

Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics

A Influência da Diferenciação Fenotípica na Dinâmica do Crescimento Tumoral

Heber L. Rocha¹

Regina C. Almeida²

Anna Claudia M. Resende³

Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Petrópolis, RJ

Ernesto A. B. F. Lima⁴

Institute for Computational Engineering and Sciences (ICES), Austin, Texas, EUA

Resumo. O crescimento tumoral é resultado de mecanismos não lineares complexos que ocorrem em diversas escalas de tempo e espaço. A modelagem computacional pode ajudar na compreensão de tais mecanismos, assim como auxiliar no desenvolvimento de terapias efetivas. Neste trabalho, desenvolvemos um modelo híbrido avascular que integra três escalas espaciais (tecidual, celular e molecular) com o objetivo de estudar a influência da resposta regulatória intra-celular nos processos de migração e proliferação. Essas repostas resultam de reações bioquímicas de sinalização molecular iniciadas por estímulos extracelulares. Experimentos computacionais são realizados para demonstrar a importância da diferenciação fenotípica na dinâmica do crescimento tumoral.

Palavras-chave. Crescimento Tumoral, Modelo Híbrido, Rede de Sinalização

1 Introdução

Neste trabalho, utilizamos como base o modelo híbrido multiescala desenvolvido em [4] para estudar diferenciação fenotípica em células cancerosas. O fenótipo celular é orquestrado por uma rede complexa de sinalização molecular que integra estímulos extracelulares que culmina com uma resposta regulatória. Assumimos que em cada célula a proliferação e migração é controlada pelo mecanismo de sinalização do fator de crescimento epidérmico EGF (*Epidermal Growth Factor*) [5]. Este mecanismo está hiperativado em aproximadamente 30% de todos os cânceres [2] e aqui é modelado por um sistema de equações diferenciais ordinárias. As taxas de variação de duas moléculas que fazem parte deste mecanismo conferem à célula vantagem proliferativa ou migratória, tendo efeito no padrão do desenvolvimento do tumor.

¹heberlr@lncc.br

²rcca@lncc.br

³annacmr@lncc.br

⁴lima@ices.utexas.edu

2 Modelo Híbrido

O modelo híbrido desenvolvido modela fenômenos do crescimento tumoral avascular que ocorrem em nível tecidual, celular e molecular. Na escala celular utilizamos um modelo baseado em agentes (MBA) através do qual atribuímos propriedades fenotípicas e quantidades físicas à cada célula, cujo comportamento é controlado por um conjunto de regras. As dispersões de oxigênio (única fonte de nutrientes) e EGF no microambiente são caracterizadas na escala tecidual, utilizando modelos contínuos de transporte de massa representados por equações diferenciais parciais. No nível molecular, ou intra-celular, modelamos a sinalização de EGF através de um sistema de equações diferenciais ordinárias, cuja resposta confere à célula a vantagem de proliferação ou de migração (ver Fig. 1). Os modelos são brevemente descritos a seguir. Maiores detalhes podem ser encontrados em [3, 4].

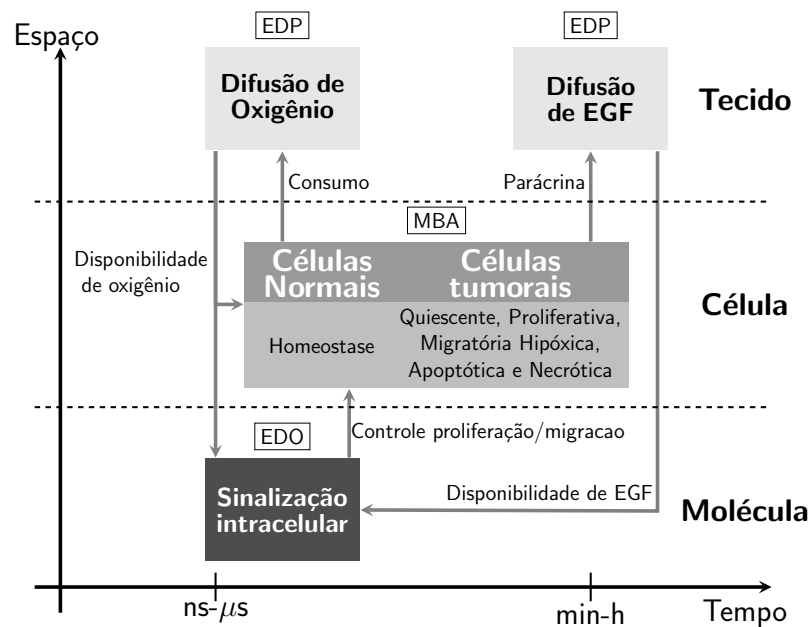


Figura 1: Esquema conceitual do modelo híbrido desenvolvido.

2.1 Escala celular: Forças que atuam sobre as células

O movimento celular resulta do balanço de forças que atuam em cada célula. Como apresentado em [1, 3], as forças são modeladas dependendo do espaço, tempo e do microambiente, e são definidas a partir de um raio de ação R_A , que expressa a distância máxima possível para que ocorra alguma interação. Consideramos as seguintes forças: (i) *adesão e repulsão célula-célula* (\mathbf{F}_{cca} e \mathbf{F}_{ccr}); (ii) *compressão e resistência à compressão do tecido* (\mathbf{F}_{ct} e \mathbf{F}_{ret}), associadas ao acúmulo de tensão de compressão no interior do tumor devido ao seu crescimento; (iii) *atrito* (\mathbf{F}_a) atrito do fluido intersticial; (iv) *haptotática* (\mathbf{F}_{hap}), na direção da degradação da matriz extracelular. Assumimos que as forças entram em equilíbrio rapidamente e desprezamos os efeitos da inércia. Como em [1], assumimos

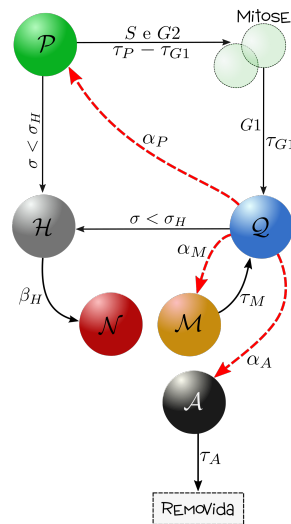
$\mathbf{F}_d^i = -\eta \mathbf{v}_i$, em que η representa a viscosidade do fluido intersticial e \mathbf{v}_i é a velocidade da célula i . Sendo $N(t)$ o número de células no tempo t , a segunda lei de Newton conduz a

$$\sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N(t)} \overbrace{(\mathbf{F}_{cca}^{ij} + \mathbf{F}_{ccr}^{ij})}^{\text{célula-célula}} + \overbrace{(\mathbf{F}_{ct}^i + \mathbf{F}_{rct}^i + \mathbf{F}_d^i + \mathbf{F}_{hap}^i)}^{\text{célula-meio}} = 0 \Rightarrow \mathbf{v}_i = \frac{1}{\eta} \left(\sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N(t)} (\mathbf{F}_{cca}^{ij} + \mathbf{F}_{ccr}^{ij}) + \mathbf{F}_{ct}^i + \mathbf{F}_{rct}^i + \mathbf{F}_{hap}^i \right).$$

As forças \mathbf{F}_{cca}^{ij} , \mathbf{F}_{ccr}^{ij} , \mathbf{F}_{ct}^i e \mathbf{F}_{rct}^i são definidas a partir de funções potenciais (ver [4]). Descrevemos o movimento haptotático apenas para as células migratórias, o qual depende da densidade da matriz extracelular (MEC), denotada por f . Dados uma distribuição para f e o coeficiente χ de adesão entre a célula e a MEC, a força haptotática que ocorre na direção de degradação da MEC é representada por $\mathbf{F}_{hap}^i = -\chi \nabla f$.

2.2 Escala celular: Estados fenotípicos

No MBA cada célula pode ser tumoral ou normal, sendo as células normais mantidas em homeostase. As células tumorais são diferenciadas em seis fenótipos (quiescente, proliferativa, apoptótica, migratória, hipóxica e necrótica). As transições fenotípicas (ver Fig. 2) dependem fundamentalmente da disponibilidade de oxigênio no microambiente, cuja concentração é denotada por σ . Havendo oxigênio suficiente, uma célula quiescente pode proliferar, migrar ou morrer (sofrer apoptose). Tais transições são modeladas como eventos estocásticos. Se a concentração de oxigênio na célula estiver abaixo de certo limiar σ_H , a célula se torna hipóxica e eventualmente morre por necrose, já que não consideramos aporte adicional de oxigênio por angiogênese (modelo avascular).



Q quiescente: célula que possui oxigênio suficiente para sobrevivência e está na fase G_0 do ciclo celular;

P proliferativa: célula que sofre mitose;

M migratória: célula que sofre migração;

A apoptótica: célula que sofre o processo natural de morte celular;

H hipóxica: célula sujeita à stress nutricional, i.e., submetida a um nível de oxigênio abaixo do necessário para divisão ou migração;

N necrótica: célula que morre por falta de oxigênio e sofre calcificação.

Figura 2: Ilustração das possíveis transições entre estados fenotípicos. Transições estocásticas e determinísticas estão indicadas por setas em vermelho e em preto, respectivamente.

Dado um intervalo de tempo Δ_t , as transições estocásticas são definidas pelas seguintes

probabilidades:

$$\begin{aligned} Pr(\mathcal{Q} \rightarrow \mathcal{P}) &= 1 - \exp(-\alpha_P \Delta t); & \alpha_P(t) &= \bar{\alpha}_P \left(\frac{\sigma - \sigma_H}{1 - \sigma_H} \right) \left(1 - \frac{N_{out}^t}{N_{out}^{max}} \right); \\ Pr(\mathcal{Q} \rightarrow \mathcal{M}) &= 1 - \exp(-\alpha_M \Delta t); & \alpha_M(t) &= \bar{\alpha}_M \left(\frac{\sigma - \sigma_H}{1 - \sigma_H} \right); \\ Pr(\mathcal{Q} \rightarrow \mathcal{AP}) &= 1 - \exp(-\alpha_A \Delta t); & \alpha_A &= \text{constante}. \end{aligned}$$

A disponibilidade de oxigênio atua na inibição da proliferação e migração celular até o limiar σ_H ser alcançado, a partir do qual não há disponibilidade de oxigênio para estas alterações fenotípicas. Assumimos que N_{out}^t , que expressa o número máximo de células que deixam o domínio, está correlacionado ao acúmulo de compressão induzido pelo crescimento do tumoral. Quando $N_{out}^t = N_{out}^{max}$, a proliferação é completamente inibida e o crescimento estagna. Os parâmetros $\bar{\alpha}_P$ e $\bar{\alpha}_M$ representam as vantagens proliferativa e migratória, respectivamente, controladas pela sinalização intracelular. Por simplicidade assumimos que a transição de quiescente para apoptótica é homogênea. As regras específicas associadas à proliferação, apoptose e necrose podem ser encontradas em [3, 4]. Assumimos que na migração celular, assim que ocorre a transição do estado quiescente para o migratório, a célula sofre estímulos migratórios durante um tempo τ_M , após o qual ela retorna ao estado quiescente.

2.3 Escala intracelular: Sinalização molecular

A cada célula associamos um modelo sub-celular em que proteínas e outras moléculas interagem numa cascata de eventos bioquímicos. Com base no modelo apresentado em [5], um sistema de equações diferenciais ordinárias modela a sinalização envolvendo 20 moléculas/compostos distintos. A taxa de variação de cada composto é dada pela lei de conservação de massa entre as reações cinéticas de produção e consumo. O sistema de equações resultante é resolvido utilizando o método de Runge-Kutta de quarta ordem. Duas moléculas, PCL_γ e ERK, têm papel crucial na proliferação e migração. Dados dois limiares T_{PLC} e T_{ERK} , a resposta do mecanismo de sinalização pode conferir uma vantagem da célula para proliferar ou para migrar, conforme a regra definida na Tabela 1. Sem vantagem, ambos $\bar{\alpha}_P$ e $\bar{\alpha}_M$ são nulos.

Tabela 1: Resposta do mecanismo de sinalização

Vantagem proliferativa: $\bar{\alpha}_P = 1$	Vantagem migratória: $\bar{\alpha}_M = 1$
$\frac{dPCL_\gamma}{dt} < T_{PLC}$ e $\frac{dERK}{dt} > T_{ERK}$	$\frac{dPCL_\gamma}{dt} > T_{PLC}$ e $\frac{dERK}{dt} < T_{ERK}$

2.4 Escala tecidual: transporte de oxigênio e de EGF

As condições do ambiente tumoral são estabelecidas pelas concentrações de oxigênio e de EGF, as quais são modeladas aplicando a lei fundamental de conservação de massa. Definindo um domínio regular $\Omega \in \mathbb{R}^2$, estes modelos são dados respectivamente por:

$$\nabla \cdot D(\nabla \sigma) - \Lambda \sigma = 0; \quad \frac{\partial \sigma_{egf}}{\partial t} = \nabla \cdot (D_{egf} \nabla \sigma_{egf}) + F_{egf}. \quad (1)$$

Nestas equações, D é o coeficiente de difusão, Λ é a taxa de consumo/decaimento de oxigênio, σ_{egf} é a concentração de EGF, $D_{egf} \ll D$ é o coeficiente de difusão de EGF e F_{egf} é a fonte de EGF, o qual é liberado pelas células quiescentes. A taxa de consumo Λ e a fonte de EGF são os elementos que integram o MBA com os modelos de transporte no microambiente. As equações (1) são resolvidas utilizando o método de diferenças finitas via diferença centrada no espaço e o método de Euler implícito no tempo [3].

3 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

Consideramos uma região de um tecido qualquer, composta por células normais e tumorais. Por simplicidade, assumimos que o domínio computacional do modelo discreto é circular de raio $250 \mu\text{m}$. O domínio computacional do problema contínuo é quadrangular de lado $500 \mu\text{m}$, envolvendo completamente a região do modelo celular. Os parâmetros e condições de contorno do tipo Dirichlet utilizados estão especificados em [3,4]. Para capturar padrões desejados da evolução tumoral, definimos $T_{PLC} = -1 \times 10^{-4}$, $T_{ERK} = 1,2 \times 10^{-5}$ e a densidade de matriz extracelular é tal que $f \in \mathcal{U}[0,5;1]$. Para a caracterização visual dos diferentes estados fenotípicos, definimos a notação apresentada na Fig. 3.

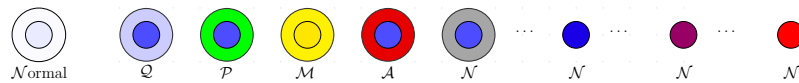
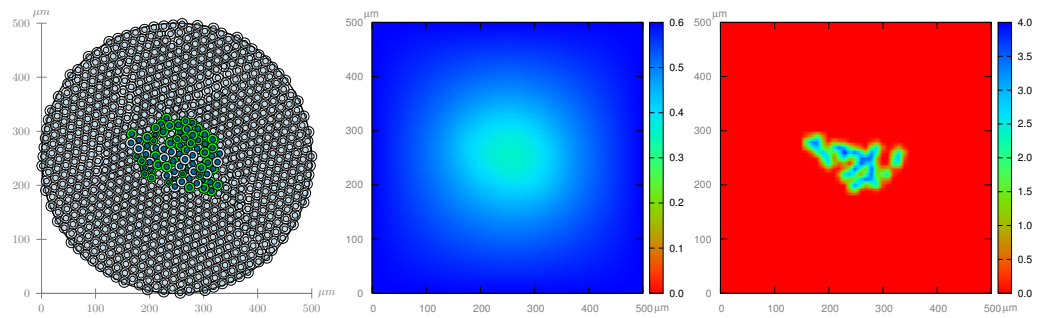


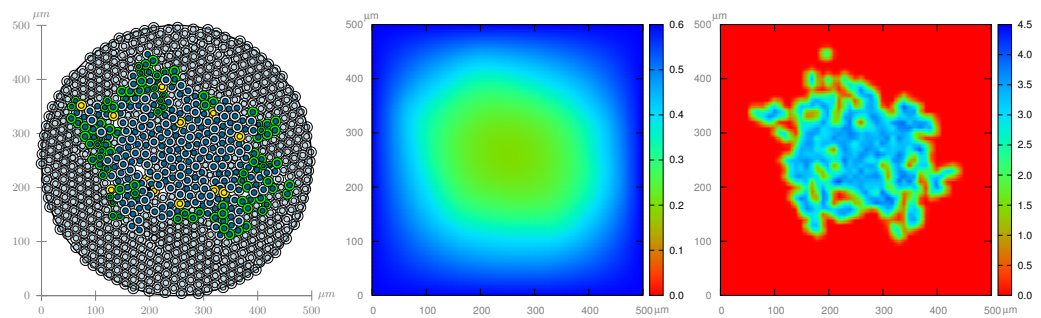
Figura 3: Notação utilizada para a visualização das simulações. Da esquerda para direita: célula normal e células tumorais classificadas de acordo com seu fenótipo: quiescente (Q), proliferativa (P), migratória (M), apoptótica (A), estágio inicial da necrose (N) e três diferentes níveis de calcificação da célula necrótica, com o vermelho indicando calcificação mais intensa.

A condição inicial representa um pequeno tumor no centro do domínio (duas células quiescentes e duas proliferativas), a distribuição associada de EGF e uma distribuição uniforme de oxigênio. Na Fig. 4 apresentamos uma realização da evolução tumoral controlada pela sinalização intracelular em $t = 4, 17, 8, 33; 12, 5 \text{ dias}$. Inicialmente o tumor se desenvolve e gradativamente consome o oxigênio disponível. Em $t = 4, 17 \text{ dias}$, o tumor é formado majoritariamente por células proliferativas, representando a fase inicial do crescimento tumoral avascular. A dispersão de EGF é restrita à vizinhança das células que liberam o fator de crescimento. Em $t = 8, 33 \text{ dias}$, observamos a formação de níveis de diferentes fenótipos: uma região mais interna onde as células quiescentes são predominantes e uma região externa onde a maioria das células são proliferativas e migratórias. Em $t = 12, 5 \text{ dias}$, a intensa proliferação produz um rápido decréscimo do oxigênio na direção do centro do tumor, onde o nível de nutrientes é incapaz de sustentar a viabilidade celular, surgindo o núcleo necrótico. Esta região eventualmente passa por um processo de calcificação, configuração típica observada em tumores avasculares. Neste padrão de evolução, observamos que o tumor está fragmentado, intercalado por células normais em decorrência da ocorrência do processo migratório.

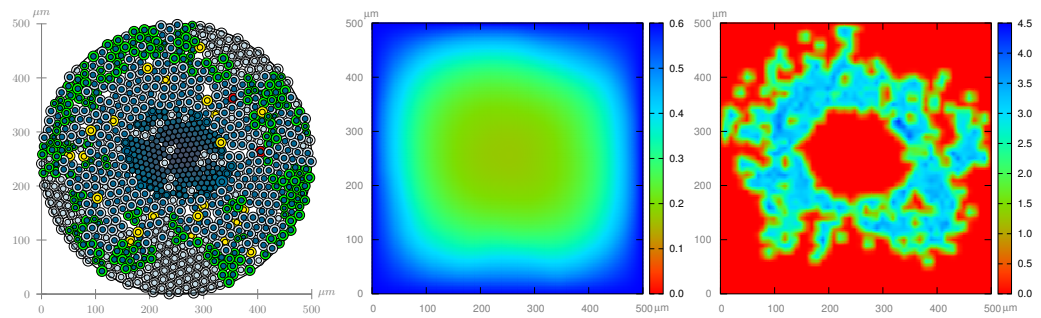
A Figura 5 apresenta a média da evolução dos fenótipos na presença e ausência de células migratórias. A ausência de migração conduz à sustentação do crescimento tumoral, o qual ocorre de forma mais lenta. A presença das células migratórias acelera o crescimento.



(a) Simulação em 4,17 dias: predominância das células proliferativas.



(b) Simulação em 8,33 dias: formação de estrutura em níveis fenotípicos.



(c) Simulação em 12,5 dias: formação do núcleo necrótico, início do processo de calcificação e redução significativa do oxigênio na direção do centro do tumor.

Figura 4: Uma realização da evolução do modelo celular (esquerda), concentração de oxigênio (centro) e concentração de EGF (direita).

Entretanto, por se tratar de um tumor avascular, o crescimento eventualmente estagna.

4 CONCLUSÕES

Os fenômenos de sinalização intracelular integrados ao modelo foram capazes de controlar a proliferação e migração celular. As simulações realizadas apontam que os mecanismos de proliferação/migração têm papel fundamental na sustentação da evolução do tumor e seu padrão de crescimento. Consideramos os efeitos adicionais da força haptotática, a qual por sua vez regula o movimento migratório das células e provoca fragmentação no tumor,

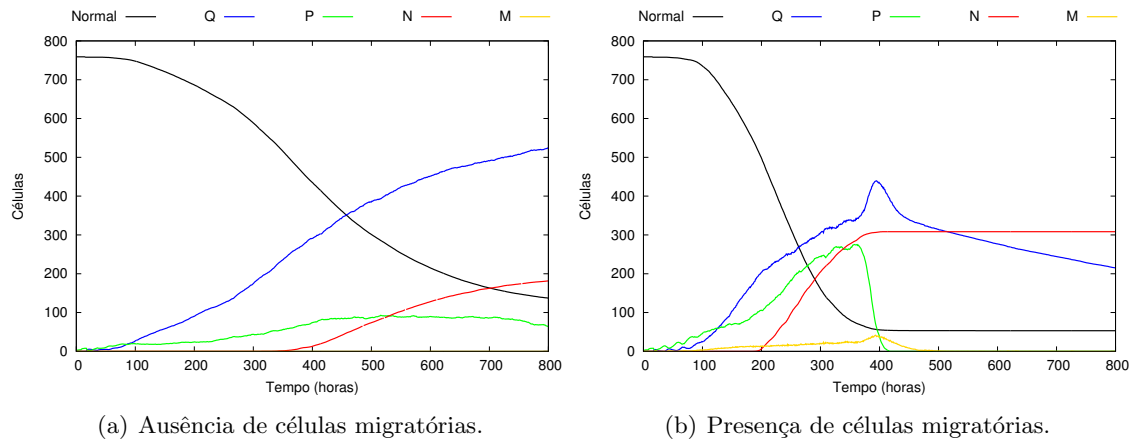


Figura 5: Média dos diferentes fenótipos. Os valores Normal, Q, P, N e M representam o número de células normais, quiescentes, proliferativas, necróticas e migratórias, respectivamente.

como observada em cânceres mais invasivos. As simulações demonstraram que o modelo consegue representar qualitativamente a diferenciação fenotípica de tumores avasculares em um microambiente.

Agradecimentos

HLR e ACRM agradecem o apoio concedido pelo CNPq e CAPES através dos projetos de número 1576953/2016-3 e 140271/2016-3.

Referências

- [1] P. Macklin, M. E. Edgerton, A. M. Thompson, and V. Cristini. Patient-calibrated agent-based modelling of ductal carcinoma in situ (DCIS): From microscopic measurements to macroscopic predictions of clinical progression, *Journal of Theoretical Biology*, 301:122-140, 2012. DOI: 10.1016/j.jtbi.2012.02.002.
- [2] P. J. Roberts and C. J. Der, Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer, *Oncogene*, 26:3291-3310, 2007. DOI: 10.1038/sj.onc.1210422
- [3] H. L. Rocha. Modelagem Híbrida Multiescala para o Crescimento Tumoral. Dissertação de Mestrado, LNCC/MCTI, 2016.
- [4] H. L. Rocha, R. C. Almeida, A. C. M. Resende, and E. A. B. F. Lima. Modelagem Híbrida em Três Escalas para o Crescimento Tumoral. Proceedings of the XXXVII Iberian Latin-American Congress on Computational Methods in Engineering (XXXVII CILAMCE), Brasília, Distrito Federal, Brasil, 2016.
- [5] Z. Wang, L. Zhang, J. Sagotsky, and T. S. Deisboeck. Simulating non-small cell lung cancer with a multiscale agent-based model, *Theor Biol Med Model*, 4:50, 2007. DOI: 10.1186/1742-4682-4-50.