{\neq} é o número de vizinhos diferentes do animóide j ;
- $n_{=}$ é o número de vizinhos iguais ao animóide j ;

Com essa definição, γ_j assume valores no intervalo $[0,1]$ e o significado dos casos limites é:

- $\gamma_j = 1$: todas as células estão espalhadas sem contato com nenhuma igual;
- $\gamma_j = 0$: cada célula está cercada por células do mesmo tecido;

A informação obtida ao se medir γ_1 é semelhante à obtida ao se medir γ_2 , de forma que, na prática apenas uma delas é utilizada. Por outro lado, para haver a possibilidade de envolvimento dos tecidos é necessário haver uma fração maior de células de ectoderme do que de endoderme. No caso de haver segregação, essa diferença produzirá uma maior variação em γ_1 do que em γ_2 , razão pela qual se adota a medida de γ_1 .

As simulações são feitas distribuindo-se aleatoriamente N células em uma região circular de área $N\pi r_c^2$ em uma proporção de 1 : 3 de células endo/ecto. Esta distribuição inicial fixa o valor inicial de γ_1 em 0.75. Os gráficos ilustram o resultado obtido para a evolução temporal para

alguns valores do parâmetro de movimento coordenado, α , vemos que o aumento deste facilita a separação dos tecidos, ver fig.3.8. Podemos notar que a evolução temporal da segregação é uma lei de potência, cujo expoente, denominado λ , possui valores $\lambda \sim -0.2$.

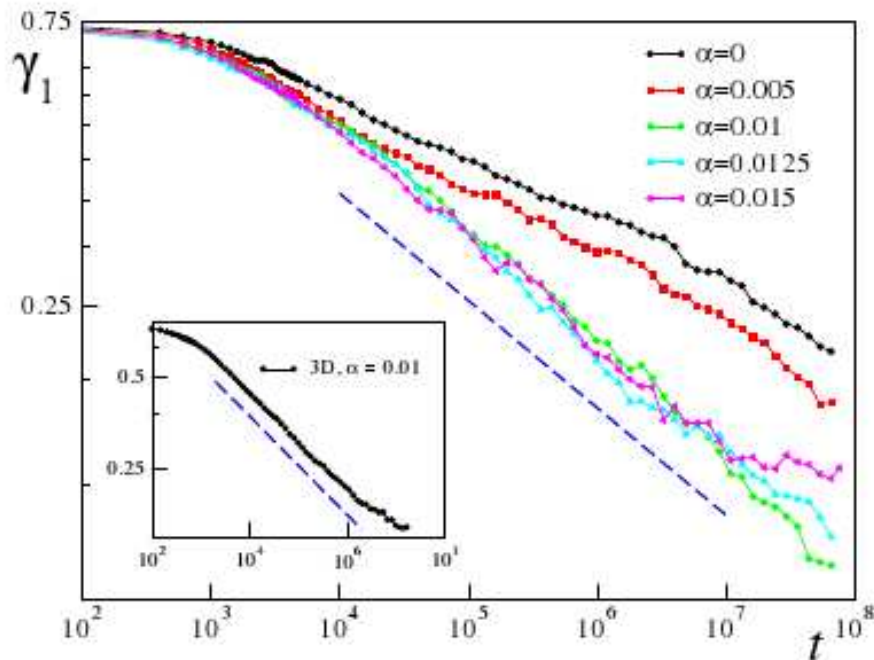


Figura 3.8: Evolução do parâmetro de ordem associado à segregação celular para um sistema bidimensional, $N = 6400$, com proporção 3:1 células de ecto/endo. A linha pontilhada é o ajuste, com $\lambda = -0.18$. Imagem retirada do artigo [15].

A influência do número total de células sobre a segregação celular também foi analisada, ver fig. 3.9. Vemos que o tempo, t^* , de reorganização total dos tecidos depende do número de células, podendo ser ajustada por uma lei de potência, com expoente μ , então, tem-se $t \sim N^{-\mu}$, ver fig. 3.9 b). Outra característica influenciada pelo número de partículas é o valor final da medida de segregação, γ^* , este também é uma lei de potência, com expoente definido por ν , dessa forma temos $\gamma^* \sim N^\nu$, ver fig. 3.9 c). Podemos ver que escalando as curvas de segregação em relação a estes expoentes, fig. 3.9 a), estas se sobrepõem, mas ao fazer as curvas diretamente, fig. 3.9 a) gráfico interno, vemos os tempos e segregações de saturação dependentes de N .

De acordo com a definição da medida de segregação celular, γ_j , deveríamos calcular esse parâmetro para os dois tecidos presentes no sistema, ou, como feito no trabalho de Belmonte, poderíamos calculá-lo somente para as células mais aderentes. No nosso caso, todas as células possuem a mesma adesão e optamos por calcular γ_j somente para as células mais lentas. Com isso podemos retirar o índice j e usar somente γ para a representação da medida:

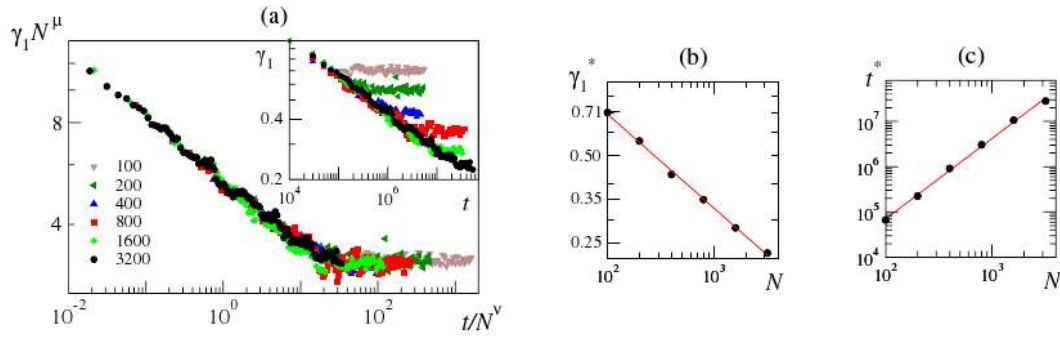


Figura 3.9: Segregação celular em duas dimensões para, com proporção 3:1 células de ecto/endo, onde: a) escala da segregação para diferentes valores de N , $\beta_{11} = 3.83$, $\beta_{12} = 2.53$, $\beta_{22} = 2.5$ e $\alpha = 0.01$; b) valor da saturação de γ contra N ; c) tempo em que ocorre a saturação contra N . Imagem retirada do artigo. [15]

$$\gamma = \left\langle \frac{n_2}{n_1 + n_2} \right\rangle. \quad (3.12)$$

Um valor de γ decrescente implica reorganização do sistema. Para que a HVD seja uma hipótese aceitável, espera-se que a medida de segregação possua características semelhantes, tanto na evolução temporal quanto na dependência com o tamanho do sistema, às obtidas para a hipótese da adesão diferenciada.

Como estamos calculando apenas para um tecido, os vizinhos iguais da célula serão pertencentes ao tecido 1 que é o mais lento e os vizinhos diferentes ao tecido 2.

Massa Média dos Agregados Celulares

Assim como no parâmetro de segregação celular, podemos efetuar as medidas de segregação celular com base em apenas um dos tecidos, nós escolhemos nos focar no comportamento da endoderme, e considerar a ectoderme como o meio onde a endoderme se agrega. Em nossas simulações, as células dos dois tecidos são iguais, exceto pela característica geradora de segregação, as células possuem mesma massa e mesmo tamanho, que é uma boa aproximação para sistemas celulares reais.

Precisamos escolher qual a medida equivalente à massa do agregado é mais adequada aos modelos de simulação adotados. Para o modelo de Animóides é simples definir quais partículas pertencem ao mesmo agregado e contá-las. No modelo de GGH contar a área total de cada agregado é a forma mais direta, porém, é igualmente fácil contar o número de células que pertencem a cada grupo.

A medida do número médio de células dos agregados é feita por um algoritmo baseado

no algoritmo de Hoshen-Kopelman[52]. Com a possibilidade de desconsiderar a contagem dos agregados pequenos, ou seja, menores do que k_{MIN} . Isto é importante pois os dados experimentais de Méhes [17] excluem células soltas, considerando que estas podem estar mortas, e, além disso, se desconsiderarmos os agregados pequenos podemos considerar a fusão de agregados como irreversível, ou seja, sem a possibilidade de fragmentação de agregados.

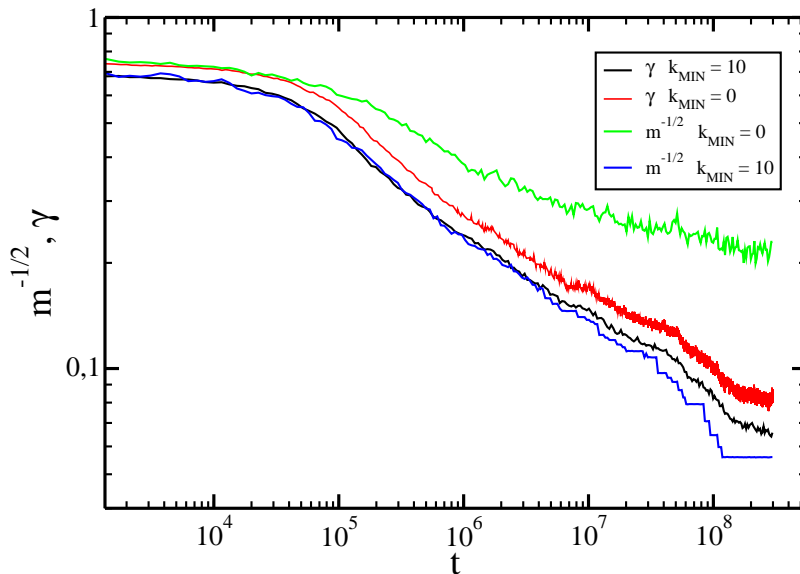


Figura 3.10: Simulação da segregação celular em duas dimensões com a HVD, para um sistema com $N=8000$ partículas, média de 4 amostras diferentes.

Na figura 3.10 vemos uma comparação entre as medidas de γ e do número médio de células dos agregados, nela consideramos que o parâmetro de segregação é proporcional a superfície total de interface entre os tecidos diferentes $\gamma \sim S_{TOT} \sim m^{-1/d}$, por isso comparamos o γ com $m^{-1/d}$. Vamos entrar em detalhes e mostrar que esta relação é válida em alguns casos no modelo de GGH que permite ambas medidas, de γ e da superfície total de interface. Podemos ver que se não desprezarmos os agregados pequenos, existe uma grande diferença entre as medidas, esta diferença ocorre devido ao impacto diverso que as partículas isoladas geram no parâmetro, nele as superfícies das células são pequenas e desprezíveis quando comparadas com a superfície dos agregados dominantes, mas, na média do número de células do agregado, as partículas soltas fazem o tamanho médio cair rapidamente, por exemplo, se tivermos um agregado contendo todas as células exceto uma. No parâmetro γ , a diferença entre ter ou não uma partícula solta é da ordem de $1/N$, no agregado médio a diferença entre os dois casos é da ordem de $N/2$.

3.4 Medida de Movimento Coletivo

Analisamos a segregação celular através das medidas definidas por Vicsek [3] (parâmetro de ordem φ , equação 3.3 neste trabalho) e por Belmonte [15] (parâmetro γ , equação 3.11 neste trabalho). A seguir detalhamos como eles foram usados.

Calculamos o valor do parâmetro de ordem, φ pela eq. 3.13, para os diferentes tecidos, k , separadamente. Têm-se, então, um valor desse parâmetro para as células mais rápidas e outro valor para as mais lentas. Isto é importante na HVD, pois as células possuem diferentes velocidades e podem possuir valores de φ diferentes por tecido. Em alguns casos, os tecidos podem estar em fases diferentes, um na movente e outro na não movente.

$$\varphi_k = \left\langle \frac{1}{Nv_k} \left| \sum_j \vec{v}_j \right| \right\rangle, \quad (3.13)$$

O parâmetro de ordem, φ , diferencia as fases movente e não movente, porém, na vizinhança da transição entre essas fases esperam-se grandes flutuações nesse parâmetro, pois encontramos uns poucos grupos numerosos de células movendo-se em direções arbitrárias. Neste caso, analisamos diretamente as imagens da segregação para aceitar ou não as segregações, escolhendo as biologicamente plausíveis. Por exemplo, se o sistema se dividir em muitos pedaços, a segregação seria inaceitável.

3.5 Simulação Numérica

A partir do modelo de Vicsek e de suas adaptações temos definidos o modelo matemático e os parâmetros de medidas da segregação celular, com isso podemos efetivamente realizar os cálculos, ou seja, desenvolver o programa que realize toda a dinâmica e calcule todas as variáveis de medida. Primeiramente definimos o estado inicial do sistema, atribuindo posições e velocidades para todas as células no tempo $t = 0$. Definimos valores iniciais aleatórios para o ângulo da velocidade, $\theta(0)$, no intervalo $[0, 2\pi)$ e, para as posições, dentro de um círculo cuja área é $N\pi r_{eq}^2$. Com isso, as células são distribuídas aproximadamente na área de equilíbrio do sistema.

A dinâmica obedece às equações, 3.8, 3.9 e 3.2. A partir das quais definimos vetores de dimensão N associados às variáveis posição, ângulo e velocidade. Também definimos as matrizes: distância e força que possuem dimensão $N \times N$. Além disso temos diversas variáveis simples de medida, como os parâmetros, γ e φ .

O tempo é a variável discreta do problema, como mencionamos anteriormente, ele sempre é incrementado em uma unidade, $\Delta t = 1$, as demais variáveis são contínuas e precisam ser recalculadas a cada passo de tempo. Essas características são semelhantes a outra forma de cálculos numéricos: a dinâmica molecular (DM) [41]. Para realizar os cálculos da dinâmica diretamente (novas posições e velocidades), precisamos calcular as distâncias e forças entre cada par de células, assim o tempo de processamento cresce com N^2 , mas podemos utilizar técnicas conhecidas da DM para reduzir este tempo otimizando o cálculo das distâncias entre as células.

Em geral, se divide a DM em etapas: o cálculo das forças; cálculo das novas posições; velocidades; cálculo das variáveis de interesse. Então, utilizamos esta organização na nossa simulação. Para cálculo das distâncias vamos utilizar um método que reduz o tempo de processamento, após este cálculo, obteremos as componentes da força sobre cada célula e, então, atualizaremos as posições e velocidades para calcular os valores das medidas de segregação celular propriamente ditas, por último geramos as imagens instantâneas da configuração espacial para acompanhar a evolução do sistema.

3.5.1 Método das Caixas

O método das caixas consiste em dividir o espaço em regiões de igual tamanho, denominadas caixas. Esta divisão do espaço permite que o sistema contenha até $N = 8000$ células e execute em tempo praticável, da ordem de meses. Dado que as forças presentes no problema tem curto alcance, não haverá qualquer erro de aproximação se calcularmos as distâncias (e as forças) apenas dentro da mesma caixa ou entre células de caixas vizinhas. No modelo adotado neste trabalho, as forças possuem um raio de alcance, r_{alc} , a partir do qual a força é nula. Atribuindo ao lado das caixas o valor da distância de alcance da força, podemos garantir que todas as vizinhas estarão dentro da mesma caixa ou em caixas vizinhas. Podemos atribuir diretamente valor zero às forças entre células com distâncias superiores ao lado da caixa.

Para trabalharmos com caixas precisamos definir sua vizinhança, pois somente a caixa onde a célula se encontra e as caixas vizinhas são consideradas nos cálculos das variáveis dinâmicas. Em duas dimensões, cada caixa possui oito vizinhas. Dado que utilizamos condições de contorno periódicas, mesmo as caixas nos limites espaciais do sistemas possuem oito vizinhas. Mas, como mostrado na figura 3.11, somente é necessário considerar quatro, das oito caixas vizinhas, pois, se percorremos todas as caixas e calcularmos as interações de cada partícula com as partículas das caixas vizinhas, estaríamos calculando duas vezes a interação.

Denotamos as caixas com números inteiros e definimos as vizinhas através de quatro veto-

res: v_1, v_2, v_3 e v_4 . Cada um desses vetores contém as vizinhas da i -ésima caixa e todos estes possuem dimensão igual ao número de caixas do espaço [41], $L_x \times L_y$. Estes vetores são criados para aumentar o desempenho em relação à recalculação a vizinhança a cada passo de tempo. A definição destes vetores é simples, mas devemos ter cuidado nas extremidades do espaço, nas laterais algumas das vizinhas estão do lado oposto do sistema, nas caixas inferiores algumas das vizinhas, (v_2, v_3, v_4), são as caixas superiores, nos cantos são usadas duas das formas anteriores, tendo estes casos separados, as demais vizinhas são facilmente determinadas, podemos ver isso na fig. 3.11.

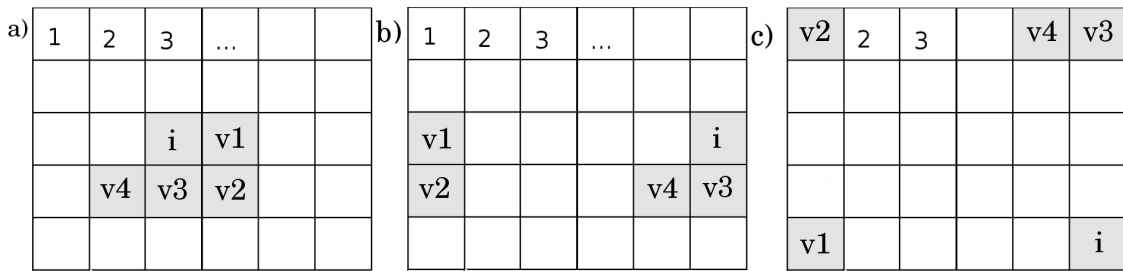


Figura 3.11: Divisão em caixas do espaço e vizinhas da i -ésima caixa, por exemplo, em três casos: a) caixa i central; b) caixa i lateral, devemos definir a vizinhança das caixas laterais e caixas inferiores; c) caixa i em um dos quatro cantos do sistema, novamente devemos defini-los em separado;

Os programas foram executados em aproximadamente 20 núcleos ao mesmo tempo, possibilitando o cálculo de diversos conjuntos de parâmetros. Os processadores utilizados são de três tipos: AMD Athlon 2x de 2.2 GHz, Intel Core 2 Quad de 2.4 GHz e Intel Core i7 de até 3.4GHz.

Para construir o espaço de parâmetros, fig.4.17, usamos um sistema com $N = 2000$ células, percorremos valores de diferença de velocidades, δ , e de movimento coordenado, α , adequados à segregação celular. Cada ponto nesse diagrama demora aproximadamente um dia para ser obtido. Uma vez definido um conjunto de parâmetros, usamos um segundo programa, onde aumentamos o número de partículas para $N = 8000$ e passamos aos cálculos de segregação. Esses cálculos são realizados até tempos finais da ordem de $t^* \sim 2 \times 10^8$, onde normalmente encontramos saturação do parâmetro γ . No primeiro programa utilizado, o cálculo do parâmetro de ordem, φ é realizado a cada 2.5×10^5 passos e usa-se um tempo final, $t = 10^6$. No segundo programa o cálculo do parâmetro de segregação, γ é realizado a cada 200 passos.

Dado que a evolução da segregação ocorre mais lentamente para tempos mais longos, escolhemos captar imagens em intervalos progressivamente mais longos, ou seja, usamos intervalos $t^{0.8}$ para captá-las. Ou seja, iniciando com uma imagem em $t = 1$, teremos imagens em

$t = \{1, 2, 4, 8, 14, 23, 36, 54, 79, \dots\}$. Como veremos nos resultados, com isto compensamos aproximadamente o expoente da segregação. Uma vez produzidas as posições das partículas a cada tempo pelo programa principal e armazenadas em arquivo, as imagens de evolução são geradas através do programa povray e unidas em vídeos pelo programa ffmpeg.

3.6 Simulações em GPU

A simulação para um sistema de $N=8000$ células é muito demorada, com o objetivo de melhorar a estatística, ou seja, para cada conjunto de parâmetros poder ter mais amostras, precisamos acelerar os cálculos. Uma boa alternativa para problemas com matrizes densas é paralelizar a execução do programa, dessa forma podemos efetuar o cálculo da força, que cada partícula sofre, em paralelo com as demais, isto é possível pois as forças dependem apenas do estado anterior do sistema. Considerando o tamanho do sistema, $N=8000$ partículas, tornar o programa em paralelo dentro do processador, não garantiria grande aumento do desempenho, pois estes possuem poucos núcleos, ou em inglês *cores*. Neste caso a melhor alternativa é paralelizar o programa para executar nas placas aceleradoras, ou em GPUs (*Graphic Processor Units*).

A programação em paralelo exige muito cuidado, primeiro por que precisamos garantir que não existam duas ou mais escritas na mesma posição da memória ao mesmo tempo, depois as cópias de dados entre as memórias do processador e da placa de vídeo, ou GPU, precisam ser feitas com cautela pois estas são operações demoradas para a GPU. Precisamos então reconstruir todo o algoritmo pensando em melhor desempenho em paralelo.

A linguagem de programação escolhida para paralelizar o programa de animóides foi o CUDA (*Compute Unified Device Architecture*) que é uma linguagem da empresa Nvidia, específica para programação massivamente paralela em placas aceleradoras da própria Nvidia. Programamos na versão de CUDA que estende a linguagem C. Devido a grande complexidade de se programar em CUDA, neste trabalho, implementamos apenas o cálculo das interações sem o método das caixas, efetuando o cálculo de distância entre todas as partículas com todas as partículas. A estimativa do tempo de execução deste algoritmo é $\Theta \sim N^2$. A extensão para o método das caixas é possível, mas até o momento esta em desenvolvimento.

Com este novo programa o ganho de desempenho foi da ordem de 10 vezes, utilizando uma placa de vídeo GeForce 680GTX, que possui 1536 CUDA *cores*, permitindo que sejam calculadas 1536 partículas ao mesmo tempo. Se tivéssemos acesso a placas com mais CUDA *cores* ou se implementássemos o método das caixas para programação paralela teríamos um ganho ainda maior. Mesmo sem implementar o melhor método de cálculo pudemos executar

para alguns casos várias amostras e para os casos de $N=8000$ temos 4 amostras para as curvas utilizadas nas comparações com os modelos propostos neste trabalho. Mas ainda temos casos de $N=8000$ com apenas uma amostra.

4 *Resultados da HVD com o Modelo de Animóides*

Mostramos aqui os resultados das simulações efetuadas sobre os três modelos, descritos na subseção 3.3.1. Vamos explorar esses resultados em duas situações distintas: com e sem o termo de movimento coletivo, α . No caso $\alpha = 0$, os três modelos são idênticos. A seguir descrevemos os parâmetros comuns às simulações.

Utilizamos a velocidade das células mais lentas sempre como $v_0 = 0.007$, o parâmetro que controla o ruído é fixo e vale sempre $\eta = 1$, o número de partículas pode variar de $N = 500$ até $N = 8000$, outro parâmetro fixo nas simulações é a adesão entre as células e vale, $\beta = 0.55$, com esse valor, as células com velocidade v_0 estarão próximas à fase sólida, veja figura 3.5. Os raios característicos de interação também são fixos, o raio impenetrável ou raio de core, $r_c = 0.2$, e o alcance da força é $r_{ALC} = 0.55$. Como em todos os casos $\Delta t = 1$, a distância percorrida em cada passo, $v_0 \Delta t$, será sempre bem menor que r_c .

Quanto à proporção das células de cada tecido, usualmente vamos explorar as proporções 1 : 3 (uma lenta para cada três rápidas) e, quando não for mencionado explicitamente, este será o padrão. Em alguns casos, no entanto, quando estudarmos o papel da proporção na segregação, essas proporção será variada. O tamanho total do sistema é calculado a partir do número total de células no sistema, pois não queremos que o sistema atinja a confluência, situação onde todo o espaço está cheio de células.

Ajustamos então as células no sorteio inicial de forma que, em média, estejam na distância de equilíbrio umas das outras. O formato deste sorteio é um círculo (exceto para o nosso primeiro resultado na seção seguinte), calculamos, então, as dimensões do sistema a partir do raio de equilíbrio da força. Para um sistema de $N = 8000$ temos que o lado do espaço disponível é $45r_e$, onde r_e é o raio de equilíbrio da força e é equivalente a $36r_{alc}$ em unidades do raio de vizinhança. O espaço é bidimensional ou tridimensional em alguns casos, mas sempre com condições de contorno periódicas, como já foi discutido anteriormente. Ou seja, a dinâmica ocorre sobre um toroide, no caso 2d, e sobre um hipertoroide, no caso 3d.

4.1 Resultados na Ausência de Movimento Coordenado

No caso em que não há movimento coordenado, $\alpha = 0$, as equações de movimento assumem a forma:

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = x_i(t) + \vec{v}_i \Delta t \quad (4.1)$$

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (4.2)$$

Os três casos de normalização que descrevemos anteriormente se equivalem nesta situação, por este motivo estudamo-lo separadamente.

4.1.1 Arredondamento

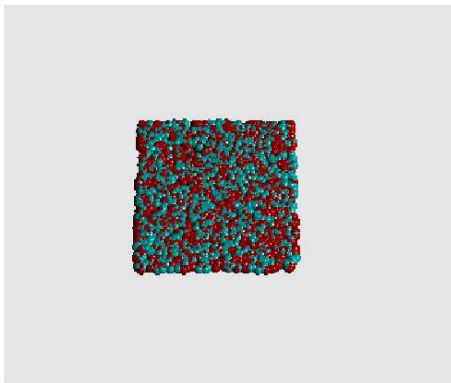


Figura 4.1: Estado inicial quadrado.

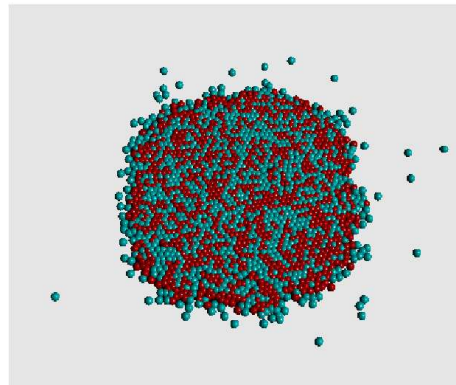


Figura 4.2: Sistema circular obtido através da dinâmica descrita após tempo de transiente, $t=17531$.

Com intuito de testar os efeitos de tensão superficial [1], analisamos inicialmente se, após um período transitório, uma distribuição inicial não circular geraria uma distribuição circular. Assim, sorteamos um estado inicial distribuindo as, $N = 2000$, células sobre um quadrado e implementamos numericamente a dinâmica das equações de movimento 4.2. A razão entre as velocidades usada foi $\delta = 3$. Depois de algum tempo ($t \sim 17500$), o sistema passou a apresentar uma distribuição aproximadamente arredondada das partículas, como mostrado nas figuras (4.1 e 4.2). Esse tempo é bem menor que o tempo típico de uma segregação completa, podemos ver que mesmo com o sistema arredondado os tecidos ainda não se reorganizaram de forma visível. A partir desse resultado, passamos a utilizar sorteios iniciais já circulares em todas as simulações.

4.1.2 Proporção entre Células de Tecidos Distintos

Considerando a hipótese da velocidade diferenciada, HVD, onde a única diferença entre os tecidos é a velocidade das células, vamos ver qual a influência da proporção de número de células de cada tecido, tanto no padrão final encontrado quanto na evolução da segregação celular. Precisaremos retornar a esta questão quando adicionarmos à HVD o mecanismo de reconhecimento celular.

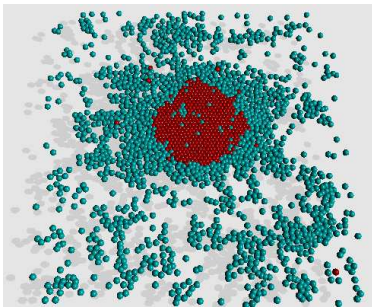


Figura 4.3: Sistema com três partículas mais rápidas para cada uma mais lenta.

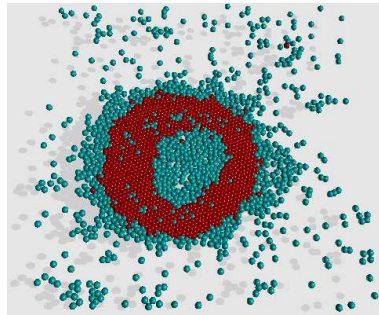


Figura 4.4: Sistema contendo metade das células de cada tipo.

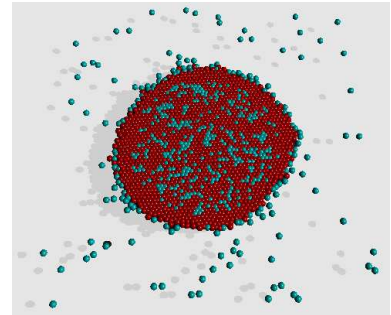


Figura 4.5: Sistema com três partículas mais lentas para cada uma mais rápida.

A primeira verificação feita é que as células com maior motilidade tendem a envolver os grupos formados por células de menor motilidade, isto é válido se todas as células tiverem a mesma adesão. Analisamos, então, a influência da proporção do número de células mais lentas em relação às demais na segregação. Quando temos muitas células velozes, estas podem se dispersar, pois um número suficiente deste tipo ainda restará no agregado e a segregação ocorrerá sem problemas. Esse caso está mostrado na figura 4.3, com as mais velozes no exterior do agregado. Caso o número de células em cada tecido seja o mesmo, nota-se uma certa dificuldade em obter a segregação, pois pode ocorrer formação de um anel, fig. 4.4, que impede as células de se reorganizarem totalmente. Com mais células lentas temos um problema ainda maior de aprisionamento, o que pode a princípio parecer uma segregação com as mais lentas por fora, na verdade é um estágio de retenção das células mais rápidas, se estas chegarem à superfície se dissiparão, fig. 4.5.

Para descobrirmos as proporções no número de células que levam à segregação celular, simulamos alguns casos com o número total de células fixo em $N = 2000$ e variamos o número de células mais lentas N_{slow} . O valor inicial do parâmetro de segregação γ depende somente da proporção entre as células, então é esperado que, para cada número de células de endoderme tenhamos um valor inicial diferente. Então, para facilitar a comparação entre as proporções, normalizamos o parâmetro com relação ao seu valor inicial, ou seja, utilizaremos γ/γ_0 . Da mesma

forma que no caso não normalizado, se houver segregação, o valor do parâmetro normalizado deve diminuir com o tempo, se não, deve permanecer aproximadamente constante.

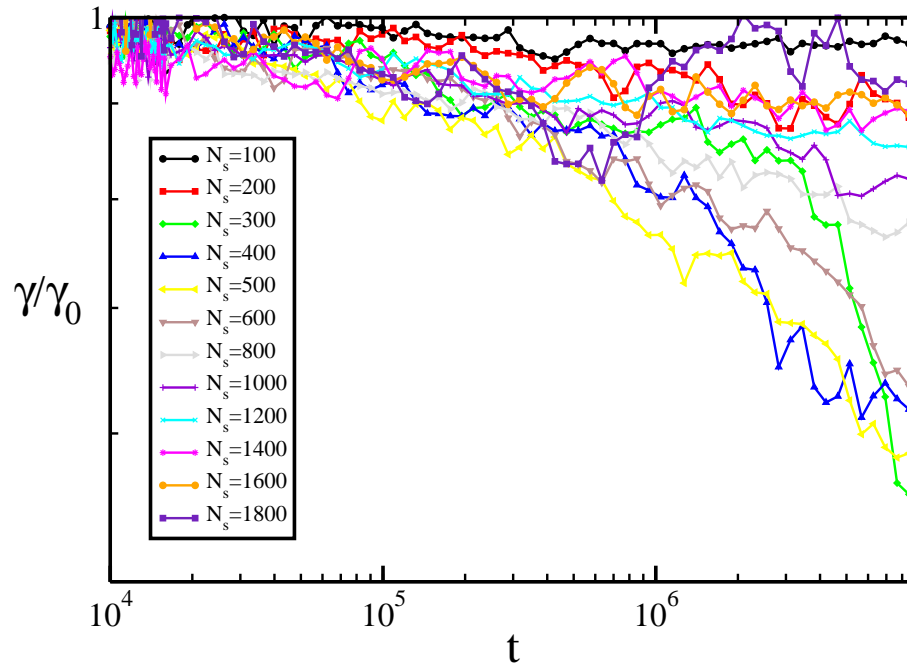


Figura 4.6: Neste gráfico temos $\gamma/\gamma_0 \times t$ para diferentes valores do número de células mais lentas. Temos segregação para algumas proporções destas células, casos onde γ/γ_0 decresce.

Podemos observar que se acertarmos a proporção entre as células dos diferentes tecidos, as mais lentas irão se aglomerar formando um núcleo envolvido pelas mais rápidas, como citado na referência [16] e contrário ao resultado de Jones et al. [2], onde foi proposta a existência de um segundo mecanismo responsável por tal configuração final, vamos abordá-lo em outra seção através de simulações.

4.1.3 Influência do Número Total de Células

Sabemos que em outros trabalhos foi encontrada uma lei de potência para o parâmetro de segregação [15, 43, 17]. Queremos confirmar se esta lei de potência é ou não afetada pelo número total de partículas no sistema. De um desses trabalhos [15] foi concluído que no caso da HAD o tamanho total do sistema não influencia na lei de potência, apenas nos valores de saturação.

Com intuito de verificar um eventual efeito de tamanho de amostra na dinâmica da segregação, realizamos simulações com sorteios circulares, proporções de células 1:3, 3 rápidas para

cada lenta e $\alpha = 0$. Analisamos o comportamento de γ para diferentes valores do número total de células do agregado, N , fixando a razão de velocidades, em $\delta = 4$. Mostramos (veja figura 4.7) que para valores diferentes de N temos, qualitativamente, a mesma dependência temporal do parâmetro γ , ou seja, a segregação possui a mesma lei de potência, mas o tempo de saturação depende de N . Dessa forma podemos utilizar um número de células conveniente para as simulações explorando o conjunto de parâmetros presente nas equações 3.8 e 3.9. Para escolher o número de partículas mais adequado precisamos levar em conta que, quanto mais células o sistema contiver, menor serão os efeitos de borda e de tamanho finito. Por outro lado, quanto maior o sistema, maior será o tempo para realizar a simulação, por dois fatores: mais cálculos por passo e mais tempo para o sistema atingir o estado assintótico segregado.

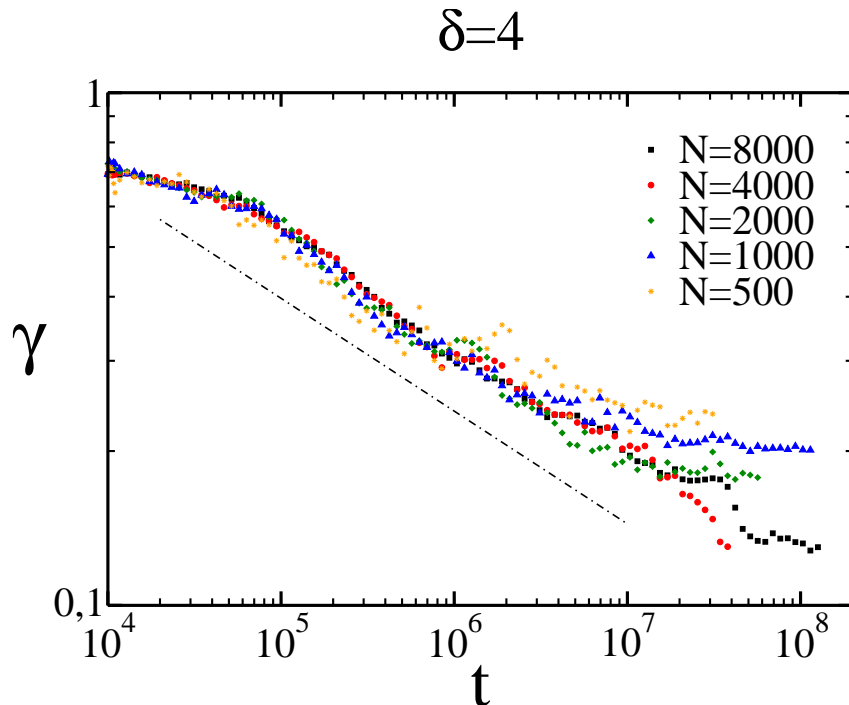


Figura 4.7: Neste gráfico mostramos a evolução do parâmetro de segregação γ , para o caso $\delta = 4$ e diferentes valores do número total de células. A reta tracejada indica uma lei de potência de expoente $\lambda = -0.21$.

Vemos no gráfico da figura 4.7 que, para diferentes valores de N e razão de velocidades fixa, $\delta = 4$, ocorre segregação. O parâmetro de ordem γ é uma função do tempo na forma de lei de potência com expoente, $\lambda = -0.21$. Note que este expoente é similar ao expoente obtido para simulações da adesão diferenciada [15]. De fato, uma lei de potência ajusta-se bem apenas quando $\delta > 3.5$; quando $\delta = 3$ uma lei logarítmica ajusta-se melhor. É importante salientar aqui que as simulações por modelo Potts [4] também encontram essa última dependência [42].

Nos gráficos da fig. 4.8 temos uma análise dos valores de parâmetros associados aos es-

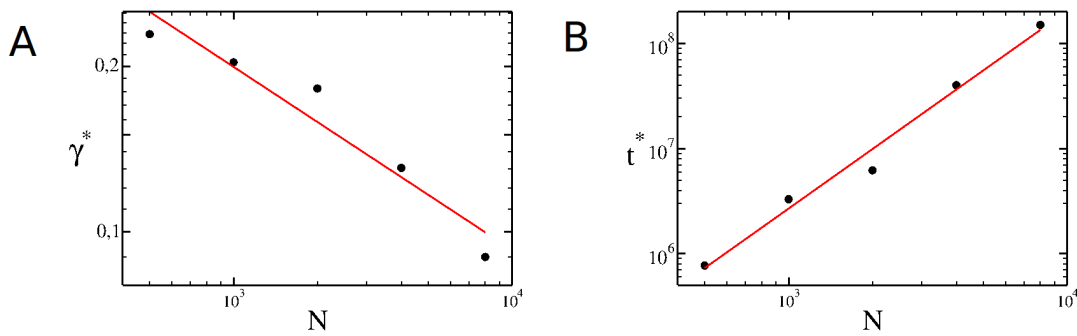


Figura 4.8: Valores de saturação para (A) γ e (B) tempo que o sistema demorou para atingir o estado de saturação em função do número total de partículas.

tados assintóticos do sistema. Primeiramente, no gráfico A, temos os valores do parâmetro de segregação, γ , na saturação, ou seja, quando o sistema atingiu seu estado final. Ajustamos o valor de saturação da medida de segregação, γ^* , através de uma lei de potência com o número de células do sistema, N . O expoente associado a esta lei de potência é denominado μ , com isso temos $\gamma^* \sim N^{-\mu}$, e de acordo com o ajuste realizado no gráfico A da figura 4.8, seu valor é $\mu = 0.33$, que é o mesmo valor obtido na análise da hipótese da adesão diferenciada. No gráfico B, da figura 4.8, temos os valores dos tempos de saturação, t^* para diferentes números de células no sistema, N . Novamente descrevemos a dependência do tempo de saturação com o número de células por uma lei de potência, $t^* \sim N^{\nu}$. O valor obtido para este expoente no ajuste é $\nu = 1.18$, este valor difere do valor obtido na análise da hipótese da adesão diferenciada. Podemos explicar isso pela dificuldade em ler tais valores, já que as curvas da nossa análise da velocidade diferenciada possuem mais flutuações que aquelas obtidas para adesão diferencial.

4.1.4 Visualização da Segregação

Como veremos, no capítulo 10, a visualização da evolução da segregação celular é fundamental para a compreensão do fenômeno e como suporte para a elaboração de modelos estatísticos.

A figura 4.9 mostra o estado inicial para $N=8000$ após um sorteio de posições de células dentro de um círculo. A proporção de três partículas mais rápidas (ciano) para uma mais lenta (vermelha) leva ao valor inicial de $\gamma = 0.75$, como pode ser visto na figura 4.7. De fato esse valor se mantém até $t = 10^4$ (veja figura 4.10), quando é ativada a diferença de velocidades, $\delta = 4$. Para $t = 10^5$ (figura 4.11) nota-se a formação de centros de nucleação, o que corresponde ao início do comportamento tipo lei de potência (figura 4.7). As figuras 4.12 e 4.13 mostram a continuidade do processo de segregação com crescimento por fusão de núcleos. E, finalmente,

a figura 4.14 mostra o sistema completamente segregado, correspondendo à saturação do parâmetro γ na figura 4.7. Nesse estado o tecido correspondente à ectoderme não se apresenta em forma circular, pois a velocidade das células que o compõe é muito grande. As células da ectoderme estão próximas à transição líquido-gás, o que gera diferenças na forma final do sistema. Mesmo no estado final algumas células da endoderme se mantêm dispersas pela ectoderme, isto se deve ao efeito do ruído, que discutiremos no capítulo 10.

Através dessas figuras podemos visualizar uma propriedade muito importante da segregação: os grupos de endoderme são bem visíveis e todos mantêm aproximadamente o mesmo tamanho, o que tornará possível a abordagem por agregado médio. Também esperamos resultados mais coerentes no início da segregação do que no final, pois, quando temos poucos grupos de células as flutuações se tornam mais importante e o desvio padrão cresce. Também vemos a presença de células de endoderme isoladas de outras iguais, o que nos motiva a partir para um modelo mais robusto de segregação celular que é uma adaptação da equação de Smoluchowski [5].

4.2 Resultados com Movimento Coordenado

Dentro de certos limites, o termo de movimento coletivo presente no modelo de animóides pode ser compreendido como viscosidade entre células vizinhas, ou seja, as células tendendo a alinhar sua velocidade com a direção da média das velocidades das vizinhas. Revendo a equação para a atualização do ângulo de movimento de cada partícula no modelo de animóides,

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j < viz >} \vec{v}_j(t) + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right],$$

o primeiro termo à direita da igualdade é o responsável por essa tendência, controlada pelo parâmetro α . Na presença de movimento coordenado pode haver movimento balístico do centro de massa, chamamos esta fase de movente, e esse movimento depende de dois fatores: a intensidade do parâmetro de movimento coordenado (α) e a velocidade das células. Porém, nesse trabalho, temos um sistema composto de dois tipos de células que se deslocam com velocidades características distintas. Logo, a análise da transição para o estado movente deve considerar a razão entre essas velocidades. De fato, essa transição pode ocorrer para valores diferentes do parâmetro de movimento coordenado (α) nos diferentes tecidos e teremos, então, as seguintes

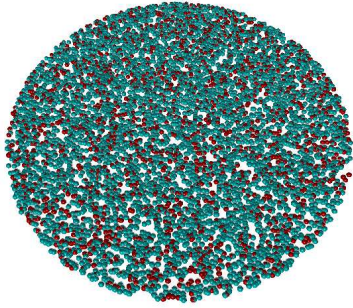


Figura 4.9: Estado inicial.

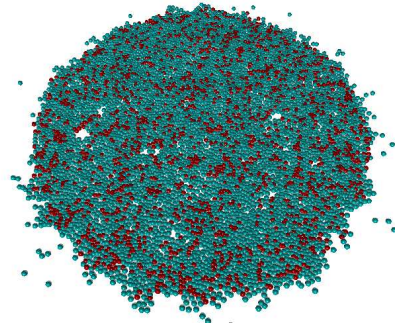


Figura 4.10: Tempo de relaxamento, as células ganham velocidade específicas ao seu tecido, $t=10^4$.

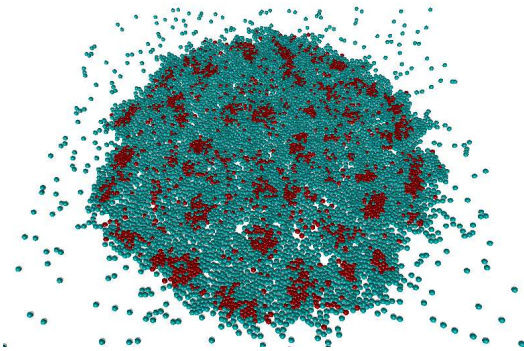


Figura 4.11: Início do regime de lei de potência, $t=10^5$

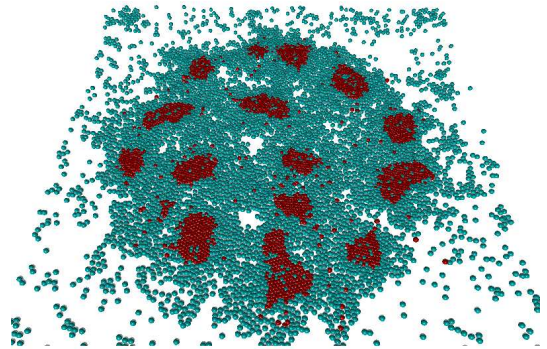


Figura 4.12: Formação dos primeiros grupos, $t=10^6$.

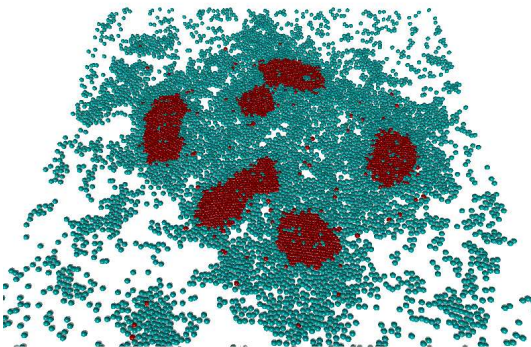


Figura 4.13: Formação dos núcleos maiores, $t=10^7$.

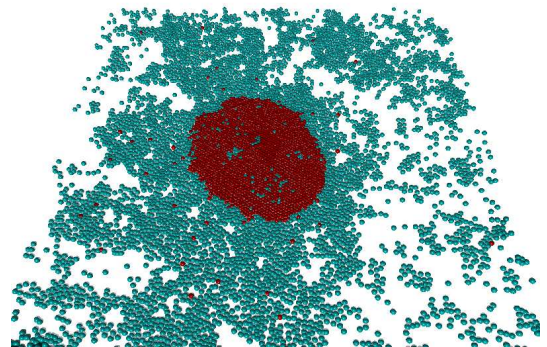


Figura 4.14: Estado final, $t=2 \cdot 10^8$.

possibilidades:

- i) Ambos tecidos estão na fase não movente, ou seja, o centro de massa das partículas mais lentas e o centro de massa das mais rápidas, em média, não se movem.
- ii) O centro de massa das células dos diferentes tecidos têm velocidade média não nula e movem-se da mesma forma mantendo a coesão do sistema.
- iii) O centro de massa das células mais rápidas se move diferentemente do centro de massa das mais lentas, o sistema perde a coesão.

Estudamos inicialmente o caso onde não há movimento do centro de massa persistindo em uma direção, pois, se houvesse, uma eventual segregação seria devida à quebra do agregado celular em pedaços. De fato, como veremos ao final dessa tese, se o sistema estiver confinado, o regime com movimento persistente pode acelerar eficientemente a segregação.

4.2.1 As Normalizações Adotadas para o Movimento Coletivo

Como visto na seção 3.3.1 na HVD temos liberdade na normalização do termo de movimento coordenado, pois nosso sistema é composto por células com duas velocidades. Vamos relembra estas normalizações e comparar os seus resultados nas seções seguintes.

Normalização 1

Como podemos retirar o parâmetro α de dentro do somatório, tornamos mais importantes os termos cuja a velocidade das células vizinhas é maior. Como mencionado na seção 3.3.1, este modelo impõe uma viscosidade dependente do tipo das células vizinhas, pois o termo do somatório das velocidades (termo modulado por α) depende da velocidade das células vizinhas mais velozes, que contribuem mais. Dessa forma, todas as células tendem a seguir mais as vizinhas do tipo veloz em comparação com as células do tipo lento.

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j \langle viz \rangle} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (4.3)$$

onde v_0 é o módulo da velocidade das partículas mais lentas.

Note que podemos ver as demais normalizações comparadas com esta primeira, onde colocamos a influência da velocidade de normalização dentro do parâmetro α .

Normalização 2

Por praticidade reescrevemos abaixo a equação para o segundo tipo de normalização adotada:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j < viz >} \frac{\vec{v}_j(t)}{|\vec{v}_i(t)|} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (4.4)$$

Se, como comentado na primeira normalização, fizermos a comparação das normalizações, reescrevendo a equação como:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\sum_{j < viz >} \frac{\alpha v_0}{|\vec{v}_i|} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (4.5)$$

Ou seja retiramos a dependência explícita da partícula do termo de movimento coletivo, e a inserimos no parâmetro α , chamamos o termo $(\alpha v_0)/v_i$ de α_i , temos então, que $\alpha_i = \alpha/\delta_i$, que facilita a comparação. Podemos facilmente ver que o termo de alinhamento dependerá da célula em questão, ou seja, as células mais rápidas tendem a seguir menos as vizinhas, esperamos com isto manter as células de endoderme mais unidas.

Normalização 3

Neste último caso, queremos que as células sejam igualmente atraídas pelos vizinhos, independentemente do tipo ao qual elas ou os vizinhos pertença, para isto temos:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\alpha \sum_{j < viz >} \frac{\vec{v}_j(t)}{|\vec{v}_j(t)|} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (4.6)$$

Da mesma forma que na normalização anterior reescrevemos a eq. 4.6, com o objetivo de facilitar a visualização dos efeitos desta normalização no termo de alinhamento, em termos do α .

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[\sum_{j < viz >} \frac{\alpha v_0}{|\vec{v}_j|} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (4.7)$$

Novamente renomeamos o $(\alpha v_0)/v_j$ por α_j que é equivalente a escrever $\alpha_j = \alpha/\delta_j$. Assim ao compararmos com a primeira normalização vemos que as células mais rápidas perderam influência na trajetória, mas agora todas as células influenciam e são influenciadas da mesma

maneira, independente do seu tipo e do tipo das vizinhas.

4.2.2 Comparação entre as Normalizações

Nesta seção vamos comparar as normalizações entre si, assim como os resultados com o termo de alinhamento e sem ele. Para isto vamos utilizar os parâmetros de medida da segregação celular, γ . Depois vamos construir os espaços de parâmetro para as três normalizações, buscando as regiões onde o sistema segrega e onde ele não segrega, assim como utilizar o parâmetro φ para delimitar as fases movente e não movente do sistema. Os parâmetros variados nestes espaços são a razão entre as velocidades das células, δ , e o parâmetro de alinhamento, α , usando as equações na forma onde α é uma constante.

A primeira medida importante é como o parâmetro de segregação evolui com o tempo, para alguns conjuntos de parâmetros, variamos a razão entre as motilidades, δ , e o parâmetro de movimento coordenado, α . Podemos ver na figura 4.15 que em qualquer normalização temos as formas logarítmica se $\delta < 3.5$ e de lei de potência se $\delta \geq 3.5$, e estas ocorrem em valores similares dos parâmetros para as três formas. Nos três gráficos temos as linhas tracejadas representando os ajustes deslocados logaritmo (acima) e lei de potência (abaixo). Em todas as normalizações vemos que o termo de movimento coletivo acelera a segregação.

No primeiro gráfico 4.15-A temos a primeira normalização, vemos as curvas de segregação bem espalhadas o que significa que o movimento coordenado tem grande efeito na dinâmica, pois se compararmos os casos sem movimento coordenado, $\alpha = 0$, para as diferentes normalizações não pode haver diferença na segregação pois estas afetam somente o termo mediado pelo α que desaparece na sua ausência. Uma desvantagem do movimento coletivo depender da motilidade da vizinhança para a segregação é que o sistema perde a coesão mais facilmente.

Nos dois gráficos abaixo, 4.15-B-C, observa-se que diferentemente do primeiro caso, as curvas estão próximas, umas das outras, até mesmo para valores elevados do parâmetro de movimento coordenado, $\alpha = 7.5v_0$ e $\alpha = 10v_0$, isto indica que o sistema mantém a coesão para valores maiores de α . O segundo gráfico corresponde à normalização 2 e se comporta como um caso intermediário entre as situações 1 e 3, mas lembramos que de fato não é, a segunda normalização acrescenta a dependência do movimento coletivo na célula e reduz importância da vizinhança, assim as células mais lentas tendem a seguir mais a suas vizinhas.

Como mencionado anteriormente no primeiro caso o sistema perde a coesão mais facilmente pois todas as células tendem a seguir as vizinhas mais rápidas e estas se dispersam mais no sistema. Precisamos excluir os casos onde o sistema perde coesão por este motivo temos

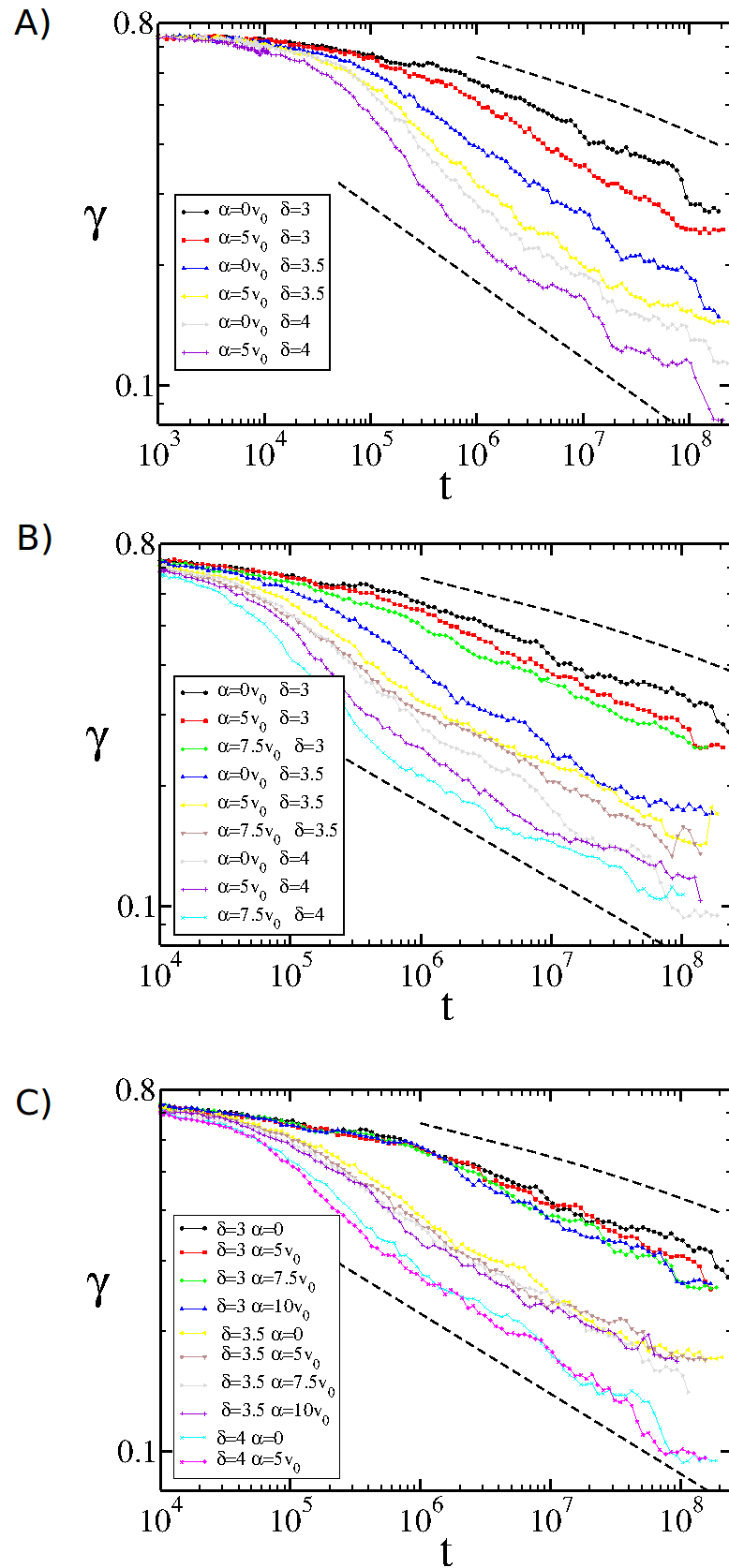


Figura 4.15: Comparação da evolução temporal da segregação para diferentes intensidades do movimento coordenado, α , e diferentes razões entre as velocidades, δ , cada curva é apenas uma amostra de tamanho $N = 8000$. Temos segregação do tipo lei de potência se $\delta \geq 3.5$ para quaisquer valores de α utilizados. A) normalização 1, B) normalização 2 e C) normalização 3.

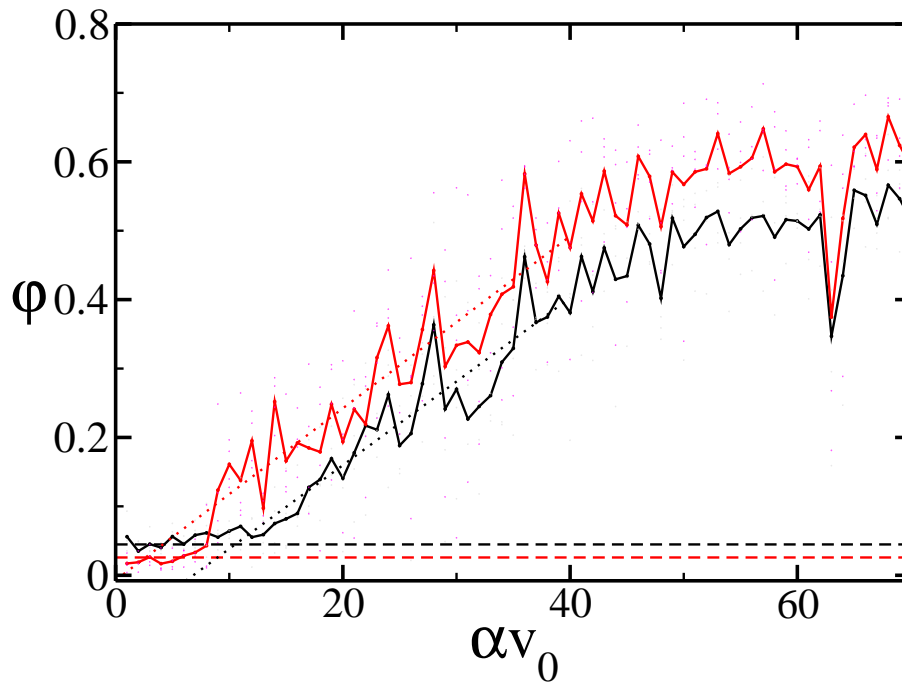


Figura 4.16: Parâmetro de ordem φ versus parâmetro de movimento coordenado α , para $\delta = 4$. A linha preta é associada às células mais lentas; a linha vermelha às células mais rápidas. As linhas tracejadas são os respectivos valores de erro esperados para $\varphi \sim 0$. Os pontilhados são os ajustes lineares das respectivas curvas durante a transição.

menos curvas para a primeira normalização, a retirada de curvas não coesas facilita a visualização mais clara das influências dos parâmetros α e δ na segregação, a principal é que ambos parâmetros aceleram a reorganização dos tecidos, mas existe um valor máximo a partir do qual o sistema perde a coesão. Por razões biológicas consideraremos casos nos quais o sistema se mantenha coeso e na fase não movente, pois fora destas o ser vivo não sobreviveria.

No último caso considerado, onde o termo de movimento coletivo não depende do tipo de célula nem das vizinhas que a cercam, o parâmetro tem efeito reduzido, o que pode ser visto pela proximidade maior das curvas de segregação. O sistema se mantém mais coeso do que no primeiro caso, mas a coesão não é muito maior do que a do segundo caso.

Para construir o espaço de parâmetros da fig. 4.17 executamos as simulações diversas vezes, variando $\alpha \in [0, 50v_0]$ e $\delta \in [1.0, 6.0]$. No caso $\delta = 1$, todas as células do sistema são idênticas e não temos segregação. A primeira informação dos espaços é indicar a região de cada lei de escala da segregação. A segregação pode evoluir como lei de potência ou como uma lei logarítmica. Para separar as duas leis de escala, executamos a simulação até o tempo de $t = 10^7$ e medimos o valor de γ . Escolhemos este valor de tempo, pois nele, sistemas com $N = 2000$ já teriam segregado. A segunda informação está nos números i, ii e iii, que indicam se o sistema

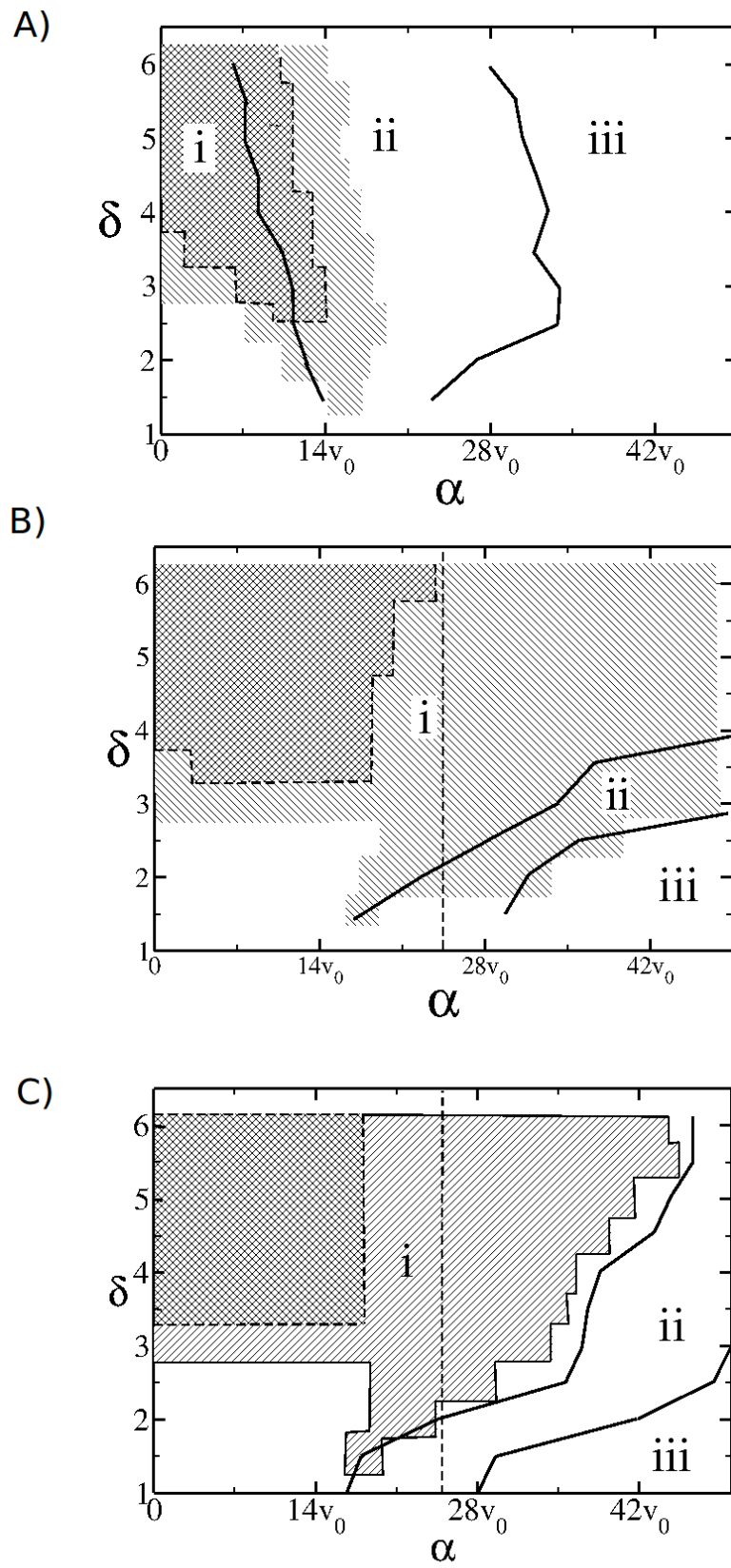


Figura 4.17: Evolução da segregação celular com o tempo variando ambos parâmetros, γ e α , em combinações destes que tenham separação de tecidos até a saturação e sem perda de coesão.

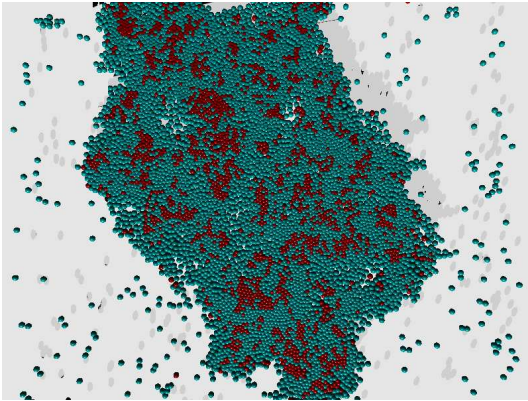


Figura 4.18: Imagem do sistema para $\delta = 3$ e $\alpha = 20$, note que o sistema se mantém coeso, e está na fase i.

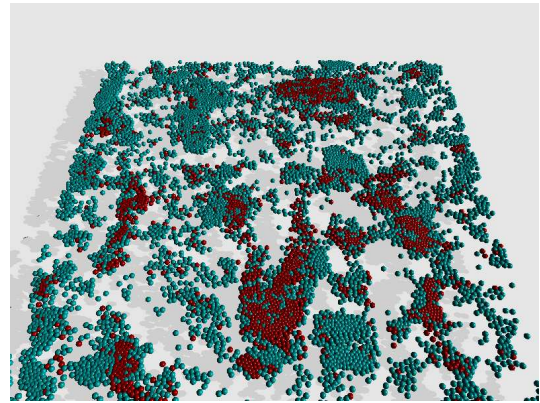


Figura 4.19: Imagem do sistema para $\delta = 3$ e $\alpha = 30$, note que o sistema perdeu a coesão completamente, apesar de estar na fase i.

está na fase movente ou não movente, como determinamos isto, será detalhado abaixo.

Para separar as regiões onde o sistema está ou não na fase movente, utilizamos o parâmetro φ , ver eq. 3.13. Lembrando que, tanto no trabalho de Vicsek quanto na adaptação de Grégoire, o sistema estar na fase movente ou não depende da densidade de partículas e também da velocidade delas. Porém, no caso de um sistema contendo partículas com duas velocidades diferentes, podemos encontrar um tecido na fase movente e o outro não. Durante a segregação, os tecidos se encontram misturados, levamos isto em conta na classificação das fases. Do ponto vista global, o sistema pode estar em três fases:

- i) Ambos tecidos estão na fase não movente, ou seja, o centro de massa das partículas mais lentas e o centro de massa das mais rápidas, em média, não se movem.
- ii) O centro de massa das células dos diferentes tecidos têm velocidade média não nula e movem-se da mesma forma mantendo a coesão do sistema.
- iii) O centro de massa das células mais rápidas se move diferentemente do centro de massa das mais lentas, o sistema perde a coesão.

A transição mais importante entre as fases, que determina se podemos aceitar ou não a segregação, é a da fase não movente para a fase movente. Esta é indicada pelo parâmetro φ , como definido na equação ???. Quando o sistema se encontra na fase não movente esse parâmetro deve ser nulo, o que indica que o movimento das células é browniano. No caso de um sistema finito, com N partículas, o somatório implícito na definição de φ deve resultar em $1/\sqrt{N}$, pois é equivalente a somar N vetores aleatórios, as velocidades das células e de acordo, com a definição de φ , este é normalizado.

Medimos o parâmetro φ para cada um dos tecidos separadamente, mas eles estão na verdade misturados no sistema. Isto pode afetar a transição da fase não movente para a movente de cada tecido, pois ela depende da velocidade das partículas [3]. Para medir esta transição, consideramos que φ é desprezível se ele for $\varphi < \sqrt{n_i}$, onde n_i é o número de células do i -ésimo tecido, ou seja, neste caso o tecido se encontra fora da fase movente. O valor de corte está associado às flutuações esperadas. Para medirmos onde a fase movente do tecido se inicia, percorremos valores de α e δ , mostramos um caso, $\delta = 4$, na fig. 4.16. Nesta figura exemplificamos como diferenciar qual fase o sistema esta, temos então, duas curvas: a preta associada ao tecido 1 (células mais lentas) e a vermelha associada ao tecido 2 (mais rápidas), cada curva tem seus ajustes lineares. A transição para a fase movente é obtida pela intersecção das duas retas de ajuste, a primeira é o ajuste linear do φ e a segunda marca o valor limite para φ desprezível.

O sistema está na fase i se os dois tecidos estão na fase não movente, esta definição de fase tem limitações originárias do parâmetro φ . A fase ii é caracterizada pelos dois tecidos moverem (ou não) seus centros de massa igualmente. Para separar a segunda fase da terceira utilizamos as apenas diferenças entre as velocidades associadas ao centro de massa de cada tecido. Dessa forma podemos diferenciar o movimento coeso de todas as células, do movimento dos dois tecidos separados. Mas note que não podemos diferenciar um sistema na fase i que seja coeso, de um sistema na mesma fase com as células se movendo como um gás ocupando todo o espaço. Nos dois casos o sistema não apresenta movimento do centro de massa, porém, só o primeiro caso é aceitável para sistemas biológicos não confinados. Esta limitação, como dita anteriormente, surge no parâmetro ϕ , que também não é capaz de diferenciar tais casos. No trabalho do Vicsek [3] ele define um novo parâmetro ϕ capaz de diferenciar estes casos, mas por simplicidade computacional, escolhemos apenas uma inspeção visual das imagens de segregação para diferenciá-los.

Analisamos o espaço de parâmetros do sistema para as três normalizações e as comparamos. No diagrama das fases, (ver fig. 4.17) vemos a separação dos três diferentes regimes de fases moventes (i,ii,iii), lembrando que estamos interessados somente no primeiro regime. As regiões hachuradas do gráfico indicam os tipos de segregação que podemos encontrar: logarítmica e lei de potência. A região densamente hachurada no gráfico é onde a segregação ocorre na forma de lei de potência. A região menos densa, é onde ocorre segregação logarítmica. Finalmente, a região não hachurada indica o conjunto de parâmetros onde não ocorre separação de tecidos.

Para as normalizações 2 e 3 a transição (i \rightarrow ii) ocorre para valores de α altos, porém o sistema perde a coesão em algum ponto entre $20v_0 < \alpha < 30v_0$. Podemos ver nas figuras 4.19 e 4.18 que para $\alpha = 20v_0$ o sistema manteve a coesão e para $\alpha = 30v_0$ o sistema se parte em

pedaços. O parâmetro de ordem, φ , não diferencia estes dois casos. Uma diferença, entre a normalização 1 e as 2 e 3, é que o valor de α que limita o sistema coeso, é maior do que o valor da transição (i→ii).

Neste capítulo, mostramos que o movimento coordenado facilita a reorganização dos diferentes tecidos, tanto no caso de segregação logarítmica (ver figura 4.15), quanto nos casos de segregação com lei de potência. No entanto, existe um limite superior para valores de α , pois se ele for muito intenso (tipicamente $\alpha > 10$) o sistema se parte em pedaços, ou ainda, pode ocorrer transição para a fase movente. Nestes mesmo gráfico (4.15) temos um caso em que o sistema se parte, para $\alpha = 7.5v_0$. Note que as curvas para este valor do parâmetro de movimento coordenado são qualitativamente diferentes das demais, evoluindo já desde o início da simulação para valores pequenos de γ . Parte desta análise, para as normalizações 1 e 2, estão publicados na referência [43].

5 *O Mecanismo de Reconhecimento*

Até o momento apresentamos os resultados para um sistema composto por dois tipos de células, onde a única diferença entre as células é a motilidade, temos uma diferença secundária que é a forma com que o movimento coordenado, α , afeta a célula. Simulando este sistema com o modelo de animóides, obtivemos tanto regimes logarítmicos como de lei de potências e o padrão final de segregação apresenta é aquele com as células mais móveis ao redor das demais, ou um sistema em anel. Entretanto, este padrão final é oposto ao obtido por Jones e colaboradores [2] em seu trabalho experimental. Aparentemente Jones e colaboradores, mesmo sem realizar simulações, deram-se conta de que apenas a diferença de velocidades não seria suficiente para explicar o experimento e propuseram um segundo mecanismo, o de reconhecimento. Vamos, então, simular este mecanismo e procurar os padrões possíveis com esta nova dinâmica.

Este mecanismo consiste em alguma propriedade celular que permita a duas células se reconhecerem como pertencentes ao mesmo tecido. Então, uma ligação mais forte se forma entre elas do que caso elas sejam de tecidos diferentes.

5.1 **Simulação no Modelo de Animóides**

Para simular o mecanismo da reconhecimento celular, precisamos que a adesão entre as células, que antes era única, passe a depender da vizinhança. Ou seja, não estamos tratando com a hipótese da adesão diferenciada, pois as células dos diferentes tecidos possuem a mesma adesão entre si, mas elas podem reconhecer se as vizinhas são do mesmo tipo, neste caso a adesão é forte, ou caso contrário a adesão é mais fraca. O parâmetro β , que para nós era uma constante, passa a ser uma matriz, onde os índices são associados aos tipos de células interagindo. Assim, aos dois termos da diagonal principal é atribuído o mesmo valor, β , pois células do mesmo tecido se aderem igualmente, e aos dois termos da diagonal secundária um valor, $f\beta$, também constante, mas menor ou igual àquele da diagonal. A matriz β assume a

seguinte forma:

$$\beta = \begin{bmatrix} \beta & f\beta \\ f\beta & \beta \end{bmatrix} \quad (5.1)$$

onde f é a fração da adesão que os tecidos diferentes (β_{\neq}) podem exercer em relação aos iguais ($\beta_{=}$), $f = \beta_{\neq}/\beta_{=}$, podendo assumir valores entre $[0,1]$: $f = 0$ significa que os tecidos não interagem entre si; $f = 1$ recai no caso $\beta_{i,j} = \beta$, que é a hipótese da velocidade diferenciada(HVD) pura em que estávamos trabalhando.

Outro fator importante, como vimos anteriormente, é a proporção de células, pois é possível que um sistema não atinja a segregação final por faltarem células de ectoderme para circundar o grupo de células de endoderme. Podemos também encontrar casos de aprisionamento onde as células não consigam superar a barreira formada pelas células de outro tipo. Assim, trabalhamos com sistemas de mesmo número total de partículas, $N = 2000$ e três proporções de células: 3:1 três células mais rápidas para cada mais lenta; 1:1 mesmo número de células dos dois tipos; 1:3 uma célula mais rápida para três mais lentas. Devido à grande quantidade de parâmetros envolvidos, vamos trabalhar com o caso $\alpha = 0$, os demais valores deste parâmetro estão nas perspectivas futuras deste trabalho. Vamos variar somente a razão de velocidades, δ , usar apenas os valores para os quais já obtivemos segregação nos estudos anteriores, i.e., $\delta = 2,3,4$. Também variaremos a fração de adesão entre os diferentes tecidos, f . Estas simulações são todas realizadas em sistemas bidimensionais.

5.2 Padrões Finais de segregação

Com a inserção do mecanismo de reconhecimento obtemos padrões mais variados do que utilizando o modelo anterior, com a adesão igual entre as células mesmo se tratando de tecidos diferentes. Para cada conjunto de parâmetros obtivemos um padrão final, que é a imagem do sistema ao final da simulação, fixamos o tempo final de simulação em $t = 10^7$, pois o sistema em todos os casos possui $N = 2000$ partículas. Classificamos todos os padrões finais em 6 categorias que se diferenciam pela presença e tipo de segregação obtida. Nem todos os padrões podem ser aceitos para uma segregação celular de um ser vivo, mas vamos utilizá-los para a construção deste espaço de parâmetros.

Unindo a HVD com o mecanismo de reconhecimento criamos padrões novos para a simulação, inclusive o mesmo estado final previsto no trabalho de Jones et al [2]. Além desses, temos a completa separação de tecidos e aprisionamento de agregados, como veremos em detalhe a seguir.

Mostramos, na fig. 5.2 três espaços de parâmetros, cada um para uma das proporções adotadas, neles variamos a diferença de velocidades entre as células, δ , e a fração da adesão entre células dos diferentes tecidos, f . As diferentes regiões implicam diferentes padrões finais. Cada cor corresponde a um dos seis padrões, (vistos na figura 5.1):

1. Azul - Segregação completa (mais lentas no interior);
2. Roxo - Segregação invertida (mais rápidas no interior);
3. Laranja - Segregação em anel;
4. Verde - Aprisionamento de células;
5. Vermelho - Tecidos com alguma união entre eles;
6. Amarelo - Tecidos separados;

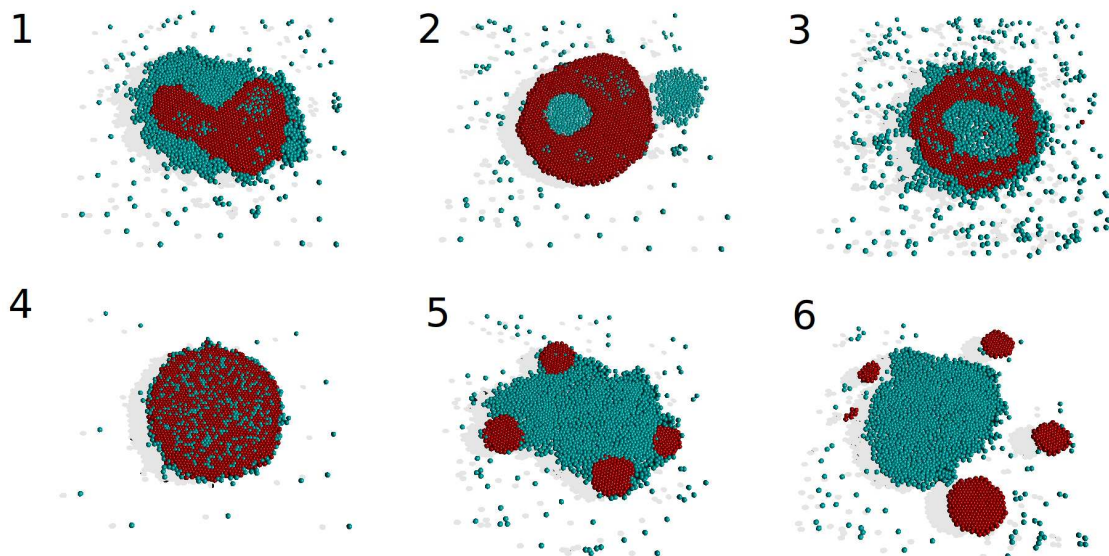


Figura 5.1: Possíveis padrões finais de segregação celular com mecanismo de reconhecimento. Os padrões finais obtidos são classificados em: 1- Segregação completa (mais lentas no interior); 2- Segregação invertida (mais rápidas no interior); 3- Segregação em anel; 4- Aprisionamento de células; 5- Tecidos com alguma união entre eles; 6- Tecidos completamente separados;

Os três espaços de parâmetros mostram claramente o quão importante é a proporção de células para a segregação ser possível e qual a sua forma. Com mais células lentas, marcadas em vermelho no espaço de parâmetros, podemos tê-las se comportando como ectoderme, que é justamente o padrão obtido por Jones et al. nos seus experimentos. Notem a necessidade

do mecanismo de reconhecimento pois sem ele as células mais lentas aprisionam as demais impossibilitando a segregação. Também podemos ter as mais lentas se comportando como endoderme, se forem em menor número, ou até formando uma camada intermediária separando duas camadas de células mais rápidas, se estiverem na mesma quantidade das outras.

Detalhando os resultados dos espaços de fase, como esperado, com a adesão pequena entre as células de tecidos diferentes, fica mais fácil para as células mais lentas formarem esferas. Consequentemente, o aprisionamento se reduz, então, esperávamos que os tecidos tendessem a se separar completamente. Como pudemos ver, se $f = 0$ não há mais aprisionamento, o que possibilita a segregação com o padrão final das células mais lentas ao redor. Isto ocorre apenas se o número de células de endoderme for suficiente, se não for, impedirá a segregação, pois sem nenhum aprisionamento as células de um tecido escapam sempre do outro. Existe a probabilidade do grupo de células mais rápidas conseguir escapar do envoltório das mais lentas, mas o tempo médio em que isto acontece é muito maior do que os tempos de segregação típicos (da ordem de 3x maiores). Interpretamos isto por um sistema biológico real, no qual as células, depois de segregar, alteram suas propriedades de forma e se mantêm com aquela configuração. Para casos sem muitas células lentas, proporções (1:3 e 1:1), apenas com $f \neq 0$ encontraremos uma segregação celular que possamos aceitar como verossímil. A medida que f aumenta podemos encontrar os tecidos se unindo cada vez mais, até que o aprisionamento se torne forte o bastante para a segregação existir com o mesmo estado final que obtínhamos sem o reconhecimento.

Sobre a segregação em anel, novamente sempre existe a possibilidade do anel de células do tecido 1 se desfazer, mas este padrão surgiu para um conjunto de parâmetros e condições iniciais aleatórias para cada um, sugerindo que este padrão é real e provavelmente seja um estado metaestável. Embora não tenhamos feito análises profundas, permitimos que o sistema evoluísse por três vezes o tempo que demorou para o anel se formar. Se neste tempo ele não se desfez, novamente adotamos um argumento biológico para sua aceitação, se as células mantiverem este padrão por tempo suficiente, no sistema real, elas podem mudar suas propriedades e manter esta estrutura. Lembrando que as nossas simulações não incluem nenhuma alteração de propriedades das células.

Finalmente, precisamos especificar a forma funcional da evolução da segregação celular nos casos com o mecanismo de reconhecimento, novamente temos leis de potência ou logarítmicas com expoentes próximos aos obtidos anteriormente, a novidade é que, na segregação invertida, podemos obter expoentes ainda menores, até $-1/3$.

Neste capítulo vimos um segundo mecanismo que pode estar presente na segregação celu-

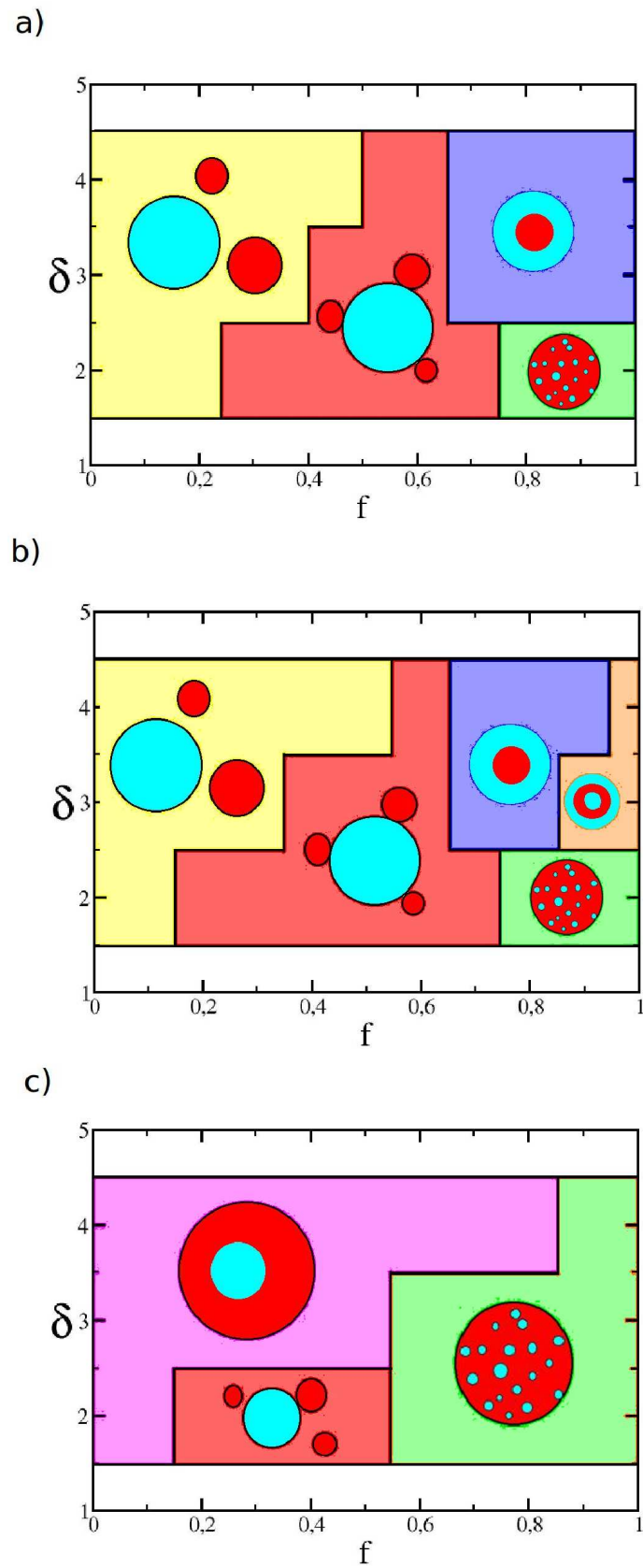


Figura 5.2: Possíveis padrões finais de segregação celular com mecanismo de reconhecimento, ver texto para detalhes. a)1:3; b)1:1; c)3:1

lar, o mecanismo de reconhecimento, mostramos uma forma de o simular com SPPs, os padrões finais obtidos tem semelhança com os obtidos na HAD, porém novos padrões foram encontrados, a segregação invertida e a segregação em anel. A evolução da segregação celular continua sendo uma lei de potência ou uma curva logarítmica, os expoentes da lei de potência variam mais do que nas HVD e HAD, pois temos os casos onde os tecidos se separam completamente.

Terminamos aqui a análise da segregação celular pelo modelo de Animoides, com a hipótese da velocidade diferenciada e a inclusão do mecanismo de reconhecimento celular. No próximo capítulo vamos abordar outro modelo de simulação para a segregação celular, que também considera células com velocidades diferentes e com o mecanismo de reconhecimento celular.

6 *O Modelo de Glazier Graner Hogeweg*

Descrevemos agora outro modelo para simular a dinâmica celular, o modelo de Glazier Graner e Hogeweg (GGH) [4]. Nós o utilizamos com o intuito de confirmar os padrões finais de segregação celular com a hipótese da velocidade diferenciada (HVD) e com o mecanismo de reconhecimento. Os dois modelos são bem diferentes em alguns pontos dificultando uma comparação direta, mas dentro do possível vamos adaptar o modelo GGH para que este contemple as características celulares necessárias a HVD.

De maneira simples, pode-se entender o modelo de Glazier, Graner e Hogeweg como uma adaptação do modelo de Potts para dinâmica celular. A base do sistema é uma rede fixa, a cada ponto da rede associa-se um índice que define a que célula pertence esse ponto da rede. Dessa forma índices distintos estão associados a diferentes células (veja fig. 6.1). A partir desses índices de estado atribui-se um valor de energia de interação entre sítios vizinhos (H): a índices iguais corresponde energia de interação nula, a índices diferentes associa-se energia positiva.

1	1	1	1	2	2	2	3	3	3
1	1	1	2	2	2	2	3	3	3
1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
1	1	2	2	2	2	5	3	3	3
1	1	4	4	4	5	5	5	3	3
4	4	4	4	4	5	5	5	6	6
4	4	4	4	5	5	5	5	6	6
4	4	7	7	5	5	5	6	6	6
4	7	7	7	7	5	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	6	6	6	6

Figura 6.1: Rede do modelo GGH, contendo os índices que associam diversos sítios as células correspondentes, σ .

A dinâmica deste sistema é do tipo Monte Carlo, ou seja, sorteiam-se dois sítios vizinhos da rede e simula-se a troca de índices entre eles, se a energia for menor que a energia antes da troca anterior então ela ocorre, caso contrário ainda pode ocorrer a troca de índices, mas com

certa probabilidade, definida a partir de uma temperatura efetiva atribuída ao sistema.

Explicitamente, para temperaturas não nulas, a probabilidade de haver troca de índices entre os sítios é dada por:

$$P = \begin{cases} e^{-\frac{\Delta H}{k_B T}} & ; \Delta H > 0 \\ 1 & ; \Delta H \leq 0 \end{cases}$$

Para $T=0$.

$$P = \begin{cases} 0 & ; \Delta H > 0 \\ 1 & ; \Delta H < 0 \\ \frac{1}{2} & ; \Delta H = 0 \end{cases}$$

Além do índice de sítios, σ , associado a diferentes células, também é atribuído a cada sítio um índice, τ , para diferenciar os tecidos celulares. Células pertencentes ao mesmo tecido têm o mesmo valor de τ . Assim na definição da energia teremos termos dependendo do tipo do tecido, assim como da célula.

Para definir a energia do sistema consideram-se os tipos dos tecidos dos sítios envolvidos na troca, $\tau(\sigma(id))$ e $\tau(\sigma(id'))$. É necessário limitar o volume celular, pois as células possuem volume finito e este varia muito pouco ao longo do processo de segregação celular. Isso ocorre por que desprezamos as poucas divisões que acontecem no processo real. Além disso, embora o volume se mantenha, a forma da célula pode variar bastante ao longo desse processo. Para levar em consideração esses aspectos, Glazier e Graner propuseram uma função hamiltoniana com três termos, o primeiro representando a energia entre sítios de células diferentes e o segundo desempenhando o papel de limitar o volume celular:

$$H_{sort} = \sum_{(id)(id')neig} J[\tau(\sigma(id)), \tau(\sigma(id'))][1 - \delta_{\sigma(id), \sigma(id')}] + \sum_{\sigma} \lambda_S [S(\sigma) - S_T(\sigma)]^2 + H_{químico} + \dots \quad (6.1)$$

onde,

- id é o número identificador do sítio da rede;
- σ é o identificador da célula, com valores de 1 ao número total de células do sistema;
- τ é o tipo do tecido. Neste trabalho ele assume três valores: 0 para o meio extracelular; 1 para célula de endoderme; 2 para célula de ectoderme.

- $J[\tau(\sigma(id)), \tau(\sigma(id'))]$ é a energia de superfície entre os tecidos e é inversamente proporcional à adesão entre as células. Por exemplo, se J não depender do tipo de célula todas as células tem mesma adesão.
- λ_S é o multiplicador de Lagrange associado ao termo de superfície;
- $S(\sigma)$ superfície (ou perímetro) total da célula σ ;
- $S_T(\sigma)$ superfície alvo (*target* do inglês) da célula, é a superfície ideal que minimiza a energia;
- $H_{químico}$ é qualquer potencial químico, interno ou externo às células.

A função hamiltoniana assim construída descreve as tensões superficiais entre células distintas e entre diferentes tecidos. Pode-se alterar esta função de energia como for conveniente para o sistema que simulamos. Já escrevemos a energia com termos adicionais, indicando as extensões possíveis para este modelo. A seguir neste capítulo acrescentaremos um terceiro termo à energia para levar em conta os efeitos de velocidade diferenciada e reconhecimento. No entanto, a inclusão de um termo de movimento coordenado, seria de difícil implementação, pois envolveria termos de energia associados ao movimento relativo de células. Nós implementamos tais termos, mas, mesmo assim, a velocidade de cada célula não pode ser totalmente controlada, o que dificulta a construção de um espaço de parâmetros.

6.1 Adaptação Adotada

A energia usada neste trabalho contém os termos de adesão, ou interação dependente do tipo de tecido, possui também o termo de volume (ou área) ideal, adicionado a estes temos o termo de alinhamento e de um deslocamento do centro de massa ideal, ver eq. 6.2.

$$\begin{aligned}
 H_{sort} = & \sum_{(id)(id')} J[\tau(\sigma(id)), \tau(\sigma(id'))][1 - \delta_{\sigma(id), \sigma(id')}] + \sum_{\sigma} \lambda_S [S(\sigma) - S_T(\sigma)]^2 \\
 & + \lambda_{\alpha} \left\{ \Delta C \vec{M}(\sigma) - \left[\sum_{\sigma_{neig}} \alpha(\sigma(id), \sigma(id')) \Delta C M_T(\vec{\tau}(\sigma)) + \alpha_A(\sigma(id)) \Delta C M(\vec{\sigma}(id)) + \alpha_R \vec{u} \right] \right\}^2
 \end{aligned} \tag{6.2}$$

Descrevendo em detalhe a eq. 6.2: o primeiro somatório descreve a interação de superfície entre as células. Variando o valor de J para os tipos de célula produzimos diferenças de adesão entre as células. Este valor é inversamente proporcional ao valor de β do modelo de animoides.

De forma análoga ao modelo de animoides, utilizamos níveis diferentes de $J(\tau, \tau')$ para produzir a HAD e o reconhecimento. No modelo anterior as diferenças estavam nas adesões. Então, se tivermos apenas dois valores de J , um valor menor para vizinhas iguais e um valor maior para vizinhas diferentes, estamos simulando o mecanismo de reconhecimento celular do Jones. Se tivermos que $J(2, 2) < J(1, 2) < J(1, 1)$ temos a condição de Steinberg para a segregação celular com a HAD, onde o tecido identificado com $\tau = 1$ forma a endoderme. Neste caso a condição de Steinberg é satisfeita com o tecido identificado por 1 formando a endoderme e o tecido 2 formando a ectoderme.

O segundo termo da hamiltoniana é o termo de volume, no caso 2d termo de superfície da célula. Este termo minimizará a energia quando a superfície da célula for igual ao valor da superfície alvo, S_T . Este valor pode depender do tecido da célula, porém neste trabalho ele será único.

O terceiro termo da hamiltoniana descreve o caráter auto-propelente das células. Nele, minimizamos a energia caso o deslocamento do centro de massa da célula, ΔCM , seja igual ao deslocamento ideal. Regulamos a importância deste termo em relação aos outros pelo multiplicador de Lagrange λ_α . O deslocamento ideal é composto por três partes: na primeira temos a tendência das células se alinharem com a vizinhança, para isto introduzimos o conceito de variação de centro de massa alvo, CM_T , desta forma o movimento coletivo passa a ser possível. Também temos a auto-persistência da célula, este termo simula o efeito de memória da célula [42], mediado pelo parâmetro α_A . Finalmente, colocamos uma direção aleatória de movimento, o vetor unitário \vec{u} , mediado pelo alfa aleatório, α_R .

Com este hamiltoniano temos um sistema onde as células possuem um volume ideal, podem movimentar e tendem a seguir a vizinhança, características observadas em sistemas celular reais [17]. Outra característica presente nesta hamiltoniana é a da auto-persistência de cada célula. A limitação deste modelo é que não podemos garantir que as células tenham sempre uma velocidade fixa, o que dificulta a construção de um espaço de parâmetros. Então, no modelo GGH, nos limitamos a simular a evolução da segregação para alguns parâmetros e comparar os resultados com o modelo de animoides. Também exploramos os possíveis padrões finais de segregação.

Para executar as simulações no modelo GGH utilizamos o CompuCell3D [44], que é uma interface gráfica para simular a dinâmica celular com o modelo básico de GGH. Ela permite, que o usuário crie suas próprias extensões desejadas, com pouca programação adicional. Toda a programação adicional foi feita na linguagem python, que é de fácil aprendizado e programação.

Nos trabalhos com modelo GGH, e derivados, é comum usar o tamanho da interface entre

os tecidos diferentes, como medida da segregação. Nas simulações com animoides a medida da interface entre os tecidos é de difícil implementação, pois envolveria usar algoritmos de contagem de agregados ao longo da simulação de evolução. Por essa razão foi definido o parâmetro γ naquele contexto. Por outro lado, no modelo GGH as duas medidas podem ser realizadas sem grandes custos, assim aproveitaremos a oportunidade para verificar a equivalência entre essas medidas.

No próximo capítulo mostramos os resultados obtidos com a energia de troca, eq. 6.2. Primeiro consideramos as células com auto-persistência diferenciada, que é a forma mais próxima da velocidade diferenciada que simulamos com animoides. As células de diferentes tecidos tendem a manter seu movimento com velocidades alvo diferentes, o que faz que os passos sejam diferentes. No entanto, dado o caráter estatístico do algoritmo, na prática, as razões entre as velocidades flutuam. Depois, como no modelo com animoides, procuramos os padrões quando incluímos tanto células com movimento coordenado quanto com mecanismo de reconhecimento.

7 *Resultados com o Modelo GGH*

Comparamos os resultados de segregação celular do modelo de animoides com simulações executadas no modelo GGH no CompuCell3D. Mostramos uma comparação entre o parâmetro típico de medida de segregação celular dos dois modelos e as suas evoluções na hipótese da Velocidade Diferenciada (HVD). O enfoque deste trabalho não é o modelo GGH apenas apresentamos alguns resultados para mostrar a possibilidade de equivalência dos modelos.

7.1 **Equivalência entre Parâmetros de Medida da Segregação**

Em trabalhos com o modelo GGH é usual medir a segregação celular pela soma de todas as interfaces entre células de diferentes tecidos. Porém, no modelo de animoides, como mencionada anteriormente, essa superfície é computacionalmente custosa de ser determinada, pois envolve a implementação de um algoritmo de identificação de agregados. Bem mais simples é fazer a contagem da fração de vizinhos pertencentes a tecidos diferentes e assumir que isto seja proporcional à interface. No programa `compuCell3d` [44], porém, esta mesma contagem pode ser facilmente feita e, junto com ela, a medição da interface. Assim podemos comparar os resultados dessas medidas.

Na *fig. 7.1* mostramos a comparação das medidas de γ e S . Como a superfície de interface é proporcional ao parâmetro γ , podemos comparar as formas funcionais dos dois modelos, não importando qual a medida espacial de segregação apresentada (γ , superfície de interface, tamanho característico, raio dos grupos de célula, etc.) pois todas são proporcionais. Mais adiante neste trabalho usaremos como medida de segregação a contagem do número médio de células nos agregados, nesse caso a medida está relacionada com o quadrado do raio dos grupos.

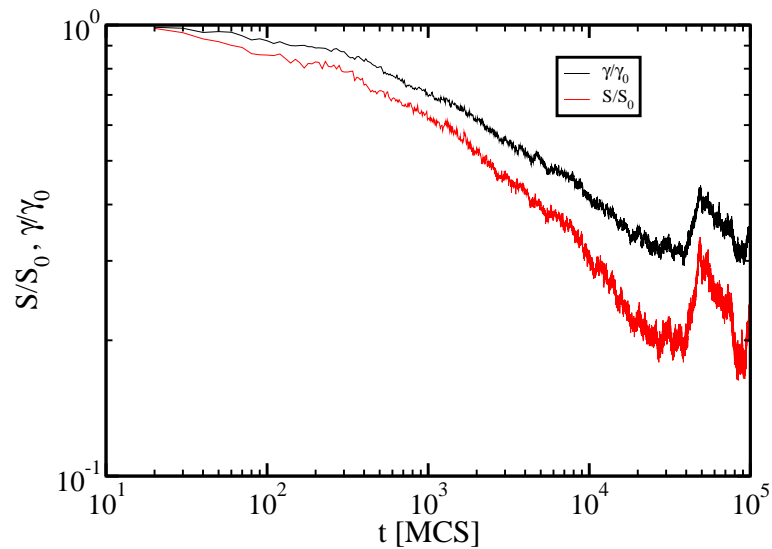


Figura 7.1: A evolução tanto de γ quanto da superfície de interface, S , seguem formas similares.

7.2 Resultados na Hipótese da Velocidade Diferenciada

Primeiro vamos mostrar os resultados para a HVD pura, o que no modelo GGH significa que as células possuem $\alpha_A \neq 0$. Neste caso o $\alpha(\sigma) = 0$, pois não teremos alinhamento com vizinhos e os valores de J não dependem da célula, sendo fixados em $J_{célula} = 5$. No modelo de GGH também deve ser definida a energia de interação entre as células e o meio. Para evitar que o agregado de células se parta, um valor alto para essa energia é escolhido, no nosso caso usamos $J(\text{meio}, \text{célula}) = 50$. Para os demais parâmetros o meio não é considerado, então sempre trataremos o meio com valor nulo. Nosso resultado com apenas a velocidade diferenciada é bastante similar ao obtido com o modelo de animóides, ver fig. 7.2. A evolução do parâmetro γ parece seguir uma lei de potência, porém não temos nem uma década completa, dessa forma não faz sentido falar em valores dos expoentes da lei de potência. Isso ocorre pelo tamanho do sistema ser muito pequeno, com apenas $N = 384$ células.

Mostramos apenas este resultado para a HVD no modelo GGH, pois este não era o modelo central de simulações celulares deste trabalho. Apenas simulamos alguns casos isolados, sem montar nenhum espaço de fase, para mostrar que os resultados nos dois modelos são equivalentes.

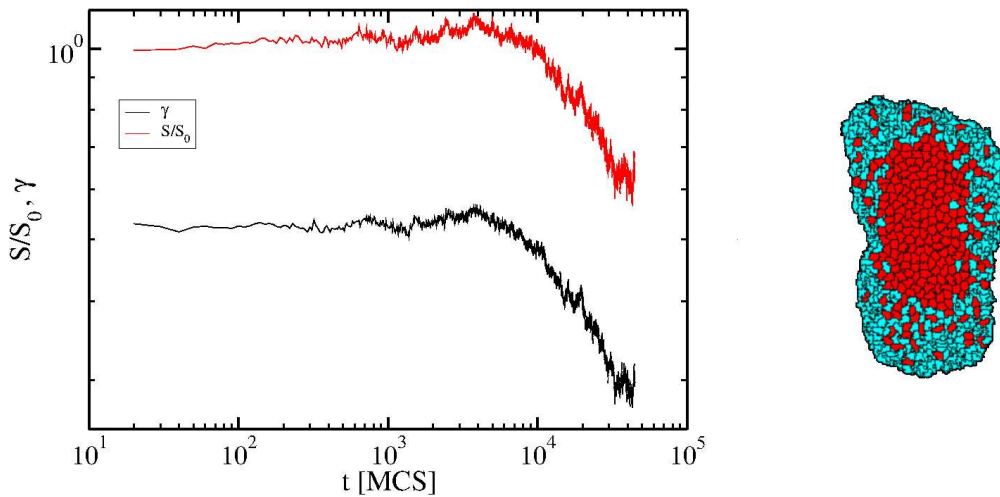


Figura 7.2: À esquerda temos a evolução tanto de γ quanto da superfície de interface sobre o valor inicial, S/S_0 , para sistema onde as células apresentam apenas diferença de velocidade $\alpha_A = [0.2, 0.4]$. À direita temos o padrão final para o sistema, com $t \sim 10^5 \text{MCS}$, onde MCS, é um passo de Monte Carlo.

7.3 Padrões Finais com o Mecanismo de Reconhecimento

Utilizando a hamiltoniana com as nossas extensões de alinhamento com a vizinhança podemos simular o mecanismo de reconhecimento celular. Não vamos refazer os espaços de parâmetros por que não podemos controlar a velocidade das células de cada tecidos, e também por que a adesão entre as células entra de forma inversa ao modelo de animóides. O caso onde todas as adesões são iguais é facilmente simulado usando-se energias de ligação idênticas. Porém o caso onde os tecidos diferentes não interagem não é tão simples, para simulá-lo neste modelo, precisaríamos de uma energia de ligação tendendo ao infinito, pois este limite corresponde a adesão nula no modelo de animóides. Também levar em conta as energias de ligação com o meio que não possui correspondente no modelo de animóides. Vamos, então, procurar se os padrões de segregação encontrados no modelo de animóides também são obtidos com esta adaptação do GGH.

Variando a proporção de células de cada tipo e os níveis de adesão, pudemos reproduzir os resultados obtidos com o modelo de animóides. Precisamos ressaltar algumas diferenças, para obter esses padrões foi necessário variar a energia de ligação com o meio para manter o sistema coeso. O padrão em anel não foi encontrado, provavelmente devido ao tamanho reduzido do sistema em GGH. Nesse modelo cada célula é composta por aproximadamente 25 pixels, o que limitou o tamanho do sistema a menos de 400 células, $N = 384$.

Para procurar pelo padrão final em anel precisaríamos percorrer o espaço de parâmetro de

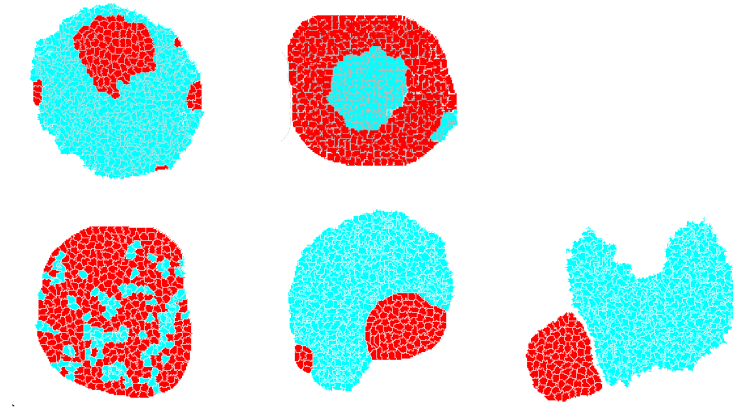


Figura 7.3: Padrões finais de segregação no modelo GGH, até o momento não obtivemos o padrão em anel.

α e das velocidades, dado que já tenhamos encontrado o valor de adesão J adequado. Isto ficará como uma perspectiva de continuação deste trabalho.

8 *Modelo de Agregado Médio*

Neste capítulo nosso objetivo é estudar o problema da segregação celular do ponto de vista estatístico, vamos construir equações diferenciais que descrevem o problema considerando algumas simplificações. Primeiro vamos aproximar o sistema como contendo apenas um tipo de células, a endoderme, que se agregam desprezando as demais. Dessa forma toda a influência da ectoderme estará implícita dentro dos parâmetros. Além disso, vamos trabalhar apenas com valores médios de agregado, dessa forma, temos apenas um tamanho possível de agregado de endoderme e este tamanho evolui com o tempo. Outra aproximação que tomaremos é que todas as fusões de agregados são irreversíveis. Compararemos os resultados analíticos deste modelo com os obtidos para a segregação celular em simulações adotando duas hipóteses distintas [43, 15] e com os experimentos de Méhes [17].

O objetivo deste primeira abordagem é explicar o expoente obtido para a segregação celular (valores entre (-0.23,-0.18) para simulações) com uma modelagem do tipo agregado-agregado (*cluster-cluster aggregation* em inglês) e também, tentar compreender os limites impostos pelos efeitos de tamanho finito das amostras. Consideramos que todos os grupos (ou agregados) de células da endoderme podem se difundir, colidindo com outros agregados e se transformando em grupos maiores irreversivelmente. A difusão depende da massa do agregado através de uma lei de potência, cujo expoente é α . Nossa aproximação é que todos os agregados possuem a mesma massa (ou número de células) em um dado tempo [19] e que o crescimento do tamanho médio se dá por fusão de agregados. Assim, ao ocorrer uma fusão, o aumento de massa de um agregado deve ser proporcional à massa média dos agregados naquele momento, ou seja,

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m}{\tau}, \quad (8.1)$$

onde τ descreve o tempo característico para o encontro entre grupos de m células.

Nesta equação ainda não temos um valor máximo de m , então, ela descreve a fusão de agregados no limite do tamanho do sistema infinito, porém, com densidade finita de agregados. Em um processo de difusão normal o tempo característico τ depende da distância média entre agre-

gados, L , e da constante de difusão, $D(m)$. Esta constante depende da massa do agregado [19], veja eq. 8.2, (o expoente α não está relacionado com o parâmetro de mesmo nome do modelo de animóides). Para uma partícula em movimento browniano no equilíbrio, a relação de Einstein é válida e temos $\alpha = -1$ [45]. Isto pode ser entendido pois, no caso de partículas brownianas ligadas por molas, a informação da direção da velocidade não é transmitida, como consequência, a difusão é cada vez menor com o aumento de massa. Já para um grupo de partículas com movimento coletivo, como no modelo de Vicsek, há difusão de informação da direção da velocidade entre os vizinhos e isto pode alterar a dependência da constante de difusão com a massa, essa alteração dependerá da intensidade do termo de movimento coletivo.

$$D(m) = m^\alpha \quad (8.2)$$

A distância média entre agregados, L , pode ser determinada a partir do volume total do sistema, V , e do número instantâneo de agregados, n . O número de células, ou a massa total, do sistema M_0 é conservado de forma que em qualquer instante podemos determinar o número de agregados n a partir da relação, $n = M_0/m$. Então, para um sistema de dimensão d teremos:

$$L = \left(\frac{V}{n}\right)^{1/d} = \left(\frac{mV}{M_0}\right)^{1/d} = \left(\frac{m}{\rho}\right)^{1/d} \quad (8.3)$$

onde, ρ é a densidade média de células. O desvio quadrático da posição de um agregado em difusão aleatória independe da dimensão, d , do sistema e está diretamente relacionado com a constante de difusão, D e com o tempo de difusão. Se tomarmos a raiz quadrada da flutuação de posição está relacionada com a distância característica que um agregado varre, quando esta for da ordem de L , teremos uma estimativa do tempo de fusão a partir de $L^2 = D\tau$. Finalmente, supondo que a constante de difusão dependa da massa com descrito acima, teremos:

$$\tau \propto \frac{L^2}{D} = \frac{m^{\frac{2-d\alpha}{d}}}{\rho^{\frac{2}{d}}} \quad (8.4)$$

Substituindo esse valor de tempo característico na equação diferencial acima, eq. 8.1, encontramos,

$$\frac{dm}{dt} = am^{1-\frac{2-d\alpha}{d}}, \quad (8.5)$$

onde a é uma constante de tempo, que também inclui a densidade, ρ , e a parte independente da

massa da constante de difusão. Essa equação possui solução analítica, que é escrita como:

$$m(t) = \sqrt[2-d\alpha]{\left(\frac{2a - a\alpha d}{d}(t - t_0) + m_0^{2/(d-\alpha)}\right)^d} \propto t^{d/(2-d\alpha)} \quad (8.6)$$

que coincide com a solução encontrada por Kolb [19] nos casos de dimensão não fractal. Esses expoentes serão válidos dentro de dois limites, onde o tamanho do agregado médio seja muito maior do que 1 e simultaneamente muito menor que a massa total do sistema. Para os demais casos que vamos descrever teremos soluções analíticas transcendentais, que vamos escrever de forma genérica. Os casos realmente úteis vamos escrever com detalhes no Apêndice A.

Experimentos com agregados celulares sempre envolvem um número grande de células, mas esse número é finito de forma que ao final do processo chegamos a um único agregado que inclui a maior parte das células do tecido endoderme. Também o tamanho dos agregados que se formam ao longo do processo não é desprezível se comparado ao tamanho de uma célula, principalmente no início do processo. Precisamos, assim, estender a validade das equações obtidas até agora. Procuramos adicionar termos na equação diferencial que incluam os efeitos de tamanho finito do sistema e das células. Inicialmente vamos introduzir um tamanho máximo no sistema, b , que o agregado médio deve atingir assintoticamente. A condição inicial utilizada na equação é o tamanho inicial do agregado médio, m_0 , todos os agregados do sistema possuem o mesmo tamanho, mas no sistema real apenas alguns agregados realmente se fundem, para modelar este efeito introduziremos um tamanho mínimo efetivo para os agregados, c . Ao fazer isso não esperamos mais uma lei de escala para todo o tempo, apenas para tempos intermediários, se os tamanhos b e c forem suficientemente diferentes ($b \gg c$). Para tempos curtos ou muito longos esperamos um desvio dessa tendência e um valor máximo de saturação do sistema.

A primeira extensão diz respeito ao tamanho máximo do agregado, imporemos então um tamanho máximo, ou massa máxima, b . Alteraremos a equação para que a derivada temporal do tamanho médio de agregado se anule quando o sistema atingir b . Isto é o que está descrito pela equação 8.7 abaixo. Essa e as demais equações propostas possuem solução analítica, apesar dessas serem transcendentais. Mostraremos as soluções na seção de resultados também mostraremos que as soluções obtidas tem como limites a solução obtida por Kolb [19].

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m}{\tau} \left(1 - \frac{m}{b}\right) = am^{1-\frac{2-d\alpha}{d}} \left(1 - \frac{m}{b}\right) \quad (8.7)$$

Outra adaptação à equação 8.5 refere-se ao limite inferior para a massa dos agregados. Atribuímos um valor mínimo de massa para o agregado como uma forma de simular os efeitos da fragmentação de agregados no sistema e esperamos que essa alteração seja mais importante

no início da evolução do sistema, pois é quando os agregados tem menor massa.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(m-c)}{\tau} = am^{-\frac{2-d\alpha}{d}}(m-c) \quad (8.8)$$

Por último, unimos ambas as alterações em uma única equação 8.9. Esperamos obter um comportamento amplo que descreva a dinâmica do início ao fim das agregações celulares.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(m-c)}{\tau} \left(1 - \frac{m}{b}\right) = am^{-\frac{(2-d\alpha)}{d}} \left(1 - \frac{m}{b}\right) (m-c) \quad (8.9)$$

Lembrando que todas estas adaptações são feitas dentro da aproximação de agregado médio, ou seja, de que todos os agregados possuem a mesma massa/tamanho. Então, nas situações onde os tamanhos de agregado apresentem diferenças significativas com relação ao valor médio, esperamos desvios da nossa modelagem. Outra limitação deste modelo é quanto a irreversibilidade das fusões de agregados: não consideramos a possibilidade de fragmentação. Para considerar variação no tamanho dos diversos agregados num dado instante de tempo e a fragmentação precisamos de métodos mais genéricos, como a equação de Smoluchowski, que veremos no capítulo 10.

No próximo capítulo mostramos as soluções analíticas para as equações do agregado médio. Primeiro vamos mostrá-las na sua forma mais genérica e depois para valores utilizados nas comparações com as simulações e com os experimentos.

8.1 Os Experimentos de Méhes

Apresentamos os resultados do trabalho de Méhes [17], pois ele possui dois experimentos de segregação celular que podem servir como base para o ajuste dos parâmetros do modelo de agregado médio.

Os experimentos consistem em misturas binárias de células, os tipos de célula utilizados são: HaCat (linhagem imortalizada de queratinócito humano), PFK (células primárias de queratinócito de peixe) e EPC (linhagem imortalizada de queratinócito de peixe). As misturas adotadas foram: HaCat + EPC e PFK + EPC. O sistema está disposto em uma mono camada de células, no estado confluyente, ou seja, as células ocupam todo o espaço disponível. As medidas foram feitas ao longo de aproximadamente vinte horas.

Na figura 8.1, vê-se os padrões de segregação, após 15h de experimentos. E, também, as medidas de diâmetro para os dois tecidos envolvidos. Porém, estamos interessados, apenas,

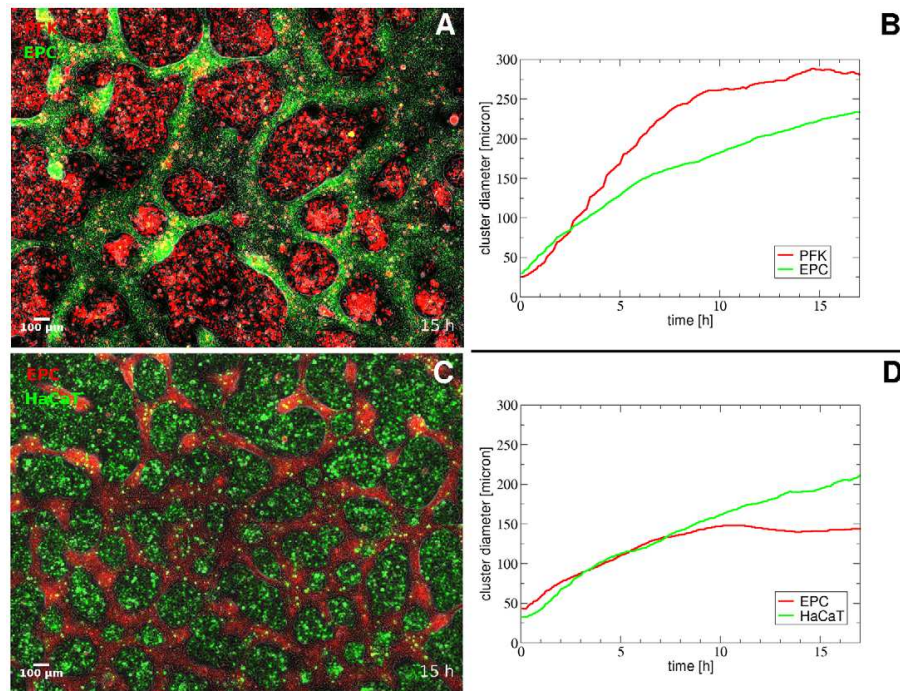


Figura 8.1: A - Padrão de segregação de PFK + EPC após 15h. B - Medidas do diâmetro médio dos agregados de cada tecido. Para A e B : em verde o EPC e em vermelho o PFK. C - Padrão de segregação de HaCaT + EPC após 15h. D - Medidas do diâmetro médio dos agregados de cada tecido. Para C e D: em verde as células de HaCaT, em vermelho o EPC.

na evolução da endoderme, pois o MAM despreza a dinâmica da ectoderme, aproximando-a pelo meio. Nas imagens A e C da fig. 8.1, observa-se que, nos dois experimentos o EPC se comportou como a ectoderme. Por este motivo, vamos nos referir as duas misturas pelo nome do tecido da endoderme.

9 *Resultados com Modelo de Agregado Médio*

As leis de escala para a evolução do tamanho do agregado médio na segregação celular, tem expoentes muito variados, no intervalo $[0.2, 2]$. Utilizamos uma equação diferencial que nos permita compreender a dinâmica para um sistema infinito de forma simples e a modificamos para os limites finitos do sistema real. Vamos utilizar primeiro uma característica experimental dos agregados, que pode ser vista nas imagens do trabalho de Méhes et al [17]. A cada instante de tempo nota-se um tamanho de agregado característico, então, escrevemos uma equação diferencial, eq.8.5, que descreve a fusão de agregados com outros agregado de mesmo tamanho para um sistema infinito, esta equação está de acordo om os resultados obtidos por Kolb [19]. Como descrito anteriormente, as soluções para esta equação assim como as de Kolb, são leis de potência $m(t) \sim t^{d/(2+d\alpha)}$, onde d é a dimensão do sistema, α é o expoente que relaciona a massa e a difusão, $D \propto m^\alpha$, e m é a massa (ou o tamanho) do agregado médio.

As equações para sistema infinito, assim como as de Kolb, são válidas apenas dentro de dois limites, a massa do agregado médio deve ser muito maior que o inicial e também deve ser muito menor que a massa total do sistema. Estendemos a equação para contemplar os casos fora destes limites, propusemos três extensões, desta forma temos quatro modelos para representar o sistema:

1. Sistema infinito: o caso estudado por Kolb;
2. Sistema finito: a equação impõe um limite de tamanho de agregado;
3. Sistema infinito com tamanho mínimo de agregado: esta equação impõe um tamanho mínimo de agregado;
4. Sistema finito e com tamanho mínimo de agregado: com as duas correções agrupadas esperamos que a equação se ajuste por toda a evolução, independente do valor do agregado médio;

Com as adaptações, as equações se tornam mais complexas, podemos escrevê-las de forma genérica, analítica, mas transcendental. Como vemos na eq. 9.1, onde a função $G(m_0)$ é a função $G(m)$ no instante inicial, e a função $G(m)$ é uma função hipergeométrica de Gauss [46].

$$t(m) = G(m) - G(m_0) \quad (9.1)$$

Esta função é genérica, cada caso resulta em funções diferentes dependendo da dimensão do sistema, d e do expoente da difusão α . Vamos escrever as soluções para valores de α e d relevantes a este trabalho, no Apêndice A.

9.1 Aproximação de Sistema Infinito

Reescrevemos as equações diferenciais por praticidade de leitura e acrescentamos as respectivas soluções analíticas.

$$\frac{dm}{dt} = am^{1-\frac{2-d\alpha}{d}} \quad (9.2)$$

cuja solução é dada por:

$$m(t) = {}^{2-d\alpha}\sqrt{\left(\frac{2a - a\alpha d}{d}(t - t_0) + m_0^{2/(d-\alpha)}\right)^d} \propto t^{d/(2-d\alpha)} \quad (9.3)$$

Nos demais casos as soluções são analíticas mas transcendentais. Ou seja, obtemos a dependência do tempo com relação ao tamanho característico do agregado médio, mas não podemos inverter a equação obtendo a relação inversa. Então, escrevemos as equações para $t(m)$ e mostramos em gráficos as funções para $m(t)$ nos casos interessantes. As soluções bidimensionais foram obtidas através de integração simples, porém os casos tridimensionais são mais complexos, resolvemos com o auxílio do *site* wolfram alfa [47]. Este *site* nos retorna soluções para as integrais indefinidas dos casos 3D, mas não mostra que método de resolução foi adotado, então, após exibir todas as soluções, nós comparamos às soluções numéricas obtidas pelo método de Euler e verificamos que estão corretas. Além disso, verificamos analiticamente os limites dessas soluções com as obtidas para o sistema com tamanho infinito.

9.2 Limites Finitos Superior e Inferior

Abordamos o sistema com as limitações de tamanho finito, tanto o tamanho máximo para o agregado médio, quanto o valor mínimo de agregação. Apresentamos a solução genérica para a equação diferencial completa. Os casos com apenas uma das duas limitações e as soluções para parâmetros específicos estão dispostos no Apêndice A.

Relembramos na equação 9.49.4 abaixo a expressão para a evolução do agregado médio.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(m-c)}{\tau} \left(1 - \frac{m}{b}\right) = am^{-(d-2)/d} \left(1 - \frac{m}{b}\right) (m-c) \quad (9.4)$$

Esta equação possui solução genérica transcendental, que é dada pela eq. 9.5. A solução é composta por duas funções hipergeométricas, para tamanho de agregado: a primeira contém a limitação mínima; a outra contém o tamanho máximo.

$$\begin{aligned} G(m) = & \frac{1}{ac(d\alpha-2d)(b-c)} \left[dm^{-\alpha+\frac{2}{d}+1} \right. \\ & (b {}_2F_1[1, -\alpha + \frac{2}{d} + 1; -\alpha + \frac{2}{d} + 2; m/c] \\ & \left. - c {}_2F_1[1, -\alpha + \frac{2}{d} + 1; -\alpha + \frac{2}{d} + 2; m/b] \right) \end{aligned} \quad (9.5)$$

Como discutiremos em detalhe a seguir, os parâmetros b e c afetam a evolução do agregado médio de forma diferente.

9.3 Evolução do Tamanho do Agregado Médio

Primeiro vamos mostrar como cada caso de limitação finita altera a evolução do sistema, e depois vamos comparar os resultados deste modelo com os resultados de simulações deste trabalho, com a hipótese da adesão diferenciada(DAH) [15] e, também, com resultados experimentais extraídos do trabalho de Méhes [17].

No primeiro gráfico, fig. 9.1 podemos ver a influência de cada caso na evolução do tamanho do agregado médio. Em sistemas infinitos, caso 1, temos uma curva que começa em $m = m_0$ e logo após segue a lei de potência, $m(t) \sim t^{1/2}$. Em sistemas com tamanho máximo de agregado, caso 2, a evolução inicia da mesma forma que para sistemas infinitos. Quando m se aproxima do valor do tamanho máximo do sistema, b , a curva se estabiliza chegando a saturação do sistema, como era esperado. Para o caso de sistema infinito que tenha um tamanho mínimo de agregado, c , a evolução de m é mais afetada no início, depois a curva se encontra com a lei de potência

para sistemas infinitos. Isto não ocorre no caso 4, onde, além de tamanho mínimo de agregado, temos também o tamanho máximo para o agregado, ou seja, o sistema tende a se aproximar da lei de escala, mas a limitação de tamanho finito faz com que o sistema encontre a saturação. Então, dependendo das constantes b e c , pode-se não ver a lei de potência nos limites de Kolb.

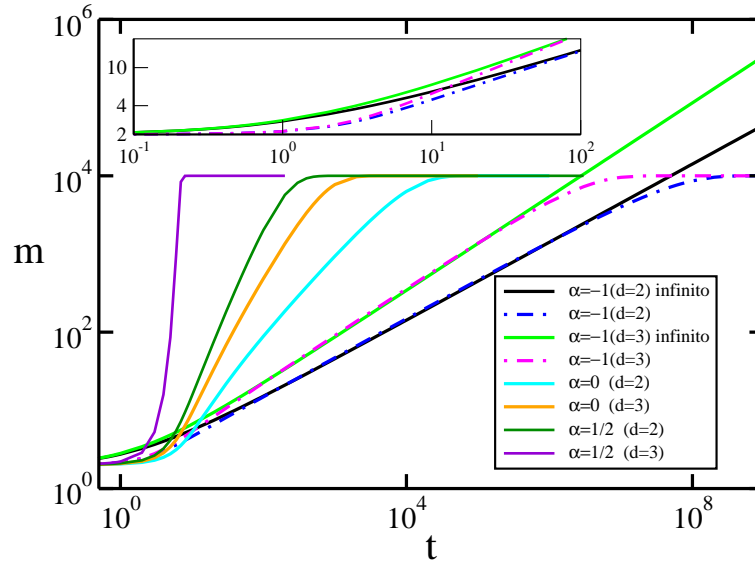


Figura 9.1: Curvas de evolução do tamanho característico do agregado médio em sistemas bidimensionais para cada um dos casos. No subplot temos um zoom intenso, para podermos visualizar em detalhe a diferença nas soluções para sistemas com tamanhos mínimo não nulo.

Como mencionado no capítulo 8, o coeficiente de difusão de agregados de partículas sem movimento coletivo depende inversamente da massa desses agregados, ou seja, na equação 8.2 teremos $\alpha = -1$. Para esse valor, temos uma evolução lenta, uma lei de potencia com $m \sim t^{1/2}$ em 2D, para valores maiores de α , temos agregação de grupos mais rápida. Em casos experimentais veremos que o expoente α poder ser nulo ou mesmo positivo. Isso indica que se, a difusão não cair rapidamente com a massa, o sistema pode se agregar mais rapidamente. O significado físico de α para valores maiores do que -1 é importante para a matéria ativa, quando α cresce os agregados não perdem a mobilidade da mesma forma que matéria inerte, pois as partículas se alinham com a direção de movimento, se $\alpha = 0$, o crescimento do agregado não afeta a difusão. Se $\alpha > 0$ temos outro caso interessante, a medida que o agregado cresce eles se difundem ainda mais rápido. De fato, os casos onde a constante de difusão aumenta com a massa do agregado devem ocorrer até um certo tamanho de agregado, para ser fisicamente razoável.

9.4 Comparação com Simulações e Experimentos

Para comparar o modelo de agregado médio com as simulações, em HVD e DAH, com experimentos e, depois, com resultados com a equação de Smoluchowski, precisamos de uma medida unificada, pois os dados experimentais [17] mostram o diâmetro médio dos agregados. As simulações tem como resultado o parâmetro γ , que é proporcional à superfície total dos agregados, enquanto o modelo do agregado médio, trata da massa do agregado.

Os dados experimentais foram convertidos de diâmetro de agregado para área (ou massa) de agregado. Nós consideramos que a massa das células seja constante e que os agregados sejam aproximadamente circulares (o experimento é feito em mono-camada de células). Para as simulações, temos a medida de γ que, como vimos anteriormente com o modelo GGH, é proporcional à superfície total dos agregados. De forma semelhante ao feito para os dados experimentais, poderíamos converter a medida de γ para obter a evolução média da massa, mas, como dispomos dos dados das posições das partículas em diferentes tempos, podemos fazer a contagem direta do número de células por agregado e fazer a média. Fazemos isto com um algoritmo de contagem de agregados baseado no algoritmo de Hoshen-Kopelman [52]. Assim como nos dados experimentais, desconsideramos os agregados muito pequenos, pois eles podem ser resultados da fragmentação de agregados, que não está incluída no modelo.

Vamos, então, procurar nos parâmetros do modelo de agregado médio (MAM) qual a combinação que melhor ajusta os dados (experimentais ou de simulação). Duas formas foram adotadas, na primeira, invertemos os eixos dos dados de entrada para utilizar a função de ajuste não linear do programa xmgrace, lembrando que as soluções estão definidas apenas para $t(m)$. A segunda forma de ajuste é mais direta: escolhemos parâmetros por tentativa e minimizamos o erro com relação aos dados.

Na fig. 9.2 mostramos o ajuste do modelo de agregado médio com as simulações de DVH e DAH usando animoides. Ao final das simulações usando DVH ou DAH restam muitas células de endoderme dispersas na ectodermo. Assim, para podermos comparar com a dinâmica de agregado médio desconsideramos agregados menores do que um tamanho de corte. No caso, escolhemos considerar apenas os agregados com mais do que 5 células. Nos dados experimentais os agregados pequenos já foram extraídos. Os autores consideraram que células isoladas podem estar mortas e por isso devem ser desprezadas.

Para comparar os tempos e valores de tamanho de agregado em sistemas tão diferentes, reescalamos os eixos em função dos parâmetros de ajuste do MAM. Dessa forma, na fig. 9.2, temos nos eixos $m^* = m/m_0$ e $t^* = t/a$, assim todas as curvas iniciam com $m^* = 1$, pois a

massa e o tempo estão adimensionalizadas.

Os parâmetros associados às curvas não reescaladas são interpretados da seguinte forma: o parâmetro a define a escala temporal, tendo dimensões de inverso do tempo. O parâmetro b , é o número total de células que formam a endoderme, o parâmetro c leva em consideração o fato que nem todas as células agregam e o parâmetro m_0 é o valor inicial de tamanho do agregado. Nesse ajuste, o parâmetro α foi mantido em -1 , pois essas simulações iniciais foram feitas abaixo do limite de transição para o movimento coletivo. Fizemos simulações específicas, mostrando a dependência da difusão com a massa (não apresentadas aqui), para esses casos, que corroboram a correção desse valor. Na fig. 9.2, os dados de simulação de HVD estão representados por triângulos em verde claro. A curva do MAM ajustada para a HVD é representada por uma linha verde escura, onde, os valores dos parâmetros são: $a = 0.009$, $b = 2000$, $c = 9.0$ e $m_0 = 11.5$. Para a HAD temos os dados em triângulos para baixo na cor roxa. O ajuste para a HAD esta representado pela linha em ciano e os valores dos parâmetros de ajuste são: $a = 0.00105$, $b = 1600$, $c = 2.2$ e $m_0 = 7.18$. Nas simulações fixamos os parâmetros b e m_0 pois obtemo-los diretamente das simulações e ajustamos os outros valores.

No artigo de Méhes [17], estão dispostos os resultados para experimentos de segregação com misturas binárias de três tipos de células: HaCat (linhagem de queratinócito humano), PFK (queratinócitos primários de peixe) e EPC (linhagem de queratinócito de peixe). As misturas feitas foram: PFK + EPC e HaCat + EPC. Em ambas, o EPC se comporta como a ectoderme, sendo, então, omitido.

Nos experimentos, não temos dados precisos de valor inicial e final de tamanho de agregado, então, eles são deixados livres nos ajuste dos dados. Além disso, nos trabalhos experimentais, a possibilidade de dependência não trivial (i.e. $\alpha \neq -1$) da difusão com a massa do agregado manifesta-se através da persistência direcional de grupos de células mencionadas no trabalho de Méhes e colaboradores [17]. Por essa razão, fizemos o ajuste de dados liberando também o parâmetro α . Na fig. 9.2, os dados de Méhes para o PFK estão marcados como quadrados em magenta, os dados de HaCaT estão mostrados em círculos vermelhos. Os demais parâmetros obtidos para PKF são $a = 65.0$, $b = 330$, $c = 23$ e $m_0 = 25.26$, linha preta na fig. 9.2. E no HaCat os parâmetros são $a = 3500$, $b = 6000$, $c = 29$ e $m_0 = 32$, cuja a curva correspondente é a linha em azul na figura 9.2. Os valores obtidos para b são bem menores do que os valores citados no trabalho de Méhes. Isto é devido as células pararem de segregar antes de obter o estado com um único agregado de endoderme. Isto pode ocorrer em sistemas biológicos pois as células podem morrer, parando de segregar.

Ainda na mesma figura temos as comparações com os experimentos. Note que os experi-

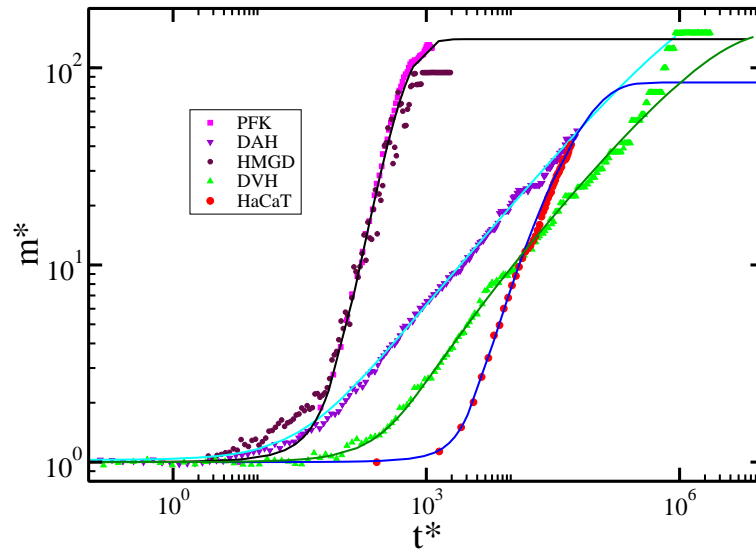


Figura 9.2: Dados experimentais ajustados: PFK (quadrado, magenta), cujo ajuste (linha preta); HaCaT(círculo, vermelho) ajustada por (linha azul). Dados de simulações ajustados: DVH (triângulos para cima, verde claro) ajustado por (linha verde escura); DAH (triângulo para baixo, roxo) ajustado por (linha ciano). Marcada em (círculo, marrom) temos os dados para simulação com a hipótese da motilidade de grupo diferenciada, que será detalhada na próxima seção.

mentos não possuem a mesma inclinação das simulações. Como desconsideramos os casos que o sistema entra em movimento coletivo, os resultados de simulação são ajustadas pelo valor de $\alpha = -1$, ou seja, as células que compõe a endoderme não estão na fase movente. Já a curva de HaCaT possui uma inclinação maior, o valor de melhor ajuste é $\alpha = 0$, sugerindo que as células de endoderme estão na fase movente, ou de movimento coletivo. No experimento com PFK, o movimento coletivo é mais acentuado, e o melhor ajuste ocorre para $\alpha = 0.5$. A presença da fase movente na segregação fica clara no trabalho do Méhes [17] onde, foi observado, que as células de PFK apresentam movimento coletivo muito mais intenso que no HaCaT.

9.5 Hipótese da Motilidade de Grupo Diferenciada

Na seção anterior, mostramos as comparações do modelo de agregado médio com os dados de experimentos e simulações, fig. 9.2. Nota-se que as inclinações, na região com lei de potência, são diferentes entre os dados experimentais e as simulações com HVD e HAD. Isto indica a presença de um mecanismo, mais poderoso, responsável pela segregação.

Nas simulações com o modelo de animoides, desprezávamos os casos onde algum dos tecidos atingisse a fase movente, pois os considerávamos como biologicamente inviáveis. Porém, os experimentos de Méhes [17], foram realizados com células confluentes, ou seja, as célu-

las estão dispostas em uma mono-camada e ocupam todo o espaço disponível. Nesse caso, o agregado não pode se partir em pedaços, pois ele está confinado, logo os casos na fase movente podem ser considerados.

O confinamento do sistema possibilita um novo mecanismo de segregação, a hipótese da motilidade de grupo diferenciada (HMGD). Esta hipótese é caracterizada pelo termo de alinhamento com a vizinhança depender do tipo de célula. Lembrando, este parâmetro de coletividade foi denominado $\alpha_{i,j}$, no contexto de simulação com o modelo de animóides, e $\alpha(\sigma(id), \sigma id')$, no modelo GGH. Se este parâmetro for muito grande para as células de um tecido e nulo para as demais, obtemos um sistema em que um tecido está na fase movente. O outro tecido continua longe da transição para a fase movente, possibilitando mantermos a aproximação como meio, onde se movimenta a endoderme.

Como mostrado no capítulo 3, no modelo de animóides temos os seguintes parâmetros: $\alpha_{i,j}$ que regula o movimento coletivo, $\beta_{i,j}$ que regula a adesão entre as células e δ_i que relaciona a velocidade da i -ésima célula em relação a velocidade das mais lentas. A nova hipótese de mecanismo gerador de segregação celular é considerar as células como iguais exceto na tendência a seguir a vizinhança, ou seja, o fator determinante de segregação é a diferença de motilidade de grupo (HMGD). O importante é como as células se alinham com as vizinhas. Isto, no modelo de Animóides, é feito com um sistema onde as células da endoderme tem alto valor de $\alpha_{1,1}$, enquanto o $\alpha_{i,j}$ para as demais combinações de células é nulo. A adesão entre qualquer par de células é igual e o modelo poder ser facilmente estendido para o caso onde há adesão diferenciada.

Um tecido na fase movente não diminui sua velocidade ao receber mais células homotípicas. Em termos do expoente de difusão, isto equivale ao caso $D \sim m^\alpha$, com $\alpha \neq -1$. De acordo com o modelo de agregado médio, o único parâmetro livre que, pode afetar o expoente da lei de potência de segregação, é o expoente da difusão com a massa, α . O que sugere a possibilidade desta hipótese ser capaz de produzir uma lei de potência adequada aos dados experimentais.

Executamos um conjunto, de quatro amostras, de simulações com apenas a HMGD, usando o modelo de animóides. Nesta simulação, os tecidos não possuem nenhuma diferença adicional, não possuem qualquer adesão entre si, apenas o confinamento do sistema. Os parâmetros são os mesmos do modelo de animóides para a HVD, sem diferença de velocidades. Para as células de endoderme $\alpha = 100$, se a vizinha também for da endoderme, e nulo para as demais combinações. Os dados foram reescalados, como os demais do agregado médio, com $a = 0.0075$. O número total de células é de $N = 6000$, com mesmo número de células de endo e ectoderme. Este total é inferior ao valor necessário para encontrar o mesmo valor da saturação que o ex-

perimental, pois a placa aceleradora utilizada para esta simulação, tem limitação de memória cache L1 em 48KB, que impede um número maior de partículas.

O resultado, das simulações com a HMGD, pode ser visto marcados como os pontos em marrom da fig. 9.2. Vê-se que eles se aproximam dos dados experimentais para as células de PFK e seu respectivo ajuste no MAM. Então, esta hipótese é corroborada pelos experimentos de Méhes. Esses resultados estão expostos em um artigo submetido ao periódico *Physical Review Letters* [48].

10 Equação de Smoluchowski

A equação de coagulação de Smoluchowski, ou simplesmente equação de Smoluchowski, descreve a reação e difusão de sistemas que se agregam irreversivelmente. Existe, também, uma versão desta equação que inclui a possibilidade de fragmentação, falaremos nela mais tarde. Esta equação considera que a taxa de criação de agregados de um dado tamanho depende, em média, da densidade disponível de agregados menores, capazes de se fundirem aos pares. Os detalhes do sistema físicos são descritos no chamado núcleo de coagulação, $K_{i,j}$, que pode conter, por exemplo, seção de choque e da difusividade dos agregados.

Adotar a equação de Smoluchowski para descrever problemas celulares é uma abordagem recente [49]. Anteriormente, era muito utilizada para descrever a fusão sucessiva de agregados genéricos e de agregados fractais [31, 19, 32]. A equação relaciona a variação da densidade de agregados, n_k , de tamanho k , com os termos de criação e destruição de agregados. O primeiro somatório da eq. 10.1 é parte de criação de agregados de tamanho k , que ocorre pela fusão de agregados menores, tamanhos entre 1 e $k - 1$. O segundo somatório considera a destruição de agregados de tamanho k , que ocorre apenas por fusão com outro agregado. Este agregado pode ter qualquer tamanho, então, o segundo somatório inicia em $j = 1$ e termina em $j = +\infty$. No caso de sistemas com tamanho máximo de coagulação, k_{MAX} , este valor será o limite do segundo somatório.

$$\frac{dn_k}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{k-1} K_{i,k-i} n_i n_{k-i} - \sum_{j=1}^{\infty} K_{j,k} n_j n_k \quad (10.1)$$

O funcionamento da criação de agregados pode ser visto na fig. 10.1. Esta equação fica bem definida quando caracterizado o núcleo de coagulação, $K_{i,j}$. Para representar a segregação celular, o núcleo deve englobar parâmetros relativos à difusão e a seção de choque de agregados de massa i e j . Lembrando que nesta equação o processo é irreversível, uma vez unidos, dois agregados não mais se separam. Esta equação possui solução analítica para alguns casos, por exemplo quando $K_{i,j} = i + j$ ou $K_{i,j} = ij$ [50]. Os demais casos da equação não podem ser resol-

vidos analiticamente, então utilizaremos os métodos numéricos de Euler e de Runge-Kutta [41] com passo variável para resolver o sistema.

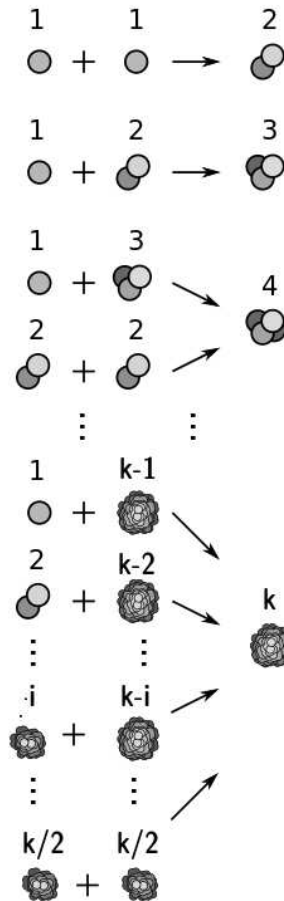


Figura 10.1: Para o número de agregados de tamanho k aumentar é necessário considerar todos os tamanhos menores possíveis de se coagular, de 1 até $k - 1$, para o número de agregados de tamanho k diminuir precisamos considerar todos os tamanhos que possam se unir ao agregado de tamanho k , que em sistema infinito é de 1 até o tamanho máximo do sistema.

Inicialmente, procuramos um núcleo de coagulação adequado na literatura. Nela existe uma grande variedade de núcleos de coagulação e cada um deles é melhor adequado a um tipo de problema específico na física ou química. Para modelar células, existe um núcleo de coagulação que descreve o movimento de células exclusivamente na fase movente [49], mas este caso não é sempre aplicável ao nosso. O nosso problema requer um núcleo mais genérico, que possa considerar que as células estejam ou não na fase movente. Outra possibilidade é definirmos um novo núcleo de coagulação, que contenha as características importantes da segregação celular: a primeira, a dependência da velocidade de difusão de cada agregado com a massa, ou de quantas partículas o compõe; a segunda, é que estes agregados quando se fundem tendem a formar

estruturas próximas a esferas. Isto significa que devemos considerar arredondamento e seus efeitos na área de contato dos agregados. Então, o núcleo de coagulação adotado é descrito na eq. 10.2.

$$K_{i,j} = cte \left(\frac{1}{i} + \frac{1}{j} \right) (\sqrt{i} + \sqrt{j}) \quad (10.2)$$

Resolvemos a equação de Smoluchowski com este núcleo de coagulação, eq. 10.2. Para comparar com os outros, calculamos o tamanho médio de agregado. A evolução deste tamanho de agregado médio, $\langle k \rangle$, resulta em uma lei de potência para tempos suficientemente grandes, de forma bastante similar ao modelo de agregado médio para sistema sem limite máximo de agregado. Assim como nas simulações [15, 43], esta solução capta um desvio da lei de potência para tempos curtos. Este é um efeito de tamanho finito, pois a condição inicial é homogênea, *i. e.*, todos os agregados possuem tamanho unitário. O problema com esse núcleo é que os agregados crescerão indefinidamente e, como não podemos simular um vetor de infinitas posições para armazenar o n_k , precisamos limitar o tamanho máximo aceito para i e j a partir do qual não possa mais haver fusão. Além disso, como mencionado, vamos generalizar este núcleo adicionando expoentes aos termos que o formam. Isto gera maior flexibilidade, permitindo que a difusão dos grupos de células seja da forma $D(i) \propto i^\alpha$. Da mesma forma, para que a seção de choque possa contribuir com peso diferente para a dinâmica, associamos um expoente, β . Então, o núcleo de coagulação, que propomos, assume a forma:

$$K_{i,j} = \begin{cases} k(i^\alpha + j^\alpha)(i^{(d-1)/d} + j^{(d-1)/d})^\beta & \text{se } i \leq k_{max} \text{ e } j \leq k_{max} \\ 0 & \text{se } i > k_{max} \text{ ou } j > k_{max} \end{cases} \quad (10.3)$$

Este núcleo tem vantagens em relação ao anterior, pois já temos naturalmente as duas limitações de tamanho finito do sistema: os tamanhos mínimo e máximo de grupo. Este núcleo é simétrico, o que implica a conservação do número total de partículas ao longo do tempo, que é uma boa aproximação para sistemas de segregação celular. Partimos, então, para a próxima versão da equação de Smoluchowski que inclui a fragmentação de agregados.

10.1 Equação de Coagulação-Fragmentação de Smoluchowski

Durante o processo de segregação celular, usualmente, quando dois grupos de células se unem, o processo é irreversível. Porém, se o sistema for composto por um número muito

grande de células, existe a possibilidade de grupos de células se desprenderem do agregado. Estes pedaços precisam conter um número inteiro de células, de forma a conservar seu número total.

Para considerar a quebra de agregados vamos adotar a equação de coagulação-fragmentação de Smoluchowski. Acrescentam-se, então, dois termos à equação 10.1: o primeiro associado à quebra de agregados de tamanho k em agregados menores; o segundo associado à criação de agregados de tamanho k à partir de agregados maiores que se partiram.

$$\frac{dn_k}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{k-1} (K_{i,k-i} n_i n_{k-i} - F_{i,k-i} n_k) - \sum_{j=1}^{\infty} (K_{j,k} n_j n_k - F_{j,k} n_{j+k}) \quad (10.4)$$

Nesta equação, o termo $F_{i,j}$ é o núcleo de fragmentação e n_{i+j} a densidade de agregados de tamanho $i+j$. O produto deles representa a probabilidade por unidade de tempo de um agregado de tamanho $i+j$, se partir em agregados de tamanho i e j .

Vamos trabalhar com dois núcleos de fragmentação: o primeiro considera a fragmentação constante; o segundo usa a distribuição de Boltzmann para descrevê-la.

10.1.1 Fragmentação Constante

Durante as simulações de segregação frequentemente vemos células de endoderme dispersas na ectoderme. Isto ocorre, mesmo quando, já há apenas um agregado contendo a maioria dessas células. Isto pode ocorrer por duas causas: menor probabilidade de fusão para agregados pequenos; ou, o agregado pode perder células.

A forma mais simples de modelar a fragmentação é considerar o núcleo associado como uma constante. Para levar em conta a fragmentação apenas de agregados pequenos, ela é tomada como constante até um valor limite, ou seja,

$$F_{i,j} = \begin{cases} f & \text{se } i \leq f_{max} \text{ ou } j \leq f_{max} \\ 0 & \text{se } i > f_{max} \text{ e } j > f_{max} \end{cases} \quad (10.5)$$

onde, f_{max} é esse valor de corte. A vantagem da fragmentação constante é ser simples e computacionalmente rápida.

10.1.2 Fragmentação Exponencial

Uma segunda possibilidade é que a fragmentação dependa da variação da energia superficial do agregado e de flutuações associadas, por exemplo, à membrana celular. Espera-se que um agregado com superfície maior perca mais facilmente agregados menores do que se parta ao meio. Neste caso, uma representação adequada para a probabilidade de fragmentação é a exponencial de Boltzmann [51].

$$F_{i,j} = f e^{-\frac{((j+i)^{(d-1)/d} - (i^{(d-1)/d} + j^{(d-1)/d}))}{T}} \quad (10.6)$$

Nessa expressão, f é a constante de fragmentação, $i^{(d-1)/d}$ e $j^{(d-1)/d}$ são as seções de choque de agregados de massa i e j , respectivamente e T é a temperatura efetiva associada às flutuações de membrana.

Mostraremos os resultados para os casos bidimensionais, que serão efetivamente comparados com o modelo anterior, com as simulações e com os experimentos. Neste caso, a fragmentação exponencial assume a forma, da eq. 10.7.

$$F_{i,j} = f e^{-\frac{(\sqrt{j+i} - (\sqrt{i} + \sqrt{j}))}{T}} \quad (10.7)$$

10.2 Medida de Segregação Celular

Para compararmos os resultados obtidos aqui com os demais, calculamos a massa média de agregado, $\langle k \rangle$. Esta medida pode ser comparada diretamente com o modelo de agregado médio, além de possibilitar a mesma comparação com dados de simulações [43, 15] e de experimentos [17].

$$\langle k \rangle = \frac{\sum_{i=1}^{k_{max}} kn_k}{\sum_{i=1}^{k_{max}} n_k} \quad (10.8)$$

Assim como no modelo de agregado médio, em alguns casos, desconsideramos os agregados pequenos, menores que k_{min} . Este valor médio, desprezando agregados pequenos, é utilizado para comparar casos experimentais e testar se realmente podemos aproximar os resultados

obtidos com o modelo de agregado médio, com as simulações.

11 Resultados com a Equação de Smoluchowski

Com a equação de Smoluchowski, estamos interessados em analisar o sistema onde o tamanho dos agregados possa variar, pois, pelo menos nas simulações com o modelo de animóides, o sistema apresenta distribuição de tamanho de agregado com largura finita. A figura 11.1 mostra a distribuição de tamanhos de agregado ao longo do tempo para uma simulação no modelo de animóides com a HVD. À esquerda, temos os dados em uma tabela, onde agrupamos os tamanhos em intervalos regulares para fazer a contagem. À direita temos os mesmos dados em um gráfico, onde mostramos a distribuição de n_k para alguns valores de tempo.

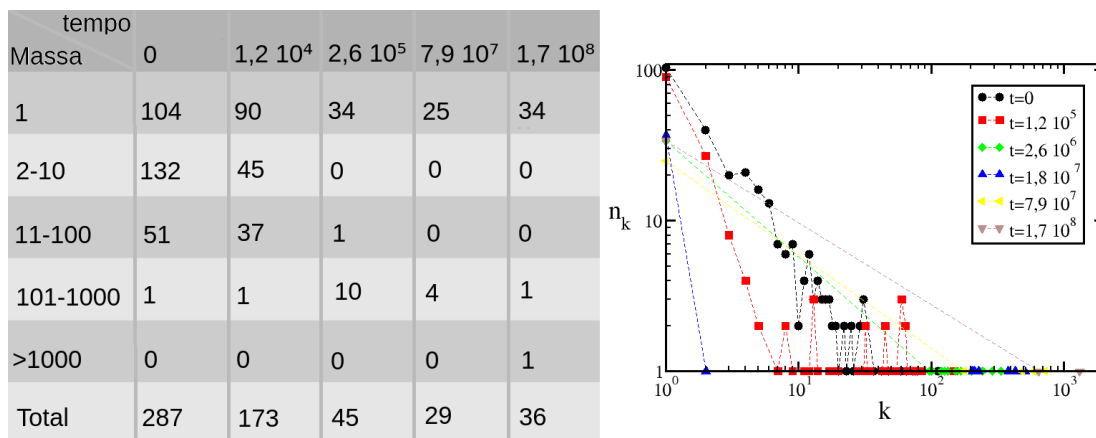


Figura 11.1: À esquerda, tabela mostrando a distribuição de massa ao longo do tempo para simulação com DVH. À direita, temos o gráfico com os mesmos dados.

Primeiro, mostramos os resultados da equação de Smoluchowski com os termos de coagulação, em seguida, determinamos como os expoentes α e β interferem, no expoente da lei de potencia, na evolução do tamanho médio. Também mostramos os efeitos da fragmentação na evolução, nas versões constante e térmica (com a distribuição de Boltzmann). Então procuramos os parâmetros que melhor ajustam os dados de simulação e dos experimentos.

11.1 Resultados com o Núcleo de Coagulação

Vamos mostrar os resultados obtidos para o núcleo da forma da eq. 11.1, válida para sistemas em duas dimensões. Nesse caso, cada agregado se difunde de acordo com, $D \sim 1/k$, e tem perímetro de contato, \sqrt{k} .

$$K_{i,j} = k' \left(\frac{1}{i} + \frac{1}{j} \right) (\sqrt{i} + \sqrt{j}) \quad (11.1)$$

Integramos a equação de Smoluchowski numericamente com o método Runge-Kutta de quarta ordem. Como pode ser visto na figura 11.2, obtemos assintoticamente uma lei de potência com expoente $\lambda = 2/3$. Esta lei deveria permanecer válida para valores grandes da massa do agregado. No entanto, isto não ocorre pois, devido a problemas numéricos, a massa total do sistema não se conserva. O que ocorre é que o vetor n_k utilizado na simulação, devido à limitação de memória, é finito. Além disso, quando $n_k \ll 1$, um passo de tempo finito pode levar a densidades negativa, o que é fisicamente inaceitável. Os efeitos em tempos longos dos erros numéricos podem ser vistos na figura 11.2.

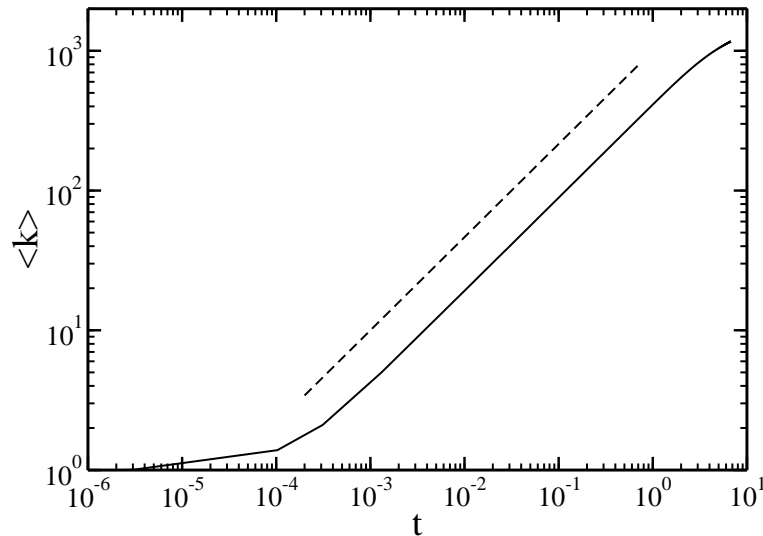


Figura 11.2: Evolução da massa média do agregado em sistemas bidimensionais, a reta indica lei de potência, cujo o expoente é $\lambda = 2/3$. Para facilitar a visualização, mostramos a linha tracejada que possui inclinação $2/3$.

O problema deste núcleo de coagulação é que o expoente obtido para a lei de potência é diferente do encontrado no modelo de agregado médio e nas simulações. Melhoramos este núcleo de coagulação de duas formas: limitando o tamanho de agregado a um valor máximo, e introduzindo expoentes que generalizam o núcleo.

$$K_{i,j} = \begin{cases} k' (i^\alpha + j^\alpha) (\sqrt{i} + \sqrt{j})^\beta & \text{se } i \leq k_{max} \text{ e } j \leq k_{max} \\ 0 & \text{se } i > k_{max} \text{ ou } j > k_{max} \end{cases} \quad (11.2)$$

Essa generalização produzirá dois efeitos sobre a dinâmica: diversos valores possíveis para o expoente da segregação celular, λ e a saturação do tamanho de agregado.

Na figura 11.3, mostramos a influência dos parâmetros α e β no expoente da lei de potência. No gráfico à esquerda, vemos como a importância relativa da seção de choque com difusão afeta a segregação. À medida que β aumenta, a segregação ocorre mais rapidamente, ou seja, com expoente maior. No gráfico à direita, vemos a influência da difusão na segregação. Como no caso do MAM, quando $\alpha = -1$ temos a difusão normal, quando $\alpha = 0$ temos o caso onde o movimento coletivo domina a difusão. Como pode-se ver na figura 11.3, a segregação é mais rápida no caso com $\alpha = 0$ do que para $\alpha = -1$ indicando que a hipótese da motilidade de grupo diferenciada é mais eficiente do que as demais na geração de segregação.

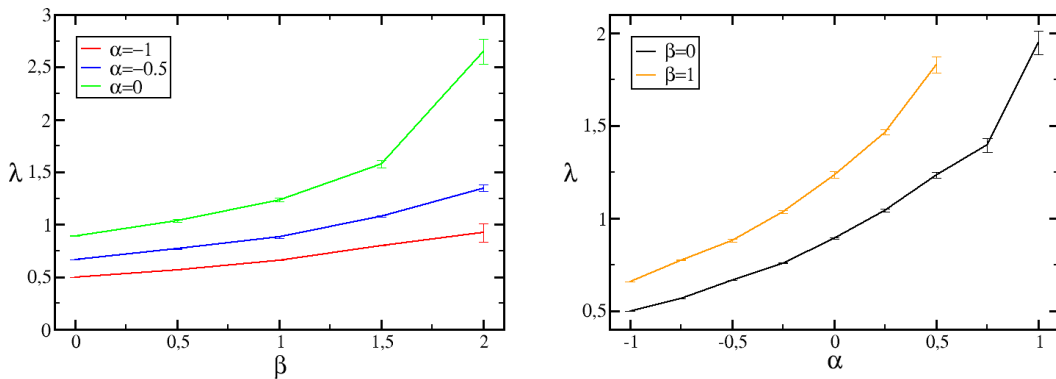


Figura 11.3: O expoente da lei de potência, λ , de $\langle k \rangle$ contra o tempo, para diversos valores dos expoentes do núcleo de coagulação, a esquerda variando o α e à direita variando β , para sistemas bidimensionais.

11.2 Resultados com Fragmentação

Nesta seção vamos mostrar a influência da fragmentação de agregados na evolução do tamanho de agregado médio. Mostraremos inicialmente, como a fragmentação constante afeta os valores de saturação do tamanho. Em seguida, como a fragmentação com distribuição de Boltzmann afeta o sistema.

11.2.1 Fragmentação Constante

Se $f_{MAX} = 1$ cada agregado pode perder uma partícula de cada vez. Como podemos ver na figura 11.4, os valores da constante de fragmentação, f , deve ser muito grandes para que se note algum efeito na evolução de $\langle k \rangle$.

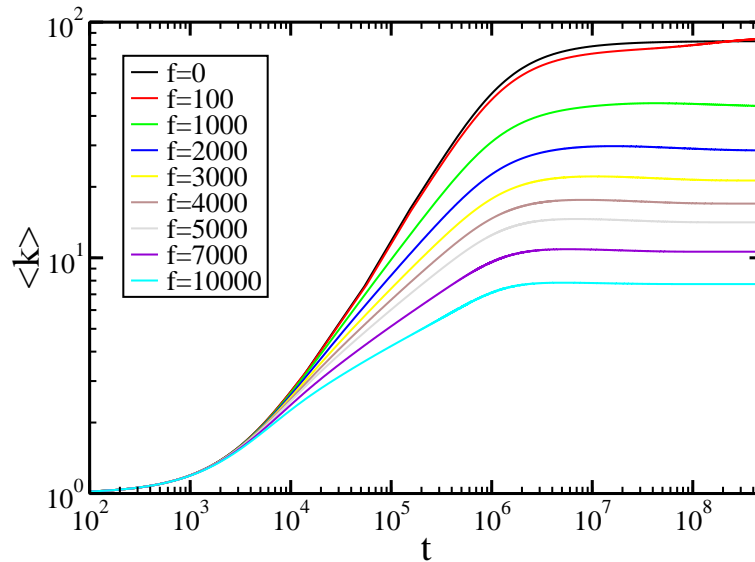


Figura 11.4: Curvas de evolução média das massas dos agregados, em sistema bidimensionais, para diferentes constantes de fragmentação, f . A fragmentação não afeta muito a evolução inicial, mas é importante para determinar os valores de saturação.

Para determinar a influência do valor máximo de tamanho para a fragmentação, f_{max} , vamos fixar a constante de fragmentação em $f = 10$. Pois, para este valor não há diferença significativa entre os casos com apenas coagulação e fragmentação com $f_{max} = 1$. A partir disso, aumentamos o tamanho máximo de fragmentação, até que atinja o tamanho máximo de agregado do sistema. Na figura 11.5 mostramos as curvas de evolução do tamanho médio de agregado para valores diferentes de f_{max} , os demais parâmetros utilizados são: $k_{MAX} = 100$, $k' = 1$, $\alpha = -1$ e $\beta = 1$.

Com esta fragmentação a informação de dimensão espacial do sistema continua toda dentro do termo com β do núcleo de coagulação, podemos facilmente fazer o mesmo gráfico para sistemas tridimensionais, que possuem resultados similares.

11.2.2 Fragmentação Térmica

Como descrito no capítulo anterior, o núcleo de fragmentação térmico é dado por:

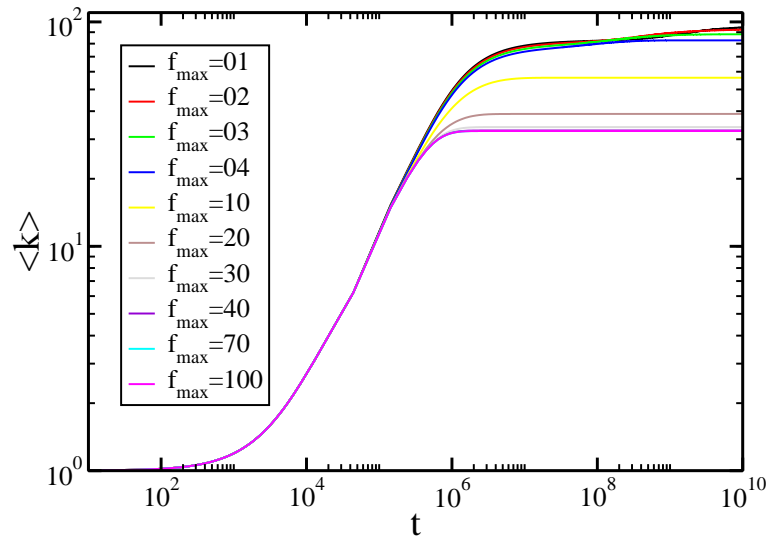


Figura 11.5: Curvas de evolução média das massas dos agregados, em sistema bidimensionais, para diferentes tamanhos máximos de fragmentação, f_{MAX} . Nota-se que a fragmentação não afeta a evolução inicial, mas é importante para determinar os valores de saturação.

$$F_{i,j} = f e^{-\frac{(\sqrt{j+i} - \sqrt{i-j})}{T}}.$$

A influência da temperatura pode ser vista na figura 11.6. Quando a temperatura cai a zero o efeito da fragmentação desaparece. À medida que a temperatura cresce, o valor de saturação diminui. Finalmente, quando $T \rightarrow +\infty$ voltamos ao limite da fragmentação constante com $f_{MAX} = k_{MAX}$. Essas tendências são observadas para quaisquer valores da fragmentação. Na figura 11.6 mostramos as curvas de evolução do tamanho médio de agregado, à esquerda para $f = 10$ e à direita para $f = 100$. Comparando-se os dois gráficos, nota-se que o efeito da temperatura é maior no gráfico à direita devido a maior constante de fragmentação. Por este motivo, o valor de temperatura necessário para atingir o limite da fragmentação constante é menor.

11.3 Comparação com Simulações e Experimentos

A figura 11.7 apresenta os resultados de simulação, os dados experimentais e os respectivos ajustes pela equação de Smoluchowski. As três de simulação são as que apresentam menor inclinação, aparecendo à direita no gráfico. Nesses dados não foram desprezados os agregados pequenos. Em quadrados verdes escuro estão marcados os dados de HVD com $\delta = 4$, os dados de HVD para $\delta = 3$ estão mostrados em losangos marrons claros. Para a HAD, utilizamos

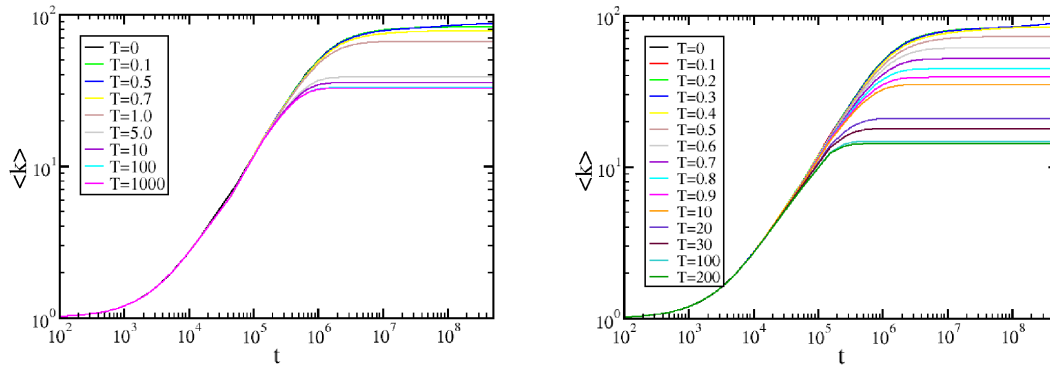


Figura 11.6: À esquerda temos as curvas para constante de fragmentação $f = 10$, à direita temos $f = 100$.

círculos roxos. A HMGD está representada em círculos marrons escuros. Os ajustes estão representados por linhas contínuas no gráfico.

Nessa mesma figura mostramos os dados de experimentos de Méhes [17]. Nesse caso, os agregados menores foram desprezados, portanto, o ajuste com equação a Smoluchowski é feito sem fragmentação. Os dados experimentais de PFK estão representados por quadrados magenta e os dados de HaCaT, por círculos vermelhos. Novamente, os ajustes estão representados por linhas contínuas no gráfico.

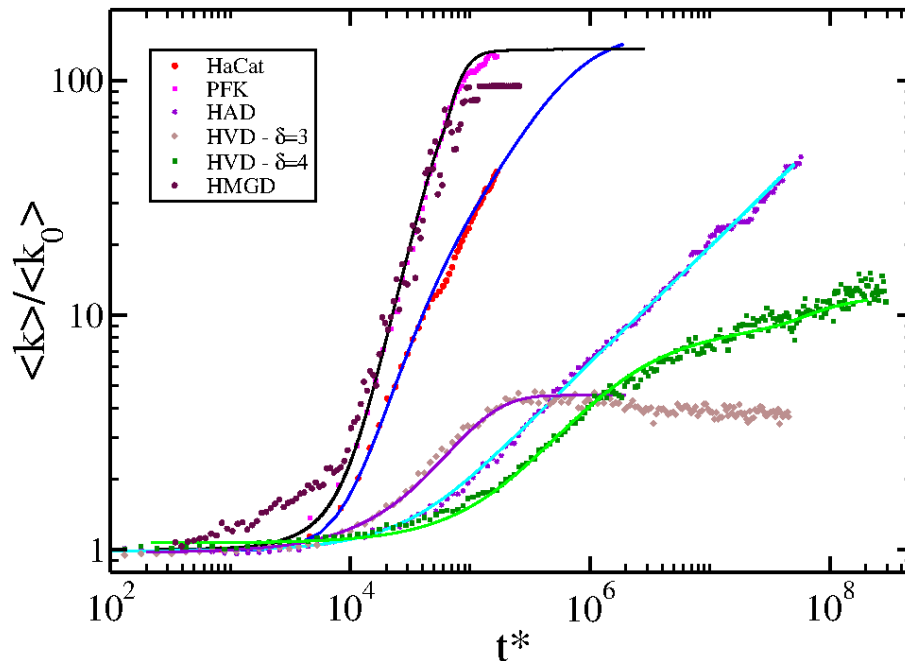


Figura 11.7: Ajustes das curvas de segregação celular para os dois casos experimentais (HaCat e PFK) sem fragmentação, e os casos de simulação (HAD e HVD) com fragmentação.

Assim como no modelo de agregado médio, reescalamos os eixos para as unidades adimensionais. Nas simulações, o valor médio do tamanho de agregado é muito alterado pela presença de agregados pequenos devido à limitação da medida adotada. No modelo de agregado médio mostramos que os experimentos de Méhes possuem partículas na fase movente, pois ajustamos um valor de $\alpha \neq -1$. De fato, naquele caso, chegamos a um ajuste de difícil interpretação física ($\alpha = 1/2$) para a curva de PFK. O ajuste com o modelo de Smoluchowski, fornece $\alpha = -0.1$ e -0.6 para o PFK e o HaCaT, respectivamente. Isto, além de ser um resultado físico aceitável indica que o sistema encontra-se na vizinhança da fase movente. No caso das simulações, os dados foram ajustados com a fragmentação térmica e usando difusão normal, $\alpha = -1$, pois as células de endoderme se encontravam abaixo da transição para a fase movente.

Na figura 11.8, mostramos os dados de agregado médio para simulação na HVD, com $\delta = 4$, para dois casos: considerando todos os agregados e desprezando os agregados pequenos, i. e., $k_{min} = 10$. Nos dados representados por círculos pretos todos os agregados foram considerados. Seu ajuste é mostrado como uma linha em vermelho. Os dados do mesmo conjunto de simulações, desprezando agregados pequenos, estão marcados em círculos verdes escuro. Estes dados possuem duas curvas de ajuste: a primeira, em roxo, possui os mesmos parâmetros que o ajuste em vermelho, exceto pela ausência da fragmentação e pela condição inicial; a segunda, em azul, é o ajuste alterando o parâmetro β e introduzindo um parâmetro equivalente ao tamanho mínimo de agregação do modelo de agregado médio.

Assim, inserimos o parâmetro de tamanho mínimo de agregação, c , no núcleo de coagulação, definido por:

$$K_{i,j} = \begin{cases} k' (i^\alpha + j^\alpha) \left(\sqrt{i - \frac{ic}{m_0}} + \sqrt{j - \frac{jc}{m_0}} \right)^\beta & \text{se } i \leq m_0 \text{ e } j \leq m_0 \\ k' (i^\alpha + j^\alpha) (\sqrt{i - c} + \sqrt{j - c})^\beta & \text{se } m_0 \leq i \leq k_{max} \text{ e } m_0 \leq j \leq k_{max} \\ 0 & \text{se } i > k_{max} \text{ ou } j > k_{max} \end{cases} \quad (11.3)$$

onde, c é o tamanho mínimo de agregação. Na figura 11.8, o ajuste referente à curva em azul tem valor de $c = 11$, e o valor inicial do agregado médio é $m_0 = 13$.

Para ajustar os dados de simulação mantemos fixo o parâmetro $\alpha = -1$. Os demais parâmetros da média contendo todos os agregados são: $\beta = 1.5$, a temperatura $T = 1.5$, a constante do núcleo de coagulação $k' = 4$ e a constante de fragmentação $f = 15$. Se utilizarmos os mesmos parâmetros do ajuste anterior e zerarmos a fragmentação temos a curva em roxo na figura 11.8. Nela, redefinimos a condição inicial para que exclua os agregados pequenos. O valor de melhor ajuste é $\beta = 0.5$, para os dados sem agregados pequenos, mostrados em azul na figura. Isto indica que, quando desprezamos os agregados pequenos, desprezamos também grande parte dos

efeitos de superfície, uma vez que, é o parâmetro β que determina o peso relativo da superfície no núcleo de coagulação, e.g., eq. 11.3.

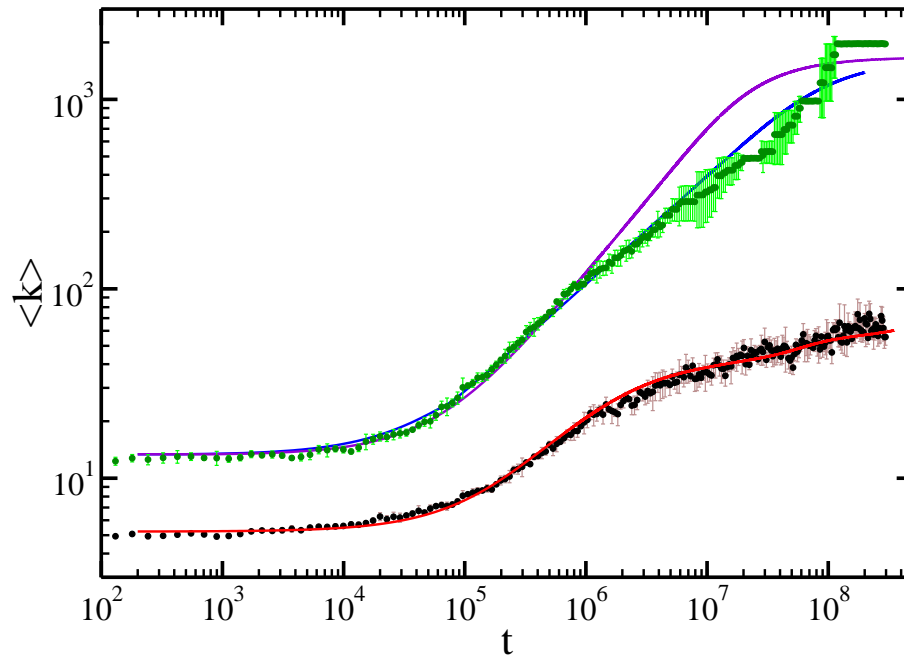


Figura 11.8: Ajustes das curvas de segregação celular, em preto, os dados de segregação para a HVD com todos os agregados, em vermelho o ajuste desses dados. Os círculos verdes escuro são os dados da simulação excluindo-se os agregados pequenos (com menos de 10 células). Em roxo o mesmo ajuste dos dados completos porém sem fragmentação. Em azul o melhor ajuste para os dados sem agregados pequenos, com $\beta = 0.5$ e $c = 11$.

Então podemos ver que existe uma ligação entre os parâmetros da Equação de Smoluchowski (com e sem fragmentação) e os dados de segregação (desprezando ou não os agregados pequenos). E que, ao desprezá-los, estamos reduzindo a influência da seção de choque na evolução do tamanho de agregado.

12 Discussão

Analizamos o problema da segregação celular na ausência de transformação citológica e quimiotaxia. Neste caso a motilidade é um fator indispensável para a reorganização dos tecidos. Este processo pode ocorrer em alguns seres vivos simples, como hidras e esponjas, ou na embriogênese, após a diferenciação celular, ou ainda, em processos de cicatrização de tecidos em seres mais complexos. Para explicar como as células podem migrar para posições adequadas, dentro do agregado, existem algumas hipóteses, dentre elas: a adesão diferenciada (HAD), a velocidade diferenciada (HVD) e a quimiotaxia. Cada uma delas atribui a reorganização de tecidos a características celulares que podem ser modeladas por variáveis físicas (HVD e HAD), ou químicas (quimiotaxia). Ao longo deste trabalho modelamos o problema com essas hipóteses físicas e propusemos uma nova hipótese de segregação. Nessa última a característica mais importante é a motilidade de grupo (HMGD). Fizemos também uma análise estatística da evolução da segregação celular com duas abordagens distintas: na primeira consideramos que todos os grupos de células da endoderme possuem o mesmo tamanho, na segunda flexibilizamos para uma abordagem com tamanho de agregado qualquer.

Este trabalho possui abordagens diferentes para o entendimento do problema, então, para facilitar a visualização de como alteramos ao longo do tempo a perspectiva de análise, mostramos na figura 1.4 o roteiro que utilizamos para o estudo da segregação celular. Iniciamos com simulações de algumas hipóteses que podem estar presentes no processo de segregação. Depois partimos para uma modelagem estatística, onde consideramos um tecido como o meio para os agregados de endoderme se deslocarem. E ao final deste trabalho, comparamos os resultados, tanto de simulação quanto estatísticos, com experimentos realizados por Méhes [17] e colaboradores. Vamos detalhar as partes deste trabalho nas seções à seguir, em cada uma delas discutimos os principais resultados, as conclusões associadas e as relações com o restante do trabalho.

12.1 A Velocidade Diferenciada e o Modelo de Animóides

Este trabalho se inicia com o estudo da segregação celular considerando uma hipótese até então pouco estudada, a da velocidade diferenciada (HVD). A hipótese mais aceita e mais estudada, até então, era a da adesão diferenciada (HAD), com trabalhos experimentais [1] e simulações [15, 4]. A hipótese de velocidade diferenciada atribui a reorganização de tecidos à diferenças na motilidade celular. Ela foi proposta por Jones e colaboradores [2] que realizaram um experimento com três tipos de tecidos, em misturas binárias. De acordo com esse experimento as células com maior motilidade terminam por ocupar o centro do agregado. Esses resultados foram explicados lançando-se mão de um segundo mecanismo: o reconhecimento celular. É provável que este argumento tenha sido usado porque o resultado encontrado não era intuitivo. De fato, referências posteriores a esse trabalho [16] citam-no sugerindo que teria sido encontrado o resultado oposto: as células mais lentas formariam o centro do agregado. Com intuito de explorar as possibilidades presentes nessa hipótese, simulamos o mecanismo de velocidade diferenciada e, em seguida, simulamos a velocidade diferenciada acrescida deste segundo mecanismo proposto por Jones.

As simulações são feitas utilizando-se o modelo de animóides, com as adaptações de Grégoire. Neste modelo, as partículas tem posições e velocidades descritas por variáveis contínuas e movem-se com passo fixo característico de cada tipo de célula. A nova posição para uma célula é obtida considerando-se as forças advindas das células vizinhas. Essas forças são compostas por termos de adesão e volume. Também leva-se em conta no cálculo da nova posição a direção da velocidade das células vizinhas, representada pelo termo de movimento coordenado. Por último, temos o ruído, que é a parte aleatória associada às flutuações da membrana.

Como o movimento coordenado depende diretamente da velocidade e queremos incluir diferenças de velocidade entre as células, temos liberdade de normalização, então escolhemos três fatores para a repesagem: i) o termo de movimento coordenado pela velocidade das partículas mais lentas; ii) dividir o parâmetro de movimento coordenado pelo módulo da velocidade da partícula em questão; iii) dividir o parâmetro de movimento coordenado pela velocidade da célula vizinha considerada. Com essas variantes estudamos os casos em que ocorre a segregação celular, mas limitamos os parâmetros de forma que o sistema não possuísse movimento do centro de massa e nem se partisse em pedaços. Esta limitação é para garantir a viabilidade biológica do agregado celular, pois se ele se partisse em pedaços o animal morreria.

Os primeiros resultados mostram que, para uma distribuição aleatória não circular de posições iniciais de células, o sistema se arredonda após um tempo transitório curto, isso possibi-

litou o uso de configurações iniciais já circulares. Também encontramos uma proporção ótima de partículas rápidas para as lentas que facilita a segregação. Se consideramos apenas a HVD, é necessário termos mais partículas rápidas, pois estas podem se separar do agregado durante a segregação, restando em alguns casos poucas destas células. A segregação mais rápida ocorre para a proporção de uma célula lenta para cada três mais rápidas.

A conclusão mais importante desta parte do trabalho é que somente com velocidade diferenciada obtivemos segregação celular e que esta tem como configuração final as células mais lentas no interior e as mais rápidas ao redor. Sabendo disso, percorremos o espaço de parâmetros com o intuito de verificar em que regiões ocorrem reorganizações de tecidos. Inicialmente, simulamos a evolução do sistema sem movimento coordenado e encontramos os valores de razão de velocidades (δ) onde ocorre reorganização de tecidos. Esta segregação pode evoluir de duas maneiras: i) logarítmica: encontrada para razão de motilidades celulares em torno de três; ii) lei de potência: quando a razão de motilidades é maior que três e meio. É importante salientar que, no caso em que encontramos uma lei de potência, o expoente do parâmetro de segregação, γ , é $\lambda \sim -0.2$, o mesmo obtido na análise numérica da hipótese da adesão diferenciada quando simulada pelo modelo de animoides [15].

A segregação depende também do movimento coordenado, pois ele facilita a separação dos tecidos. Por outro lado, valores excessivos deste parâmetro pode partir o agregado em pedaços. Nas três normalizações escolhidas temos efeitos parecidos com o aumento do parâmetro α , a segregação evolui mais rápido até o limite que o sistema se parte em pedaços. Temos pontos de ruptura distintos nas diferentes normalizações.

Outra conclusão importante é obtida analisando-se os gráficos que varrem o espaço de parâmetros em cada caso. Verifica-se que em ambos modelos a segregação ocorre para uma extensa faixa dos parâmetros α e δ , caracterizando um processo robusto. A diferença que aparece entre os dois modelos é que os valores de α para os quais o sistema troca de fase (i \rightarrow ii, ou, ii \rightarrow iii) são bastantes distintos em cada caso. Além disso, como pode ser inspecionado visualmente, no Caso 1 o sistema perde a coesão logo após a passagem para a fase movente (ii), enquanto que no Caso 2, a perda de coesão ocorre ainda na fase i.

Estas conclusões já são suficientes para afirmarmos que a velocidade diferenciada é um mecanismo gerador de segregação celular, isto não implica que este seja o único mecanismo. De fato, pelas altas razões de velocidades encontradas para a separação de tecidos, mesmo nos casos com movimento coletivo, podemos supor que este mecanismo não vai ser encontrado sozinho em seres vivos. O mais provável é ser encontrado com outros mecanismos, tais como, adesão diferenciada e fatores de reconhecimento celular.

12.2 O mecanismo de Reconhecimento e o Modelo de Animóides

No trabalho de Jones [2], onde o mecanismo da velocidade diferenciada é explorado experimentalmente, obtém-se que as células mais difusivas migram para o interior do agregado celular. Este resultado contraria nossos resultados numéricos, mas note que, para explicar essa configuração final, os autores não utilizam somente a hipótese da velocidade diferenciada, mas afirmam que as células possuem algum meio de reconhecimento. Isto permite, que quando em contato, distingam entre células do mesmo tipo e de outro tipo, para então separar os tecidos. É importante salientar que Jones e colaboradores não mediram nesse trabalho as diferenças de adesão entre os três tipos de células.

Pode-se entender a necessidade de Jones et al. de adicionar o mecanismo de reconhecimento se levarmos em consideração a visão termodinâmica que norteou os trabalhos iniciais nessa área. Esse ponto de vista foi proposto por Steinberg [1] e associa aos diferentes tecidos tensões superficiais e minimização de energia como em líquidos imiscíveis. Dentro desse quadro espera-se que as células com maior motilidade apresentem menor tensão superficial, o que as levaria para o exterior em uma mistura com outras mais lentas. Cabe ainda citar como curiosidade que em seu trabalho de revisão, Steinberg [16] cita o trabalho de Jones invertendo o resultado.

Ainda dentro da visão termodinâmica do processo de segregação, deve-se mencionar que esperava-se também encontrar hierarquização entre os tecidos. No entanto, dentro da hipótese de velocidade diferenciada não encontramos, até o momento, configuração de parâmetros que gerasse a esperada hierarquia. A diferença de velocidades δ a partir da qual encontramos segregação é muito grande e um terceiro tecido apresentar-se-ia praticamente como um gás. Provavelmente se poderia obter essa hierarquia de tecidos para sistemas confluentes confinados, deixamos isto como uma perspectiva futura.

Simulamos células que podem se reconhecer, variamos também a proporção das células mais móveis em relação as demais. Podemos notar que para cada proporção adotada existem regiões diferentes para padrões finais de segregação distintos. Inclusive, quando temos uma ligação fraca entre células diferentes e um número maior de células lentas, obtemos a inversão do padrão final, só que agora, com as células mais rápidas formando grupos aprisionados no interior das mais lentas. É claro que ao aplicarmos este, ou qualquer outro tipo de mecanismo de reconhecimento, não estamos mais explorando a velocidade diferenciada propriamente dita e sim, combinações de mecanismos. Para se determinar efetivamente a validade da hipótese

de velocidade diferenciada e a existência (ou não) de um fator de reconhecimento, teríamos que realizar um experimento de medida de motilidade celular em uma configuração onde a diferença de adesão entre as células fosse mínima. O que também deixamos como perspectivas de trabalhos futuros.

12.3 O Modelo de GGH e os Padrões Finais de Segregação

As simulações no modelo GGH confirmaram a possível inversão do padrão final de segregação em relação a HVD pura e, também, dela com o mecanismo de reconhecimento. Então é possível obter as células mais rápidas, tanto por fora quanto por dentro do agregado celular, dependendo da relação entre as ligações homotípicas e heterotípicas.

Além disso, pela facilidade de medida pudemos confirmar uma relação intuitiva entre o parâmetro de segregação celular γ e a interface entre os tecidos diferentes. Esta confirmação se mostrou útil para compararmos os resultados das simulações diretamente com os modelos estatísticos apresentados, porém decidimos ao longo do trabalho executar todas as medidas em termos do número médio de células por agregado que é diretamente comparável ao tamanho médio.

12.4 O Modelo de Agregado Médio

Após a análise da velocidade diferenciada e do mecanismo de reconhecimento, propomos duas abordagens para fusão de agregados, associada à segregação celular. À partir deste ponto a hipótese ou as hipóteses responsáveis pela segregação ficam em segundo plano e estamos interessados em como ocorrem as ligações entre os grupos de células de um tecido dentro do outro, que agora consideramos como o meio.

Para esta abordagem consideramos a existência de apenas um tamanho de agregado no sistema a cada instante de tempo. Propomos equações diferenciais para descrever a evolução do seu tamanho, obtemos soluções analíticas para sistemas infinitos equivalentes aos resultados anteriores obtidos por Kolb [19]. Também, à partir dessa, criamos novas equações, com limitações de tamanho máximo e sistema com um tamanho mínimo de agregado. Nestes casos temos uma lei de potência somente em um intervalo restrito da evolução da segregação. Esses resultados são similares com os resultados obtidos em experimentos e simulações [43, 15, 17]: temos resultados analíticos que se ajustam bem aos resultados de simulação com a HVD e com a HAD e, recentemente, tivemos acesso a resultados experimentais comparáveis com este modelo.

Os experimentos de Méhes [17] tem como resultado uma segregação muito mais rápida do que a segregação obtida com as simulações em HVD e HAD. O expoente dessa lei é ~ 1 para células de HaCaT e ~ 2 para células de PFK. Por outro lado, as simulações indicam valores ao redor de $1/2$ tanto para HVD quanto para HAD, indicando a necessidade de reformulação dessas hipóteses. Com o modelo de agregado médio fomos capazes de ajustar os dados experimentais adequadamente, ao considerarmos que a endoderme não possui dependência normal da difusão com a massa, ou seja, $D(m) \sim m^\alpha$ com $\alpha \neq -1$. Esse expoente de difusão mostra que a motilidade de grupo tem papel importante na segregação, pois se a difusão for normal temos uma segregação com expoente $1/2$. Porém, ao nos aproximarmos da fase movente, as células de endoderme passa a seguir fortemente a vizinhança, o expoente da segregação celular cresce, aproximando-se dos valores obtidos experimentalmente. Os valores que melhor ajustam as curvas são: $\alpha = 0$ para a HaCat e $\alpha = 0.5$ para o PFK, o primeiro valor implica que a difusão independe da massa do agregado, pois as células estão totalmente na fase movente; o segundo indica que à medida que o agregado cresce aumenta, sua difusividade. Entretanto, isto não tem um significado físico claro, indicado a necessidade de uma modelagem mais detalhada.

Ao final da análise com o modelo de agregado médio chegamos a uma hipótese para explicar os resultados de Méhes [17], a hipótese da motilidade de grupo diferenciada (HMGD). Nela, as células de endoderme encontram-se próximas ou na fase movente, enquanto as células de ectoderme estão na fase não movente. Até o momento a HMGD é a única hipótese que apresenta uma segregação tão rápida quanto a verificada no experimento, indicando a possibilidade deste ser um excelente mecanismo de segregação do ponto de vista evolutivo, pois, quanto menos tempo durar a segregação menor é o tempo que o sistema está vulnerável.

12.5 A Equação de Smoluchowski

Nossos últimos resultados são aqueles obtidos com a equação de fragmentação-coagulação de Smoluchowski. Nela, temos a relação da densidade de agregados de cada tamanho com as probabilidades de dois agregados se fundirem e com a probabilidade de cada agregado fragmentar. Definimos um núcleo de coagulação que seja adaptável e possua significado físico, no caso da segregação celular, relacionando a dependência da difusão e da seção de choque com a massa. A partir deste núcleo, obtivemos resultados para alguns valores de fragmentação e vimos que esta afeta mais a evolução final dos agregados. Passamos a trabalhar nos casos mais simples, sem fragmentação, e temos como resultados leis de potência cujos expoentes estão dentro ou próximos aos valores encontrados para a segregação celular.

O ajuste da equação de Smoluchowski para os casos experimentais de Méhes apresenta valores menores do expoente da difusão com a massa do que os obtidos no modelo de agregado médio: $\alpha = -0.1$ para o PFK e $\alpha = -0.6$ para o HaCaT. Isto sugere que a seção de choque, contida no núcleo de coagulação, joga um papel importante. Pois ela não é considerada no modelo de agregado médio, enquanto, na aproximação de Smoluchowski mostramos que ela acelera a segregação e permite a obtenção dos valores razoáveis para o parâmetro α .

Como conclusão final, desta equação, temos a origem física provável do alto expoente para a segregação celular, a hipótese HMGD, com ela podemos explicar e reproduzir os valores experimentais através de uma simulação com o modelo de animoides, simulação esta feita apenas para o caso do PFK.

12.6 A Hipótese da Motilidade de Grupo Diferenciada

Os experimentos de Méhes apresentam uma segregação muito mais rápida do que a predita pelas simulações da HAD e HVD, ou seja, o expoente para a lei de potência da evolução do tamanho médio de agregado era de $1/2$ para as simulações com modelo de animoides, tanto para a adesão diferenciada, quanto para a velocidade diferenciada. Porém, os dados experimentais indicam uma lei de potência com expoente $\lambda = 1$ e $\lambda = 2$. No modelo de agregado médio temos alguns parâmetros que podemos percorrer para ajustar os dados. Porém, apenas dois influenciam o expoente da lei de potência: a dimensão do espaço, d e o expoente que relaciona a difusão do agregado com a sua massa, α . Então, fixando a dimensão do sistema, procuramos o valor adequado do expoente α para os dados de Méhes. Sabendo que experimento foi desenvolvido em uma mono-camada celular, consideramo-lo bidimensional e fixamos $d = 2$.

Testamos a hipótese de que os diferentes graus de coletividade das células podem gerar expoentes de segregação compatíveis com os dados experimentais. Fizemos esta simulação apenas no modelo de animoides, onde consideramos um sistema confinado com condições de contorno periódicas. Na simulação, as células não possuem adesão entre si, nem qualquer diferença de velocidades ou adesividades. A única diferença entre elas é o grau de alinhamento com a vizinhança, ou seja, o $\alpha_{i,j}$ de Vicsek depende fortemente dos tecidos das células. Com isto, obtivemos uma lei de potência que pode ser reescalada aos dados experimentais de PFK, os de maior expoente de segregação. Logo, a HMGD é capaz de explicar os dados experimentais de Méhes, sem necessidade de hipóteses adicionais, apenas o confinamento externo das células é necessário.

12.7 Perspectivas

Este é um trabalho amplo e cada uma das abordagens permite diversas extensões, por exemplo, podemos continuar com as simulações para o modelo de animóides, além de estender as equações do agregado médio para sistemas com dimensão fractal, e fazer o mesmo para a equação de Smoluchowski.

Para as simulações da hipótese da velocidade diferenciada no modelo de animóides, um número estatístico maior de amostras seria útil, pois reduziria o erro quando restar um número pequeno de agregados no sistema. Também seria interessante produzir resultados tridimensionais, para compará-los com as demais hipóteses e experimentos. Para possibilitar isto, estamos trabalhando em implementar o cálculo das distâncias com o método das caixas em placas de vídeo, que permite grande paralelização dos cálculos e acelerar muito a execução dos programas. Este programa pode ser utilizado também para trabalhar com sistemas de tamanhos maiores nas simulações com o mecanismo de reconhecimento celular, pois, até o momento, todos os resultados dos espaços de parâmetros são para sistemas com número total de partículas $N = 2000$. Devido ao tempo de execução, ainda não foi possível analisar a forma da evolução da segregação para o mecanismo de reconhecimento, porém, com sistemas contendo $N = 8000$, isso será possível. Neste trabalho as curvas de segregação foram feitas para sistemas com $N = 8000$, mas a HMGD foi estudada com apenas $N = 6000$, devido a limitações arquiteturais das placas de vídeo.

Para a aproximação de agregado médio a perspectiva é estender as equações para o caso onde os agregados possam ter dimensão fractal. Essa é uma característica celular, pois inspecionando imagens de experimentos [17] e simulações [15, 43], vemos que as células não formam estruturas perfeitamente circulares ou esféricas. Para sistemas infinitos esta solução já existe e foi calculada por Kolb [19]. Podemos, então, reescrever nossas equações e calcular tais soluções. Iniciamos esta análise, mas depois de concluirmos que a dimensão fractal não afetava muito as curvas, voltamos a utilizar a dimensão do agregado inteira, ou seja, igual a dimensão do espaço, mas esta pode ser uma melhoria importante à medida que mais dados experimentais surgirem.

Quanto à equação de Smoluchowski, temos perspectivas similares às aquelas da aproximação de agregado médio. Vamos estender o núcleo de coagulação para caso onde possa existir agregados com dimensão fractal. Executar mais curvas para valores dos expoentes do núcleo de coagulação. Também nesta equação temos um problema a ser resolvido, pois toda a informação da dimensionalidade do sistema está nos núcleos de coagulação (termo de seção de choque) e

de fragmentação, (energia de superfície).

E, como a proposta da hipótese da motilidade de grupo diferenciada é muito recente, não fizemos uma análise profunda do espaços de parâmetros, nem da robustez da nova hipótese. Por este motivo não, temos resultados de simulação compatível com o resultado experimental com células de HaCaT, sendo esta, uma extensão óbvia deste trabalho.

Para finalizar, abrimos muitas possibilidades experimentais, pois trabalhamos com três hipóteses ainda em aberto, a HVD, o mecanismo de reconhecimento e a HMGD. Com experimentos é possível determinar efetivamente a validade da hipótese de velocidade diferenciada e a existência (ou não) de um fator de reconhecimento. Para tanto, seria necessário realizar um experimento de medida de motilidade celular em uma configuração onde a diferença de adesão entre as células fosse mínima. Adicionalmente, temos a HMGD, que pode ser testada, determinando-se como a difusão de agregados celulares depende da massa destes e se existem diferenças significativas nos expoentes encontrados nos dois tecidos envolvidos na mistura binária.

APÊNDICE A – Soluções do Modelo de Agregado Médio

As soluções para as equações diferenciais de sistemas sem limitações de tamanho, são analíticas diretas e foram apresentadas no texto, vamos escrever em detalhes as demais soluções transcendentais derivadas das funções hipergeométricas.

A.1 Tamanho Máximo de Agregação

A primeira limitação de tamanho modelada é por valor máximo, ou seja, o sistema contém um número finito de células, que podem se fundir, uma vez que todas as células estejam em um agregado o sistema entra em equilíbrio. Mostramos a equação diferencial novamente para este caso, eq. A.1.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m}{\tau} \left(1 - \frac{m}{b}\right) = am^{1-\frac{2-d\alpha}{d}} \left(1 - \frac{m}{b}\right) \quad (\text{A.1})$$

A solução geral, na forma de função hipergeométrica é dada pela eq. A.2.

$$G(m) = \frac{-dm^{\frac{-\alpha+2}{d}}}{b(-2-d+d\alpha)(-2+\alpha d)} \left\{ b(-2-d+d\alpha) + m(-2+\alpha d) {}_2F_1\left[1, 1-\alpha+\frac{2}{d}; 2-\alpha+\frac{2}{d}; \frac{m}{b}\right] \right\}$$

Neste trabalho, utilizamos apenas algumas combinações de valores de α e d , pois consideramos apenas sistemas de mono-camada, 2D, ou tridimensionais. Os valores utilizados de $\alpha = -1, 0, 0.5$, que representam a difusão normal, e os dois casos com movimento coletivo.

Podemos obter soluções específicas, com α e δ fixos, de duas formas. Podemos substituir os valores na equação diferencial e resolvê-la novamente, ou podemos substituir os valores na solução geral, ambas levam ao mesmo resultado para a $G(m)$ exceto por uma constante. Lembrando que toda a $G(m)$ será subtraída pela condição inicial, $G(m_0)$, logo qualquer constante

será eliminada por construção.

Vamos mostrar primeiro as soluções em duas dimensões, nas equações A.2, A.3 e A.4. Obtivemos a solução genérica com apoio do sitio wolframalpha [47] porém as soluções com $d = 2$ e $\alpha = -1$ foram obtidas calculando as integrais separáveis.

$$G(m) = \frac{b}{a} [-m - b \ln(|b - m|)] \quad (\text{A.2})$$

Nesta forma fica mais fácil calcular o limite $b \rightarrow \infty$ e testar se esta solução o respeita.

Para $\alpha = 0$,

$$G(m) = \frac{-b}{a} [\ln(a) + \ln(b - m)] \quad (\text{A.3})$$

Para $\alpha = 0.5$,

$$G(m) = \frac{1}{a} \left[2\sqrt{b} \tanh^{-1}(\sqrt{m/b}) \right] \quad (\text{A.4})$$

A solução em 3D, eq. A.5, é bem mais complexa do que a anterior, mas ainda podemos fazer a análise do limite $b \rightarrow \infty$ e testar se ela está de acordo com a solução para o caso infinito.

$$G(m) = -\frac{b}{2a} \left[-b^{2/3} \ln(b^{2/3} + \sqrt[3]{bm} + m^{2/3}) + 2b^{2/3} \ln(b^{1/3} - m^{1/3}) \right. \\ \left. + 2\sqrt{3} b^{2/3} \tan^{-1} \left(\frac{2m^{1/3} + b^{1/3}}{\sqrt{3} b^{1/3}} \right) + 3m^{2/3} \right] \quad (\text{A.5})$$

Para $\alpha = 0$:

$$G(m) = -\frac{-b^{2/3}}{2a} \left[-\ln(b^{2/3} + \sqrt[3]{bm} + m^{2/3}) + 2\ln(b^{1/3} - m^{1/3}) \right. \\ \left. + 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{2m^{1/3} + b^{1/3}}{\sqrt{3} b^{1/3}} \right) + 3m^{2/3} \right] \quad (\text{A.6})$$

E $\alpha = 0.5$:

$$G(m) = \frac{b^{1/6}}{2a} \left[-2\ln(b^{1/6} - m^{1/6}) + 2\ln(b^{1/6} + m^{1/6}) - \ln(\sqrt[6]{mb}) \right. \\ \left. - \ln(b^{1/3} + m^{1/3} - \sqrt[6]{mb}) + \ln(b^{1/3} + m^{1/3} + \sqrt[6]{mb}) \right. \\ \left. - 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{b^{1/6} - 2m^{1/6}}{\sqrt{3} b^{1/6}} \right) + 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{b^{1/6} + 2m^{1/6}}{\sqrt{3} b^{1/6}} \right) \right] \quad (\text{A.7})$$

A.2 Tamanho Mínimo de Agregação

Agora mostramos as soluções para a equação diferencial com a limitação de tamanho mínimo para a fusão de agregados. Assim como no primeiro limite, temos soluções bidimensionais e tridimensionais, assim como os valores de $\alpha = -1, 0, 0.5$ se mantêm. Por simplicidade, vamos mostrar apenas uma solução tridimensional, pois elas estão inclusas nas soluções com as duas limitações de tamanho, as soluções 2D são:

$\alpha = -1$:

$$G(m) = \frac{1}{2a} \left[(m-c)^2 + 4c(m-c) - (m_0-c)^2 - 4c(m_0-c) + 2c^2 \ln \left(\frac{|m-c|}{|m_0-c|} \right) \right] \quad (\text{A.8})$$

$\alpha = 0$:

$$G(m) = \frac{1}{2a} \left[(m-c)^2 + 4c(m-c) - (m_0-c)^2 - 4c(m_0-c) + 2c^2 \ln \left(\frac{|m-c|}{|m_0-c|} \right) \right] \quad (\text{A.9})$$

$\alpha = 0.5$:

$$G(m) = \frac{1}{2a} \left[(m-c)^2 + 4c(m-c) - (m_0-c)^2 - 4c(m_0-c) + 2c^2 \ln \left(\frac{|m-c|}{|m_0-c|} \right) \right] \quad (\text{A.10})$$

Solução 3D: $\alpha = -1$:

$$G(m) = \frac{1}{15a} \left[30c^2(m^{1/2} - m_0^{1/2}) + 10c(m^{3/2} - m_0^{3/2}) + 60(m^{5/2} - m_0^{5/2}) - 30c^{5/3} \left(\arctg \left(\sqrt{\frac{m}{c}} \right) - \arctg \left(\sqrt{\frac{m_0}{c}} \right) \right) \right] \quad (\text{A.11})$$

A.3 Limites Finitos Superior e Inferior

Para finalizar os casos com limitação de tamanho, mostramos as soluções específicas para a equação diferencial com ambas restrições de tamanho. Teremos, então, a dependência explícita dos parâmetros b e c em conjunto nestas soluções. Assim como nos outros casos, com apenas uma limitação, podemos obter as soluções específicas de duas formas: substituindo os valores de α e δ na equação diferencial; ou efetuando a substituição na hipergeométrica correspondente. Nas duas formas obtemos a mesma solução $G(m)$, a menos de uma constante.

As soluções bidimensionais são dadas abaixo pelas eqs. A.12 para $\alpha = -1$, A.13 para $\alpha = 0$ e A.14 para $\alpha = 0.5$.

$$G(m) = \frac{b}{a(b-c)} \left\{ -\frac{1}{2} [2bm + m^2 + 2b^2 \ln(|b-m|)] + \frac{1}{2} [m^2 + 2c^2 \ln(|m-c|)] \right\} \quad (\text{A.12})$$

Solução 2D $\alpha = 0$:

$$G(m) = \frac{1}{a(b-c)} [-b^2 \ln(|b-m|) + bc \ln(|m-c|)] \quad (\text{A.13})$$

Solução 2D $\alpha = 0.5$:

$$G(m) = \frac{[2\sqrt{b} \tanh^{-1}(\sqrt{\frac{m}{b}}) - \frac{2b}{\sqrt{c}} \tanh^{-1}(\sqrt{\frac{m}{c}})]}{a(b-c)} \quad (\text{A.14})$$

Da mesma forma, as soluções tridimensionais podem ser vistas nas eqs. A.15, para $\alpha = -1$, A.16 para $\alpha = 0$ e A.17 para $\alpha = 0.5$. Para $\alpha = -1$:

$$G(m) = \frac{b}{2a(b-c)} \left\{ b^{5/3} \ln(b^{2/3} + b^{1/3}m^{1/3} + m^{2/3}) - 2b^{5/3} \ln(b^{1/3} - m^{1/3}) \right. \\ \left. - 2\sqrt{3} b^{5/3} \left[\arctg \left(\frac{\frac{2m^{1/3}}{b^{1/3}} + 1}{\sqrt{3}} \right) \right] - 3b \left(m^{2/3} \right) \right. \\ \left. - c^{5/3} \ln(c^{2/3} + c^{1/3}m^{1/3} + m^{2/3}) + 2c^{5/3} \ln(c^{1/3} - m^{1/3}) \right. \\ \left. + 2\sqrt{3} c^{5/3} \left[\arctg \left(\frac{\frac{2m^{1/3}}{c^{1/3}} + 1}{\sqrt{3}} \right) \right] + 3cm^{2/3} \right\} \quad (\text{A.15})$$

Solução 3D $\alpha = 0$

$$G(m) = \frac{1}{2a(b-c)} \left[(b^{1/3} \ln(b^{2/3} + \sqrt[3]{bm} + m^{2/3}) + \frac{2b \ln(b^{1/3} - m^{1/3})}{c^{2/3}} \right. \\ \left. + 2b^{1/3} \ln(b^{1/3} - m^{1/3}) + 2\sqrt{3} b^{1/3} \tan^{-1} \left(\frac{2\sqrt[3]{m} + \sqrt[3]{b}}{\sqrt{3}\sqrt[3]{b}} \right) \right. \\ \left. - \frac{b \ln(c^{2/3} + \sqrt[3]{cm} + m^{2/3}) + 2b \ln(c^{1/3} - m^{1/3})}{c^{2/3}} + 2\sqrt{3} b^{1/3} \tan^{-1} \left(\frac{2\sqrt[3]{m} + \sqrt[3]{c}}{\sqrt{3}\sqrt[3]{c}} \right) \right] \quad (\text{A.16})$$

E $\alpha = 0.5$:

$$G(m) = \frac{-b}{2a(b-c)} \left\{ \frac{1}{b^{5/6}} \left[2 \ln(b^{1/6} - m^{1/6}) - 2 \ln(b^{1/6} + m^{1/6}) - \ln(b^{1/3} + m^{1/3} + \sqrt[6]{mb}) \right. \right. \\ \left. \left. + \ln(b^{1/3} + m^{1/3} - \sqrt[6]{mb}) + 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{b^{1/6} - 2m^{1/6}}{\sqrt{3} b^{1/6}} \right) - 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{b^{1/6} + 2m^{1/6}}{\sqrt{3} b^{1/6}} \right) \right] \right. \\ \left. + \frac{1}{c^{1/6}} \left[-2 \ln(c^{1/6} - m^{1/6}) + 2 \ln(b^{1/6} + m^{1/6}) \right. \right. \\ \left. \left. - \ln(c^{1/3} + m^{1/3} - \sqrt[6]{mc}) + \ln(c^{1/3} + m^{1/3} + \sqrt[6]{mc}) \right. \right. \\ \left. \left. - 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{c^{1/6} - 2m^{1/6}}{\sqrt{3} c^{1/6}} \right) + 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{c^{1/6} + 2m^{1/6}}{\sqrt{3} c^{1/6}} \right) \right] \right\} \quad (\text{A.17})$$

APÊNDICE B – Os Limites das Soluções

É fundamental que as equações, assim como suas respectivas soluções, tenham como casos limites de sistema infinito os resultados de Kolb. O primeiro limite para os casos 2,3 e 4 é considerar o tamanho máximo do sistema infinito, ou seja, b deve ser infinito. O segundo limite é considerar que o tamanho(ou a massa) mínimo do agregado é nula, assim devemos retornar as leis de escala propostas por Kolb e também obtidas na nossa equação diferencial que descreve o sistema. Vamos mostrar apenas os limites para $\alpha = -1$, primeiramente tratamos os casos bidimensionais para depois calcular os limites das soluções tridimensionais que são compostas por mais termos e devem ser analisadas com maior cuidado.

B.1 Limites em Sistemas Bidimensionais

Para o caso bidimensional com difusão normal, $\alpha = -1$ e $d = 2$, mostraremos os limites tomados para as soluções com os limites em todos os casos.

B.1.1 Limite Tamanho Máximo de Agregado Tendendo ao infinito

O primeiro limite tomado é para o caso 2, bidimensional, tomamos o limite para tamanho de sistema infinito, tomaremos o seguinte limite:

$$\lim_{b \rightarrow \infty} t(m) = \lim_{b \rightarrow \infty} \frac{b}{a} \left[-m + m_0 - b \ln \left(\frac{|b-m|}{|b-m_0|} \right) \right] \quad (\text{B.1})$$

Expandimos o logaritmo em série de potência. É importante expandir até termos de segunda ordem, pois os termos de primeira ordem são cancelados com os demais termos da equação levando a uma solução trivial desinteressante. A expansão do logaritmo natural é dada por:

$$\ln(1+x) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n x^{n+1}}{n+1} \quad (\text{B.2})$$

Esta expansão é válida para valores de $|x| < 1$, então antes de expandir em série precisamos reescrever o argumento do logaritmo, para obter um valor pequeno de $|x|$, temos então

$$\ln \left(\frac{|b-m|}{|b-m_0|} \right) = \ln \left(\frac{b|1-m/b|}{b|1-m_0/b|} \right) = \ln(|1-m/b|) - \ln(|1-m_0/b|) \quad (\text{B.3})$$

Reescrevemos a solução para o caso 2, com os logaritmos reescritos, para efetuarmos a expansão em série.

$$\lim_{b \rightarrow \infty} t(m) = \lim_{b \rightarrow \infty} \frac{b}{a} [-m + m_0 - b \ln \ln(|1-m/b|) - \ln(|1-m_0/b|)] \quad (\text{B.4})$$

Substituindo a expansão dos dois logaritmos na eq. B.1, com $x = -m/b$ e $x = -m_0/b$ respectivamente obtemos:

$$\lim_{b \rightarrow \infty} t(m) = \frac{b}{a} \left[-m + m_0 - b \left(-\frac{m}{b} - \frac{m^2}{2b^2} + \right) + b \left(-\frac{m_0}{b} - \frac{m_0^2}{2b^2} + \right) \right] = \frac{1}{2a} (m^2 - m_0^2) \quad (\text{B.5})$$

que é equivalente a $m(t) \sim t^{1/2}$ que era o resultado para o caso 1.

B.1.2 Tamanho Efetivo de Coagulação

Para o caso 3, com tamanho mínimo de agregado indo a zero, o limite é trivial, podemos fazer a substituição de forma bastante direta, temos então:

$$\lim_{c \rightarrow 0} t(m) = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{2a} \left[(m-c)^2 + 4c(m-c) - (m_0-c)^2 - 4c(m_0-c) + 2c^2 \ln \left(\frac{|m-c|}{|m_0-c|} \right) \right] = \frac{1}{2a} (m^2 - m_0^2) \quad (\text{B.6})$$

como esperado.

B.1.3 Tamanhos Mínimo e Máximo

O último limite bidimensional é o caso 4, onde precisamos tomar ambos os limites. À pesar da solução ser mais complexa, os cuidados necessários são exatamente os mesmos que aqueles tomados que os tomados limites anteriores. Efetuamos, então, o limite de $c \rightarrow 0$, por ser trivial, e depois o limite $b \rightarrow \infty$, e, como esperado, chegamos ao mesmo expoente para a lei de escala.

$$\lim_{b \rightarrow \infty} \lim_{c \rightarrow 0} t(m) = \frac{1}{2a} (m^2 - m_0^2) \quad (\text{B.7})$$

B.2 Limites em Sistemas Tridimensionais

Os casos tridimensionais exigem mais cuidados, precisamos expandir as funções até no mínimo quinta ordem para encontrarmos a solução não trivial. Então, além da expansão dos termos com logaritmos, cuja a expansão foi mostrada, na eq. B.2, temos também de expandir o arco tangente, que em torno de $x = 0$, é dado por:

$$\arctg(x) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1} x^{2n-1}}{2n-1} \quad (\text{B.8})$$

Como nos casos bidimensionais o limite, $c \rightarrow 0$ é feito diretamente, então, vamos mostrar apenas o caso 2, que contém apenas o limite de tamanho máximo.

A solução para este caso é dada por:

$$G(m) = -\frac{b}{2a} \left[-b^{2/3} \ln(b^{2/3} + \sqrt[3]{bm} + m^{2/3}) + 2b^{2/3} \ln(b^{1/3} - m^{1/3}) + 2\sqrt{3}b^{2/3} \tan^{-1} \left(\frac{2m^{1/3} + b^{1/3}}{\sqrt{3}b^{1/3}} \right) + 3m^{2/3} \right] \quad (\text{B.9})$$

Como feito no limite bidimensional, nós reescrevemos o logaritmo, que assume a forma da eq. B.10. Note que agora estamos escrevendo a solução apenas com a parte dependente de m , sem o termo inicial. Logo qualquer constante que possa depender de b , será anulada pela mesma constante no termo em m_0 .

$$\ln(b^{2/3} + (bm)^{1/3} + m^{2/3}) = \ln(1 + m^{1/3}b^{-1/3} + m^{2/3}b^{-2/3}) + \frac{2}{3} \ln(b) \quad (\text{B.10})$$

A expansão do logaritmo, contendo termos de até quinta ordem e desprezando a parte constante é dada por:

$$\ln \left[1 + \left(\frac{m}{b} \right)^{\frac{1}{3}} + \left(\frac{m}{b} \right)^{\frac{2}{3}} \right] = m^{\frac{1}{3}}b^{-\frac{1}{3}} + \frac{m^{\frac{2}{3}}b^{-\frac{2}{3}}}{2} - \frac{2mb}{3} + \frac{m^{\frac{4}{3}}b^{-\frac{4}{3}}}{4} + \frac{m^{\frac{5}{3}}b^{-\frac{5}{3}}}{5} + O(((m/b)^{\frac{1}{3}})^6) \quad (\text{B.11})$$

De forma análoga reescrevemos e expandimos o segundo logaritmo da solução:

$$\ln(1 - (m/b)^{1/3}) = -m^{\frac{1}{3}}b^{-\frac{1}{3}} - \frac{m^{\frac{2}{3}}b^{-\frac{2}{3}}}{2} - \frac{m^{\frac{4}{3}}b^{-\frac{4}{3}}}{4} - \frac{m^{\frac{5}{3}}b^{-\frac{5}{3}}}{5} + O(((m/b)^{\frac{1}{3}})^6) \quad (\text{B.12})$$

E também reescrevemos o arco-tangente:

$$\tan^{-1} \left(\frac{2(m/b)^{1/3} + 1}{\sqrt{3}} \right) = \frac{\sqrt{3}}{2} m^{\frac{1}{3}}b^{-\frac{1}{3}} - \frac{\sqrt{3}}{4} m^{\frac{2}{3}}b^{-\frac{2}{3}} + \frac{\sqrt{3}}{8} m^{\frac{4}{3}}b^{-\frac{4}{3}} - \frac{\sqrt{3}}{10} m^{\frac{5}{3}}b^{-\frac{5}{3}} + O(((m/b)^{\frac{1}{3}})^7) \quad (\text{B.13})$$

No limite $b \rightarrow +\infty$ os termos de ordem mais alta que $m^{5/3}$ desaparecem porque todos eles têm potências negativas de b , que tendem a zero a medida que b cresce. Já os termos com potências menores que $5/3$ se anulam, e, como era esperado, o termo com $m^{5/3}$ é o único que resta para este limite.

$$\lim_{b \rightarrow \infty} G(m) = \frac{3m^{5/3}}{5a} \quad (\text{B.14})$$

Como esperado para o caso tridimensional com difusão normal, o limite de $b \rightarrow +\infty$ resulta em uma lei de potência com o expoente previsto por Kolb [19].

Não vamos detalhar os demais casos que utilizamos neste trabalho, pois as condições necessárias para efetuar os limites é similar, em alguns casos até mesmo mais simples.

Referências Bibliográficas

- [1] M. S. Steinberg, *Science* **141** 401 (1963).
- [2] B. M. Jones, P. M. Evans, D. A. Lee *Exp. Cel. Res.* **180** 287-296 (1989).
- [3] T. Vicsek, A. Czirók, E. Ben-Jacob, I. Cohen, O. Shochet, *Phys. Rev. Lett.* **75**, 1226 (1995).
- [4] F. Graner and J. Glazier, *Phys. Rev. Lett.* **69** 2013 (1992).
- [5] A. Kolodko e K. Saberfeld, *Monte Carlo Methods and Applications mcma.* **9** 4 315–339 (2003).
- [6] S. F. Gilbert (editor), *Developmental Biology*, publicado por Sinauer Associates Inc., (1997).
- [7] J. P. Rieu, C. Barentin, S. Sawai, Y. Maeda, Y. Sawada, *J. Biological Physics* **30** 345 (2004).
- [8] J. P. Rieu, N. Kataoka and Y. Sawada, *Phys. Rev. E* **57** 1 (1998).
- [9] P. Schiefferdecker *Z. Wiss. Mikr.* **3** 483-484 (1886).
- [10] A. Moscona, *Exp. Cell Res.* **3** 535–539, (1952).
- [11] Verônica Grienen, "Estudo do estabelecimento de configurações em estruturas celulares", dissertação apresentada em 09/11/2004 no IF-UFRGS. Orientação: Rita M. C. de Almeida.
- [12] J. C. Mombach, J. A. Glazier, R. C. Raphael, M. Zajac, *Phys. Rev. Lett.* **75** 11 (1995).
- [13] V. H. Wilson, *J. Exp. Zool.* **5** 245-258 (1907).
- [14] J. Holtfreter, *Rev. Can. Bio.* **3** 220-250 (1944).
- [15] J. Belmonte, L. G. Brunnet, G. L. Thomas, R. M. C. de Almeida, H. Chaté, *Phys. Rev. Lett.* **100** 248702 (2008).
- [16] M.S. Steinberg, *Developmental Biology* **180** 377 (1996).
- [17] E. Méhes, E. Mones, V. Nemeth, T. Vicsek, *PLoS ONE* **7** **2** e31711 (2011).
- [18] Carine P. Beatrici, "Segregação Celular Induzida por Diferença de Motilidade", dissertação apresentada em 04/08/2008 no IF-UFRGS. Orientação: Leonardo G. Brunnet.
- [19] M. Kolb, *Phys. Rev. Lett.* **53** 1653 (1984).

- [20] M. J. Ratcliff, *Isis* **95** 255 (2004).
- [21] A. M. Turing. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* **237** 37-72 (1952).
- [22] A. S. G. Curstis, *Exp. Cel Res. Suplemento* **8** 107-122, (1961).
- [23] A. K. Harris, *J. Theor. Biol.* **61** 267-285 (1976).
- [24] J. v. Gestel, F. J. Weissing, O. P. Kuipers e Á. Kovács *The ISME Journal* **8** 2069–2079, (2014).
- [25] James P. Sethna, *Statistical Mechanics Entropy, Order Parameters, and Complexity*, Clarendon Press Oxford (2011).
- [26] A. J. Bray, *Advances in Physics*, **43** 3 357-459 (1994).
- [27] A. J. Bray, *Advances in Physics*, **51** 2 481-587 (2002).
- [28] T. A. Witten Jr., L. M. Sader, *Phys. Rev. Lett.* **47** 1400 (1981).
- [29] Tamás Vicsek, Fereydon Family, *Phys. Rev. Lett.* **52** 1669 (1984).
- [30] P. Meaking, T. Vicsek e Fereydon Family, *Phys. Rev. B* **31** 564 (1985).
- [31] R. Julies, R. Botet and P. M. Mors, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **83** 135 (1987).
- [32] M Kreer and O. Penrose, *J. Stat. Phys* **75** 389-407 (1994).
- [33] C. W. Reynolds **21(4)**(Seggraph'87 Conference Proceedings), 25-34, (1987).
- [34] C. Huepe, M. Aldana, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 168701 (2004).
- [35] M. Nagy, I. Daruka, T. Vicsek, **373** 445 (2007)
- [36] G. Baglietto, E. V. Albano, *Phys. Rev. E*, **80**, 50103 (2009).
- [37] H. Chaté, F. Ginelli, F. Raynaud, *Phys. Rev. E* **77** 1 (2008).
- [38] G. Grégoire, H. Chaté, Y. Tu, *Physica D* **181**,157 (2003).
- [39] B. Szabó, G. L. Szöllöski, B. Gönei, Z. Jurányi, D. Selmeczi, T. Vicsek, *Phys. Rev. E* **74** 061908 (2006).
- [40] J. D. Van der Waals, D. "The Equation of State for Gases and Liquids", Nobel Lecture, December 12 (1910).
- [41] C. Scherer, *Métodos Computacionais da Física* (2005).
- [42] A. J. Kabla, *J R Soc Interface* **9** 3268–3278, (2012).
- [43] Carine P. Beatrici, Leonardo G. Brunnet, *Phys. Rev. E.* **84** 031927 (2011).
- [44] Multi-Scale Modeling of Tissues Using CompuCell3D – M. Swat, Gilberto L. Thomas, Julio M. Belmonte, A. Shirinifard, D.Hmeljak, J. A. Glazier, *Computational Methods in Cell Biology, Methods in Cell Biology* **110**: 325-366 (2012).

- [45] R. Kubo, M. Toda, N. Hashitsume, “Statistical Physics II”, Springer-Verlag, p. 6 , (1978).
- [46] Milton Abramowitz and Irene A. Stegun, Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables (1964).
- [47] <http://www.wolframalpha.com/>
- [48] Carine P. Beatrice, Rita M. C. de Almeida, Leonardo G. Brunnet, Mean cluster approach indicates cell sorting is a collective diffusion problem, submetido ao Physical Review Letters
- [49] F. Peruani, A. Deutsch, M. Bär, Eur. Phys. J. Special Topics **157**, 111–122 (2008)
- [50] Julio M. Fernández-Dias, Germán J. Gómez-García, Physica D, **239** 279 (2010).
- [51] L. E. Reichl, A Modern Course in Statistical Physics (1998).
- [52] J. Hoshen e R. Kopelman, Phys. Rev. D. **14** 8 (1976).