

A Influência de *Jagged* durante a angiogênese

Dandara L. do Nascimento¹

Pós-graduação em Modelagem Matemática e Computacional, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG 7675, Av. Amazonas, Nova Gameleira, Belo Horizonte, MG, Brasil

Allbens P. F. Atman²

Departamento de Física - CEFET-MG e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Sistemas Complexos - INCT - SC

Resumo. Este estudo tem como objetivo apresentar um modelo matemático para a angiogênese, baseado em equações diferenciais ordinárias, e analisar se o modelo reproduz a influência da proteína *Jagged*, quando a ação de *fringe* é desconsiderada. O modelo matemático foi traduzido em equações de diferenças para o *software MatLab*[®] e, tanto a dinâmica quanto o equilíbrio do sistema foram analisados ao variar a taxa de produção de *Jagged*. Os resultados obtidos foram comparados com estudos da literatura e verificou-se que o modelo pode representar a angiogênese em estados fisiológicos ou patológicos, a depender dos parâmetros utilizados para *Jagged*.

Palavras-chave. Angiogênese, Modelos Baseados em Equações Diferenciais, Proteínas

1 Introdução

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos já existentes [4]. Esse mecanismo é importante, por exemplo, para a cicatrização de ferimentos, formação de embriões e para direcionar oxigênio e nutrientes para as células[2].

Durante a angiogênese, as células migram em direção à sinalização emitida por proteínas, formando um novo ramo de vaso sanguíneo para suprir o sistema de nutrientes e oxigênio. Em condições normais, os novos vasos sanguíneos são formados de maneira robusta e organizada. Em condições anormais, como ocorre no surgimento de um tumor, os vasos formados são excessivos, raquíticos e emaranhados [4].

Para compreender este processo, é preciso analisar os componentes que atuam para que a angiogênese ocorra. Dessa forma este trabalho tem como objetivo apresentar um modelo matemático para a regulação da angiogênese, baseado no modelo apresentado em [4], e avaliar o sistema quando a taxa de produção das proteínas é alterada.

Estudos que se concentram na caracterização das vias de sinalização atuantes durante o processo de angiogênese auxiliam pesquisas direcionadas ao uso de novos medicamentos para diversas doenças, entre elas o câncer. Os dados aqui apresentados poderão contribuir futuramente com pesquisas que investiguem novas terapias que minimizam os riscos e efeitos colaterais no tratamento do câncer e de outras doenças.

2 Dinâmica das proteínas no processo de angiogênese

Para sobreviver, qualquer célula de um organismo vivo, inclusive a tumoral, precisa do oxigênio e nutrientes transportados pela corrente sanguínea. Quando essa alimentação falta, tem início um

¹dandaralno@gmail.com

²atman@cefetmg.br

processo no qual as células “asfíxiadas” liberam fatores de crescimento angiogênico. Um desses fatores é o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que é uma proteína que promove o crescimento de novos vasos sanguíneos em direção a uma população de células carente de sangue oxigenado.

No processo de angiogênese há a presença de *Notch*, que é uma proteína receptora que se conecta às proteínas ligantes *Jagged* e *Delta*. A proteína *Notch* é de extrema importância para a manutenção dos tecidos do corpo humano.

Quando *Notch* recebe a proteína *Delta* ou *Jagged* de células diferentes, há uma ligação trans, porém, quando essa dinâmica ocorre na mesma célula, há uma ligação cis [4].

Quando *Notch* recebe *Delta* ou *Jagged* por ligação trans, um composto é formado, denominado NICD. Este composto vai diretamente para o núcleo da célula que contém a *Notch* da ligação. No núcleo, NICD restringe a taxa de produção de novas proteínas *Delta*, porém aumenta a taxa de produção de novas proteínas *Notch* e *Jagged*. Quando ocorre uma ligação cis, NICD não é formado.

Além do receptor *Notch*, há o receptor VEGFR2 presente nas células. Este receptor conecta-se ao ligante VEGF-A e o NICD formado neste processo migra para o núcleo da célula que contém o receptor da ligação. No núcleo, NICD aumenta a taxa de produção de novas proteínas *Delta*, porém diminui a taxa de produção de VEGFR2.

A Figura 1 apresenta um esquema da dinâmica das proteínas no processo de angiogênese.

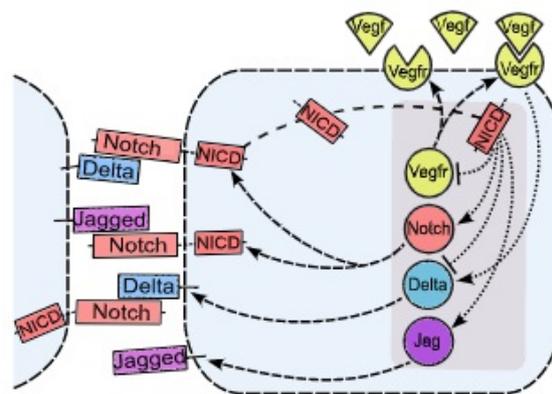


Figura 1: A dinâmica das proteínas no processo de angiogênese. Fonte: Adaptado de [4].

As células com altas concentrações de *Delta* e VEGFR2 são chamadas de células *tip*. Essas células guiam a formação dos novos vasos sanguíneos em direção à sinalização enviada por VEGF-A em resposta à hipóxia. As altas concentrações de *Delta* e VEGFR2, juntamente com as baixas concentrações de *Jagged* e NICD nas células *tip* fazem com que suas células vizinhas adquiram um padrão contrário. Dessa forma, as vizinhas às células *tip* são chamadas de células *stalk*, as quais possuem altas concentrações de NICD e *Jagged* e baixas concentrações de *Delta* e VEGFR2. No processo de angiogênese as células *stalk* são responsáveis pela formação das paredes dos novos vasos sanguíneos e elas induzem que suas vizinhas adotem o mesmo padrão, sendo também *stalk*. A troca do padrão de célula *tip* para célula *stalk* é chamada de inibição lateral e a configuração de várias células *stalk* vizinhas umas às outras é chamada de indução lateral.

Em estado de equilíbrio, a indução e a inibição favorecem a criação de vasos sanguíneos robustos, porém, em um sistema desequilibrado, como ocorre na presença de um tumor, são criados vasos sanguíneos raquíticos, emaranhados e mal perfundidos que crescem rapidamente para levar nutrientes e oxigênio para alimentar este tumor [7].

No modelo apresentado em [4] os autores ainda acrescentam um fator à dinâmica da angiogênese,

que é o efeito *fringe*. O efeito *fringe* modula parte da população de proteínas *Notch* tornando-as mais suscetíveis a receberem *Delta* que *Jagged* [5, 6]. Além disso, o estudo apresentado em [6] mostrou que o efeito *fringe* faz com que a sinalização de *Notch* acionada por *Jagged* seja substancialmente reduzida.

3 Materiais e Métodos

Após analisar o modelo proposto em [4], foi realizada uma adaptação a fim de avaliar a dinâmica celular decorrente da variação das taxas de produção das proteínas presentes na angiogênese. Para validar o modelo, as análises realizadas foram comparadas com as investigações feitas em [4].

O modelo matemático é construído por equações diferenciais de primeira ordem, as quais foram traduzidas em equações de diferenças, e as análises computacionais foram realizadas com o auxílio do software *MatLab*[®].

Ao considerar a dinâmica discutida anteriormente e apresentada na Figura 1, sem acrescentar a atuação de *fringe*, e analisar a atuação das seis proteínas citadas presentes no processo de angiogênese³, o modelo matemático para a angiogênese é descrito pelas seis equações diferenciais seguintes:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^{S^+}(I, \lambda_{I,N}) - k_t N (D_{ext} + J_{ext}) - k_c N (D + J) - \gamma N. \quad (1)$$

$$\frac{dD}{dt} = D_0 H^{S^-}(I, \lambda_{I,D}) H^{S^+}(V, \lambda_{V,D}) - k_t N_{ext} D - k_c N D - \gamma D. \quad (2)$$

$$\frac{dI}{dt} = k_t N (D_{ext} + J_{ext}) - \gamma I. \quad (3)$$

$$\frac{dJ}{dt} = J_0 H^{S^+}(I, \lambda_{I,J}) - k_t N_{ext} J - k_c N J - \gamma J. \quad (4)$$

$$\frac{dV}{dt} = k_t V_{ext} V R - \gamma V. \quad (5)$$

$$\frac{dVR}{dt} = VR_0 H^{S^-}(I, \lambda_{I,VR}) - k_t V_{ext} V R - \gamma VR. \quad (6)$$

em que N , D , I , J , V , e VR representam, respectivamente, as concentrações das proteínas *Notch*, *Delta*, *NICD*, *Jagged*, VEGF-A e VEGFR2. N_0 , D_0 , I_0 , J_0 e VR_0 representam, respectivamente, as taxas de produção de *Notch*, *Delta*, *NICD*, *Jagged* e VEGFR2 no núcleo da célula. O termo k_t representa a interação trans e o termo k_c representa a inibição cis. N_{ext} , D_{ext} , J_{ext} e V_{ext} representam, respectivamente, as concentrações externas à célula, das proteínas *Notch*, *Delta*, *Jagged* e VEGF-A. Além disso, γ e γ_I são as taxas de degradação natural das proteínas. O termo $H^{S^+}(I, \lambda_{I,N})$ representa a equação deslocada de Hill, a qual modula o aumento da taxa de produção de *Notch* quando ele recebe *Delta* ou *Jagged* via ligação trans. De maneira semelhante, $H^{S^-}(I, \lambda_{I,D})$ representa a equação deslocada de Hill que modula a diminuição da taxa de produção de *Delta* quando essa proteína se liga com *Notch* por interação trans e $H^{S^+}(V, \lambda_{V,D})$ representa o aumento da taxa de produção de *Delta* devido a ligação entre VEGF-A e VEGFR2. O termo $H^{S^+}(I, \lambda_{I,J})$ representa a equação deslocada de Hill que aumenta a taxa de produção de *Jagged* quando ele se liga à *Notch* por meio de interação trans. A equação deslocada de Hill que representa

³Proteínas: *Notch*, *Delta*, *Jagged*, *NICD*, VEGFR2 e VEGF-A.

a diminuição da taxa de produção de VEGFR2 é $H^{S-}(I, \lambda_{I,VR})$. De maneira geral, a equação deslocada de Hill que compõe as equações diferenciais do modelo é:

$$H^S(X, \lambda_{X,Y}) = H^-(X) + \lambda_{X,Y}H^+(X) = \frac{1}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^n} + \lambda_{X,Y} \frac{\left(\frac{X}{X_0}\right)^n}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^n}. \quad (7)$$

em que $\lambda_{X,Y}$ representa a saída de Y de acordo com o valor de X , $H^-(X)$ é uma função de restrição (quando $\lambda_{X,Y} = 0$) e $H^+(X)$ é uma função de ativação (quando $\lambda_{X,Y} > 1$). O parâmetro n é o expoente de Hill, o qual assume diferentes valores, a depender se a proteína terá sua taxa de produção aumentada ou diminuída.

4 Resultados e Discussões

Primeiramente, a dinâmica do sistema será avaliada e, após, o estado de equilíbrio será analisado a fim de identificar a influência da superexpressão de *Jagged* em um sistema em que não se considera o efeito *fringe*.

Ressalta-se que as equações do modelo representam a dinâmica das concentrações das proteínas em uma única célula, a qual está imersa em um ambiente rodeado por concentrações externas.

Após compor as equações do modelo, a primeira análise a ser realizada é identificar a influência da superexpressão de *Jagged* na dinâmica do sistema. Para isso, os parâmetros utilizados foram os mesmos indicados em [4], os quais são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros do modelo

Parâmetro	Valor	Unidade de Medida
N_0	1200	Número de proteínas / tempo (h)
J_0	800	Número de proteínas / tempo (h)
$D_0 = VR_0$	1000	Número de proteínas / tempo (h)
$I_0 = V_0$	200	Número de proteínas / tempo (h)
$N_{ext} = D_{ext} = J_{ext} = V_{ext}$	2000	Número de proteínas
γ	0.1	$tempo^{-1}(h^{-1})$
γ_I	0.5	$tempo^{-1}(h^{-1})$
$\lambda_{I,N} = \lambda_{I,J} = \lambda_{V,D}$	2	Adimensional
$\lambda_{I,D} = \lambda_{I,VR}$	0	Adimensional
$n_D = n_N = n_V = n_{VR}$	2	Adimensional
n_J	5	Adimensional
k_t	$2.5 * 10^{-5}$	$tempo^{-1}(h^{-1})$
k_c	$5 * 10^{-4}$	$tempo^{-1}(h^{-1})$

O valor da taxa de produção de *Jagged* (J_0) será aumentado a fim de avaliar sua influência na angiogênese. Para isso, serão utilizados os parâmetros apresentados na Tabela 1. A seguir, a Figura 2 mostra esse resultado.

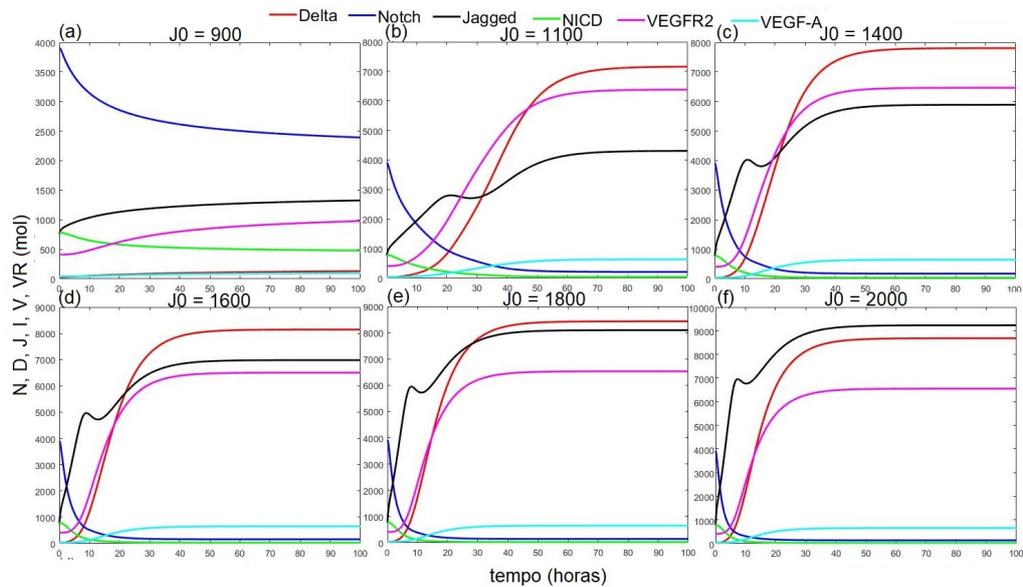


Figura 2: A dinâmica da angiogênese com a superexpressão de *Jagged*. Em (a): $J_0 = 900$. Em (b): $J_0 = 1100$. Em (c): $J_0 = 1400$. Em (d): $J_0 = 1600$. Em (e): $J_0 = 1800$. Em (f): $J_0 = 2000$.

De acordo com a Figura 2(a), quando $J_0 = 900$ proteínas, pode-se dizer que a célula que representa o modelo, com os parâmetros utilizados na Tabela 1, é uma célula *stalk*. Isso pode ser verificado pela alta concentração de *Notch*. Além disso, há baixas concentrações de *Delta* e VEGFR-2, que é característico das células *stalk* [1, 3, 4]. De acordo com a dinâmica apresentada na Figura 2(a), percebe-se que *Delta* e VEGF-A possuem as menores concentrações no sistema. Isso pode ser explicado por dois motivos. O primeiro é que as baixas concentrações de VEGF-A e VEGFR2 na célula não produzem efeito significativo para que o NICD atue no aumento da produção de *Delta* no núcleo. O segundo motivo explica-se pela alta concentração de *Notch*, que ao ligar-se com *Delta* externo (interação trans) faz com que a produção de *Delta* interno seja restringido no núcleo da célula.

Entretanto, a Figura 2(b) mostra que quando $J_0 = 1100$, o sistema troca de estado, deixando de ser *stalk* para se tornar *tip*. Isso pode ser observado pelas altas concentrações de *Delta* e VEGFR2 e baixas concentrações de *Notch* e NICD, características das células que guiam o crescimento dos novos vasos sanguíneos. Além disso, percebe-se que o aumento gradativo da taxa de produção de *Jagged* faz com que sua curva dinâmica alcance valores cada vez maiores, aproximando-se mais de VEGFR2.

De acordo com a Figura 2(c), observa-se que a curva da dinâmica de *Jagged* continua a se aproximar de VEGFR2, até ultrapassá-la em 2(d). Nas Figuras 2(e) e 2(f) observa-se que as concentrações de *Delta* e *Jagged* no sistema são grandes e próximas. Este resultado é de grande relevância, visto que isso caracteriza uma célula híbrida com características *stalk* e *tip*.

No estudo apresentado em [4] este fato é inovador e amplamente discutido, onde conclui-se que *Jagged* pode transformar a angiogênese fisiológica em patológica ao promover a existência de um fenótipo *tip/stalk* quando *Jagged* é superexpresso em comparação com *Delta*. Diante disso, as células neste destino híbrido *tip/stalk* têm características de migração comprometidas em comparação com as células *tip*. Portanto, espera-se que os vasos conduzidos por essas células sejam menores e pouco perfundidos em comparação com os conduzidos pelas células *tip*, o que promove um crescimento caótico, desenfreado e mal sucedido da angiogênese [4].

Para analisar o modelo de equilíbrio do sistema mediante a superexpressão de *Jagged* e inibição de *fringe* e, avaliar os possíveis estados no sistema, tem-se a Figura 3 a seguir.

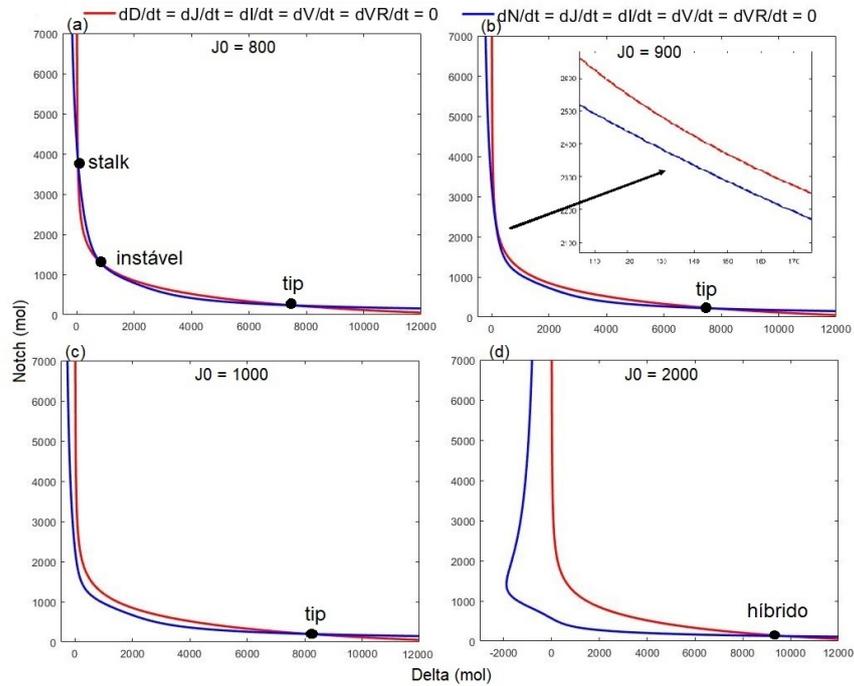


Figura 3: Os estados de equilíbrio na angiogênese para diferentes valores de J_0 . Em (a): $J_0 = 800$. Em (b): $J_0 = 900$. Em (c): $J_0 = 1000$. Em (d): $J_0 = 2000$.

A Figura 3(a) representa a angiogênese fisiológica e observa-se a existência de três pontos de equilíbrio, os quais são chamados de *tip*, *stalk* e instável. O ponto de equilíbrio *tip* é estável e representa as células que guiam o crescimento do novo vaso sanguíneo. *Tip* possui altas concentrações *Delta* e VEGFR2 e baixas concentrações de *Notch* e *Jagged*. Todavia, o ponto de equilíbrio *stalk* é estável e representa as células que formam as paredes do novo vaso sanguíneo. *Stalk* possui altas concentrações de *Notch* e *Jagged* e baixas concentrações de *Delta* e VEGFR2.

Observa-se na Figura 3(b) que ao aumentar a taxa de produção de *Jagged* para 900 proteínas, o sistema adota apenas o estado de equilíbrio estável *tip*. O mesmo ocorre na Figura 3(c) e, ao analisar as concentrações das proteínas no equilíbrio, nota-se que cada vez mais a concentração de *Jagged* aproxima-se de *Delta*.

A Figura 3(d) mostra que quando $J_0 = 2000$ há apenas um ponto de equilíbrio estável, o qual é denominado híbrido. Neste ponto, as concentrações de *Delta* e *Jagged* são altas e aproximadamente iguais.

Os resultados apresentados na Figura 3 refletem que, de fato, a superexpressão de *Jagged* altera o equilíbrio do sistema ao promover a existência de um estado de equilíbrio estável híbrido. Além disso, ressalta-se que as análises realizadas não consideraram a atuação de *fringe* no sistema e, ainda assim, foi possível verificar que a superexpressão de *Jagged* torna a angiogênese fisiológica em patológica. Entretanto, concorda-se na importância desse fator para demais análises a serem realizadas, visto que no estudo [4] foi verificado que *fringe* interfere diretamente na existência do fenótipo híbrido *tip/stalk* assim como *Jagged*.

5 Considerações Finais

Este estudo apresentou um modelo matemático para a angiogênese, baseado em equações diferenciais ordinárias. Verificou-se que o modelo representa uma célula *stalk* com alta concentração de receptores *Notch*, o que corresponde à um dos estados da angiogênese fisiológica para a formação das paredes do novo vaso sanguíneo.

Ao aumentar gradativamente a taxa de produção de proteínas *Jagged*, verificou-se que a concentração de *Notch* diminui de forma repentina, tornando a célula que antes era *stalk* em *tip*. Isso faz com que o sistema adquira altas concentrações de *Delta* e VEGFR2 para guiar os novos vasos.

À medida em que *Jagged* é superexpressado, sua concentração aproxima-se da concentração de VEGFR2, até ultrapassá-la e tornar próximo à concentração de *Delta*. Esse resultado é característica da existência de células híbridas na angiogênese, as quais competem entre a posição de *tip* e *stalk* e dão origem à vasos sanguíneos raquíticos e disfuncionais. Neste estágio, há a angiogênese patológica, a qual é característica de um organismo onde há tumor.

O fenótipo híbrido pôde ser melhor observado ao analisar os estados de equilíbrio do sistemas. Percebeu-se que a superexpressão de *Jagged* altera o equilíbrio da angiogênese e promove o surgimento de uma célula com concentrações mistas entre *tip/stalk*.

Neste estudo, a ação do efeito *fringe* foi inibida a fim de analisar se a superexpressão de *Jagged* altera a dinâmica e o equilíbrio da angiogênese. Como *fringe* promove a preferência na ligação entre *Notch* e *Delta*, a exclusão deste efeito sugere que a ação do receptor *Notch* em receber *Delta* ou *Jagged* não sofre influência de um efeito regulador preferencial. Neste cenário, o aumento da taxa de produção de *Jagged* pode ser melhor analisada. Assim, mesmo sem incluir este efeito nas equações do modelo, foi possível alcançar o resultado indicado na literatura. Logo, destaca-se que o modelo aqui apresentado trata-se de um modelo robusto e simplificado, em termos matemáticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e ao CEFET-MG pelo apoio à pesquisa.

Referências

- [1] R. Benedito et al. “The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis”. Em: **Cell** 137.6 (2014), pp. 1124–1135. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.025.
- [2] S. V. Bhadada, B. R. Goyal e M. M. Patel. “Angiogenic targets for potential disorders”. Em: **Fundamental Clinical Pharmacology** 25 (2011), pp. 29–47. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2010.00814.x.
- [3] R. Blanco e H. Gerhardt. “VEGF and Notch in tip and stalk cell selection”. Em: **Cold Spring Harb Perspect Med** 3.1 (2013), a006569. DOI: 10.1101/cshperspect.a006569.
- [4] M. Boareto et al. “Jagged mediates differences in normal and tumor angiogenesis by affecting tip-stalk fate decision”. Em: **Proceedings of the National Academy of Sciences** 29 (2015), E3836–E3844. DOI: 10.1073/pnas.1511814112.
- [5] R. Kopan e M. X. G. Ilagan. “The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism”. Em: **Cell** 2.134 (2009), pp. 216–233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
- [6] K. Shimizu et al. “Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation”. Em: **Biol Chem** 276.28 (2001), pp. 25753–25758. DOI: 10.1074/jbc.M103473200.
- [7] I. Zolnerkevic. “A fome do câncer”. Em: **Revista Fapesp** 239 (2016), pp. 55–57.