UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA

FLÁVIO HENRIQUE SANT'ANA COSTA

**Sobre Mecanismos Mesoscópicos do Crescimento de
Tumores**

Ribeirão Preto - SP
2016

FLÁVIO HENRIQUE SANT'ANA COSTA

**Sobre Mecanismos Mesoscópicos do Crescimento de
Tumores**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Física aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador:

Dr. Marco Antonio Alves da Silva.

Versão original

Disponível na FFCLRP-

Ribeirão Preto - SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Flávio Henrique Sant'Ana

Sobre Mecanismos Mesoscópicos do Crescimento de Tumores / Flávio Henrique Sant'Ana Costa; orientador Dr. Marco Antonio Alves da Silva. Ribeirão Preto - SP, 2016.

85 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Crescimento de Tumores. 2. Monte Carlo dinâmico. 3. Modelagem Matemática.

Nome: COSTA, Flávio Henrique Sant'Ana

Título: Sobre Mecanismos Mesoscópicos do Crescimento de Tumores

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo César Costa e Luciana Ferreira Sant'Ana Costa, e ao meu irmão Gleico Sant'Ana Costa.

AGRADECIMENTOS

À Jirrah Pedro de Andrade pelo incentivo, companheirismo, por toda ajuda e todo amor ao longo desses últimos anos. À sua família igualmente.

Aos professores com quem pude conviver durante esse período.

Aos amigos: Guilherme Thomaz Pereira Brancini, Rodrigo Antonio Faccioli, Renata de Oliveira Garcia Reis e Leandro Oliveira Bortot, pela convivência durante esse período.

Aos Profs. Dr. Osvaldo Eduardo Aiélio, Dr. Marcelo Campos e Dr. Antonio Caliri pela colaboração e sugestões ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva e seus colaboradores, do Laboratório de Química Analítica (FCFRP-USP) por facilitar o desenvolvimento experimental desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento parcial deste trabalho (Processo no. 2012/03823-5) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Alves da Silva pela orientação, pelas discussões e pelo incentivo ao longo do período de realização deste projeto.

“Primary causes are unknown to us;
but are subject to simple and constant laws,
which may be discovered by observation ...”

Joseph Fourier

RESUMO

COSTA, F. H. S. **Sobre Mecanismos Mesoscópicos do Crescimento de Tumores**. 2016. 85 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2016.

O estudo do crescimento de tumores tem inspirado o aparecimento de diversos modelos, que visam aproximar às características reais das interações entre as células da população tumoral. Do ponto de vista biológico, destacam-se como modelos as culturas de células *in vitro*. Elas são úteis por reduzir a complexidade intrínseca da massa tumoral real. Do ponto de vista matemático e físico, destacam-se a procura por comportamentos universais, e o uso de simulação numérica para a solução dos modelos propostos. Essas abordagens são úteis por ressaltar as características importantes do crescimento de tumores, promover um intercâmbio de conhecimento com áreas aparentemente distintas, tais como: crescimento de cristais, reações bioquímicas e epidemiologia, além de gerar soluções que seriam difíceis de obter analiticamente. Neste trabalho, abordamos o crescimento de tumores a nível mesoscópico (escala celular), por meio de: (i) experimentos de cultura de células *in vitro*, de onde obtivemos dados da evolução temporal do raio das colônias e os tempos de duplicação característicos; (ii) modelagem matemática, em que propomos uma taxa de crescimento em função do tempo com forma sigmoideal, e uma equação fenomenológica para a evolução temporal dos agregados; e (iii) descrição estocástica, em que apresentamos um conjunto de regras para a interação entre os elementos da população tumoral e simulamos a dinâmica temporal usando o método Monte Carlo dinâmico (DMC), obtendo as curvas de crescimento e as distribuições de tempo das colônias. Além disso, desenvolvemos uma generalização para o método DMC, em que é possível incluir eventos simultâneos. Essa generalização foi aplicada ao modelo matemático

de Dawson e Hillen para uma população de células sujeita a radioterapia, gerando as distribuições de tempos de extinção, e a probabilidade de controle tumoral (TCP). A abordagem ao crescimento de tumores nos permitiu comparar o experimento, a modelagem matemática, e a descrição estocástica com sucesso, e mostramos que a dinâmica de crescimento de vários tipos de células possui o mesmo formato sigmoidal, sugerindo uma universalidade para as taxas de crescimento de células aderentes. Comparamos os tempos de duplicação obtidos experimentalmente e por meio de DMC, e oferecemos alguns *insights* matemáticos a respeito dos tempos de duplicação obtidos através de DMC. Concluimos que o desenvolvimento teórico-experimental, ao nível mesoscópico, foi capaz de gerar novas ideias sobre mecanismos de crescimento tumorais de células aderentes, e novas perspectivas para abordagem do problema de crescimento de tumores.

Palavras-chave: 1. Crescimento de Tumores. 2. Monte Carlo dinâmico. 3. Modelagem Matemática.

ABSTRACT

COSTA, F. H. S. **On the Mesoscopic Mechanisms of Tumor Growth**. 2016. 85 f. Thesis (Ph.D. - Postgraduate program in Physics applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2016.

The study of tumor growth has inspired the emergence of several models, aiming to reproduce actual patterns of interactions between cells in the tumor population. From the biological point of view, *in vitro* cell culture models stand out. They are useful to reduce the intrinsic complexity of the actual tumor mass. From the mathematical and physical point of view, stand out the search for universal behaviors and the use of numerical simulation to solve proposed models. These approaches are useful to point out important characteristics of the problem, promoting a knowledge exchange with seemingly distinct areas such as: crystal growth, biochemical reactions and epidemiology, and generating solutions that could be difficult to obtain analytically. In this thesis we approach the tumor growth problem at the mesoscopic level (cellular scale), by means of: (i) cell culture experiments *in vitro*, generating data for the radius temporal evolution and characteristic doubling times for several colonies; (ii) mathematical modeling, in which we propose a sigmoidal growth rate and time evolution of aggregates by a phenomenological equation; and (iii) stochastic description, where we present a set of rules to describe the interactions among the elements in the tumor population, and we simulate them using the dynamical Monte Carlo (DMC) method, obtaining the growth curves and the time distributions. In addition, we have developed a generalization of the DMC method, making the simulation of simultaneous events to be possible. Such generalization was applied to mathematical model of Dawson and Hillen for a population of cells subjected to radiotherapy, and it was possible to obtain the distributions of extinction times and Tumor Control Probability

(TCP). Our approach allowed us to compare tumor growth in experiment with theory, and good agreement were found in our results. Furthermore, we have shown that sigmoidal growth rate appears in several cell lineages, suggesting universal-like behavior. We have compared the doubling times obtained in the experiments and in the DMC simulations, and we show some mathematical *insights* about the doubling times. We concluded that our theoretical and experimental approach, at the mesoscopic level, could generate new ideas on tumor growth mechanisms of adherent cells and new perspectives in the study of the tumor growth.

Key-words: 1. Tumor Growth 2. Dynamical Monte Carlo 3. Matematical Modeling

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	ix
1 Introdução	1
Parte I - Monte Carlo Dinâmico	
2 Método Tradicional	6
2.1 A Equação Estocástica do <i>Movimento</i>	7
2.2 Solução da Equação do <i>Movimento</i> com Monte Carlo	9
3 Generalização: Eventos Simultâneos	12
3.1 A <i>Equação do Movimento</i> incluindo Eventos Simultâneos	13
3.2 A solução Monte Carlo da <i>Equação do Movimento</i>	15
3.3 Redimensionando Sistemas com Muitos ou Poucos Elementos	16
Parte II - Crescimento Tumoral	
4 Análise dos Mecanismos de Crescimento	18
4.1 Experimentos <i>in vitro</i> e o Processamento de Imagens	18
4.1.1 Experimentos de <i>Time Lapse</i> e a Estimativa dos Tempos de Espera	19
4.2 O Modelo de Crescimento	20
4.3 O Comportamento <i>Universal</i> da Taxa de Crescimento	22
4.4 Monte Carlo Dinâmico Aplicado ao Modelo de Crescimento	32
4.4.1 O Cálculo do Raio Médio e da Taxa Mesoscópica	35
4.5 Os Ingredientes Básicos da Simulação Computacional	37

4.6	Considerações sobre os tempos de espera	40
4.6.1	Experimentos de <i>Time Lapse</i>	46
5	Probabilidade de Controle Tumoral	49
5.1	Aplicação do Método DMC	50
5.1.1	Modelando com Eventos Simples	50
5.1.2	O Modelo de Crescimento com Eventos Simultâneos	53
5.1.3	O Modelo DH Completo com Eventos Simultâneos	54
5.1.4	Aplicações do Redimensionamento	56
5.1.5	Obtenção das Curvas de TCP	59
6	Conclusão	63
	Referências	67

Introdução

Uma Breve Revisão Sobre o Desenvolvimento de
Tumores e sua Modelagem Biológica e Matemática

INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças promovidas por células que sofreram algumas mutações genéticas [1, 2]. Estima-se que até 2030 cerca de 22 milhões de novos casos serão diagnosticados no mundo, baseado apenas no envelhecimento e na taxa de crescimento populacional [3]. O desenvolvimento dos tumores é um processo complexo [1, 2], envolvendo fenômenos em várias escalas espaciais e temporais [4]. As células malignas aparecem em um microambiente heterogêneo, compondo uma massa tumoral, na localização hospedeira, que pode ser de difícil controle [1, 2, 5, 6]. Existem diversos mecanismos celulares que garantem a integridade física e fisiológica dos tecidos biológicos saudáveis [7], então, de maneira simplificada, podemos dizer que uma célula maligna surge quando ela consegue contornar esses mecanismos, passando a estruturar uma comunidade de células estranhas ao hospedeiro [5]. Do ponto de vista espacial e temporal, os eventos que mantêm a evolução dessas colônias podem ser divididos em três escalas: microscópica, mesoscópica e macroscópica [4].

A escala microscópica refere-se aos fenômenos que ocorrem no nível subcelular, por exemplo, expressão gênica, alterações no ciclo celular, absorção de nutrientes, ativação e inativação de receptores, dentre outros [2, 4]. Frequentemente observamos novas descobertas da biologia e medicina molecular sobre agentes que amplificam ou retardam a proliferação de alguns tipos de tumores [2], e há um esforço para a abordagem sistemática dos fenômenos característicos desse nível através da chamada *systems biology* [8]. Por outro lado, os eventos que ocorrem na escala macroscópica são aqueles em nível tecidual, como convecção e difusão de nutrientes e fatores químicos, respostas mecânicas e difusão de metástases [4]. Os esforços de tratamentos como a radioterapia, concentram-se em

reduzir a grande massa macroscópica de células [9].

A esperada redução macroscópica do volume de um tumor, sujeito a radioterapia, é alcançada através da quebra da molécula de DNA e outros mecanismos moleculares [10]. Em outras palavras, a resposta macroscópica é ativada através de mecanismos microscópicos. A ponte que faz a ligação entre o macro e o micro é a escala mesoscópica [11]. Ela refere-se aos acontecimentos do nível celular [4], por exemplo, a descrição estatística da progressão e estado de ativação celular [12], agregação e desagregação [13], difusão local [12,14] e competição ou cooperação entre os elementos de sua população [15]. Nesse trabalho, estamos interessados em analisar esses mecanismos celulares, os tempos característicos de duplicação das células e como elas interagem com suas vizinhas [16,17].

Dada a complexidade do fenômeno de evolução dos tumores, convém desenvolver modelos biológicos que possam ajudar a compreender alguns mecanismos, isolando características importantes [18]. No contexto mesoscópico, esses modelos biológicos podem ser as culturas de células *in vitro* [17]. Por meio delas, pode-se acompanhar o desenvolvimento de células tumorais isoladas, o que as tornam um modelo interessante. Tão importante é a sua importância, que a rotina de testes no desenvolvimento de novos fármacos passa primeiro por cultura de células [19].

Muitas características dos tumores reais podem ser reproduzidas em cultura, tais como a duplicação, a formação de agregados e a interação entre vizinhos [18]. O desenvolvimento do modelo de culturas é uma área em pleno desenvolvimento [19] e podemos destacar dois tipos principais: *i*) culturas de monocamadas aderentes e *ii*) culturas de esferóides em suspensão.

A cultura de monocamadas reproduz menos características reais que os esferóides, mas pode-se isolar ainda mais as interações que queremos estudar [18,19]. Nesse caso, as células crescem aderidas à placa de cultura e a agregação das células não cria um gradiente de difusão de nutrientes, pois as células estão sempre expostas aos nutrientes do meio de cultura [18]. Os esferóides são agregados de células que possuem o formato esférico e são cultivados sem adesão à placa de cultura [20]. Essas culturas representam melhor o desenvolvimento de um tumor real, pois os gradientes de O_2 , nutrientes e produtos metabólicos, fazem com que se crie um perfil de células ativas, quiescentes e necróticas, típicas da fase avascular do desenvolvimento real [19,21]. Nesse trabalho, utilizamos as culturas de monocamadas aderentes.

Fisicamente, os mecanismos que dirigem a formação de um agregado em monocamadas são bem conhecidos. Quando uma célula se adere à placa de cultura por meio de moléculas de ligação, há a geração de forças de contração e consequentemente as células se espalham (*spread*) pela superfície [22]. Essas células começam a se reproduzir e então dão início a um processo de difusão e agregação [13]. Uma vez que elas se aderem umas às outras, elas trocam forças adesivas [23] e a maior aderência de células favorece o agregado, que aumenta sua força coesiva até criar-se um núcleo crítico [17]. A geometria do agregado crítico não é específica, e a taxa de aspecto é maior que um, com alguns buracos no interior [24]. O crescimento da colônia segue então uma *transição morfológica*, devido ao estresse que as células mais externas da colônia exercem sobre as células internas. Essa transição é caracterizada pela redução da área das células internas, pela redução de seu movimento e diminuição da sua taxa mitótica em um processo chamado de *inibição por contato* [25]. Após a transição, as células podem ser classificadas em dois compartimentos: as células ativas, cuja grande maioria se localiza nas bordas da colônia, e as células quiescentes, internas [12]. O agregado toma o formato circular, com rugosidades na borda [12, 14, 24, 26]. Se a pressão sobre as células internas for suficientemente grande, e se alguns mecanismos moleculares permitirem, pode haver a formação de múltiplas camadas [23, 27].

Os métodos matemáticos usados para modelar esses fenômenos são compatíveis com as escalas que descrevemos acima. Em geral modelos contínuos são usados para abordar fenômenos macroscópicos [4]. Um exemplo de uma análise no contínuo bem sucedida é a de Amar *et al.* (2011) [28], em que os autores mostraram que é possível reduzir o tamanho de detecção do melanoma humano de 6 para 1,36 mm de diâmetro. A modelagem no contínuo leva em conta apenas fenômenos suaves, que são típicos da grande escala. Um tumor com um volume de 1 cm^3 têm aproximadamente um bilhão de células [29, 30], e portanto, um modelo discreto, baseado em elementos individuais, para analisar tal fenômeno seria inviável.

Percebe-se contudo que a escala mesoscópica é compatível tanto com a modelagem discreta e estocástica, quanto com a modelagem contínua [16]. Compatível com a modelagem discreta por tratar os elementos individuais de uma população, e estocástica por poder levar em conta as interações de cada um desses elementos (as interações moleculares podem também ser tratadas de forma efetiva [4]).

Para colônias de células, Brú *et al.* (1998) [14] mostraram que o crescimento radial é linear com o tempo, em tempos longos, o que é compatível com a proliferação pelas bordas. Mais tarde, Brú *et al.* (2003) [12] obtiveram a curva de crescimento desde poucas células, e o comportamento da curva de crescimento parecia ter uma parte exponencial que colapsava em uma parte linear. Radszuweit *et al.* (2009) [29] propuseram um modelo de crescimento pelas bordas com funções do tipo passo de Heaviside e Lambert-W. Esse modelo foi aplicado também por Huergo *et al.* (2011) ao crescimento de colônias tumorais. Simpson *et al.* (2013) [13] tentaram descrever o começo do desenvolvimento da colônia tumoral, levando em conta explicitamente a difusão e a proliferação. Essa abordagem têm a dificuldade intrínseca de se definir univocamente os parâmetros de proliferação e de difusão [13, 31, 32]. Brú *et al.* (1998, 2003) [12, 14] também sugeriram que a fractalidade das bordas da colônia fizessem-na pertencer a classe de universalidade MBE (*Molecular Beam Epitaxy*) e Huergo *et al.* (2011, 2012) [24, 26] vêm contestando essa classificação, sugerindo que ela pertença a classe KPZ (Kardar-Parisi-Zhang).

No caso dos modelos discretos, a simulação computacional para o crescimento de tumores vem sendo desenvolvida desde o trabalho de Eden (1958) [33]. Nesse caso, a representação de uma célula por meio de um sítio em uma rede e as interações com os sítios vizinhos fazem com que o método Monte Carlo (MC) comece a ser amplamente utilizado, com o objetivo de resolver as integrais multidimensionais resultantes das interações [16]. Radszuweit *et al.* (2009) [29] desenvolveram uma metodologia para a simulação em rede com uma vizinhança de Voronoi. Graner e Glazier (1992) [34] desenvolveram o chamado modelo de Potts celular, em que as células são representadas por diversos sítios de uma rede. Essa metodologia tem avançado com a adição de equações de reação-difusão para os nutrientes e simulações em multi-escala [35].

Dentro desse contexto, nosso objetivo neste trabalho foi utilizar os modelos biológicos, matemáticos e simulações numéricas para analisar o crescimento de colônias de células em monocamadas. Essa abordagem faz parte do ciclo de modelagem exposto por Preziosi (2003) [4]: a observação do fenômeno é seguida da proposição de algumas regras, as soluções dos modelos com essas regras são comparadas com os resultados experimentais e novos experimentos podem ser sugeridos. Em essência observamos e descrevemos o fenômeno do crescimento *in vitro*, propomos um modelo matemático baseado em uma equação sigmoidal para a taxa de crescimento e simulamos o modelo utilizando o método

Monte Carlo dinâmico (do inglês *Dynamical Monte Carlo* - DMC). A partir dos resultados gerados pela simulação, propomos novos experimentos para verificar os padrões de tempo gerados. Além disso desenvolvemos uma teoria para o método Monte Carlo dinâmico que engloba eventos simultâneos, não contemplados na teoria de Aiello e da Silva (2003) [36], aplicando-a ao modelo de Dawson e Hillen (DH) [37] que lida com células em tratamento com radioterapia.

Nosso trabalho foi dividido em duas partes: na primeira parte há o desenvolvimento teórico da simulação Monte Carlo dinâmico, que envolve os Caps. 2 e 3. No Cap. 2 descrevemos a teoria DMC desenvolvida por Aiello e da Silva (2003) [36] e no Cap. 3 desenvolvemos uma generalização para o método DMC para incluir eventos simultâneos de uma maneira mais compreensiva e também apresentamos uma maneira de lidar com sistemas com poucos ou muitos elementos [38]. Na segunda parte dessa tese, envolvendo os Caps. 4 e 5, descrevemos o crescimento de colônias de células através de experimentos, modelos matemáticos e simulação DMC (Cap. 4) e aplicamos nossa teoria DMC generalizada para o modelo DH (Cap. 5), incluindo a obtenção das distribuições de tempo de extinção e da probabilidade de controle tumoral (do inglês *Tumor Control Probability* - TCP). Por fim, no Cap. 6 oferecemos comentários finais e perspectivas a respeito desse trabalho. A parte experimental dessa tese foi desenvolvida no Laboratório de Química Analítica da FCFRP (USP) e a teórica e computacional no laboratório de Física Biológica da FCFRP (USP).

Parte I

Monte Carlo Dinâmico

MÉTODO TRADICIONAL

O método Monte Carlo (MC) constitui-se de uma vasta e importante classe de esquemas numéricos, originalmente usados para lidar com problemas em mecânica estatística [39, 40]. Essas abordagens são bastante úteis quando o fenômeno estudado pode ser representado por um modelo discreto e estocástico [41]. Além disso, se o caso possuir dependência espacial, envolvendo as vizinhanças de um elemento, dificilmente outro método numérico irá funcionar melhor que MC.

Caso estivermos interessados em estudar propriedades fora do equilíbrio, os métodos Monte Carlo dinâmico (DMC) e Monte Carlo cinético (KMC) podem realizar a integração numérica da equação mestra Markoviana para obter as *trajetórias* temporais das grandezas de interesse; eles são variantes de MC especificamente designados para lidar com as informações a respeito da evolução temporal real de um sistema [36, 42, 43]. Particularmente, problemas biológicos e sociais, tais como epidemias e crescimento de tumores, estão naturalmente fora do equilíbrio, e possuem, portanto, as características ideais para a aplicação desses métodos. Em especial, o crescimento de tumores têm inspirado modelos matemáticos e soluções por MC desde o trabalho de Eden [33] até os mais recentes avanços com o modelo de Potts celular [35], passando por DMC [16, 44] e KMC [29, 45, 46].

Fichthorn e Weinberg (1991) [43] mostraram que se três critérios são obedecidos, à saber: (i) uma hierarquia dinâmica é criada, (ii) os incrementos de tempo forem calculados apropriadamente e (iii) a independência efetiva entre os eventos que ocorrem no sistema for alcançada, então pode-se atingir a trajetória temporal real assumindo-se processos de Poisson. Em suma, obedecer esses três critérios é formar a base de aplicação do método KMC.

No entanto, existe uma limitação no terceiro critério: em muitas ocasiões não é possível garantir a independência efetiva entre os eventos. Para lidar com esse problema, Aiello e da Silva (2003) [36] mostraram que é possível encontrar uma equação estocástica para a evolução temporal das médias de uma grandeza extensiva e mensurável do sistema, e também estimar o tempo de espera entre os eventos de forma a não assumir *a priori* uma distribuição (uma Poissoniana no caso de KMC [42, 43]). Com isso, pode-se relaxar a necessidade de obedecer ao critério (iii); de fato, essa construção do método DMC é uma generalização que engloba KMC como caso particular.

No problema do crescimento de tumores, a independência entre os eventos não pode ser atingida, pois as células em mitose demandam, entre outras coisas, de espaço ao seu redor, suas características hereditárias são transmitidas à sua prole e, não raro, a cooperação e a competição ocorrem devido a interação entre as células [12, 15].

2.1 A Equação Estocástica do *Movimento*

Do ponto de vista dinâmico o método Monte Carlo fornece a solução numérica para a equação mestra Markoviana

$$\frac{d}{dt}P_i(t) = \sum_j w_{j \rightarrow i}P_j(t) - \sum_j w_{i \rightarrow j}P_i(t), \quad (2.1)$$

em que $P_i(t)$ é a probabilidade de encontrar o sistema no estado i no tempo t e $w_{j \rightarrow i}$ é a probabilidade de transição entre os estados j e i , por unidade de tempo [36, 47]. Essa equação pode descrever um processo estocástico Markoviano em sistemas discretos.

Grandezas discretas (por exemplo, o número de células, a quantidade de elementos químicos em um reservatório, a atividade radioativa) podem caracterizar muitos sistemas em que a evolução temporal é de interesse prático. Assim, consideremos uma grandeza discreta, macroscópica e extensiva $A(t)$. Suponha que o sistema esteja inicialmente em uma configuração i_0 em t_0 , caracterizando a grandeza A_{i_0} . Suponha também que o sistema discreto contenha M elementos, em que cada elemento tem g *graus de liberdade*, dado por um conjunto de variáveis dinâmicas γ_q com $q = 1, 2, \dots, g$. A variável γ_q representa o *status* de um elemento do sistema, e realizar o *movimento* (a mudança de *status*) de um elemento, caracteriza um evento, responsável pela atualização da configuração do sistema. Após uma sequência de eventos, o sistema alcança o estado i no tempo

t . Repetindo esse processo várias vezes, com a mesma condição inicial $A(t_0)$, podemos calcular o valor esperado $A(t) = \langle A \rangle = \sum_i A_i P_i(t)$, em que assumimos a condição de normalização $\sum_i P_i(t) = 1$. Diferenciando o valor esperado e usando a Eq. (2.1) podemos chegar à

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} A(t) &= \sum_i A_i \frac{d}{dt} P_i(t) \\ &= \sum_i \sum_j w_{j \rightarrow i} P_j(t) (A_i - A_j). \end{aligned} \quad (2.2)$$

Definimos a *distância* entre os estados i e j como $\Delta A_{ij} = A_i - A_j$, em que $|\Delta A_{ij}|$ é dado por um valor mínimo não-nulo a . Assim, $\Delta A_{ij} = a \delta_{ij}$, sendo $\delta_{ij} = +1$ caso $A_i > A_j$ ou $\delta_{ij} = -1$ caso $A_i < A_j$. Com isso, a Eq. (2.2) pode ser reescrita como

$$\frac{d}{dt} A(t) = \sum_{(ij)'} w_{j \rightarrow i} P_j(t) a - \sum_{(ij)''} w_{j \rightarrow i} P_j(t) a, \quad (2.3)$$

em que $\sum_{(ij)} (\cdot) = \sum_i \sum_j (\cdot)$, e $(ij)'$ indica os estados vizinhos que contribuem para o aumento de A , e $(ij)''$ aqueles que colaboram para a sua diminuição. A Eq. (2.3) pode ser novamente escrita:

$$\frac{d}{dt} A(t) = \sum_j \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^+ P_j(t) a - \sum_j \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^- P_j(t) a, \quad (2.4)$$

sendo i_{nn} os estados vizinhos mais próximos de j , e $\{w_{j \rightarrow i_{nn}}^+, w_{j \rightarrow i_{nn}}^-\}$ o conjunto das probabilidades de transição por unidade de tempo que fazem com que A aumente (sobrescrito $(+)$) ou diminua (sobrescrito $(-)$).

Podemos agora, pensar nas taxas mesoscópicas, ou seja, na média das probabilidades de transição por unidade de tempo, sobre o *ensemble* dos estados i_{nn} no tempo t ,

$$r_j^+ = \langle w_{j \rightarrow i_{nn}}^+ \rangle = \frac{a \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^+}{A_j^\dagger}, \quad r_j^- = \langle w_{j \rightarrow i_{nn}}^- \rangle = \frac{a \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^-}{A_j}. \quad (2.5)$$

A palavra *ensemble* aqui, significa um conjunto de configurações acessíveis num tempo finito (pequeno) ao redor de t ; utiliza-se aqui a idéia de ergodicidade dependente do tempo, uma vez que os sistemas são não-ergódicos em estados fora do equilíbrio [40]. Portanto,

assumimos um processo quasi-estacionário ou de *equilíbrio local* (no tempo) para fazer as médias. Assim, a Eq. (2.4), em conjunto com as Eqs. (2.5), pode ser substituída por

$$\frac{d}{dt}A(t) = \sum_j r_j^+ P_j(t) A_j^\dagger - \sum_j r_j^- P_j(t) A_j. \quad (2.6)$$

$A_j^\dagger$ é interpretada como a *fonte* de A_j , ou seja, a medida que $A_j^\dagger$ aumenta, A_j diminui e vice-versa [36]. Um exemplo claro da interpretação de fonte de uma grandeza pode ser dado com o problema do oscilador harmônico simples: a energia potencial elástica é fonte da energia cinética, e vice-versa [48]. Se as taxas forem constantes, ou somente funções do tempo, podemos reescrever a Eq. (2.6) como

$$\frac{d}{dt}A(t) = r^+(t)A^\dagger - r^-(t)A. \quad (2.7)$$

2.2 Solução da Equação do *Movimento* com Monte Carlo

A evolução temporal da Eq. (2.2) pode ser aproximada por

$$A(t) \approx A(t_0) + \sum_{k=0}^n \sum_{(ij)} w_{j \rightarrow i} P_j(t_k) a \delta_{ij} \Delta t_k, \quad (2.8)$$

em que Δt_k é o k -ésimo passo de tempo e t_k é o tempo alcançado após n intervalos de tempo. Aqui, um passo de tempo significa uma tentativa de mudar o estado do sistema. Podemos estimar o incremento de tempo através de

$$\Delta t_k = \frac{1}{w_{t_k}^{max} N}, \quad (2.9)$$

em que $w_{t_k}^{max} = \max \{w_{j \rightarrow i}\}$ e N é o número total de elementos *interagentes* do sistema. Esse incremento de tempo foi escolhido pelo fato de que ele constitui o tempo mínimo para que um elemento transite entre dois estados, não havendo assim desconsideração de nenhum evento na menor escala de observação. Esse procedimento leva a resolução correta da Eq. (2.8) se for aproximado um processo ideal (i.e., quando $N \rightarrow \infty$) [36].

Com essas considerações, podemos reescrever a Eq. (2.8) como

$$A(t) = A(t_0) + \sum_{k=0}^n \sum_{(ij)} \left(\frac{w_{j \rightarrow i}}{w_{t_k}^{max}} \right) \left(\frac{1}{N} \right) P_j(t_k) a \delta_{ij}. \quad (2.10)$$

Com essa equação em mente, podemos criar um processo hierarquico através da probabilidade de transição

$$H_{j \rightarrow i} = \frac{w_{j \rightarrow i}}{w_{t_k}^{max}}, \quad (2.11)$$

que reproduz corretamente a frequência de ocorrência dos eventos em cada tempo t_k . Assim, o procedimento MC segue da seguinte forma: (i) seleciona-se randomicamente um elemento do sistema. Isso nos dá a probabilidade $(1/N)$ que consta na Eq. (2.10); (ii) Tenta-se mudar o estado do sistema com a probabilidade $H_{j \rightarrow i}$; (iii) O tempo avança com o incremento Δt_k independentemente do resultado do aceite no passo (ii). A probabilidade $P_j(t_k)$ é gerada quando repetimos esse processo diversas vezes com a mesma condição inicial.

Um procedimento MC ideal pode levar a

$$A(t) = A(t_0) + \sum_k \langle r^+ A^\dagger - r^- A \rangle_k \left(\frac{1}{w_{t_k}^{max} N} \right), \quad (2.12)$$

em que

$$\begin{aligned} \langle r^+ A^\dagger \rangle_k &= \sum_{j_k} r_{j_k}^+ A_{j_k}^\dagger P_{j_k}(t_k) \\ &= \lim_{\mathcal{M}_k \rightarrow \infty} \frac{\sum_{j_k} r_{j_k}^+ A_{j_k}^\dagger}{\mathcal{M}_k}. \end{aligned} \quad (2.13)$$

Aqui, $\langle r^+ A^\dagger \rangle_k$ representa uma média sobre o *ensemble* das configurações j_k a cada tempo t_k . Quando o número de simulações $\mathcal{M}_k$ tende a infinito, gera-se o *ensemble* completo. Uma expressão análoga para $\langle r^- A \rangle_k$ pode ser obtida.

Devemos ressaltar três pontos importantes: primeiro, geralmente, diferentes repetições geram diferentes t_k após a mesma quantidade k de passos de tempo. Portanto, precisamos fazer uma interpolação (ou extrapolação) do conjunto de dados em cada simulação, para obter uma média amostral no mesmo ponto do eixo do tempo (no apêndice A do trabalho de Costa (2012) [44] consta o esquema de interpolação que utilizamos para a obtenção das médias). Segundo, nos tempos próximos de t_k , o valor de $w_{t_k}^{max}$ deve ser aproximadamente constante, não mudando a hierarquia, e então, não mudando o resultado. Terceiro, como as configurações não mudam drasticamente em poucos passos, as transições microscópicas reproduzem o resultado mesoscópico.

Uma outra abordagem para estimar o tempo inter-eventos é utilizar

$$\Delta t_k^e = \frac{f_e^k a}{r_j^e A_j^e}, \quad (2.14)$$

sendo que $r_j^e \in \{r_j^+, r_j^-\}$ e $A_j^e \in \{A_j^\dagger, A_j\}$; essas grandezas vão depender se e é um evento de aumento ou diminuição de A . O fator f_e deve obedecer a condição de normalização $\sum_e f_e = 1$. Esse fator reproduz corretamente a frequência com que esses eventos ocorrem, e pode ser calculado como $f_e = n_e / \sum_e n_e$, em que $\sum_e n_e$ é o número total de eventos. Se escolhermos $f_e = 0$ para todo evento e , exceto para certo evento s , em que $f_s = 1$, então a interpretação de Δt_k^e passa a ser a de tempo de espera entre eventos do tipo s . Nesse trabalho escolhemos utilizar $f_e = 1/n_e$.

Usando a abordagem descrita pela Eq. (2.14), o passo de número (*iii*) descrito para a solução da Eq. (2.10) muda. Na nova abordagem, o tempo só é incrementado quando há o aceite de uma nova configuração. Assim, muda-se a interpretação da letra k , agora ela representa o k -ésimo aceite. No entanto, pode-se mostrar que as duas metodologias levam à mesma solução para a Eq. (2.2) [36], pois

$$\Delta t_k = \sum_e \sum_{i_{nn}} \left(\frac{w_{j \rightarrow i_{nn}}^e}{w_{t_k}^{max}} \right) \left(\frac{1}{N} \right) \Delta t_k^e. \quad (2.15)$$

GENERALIZAÇÃO: EVENTOS SIMULTÂNEOS

O método Monte Carlo dinâmico é uma importante ferramenta para analisar dinâmicas de tempo real, que tem suas aplicações em uma variedade de sistemas, tais como problemas físicos [48], químicos [43], biológicos [16], ecológicos [36, 42] e econômicos [49].

Uma característica principal dos processos em tempo real são os tempos intereventos. Entretanto, a distribuição de tempos intereventos é geralmente desconhecida e, portanto, muitas aplicações de DMC foram feitas dentro da estrutura dos processos Poissonianos (nesse caso também conhecido com KMC - Monte Carlo cinético), assumindo *a priori* que os tempos intereventos pertençam a uma distribuição exponencial [42, 43]. Isso quer dizer que, nessa abordagem, assume-se que os eventos relacionados às transições entre os estados de um sistema são independentes.

Como apresentamos no Cap. 2, Aiello e da Silva (2003) [36] formularam uma abordagem DMC baseada na solução da equação mestra Markoviana e eles obtiveram uma maneira geral de calcular os tempos intereventos: construindo sua distribuição ao longo da simulação. Uma distribuição exponencial dos tempos intereventos (ou tempos de espera) aparece, se somente eventos Poissonianos estiverem envolvidos; de outra forma, diferentes distribuições podem aparecer [16], como mostramos em um modelo de crescimento de colônias na Sec. 4.6.

Um aspecto que pode limitar o método DMC apresentado (Sec. 2) é a suposição de que somente um evento possa ocorrer na menor escala de tempo [42]. Na verdade, pode-se facilmente encontrar sistemas em que vários eventos podem ocorrer *simultaneamente*, i.e., sistemas em que mais de um evento acontece na menor escala de tempo. Analisamos

aqui, como um exemplo, a formulação de Dawson e Hillen para a evolução de um sistema tumoral com células ativas e quiescentes sujeitas a um tratamento com radiação [37]. Nesse modelo, um elemento ativo gera simultaneamente dois indivíduos no estado quiescente. Mapear esse modelo na abordagem de Aiello e da Silva (2003) [36] de um único evento é possível, como mostramos na Sec. 5.1.1, entretanto, desenvolvemos aqui uma teoria DMC Markoviana, incluindo eventos simultâneos de maneira natural¹.

Outra característica marcante da abordagem de Aiello e da Silva (2003) [36] são os intervalos de tempo não-uniformes: um incremento depende da taxa e do número de elementos responsáveis por cada tipo de evento. Contudo, quando o sistema modelado alcança um número crítico de poucos elementos, os tempos intereventos tornam-se mal avaliados, levando ao acúmulo de erros, e consequentemente, desviando o sistema de sua trajetória real. Lidamos com esse problema aqui e o resolvemos redimensionando o sistema. Também estendemos essa abordagem para casos em que os sistemas são muito grandes para os representar em rede. Por fim, discutimos sobre a probabilidade de controle tumoral, a probabilidade de que as células malignas desapareçam após um tratamento.

3.1 A Equação do Movimento incluindo Eventos Simultâneos

Um evento *simples* causa uma mudança unitária na grandeza A , como no caso do crescimento de uma colônia, quando não se faz distinção entre as células (Sec. 4.4). Quando se considera eventos simultâneos, i.e., quando vários eventos simples podem ocorrer juntos na menor escala de tempo, devem existir várias maneiras de se combinar esses eventos simples para gerar os eventos simultâneos. Ao longo da trajetória do sistema, cada conjunto de eventos (simultâneos ou não) pode gerar diversos estados diferentes. Portanto, podemos categorizar o conjunto de estados $\{i\}$, alcançáveis a partir do estado j , de acordo com o tipo de evento que levaria a esses estados; assim, dividimos $\{i\} = \{i_1\} \cup \{i_2\} \cup \dots \cup \{i_m\} \cup \dots \cup \{i_\kappa\}$, em que rotulamos com inteiros $e = 1, 2, \dots, m, \dots, \kappa$ o conjunto de estados que podem ser alcançados devido a ocorrência de um evento do tipo e . Definindo $\rho_j^{(e)} = A_j^{(e)} / \mathcal{N}_j^{(e)}$ como a densidade de transições de um estado j , devido a um evento e , e $a_j^{(e)} = \delta_{iej} |\Delta A_{iej}|$, podemos reescrever a Eq. (2.2)

¹Finalizamos recentemente um artigo que descreve os passos descritos nessa seção, com aplicações ao modelo DH, e estamos em fase de submissão do mesmo [38].

como

$$\frac{dA(t)}{dt} = \sum_j P_j(t) \sum_e \sum_{i_e} w_{j \rightarrow i_e} \rho_j^{(e)} a_j^{(e)}. \quad (3.1)$$

Na densidade de transições $\rho_j^{(e)}$, $\mathcal{N}_j^{(e)}$ representa o número total de possíveis configurações devido ao conjunto de transições $j \rightarrow \{i_e\}$; na Eq. (3.1), $A_j^{(e)}$ são grandezas relacionadas com a fonte dos eventos. Nesse formalismo, as fontes $A_j^{(e)}$ são generalizações das grandezas $A_j^\dagger$ discutidas na Sec. 2.1. Pode-se encontrar $\mathcal{N}_j^{(e)}$ através de uma análise combinatorial dos eventos simples que definem os eventos simultâneos. Se o conjunto dos eventos e é constituído apenas de eventos simples, então $\mathcal{N}_j^{(e)} = A_j^{(e)}$, e assim $\rho_j^{(e)} = 1$, recobrando o resultado de Aiello e da Silva (2003) [36].

Podemos redefinir as taxas mesoscópicas (Eq. (2.5)) como

$$r_j^{(e)} \equiv \frac{\sum_{i_e} w_{j \rightarrow i_e}}{\mathcal{N}_j^{(e)}}. \quad (3.2)$$

Assim, a Eq. (3.1) pode ser colocada como

$$\frac{dA(t)}{dt} = \sum_j P_j(t) \sum_e a_j^{(e)} r_j^{(e)} A_j^{(e)}. \quad (3.3)$$

Note que $a_j^{(e)}$ não é dependente do estado j , mas somente do tipo de evento e , ou seja, $a^{(e)} = a_j^{(e)}$. Como a soma $\sum_e (\cdot)$ refere-se a todos os tipos de eventos, podemos trocar as posições de $\sum_j (\cdot)$ e $\sum_e (\cdot)$ na Eq. (3.3), chegando a equação

$$\frac{dA(t)}{dt} = \sum_e a^{(e)} \langle r^{(e)} A^{(e)} \rangle. \quad (3.4)$$

A média $\langle \cdot \rangle$ é tomada sobre o *ensemble* dos estados alcançáveis no tempo t . Ressaltamos que esse *ensemble* de eventos e gera as taxas mesoscópicas, $r^{(e)}$. Pode-se também descrever as taxas mesoscópicas através de taxas efetivas em uma forma dada por

$$r_{\text{eff}}^{(e)}(t) = \frac{\langle r^{(e)} A^{(e)} \rangle}{\langle A^{(e)} \rangle}. \quad (3.5)$$

A Eq. (3.4) toma, portanto, a seguinte forma:

$$\frac{dA(t)}{dt} = \sum_e a^{(e)} r_{\text{eff}}^{(e)}(t) \langle A^{(e)} \rangle. \quad (3.6)$$

A Eq. (3.4) é uma equação estocástica (do *movimento*) generalizada para processos Markovianos nos quais eventos simultâneos podem ocorrer. É possível recobrar o procedimento de Aiello e da Silva (2003) [36], como mostramos na Sec. 5.1.1.

3.2 A solução Monte Carlo da *Equação do Movimento*

Podemos resolver $A(t)$ da Eq. (3.1), de forma aproximada por:

$$A(t) \approx A(t_0) + \sum_{k=0}^n \sum_j P_j(t_k) \sum_e \sum_{i_e} w_{j \rightarrow i_e} \rho_j^{(e)} a_j^{(e)} \Delta t_k, \quad (3.7)$$

em que Δt_k é o incremento de tempo (ou passo de tempo) para cada passo MC, k . Um passo MC, aqui, significa uma simples tentativa de mudança do estado do sistema. O número de passos MC requeridos para alcançar o tempo t é denotado por n . O incremento de tempo é o mesmo da Eq. (2.9), com $w_t^{\max} = \max \{w_{j \rightarrow i_e}\}$.

Com essas considerações, podemos reescrever a Eq. (3.7) na forma:

$$A(t) = A(t_0) + \sum_{k=0}^n \sum_{j,e,i_e} \left(\frac{w_{j \rightarrow i_e}}{w_{t_k}^{\max}} \right) \left(\frac{1}{N} \right) \rho_j^{(e)} a_j^{(e)} P_j(t_k), \quad (3.8)$$

em que $\sum_{j,e,i_e}(\cdot) = \sum_j \sum_e \sum_{i_e}(\cdot)$. Podemos criar um processo hierárquico, escolhendo as probabilidades de transição

$$H_{j \rightarrow i_e} = \frac{w_{j \rightarrow i_e}}{w_{t_k}^{\max}}, \quad (3.9)$$

que reproduzem corretamente a frequência de eventos, em cada tempo t_k . Como um dado estado é selecionado com as probabilidades corretas para um dado tempo, um procedimento MC ideal leva a

$$A(t) = A(t_0) + \sum_{k=0}^n \sum_e a^{(e)} \langle r^{(e)} A^{(e)} \rangle \left(\frac{1}{w_{t_k}^{\max} N} \right), \quad (3.10)$$

em que

$$\begin{aligned} \langle r^{(e)} A^{(e)} \rangle &= \sum_{j_k} r_{j_k}^{(e)} A_{j_k}^{(e)} P_{j_k}(t_k) \\ &= \lim_{\mathcal{M}_k \rightarrow \infty} \frac{\sum_{j_k} r_{j_k}^{(e)} A_{j_k}^{(e)}}{\mathcal{M}_k} \end{aligned} \quad (3.11)$$

representa uma média de *ensemble* (sobre j_k) a cada instante t_k . Quando o número de simulações MC em cada passo k , $\mathcal{M}_k$, vai a infinito, gera-se o *ensemble* completo.

Outra abordagem consiste em estimar os tempos intereventos com a seguinte regra:

$$\Delta t_k^e = \frac{f_e^k}{r_{j_k}^{(e)} A_{j_k}^{(e)}}. \quad (3.12)$$

A grandeza f_e^k deve obedecer a relação $\sum_e f_e^k = 1$ (condição de normalização) a cada tempo t_k , como discutido no capítulo anterior, e aqui também utilizaremos $f_e = 1/n_e$. Note que, o incremento de tempo dado pela Eq. (3.12) representa um tempo de espera médio para transições de um dado estado j_k para um estado i_e , causado por um evento e . Nessa abordagem, se o estado microscópico permanece o mesmo em uma tentativa MC, o tempo não evolui. Podemos mostrar que esse procedimento leva ao mesmo resultado que utilizar Δt_k , a cada passo MC, notando-se que o passo de tempo é dado por

$$\Delta t_k = \sum_e \sum_{i_e} \left(\frac{w_{j_k \rightarrow i_e}}{w_{t_k}^{\max}} \right) \left(\frac{1}{N} \right) \rho_j^{(e)} \Delta t_k^{(e)}. \quad (3.13)$$

Uma vez que $r_{j_k}^{(e)} \mathcal{N}_{j_k}^{(e)} = \sum_{i_e} w_{j_k \rightarrow i_e}$ (veja a Eq. (3.11)), usando a Eq. (3.12) para Δt_k^e e a condição de normalização para f_e^k na Eq. (3.13), obtemos Δt_k .

3.3 Redimensionando Sistemas com Muitos ou Poucos Elementos

Podemos ver na Eq. (3.12) uma proporcionalidade inversa entre Δt_k^e e $A_{j_k}^{(e)}$. Em um sistema discreto, por exemplo, representado por uma rede quadrada de $M = L \times L$ sítios, se $A_{j_k}^{(e)} \approx M$, podemos resolver a Eq. (3.7) usando um método parecido com o método de Euler [50]. Entretanto, se a grandeza $A_{j_k}^{(e)}$ é pequena, grandes tempos de espera podem ocorrer, aumentando os erros sistemáticos no processo de integração. Isso seria análogo a usar grandes intervalos de tempo em uma integração numérica utilizando o método de Euler. Para reduzir os erros sistemáticos gerados pelo procedimento MC, redimensionamos o sistema. Isso é feito mapeando-se um sítio da rede, do espaço original, $\mathcal{L}$, em vários novos sítios no espaço redimensionado $\mathcal{L}'$. Assim, a grandeza A é trocada por λA no novo espaço $\mathcal{L}'$. Em um fenômeno em que A decresce monotonicamente com o tempo, quando o sistema alcança um tamanho crítico pequeno A_c em algum espaço $\mathcal{L}$, podemos reescalar a grandeza A para A' , em $\mathcal{L}'$, com $\lambda > 1$, e seguir esse procedimento até um tempo t desejado, ou até que alguma grandeza $A < A_f$ (no limite contínuo) seja alcançada no espaço $\mathcal{L}^{(\eta)}$. Dessa forma, podemos escrever o fator generalizado $\lambda(\eta) = \prod_{i=1}^{\eta} \lambda_i$, que nos ajuda a calcular a grandeza A em $\mathcal{L}$; η é o número de redimensionamentos requeridos para resolver o problema apropriadamente.

Outro problema pode ocorrer em um sistema com muitos elementos. Nesse caso, o custo computacional pode ser muito alto, fazendo com que algumas vezes o procedimento MC se torne inviável; para contornar esse problema, podemos redimensionar o sistema com $\lambda < 1$, mapeando um grupo de sítios, em $\mathcal{L}$, em um único sítio no espaço $\mathcal{L}'$. Quando o número de elementos no sistema está oscilando no tempo, pode-se alternar entre $\lambda_i > 1$ e $\lambda_i < 1$. Chamamos essa abordagem de rDMC.

Se tivermos $A^{(\eta)}$ elementos no espaço $\mathcal{L}^{(\eta)}$, a estimativa da evolução temporal no espaço $\mathcal{L}$ é feita através da iteração

$$\begin{aligned} t_k &= t_{k-1} + \left[\frac{1}{\lambda(\eta)} \right] \Delta t_k^e \\ &= t_{k-1} + \frac{f_e^k}{r_{j_k}^{(e)} A_{j_k}^{(\eta,e)}}, \end{aligned} \quad (3.14)$$

em que o segundo termo do lado direito é o tempo de espera (Eq. (3.12)), calculado no espaço $\mathcal{L}^{(\eta)}$.

Note que se houver interações locais entre os elementos, as equações de campo médio podem não descrever bem o fenômeno em estudo, e o redimensionamento pode se tornar muito difícil. Entretanto, com a ajuda dos métodos de grupo de renormalização [51, 52], o processo de redimensionamento pode se tornar viável por meio da busca por parâmetros efetivos de interação.

Esse procedimento de redimensionamento foi primeiro pensado para fatores λ , de forma que λA fosse um inteiro. Isso implica que no caso de $\lambda > 1$, λ seja também inteiro, e para $\lambda < 1$, o valor de A deve ser divisível por λ . Mas pode-se aplicar esse procedimento para todos os valores reais de λ , apenas notando que $\lambda A = A' = A'_i + A'_d$, em que A'_i é a parte inteira de A' e A'_d é a sua parte fracionária. Nesse caso, a distância entre as configurações $a^{(e)}$ deve ser também reescalada. Esse redimensionamento é alcançado através de $a'^{(e)} = a^{(e)}(1 + A'_d/A'_i)$. Note que se λA for inteiro, $A'_d = 0$ e então $a'^{(e)} = a^{(e)}$.

Parte II

Crescimento Tumoral

ANÁLISE DOS MECANISMOS DE CRESCIMENTO

4.1 Experimentos *in vitro* e o Processamento de Imagens

Cultivamos células das linhagens HeLa (carcinoma cervical humano), HCT-115 (adenocarcinoma coloretal humano)¹, B16-F10 (melanoma de camundongo)² e NIH-HN-13 (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço humano) com passagens entre 2 e 20. Também utilizamos dados da linhagem celular HT-29 (carcinoma coloretal humano), provindos do trabalho de Brú *et al.* (2003) [12].

As células foram plaqueadas em baixa densidade (entre 25 e 50 células/ml) em frascos de cultura de 25 cm² de área. Para as células HeLa e NIH-HN-13 usamos 4 ml de meio de cultura DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e streptomycina; para as linhagens HCT-115 e B16-F10 usamos 4 ml de meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) com a mesma quantidade de suplementos mencionados acima. As células foram mantidas em um ambiente controlado de 5% de CO₂ e 37 °C. Cuidadosamente, o meio de cultura era completamente substituído a cada 3 dias.

Vinte e quatro horas após o plaqueamento, várias colônias foram selecionadas e imageadas regularmente com magnificações de 10X e 20X usando dois microscópios invertidos: um com contraste de fase (Olympus IX-71, para imagear as células HeLa, HCT-115 e NIH-HN-13) [44] e outro equipado com DIC (Nikon Ti-Eclipse, para imagear

¹ATCC, Rockville, MD.

²BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

células B16-F10). As fotografias foram escaneadas com resoluções de $1 \mu\text{m}/\text{pixel}$ (10X) e $0,5 \mu\text{m}/\text{pixel}$ (20X) (IX-71), e, $0,64 \mu\text{m}/\text{pixel}$ (10X) e $0,32 \mu\text{m}/\text{pixel}$ (20X) (Ti-Eclipse).

Consideramos que as colônias cresciam essencialmente em duas dimensões e então traçamos os perfis das colônias, manualmente, com o auxílio dos softwares *ImageJ*³ e *CellSens* 2.0, e as medidas do raio desses perfis foram feitas com uma ferramenta computacional desenvolvida por nós. Quando necessário, a imagem de uma colônia inteira era o resultado da composição de imagens parciais.

Com nossa ferramenta computacional, calculamos o raio médio dos perfis com magnificação de 10X usando a relação $r(t) = \sqrt{2}d_{px}r_g$; em que d_{px} é a resolução em $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e $r_g = \sqrt{(1/n_p) \sum_{p=1}^{n_p} [\vec{r}_p - \vec{r}_{cm}(t)]^2}$ é o raio de giração, obtido através da posição dos pixels dentro da colônia, $\vec{r}_p$, do número de pixels da colônia, n_p , e do centro de massa, $\vec{r}_{cm}(t) = (1/n_p) \sum_{p=1}^{n_p} \vec{r}_p$. Cada agregado foi acompanhado até tocar a borda de uma colônia vizinha, levando até 330 horas para o contato. Para as magnificações de 20X contamos manualmente o número de células em cada imagem. Na Fig. 4.1 mostramos o desenvolvimento de uma colônia típica crescendo *in vitro*, em três momentos.

4.1.1 Experimentos de *Time Lapse* e a Estimativa dos Tempos de Espera

Mantidas as mesmas configurações para os experimentos, descritas no item anterior, realizamos experimentos de *Time Lapse*. Esses experimentos consistem em utilizar uma incubadora *Stage Top Incubator* (Tokai-Hit), própria para uso no microscópio, e fotografar em tempos programados as colônias. No nosso caso utilizamos *lapses* de 10 minutos e acompanhamos as colônias por até 3 dias. Com essa abordagem, foi possível prever os tempos de espera experimentais, ou seja, o tempo para que uma variação no número de células ocorra. Como os tempos de espera exercem um papel fundamental no método Monte Carlo dinâmico, comparamos os tempos de espera experimentais com os obtidos através de simulação numérica.

Também utilizamos as imagens geradas como descrito na seção anterior para estimarmos o tempo médio de espera utilizando o conjunto de dados $\{(t_i, N_i)\}$ e a relação $\Delta t^{(N_i)} = (t_i - t_{i-1})/\Delta N$, em que $\Delta t^{(N_i)}$ é o tempo de espera para o aparecimento da célula de número N_i , t_i é o tempo até o i -ésimo dado experimental e $\Delta N = N_i - N_{i-1}$ é a

³<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Figura 4.1: A evolução temporal de uma colônia de células B16-F10. (a) com cerca de 44 horas de cultura, $36 \mu\text{m}$ de raio e com um número contável de 8 células. (b) em 158 horas depois do início do experimento e com raio de $218 \mu\text{m}$; aqui o número de células é incontável. (c) após 166 h e raio médio de $258 \mu\text{m}$.

quantidade de células adicionadas entre o $i - 1$ e o i -ésimo dado experimental (obedecendo as condições $t_{(-1)} = 0$ e $N_{(-1)} = 0$). Para distinguir essa abordagem do *Time Lapse*, vamos chamá-la de *Coarse-Grained*.

4.2 O Modelo de Crescimento

Começamos nossa modelagem no limite contínuo, ajustando os dados experimentais de Brú *et al.* (2003) [12] (veja a Fig. 4.2) usando a seguinte equação sigmoidal:

$$\begin{aligned} \omega(t) &= \frac{d}{dt}r(t) \\ &= \alpha - \frac{\beta}{1 + \exp[\gamma(t - t_c)]}. \end{aligned} \quad (4.1)$$

Na prática, a derivada é obtida pela média da inclinação nos pontos adjacentes a cada dado experimental (t_i, r_i) , i.e., $w(t_i) = 2^{-1}(\Delta r_{i+1}\Delta t_{i+1}^{-1} + \Delta r_i\Delta t_i^{-1})$ com $\Delta r_i = r_i - r_{i-1}$. No extremo $i = i_{max}$ utilizamos somente um termo, e então trocamos o fator 2 por 1. Inicialmente, o crescimento é aproximadamente linear com uma taxa constante $\omega(0) =$

$\omega_0 \approx \alpha - \beta$. Após um tempo crítico t_c (note que $\omega(t_c) = \alpha - \beta/2$), a curva muda seu comportamento indo para uma taxa constante α , onde γ é um parâmetro que determina o quão rápido a taxa evolui de ω_0 para α . Agora podemos definir variáveis reduzidas para a taxa e o tempo, respectivamente, como segue:

$$\omega_c = \frac{[(\omega/\alpha) - 1]}{\Gamma}, \quad (4.2)$$

e

$$\tau = \gamma(t - t_c), \quad (4.3)$$

com $\Gamma = \beta/\alpha$. Depois de algumas manipulações algébricas na Eq. (4.1), e utilizando as Eqs. (4.2)-(4.3), obtemos:

$$\omega_c = -\frac{1}{1 + \exp(\tau)}. \quad (4.4)$$

Figura 4.2: A taxa de crescimento de células HT-29 cultivadas *in vitro* (círculos pretos unidos por segmentos de reta) e o ajuste sigmoidal (linha vermelha) com a Eq. (4.1). As linhas tracejadas azuis mostram a taxa de crescimento inicial ($\omega(t \approx 0) = \alpha - \beta$) e a sua saturação ($\omega(t \gg 0) = \alpha$).

Assim, apesar dos diferentes parâmetros α , β , γ e t_c , intrínsecos de cada linhagem celular, a taxa e o tempo reduzidos nos permitem colapsar os dados experimentais em uma única curva do tipo sigmoidal. Portanto, podemos ajustar os dados experimentais para o raio médio das colônias com a função

$$r(t) = r_0 + \frac{\beta}{\gamma} \ln \left\{ \frac{\exp[-\gamma(t - t_c)] + 1}{\exp(\gamma t_c) + 1} \right\} + \alpha t, \quad (4.5)$$

que é a solução da Eq. (4.1) com a condição $r(0) = r_0 \equiv 5 \mu\text{m}$ [53]. Para o ajuste da curva, deslocamos os dados do raio médio, para as diferentes colônias, de cada linhagem celular, seguindo uma abordagem similar a de Brú *et al.* (1998) [14] e Puliafito *et al.* (2012) [25]. Esses autores deslocaram as curvas de crescimento para que coincidissem com o raio inicial em $t = 0$ (Brú *et al.*), e no começo da transição morfológica (Puliafito *et al.*). Aqui, deslocamos e ajustamos os dados experimentais para construir as curvas de crescimento usando o seguinte esquema:

(i) fazer o ajuste dos dados experimentais de cada colônia individual com a função dada pela Eq. (4.5);

(ii) escolher a melhor curva obtida com os ajustes do passo (i) - aquela com os menores erros nos parâmetros - para usar como *curva-guia*;

(iii) minimizar a soma dos resíduos, entre a curva-guia e os dados de cada colônia, individualmente, através de deslocamentos temporais;

(iv) colocar todos os dados deslocados juntos (incluindo aqueles usados para construir a curva-guia), e ajustar esse conjunto com a Eq. (4.5) para obter os valores dos parâmetros α , β , γ e t_c .

4.3 O Comportamento *Universal* da Taxa de Crescimento

A Fig. 4.3 mostra as curvas de crescimento e os parâmetros da taxa sigmoideal (veja a Eq. (4.1)). Para as células B16-F10 encontramos $\alpha = 6,2 \pm 0,4 \mu\text{m/h}$. Também fizemos uma média dos parâmetros obtidos para cada colônia individual (passo (i) no esquema de deslocamento e ajuste, Sec. 4.2), chegando a $\langle \alpha \rangle = 5,7 \pm 0,3 \mu\text{m/h}$; para a linhagem HeLa obtivemos $\alpha = 2,5 \pm 0,1 \mu\text{m/h}$ e $\langle \alpha \rangle = 2,5 \pm 0,2 \mu\text{m/h}$, e para células HCT-115, $\alpha = 2,4 \pm 0,3 \mu\text{m/h}$ e $\langle \alpha \rangle = 2,6 \pm 0,7 \mu\text{m/h}$. Apresentamos especialmente o parâmetro α porque vamos compará-lo com a literatura; os outros parâmetros podem ser vistos na Fig. 4.3, Tab. 4.1, e nos dados suplementares de Costa *et al.* (2015) [17].

O deslocamento dos dados no eixo do tempo, para construir as curvas

Figura 4.3: A evolução temporal do raio médio de agregados de células. A parte de cima a esquerda mostra a evolução temporal de células HCT-115, a direita para células da linhagem HeLa e abaixo para colônias de B16-F10. Os símbolos coloridos representam os dados experimentais e as linhas sólidas azuis escuras são os ajustes usando a Eq. (4.5).

de crescimento, é um procedimento simplificado para corrigir os efeitos devidos a heterogeneidade das colônias, tais como desincronização celular, diferentes tempos de adesão e área de contato inicial. Os valores de α que encontramos para células B16-F10 concordam com o valor encontrado por Brú *et al.* (2003) [12]: $\alpha = 5,83 \pm 0,01 \mu\text{m/h}$. Entretanto, para a linhagem HeLa, nossos resultados foram aproximadamente duas vezes maiores que os obtidos por Brú *et al.*: $\alpha = 1,34 \pm 0,01 \mu\text{m/h}$. Uma possível explicação para a diferença na taxa de crescimento das células HeLa é o meio de cultura: usamos meio DMEM, enquanto Brú *et al.* usaram o meio RPMI-1640. A mudança do meio de cultura pode influenciar algumas propriedades celulares [54], incluindo as taxas de crescimento em culturas com células bem estabelecidas [55] e em culturas primárias [56, 57].

Podemos encontrar na literatura, uma vasta gama de trabalhos usando os meios

RPMI-1640 e DMEM em linhagens bem estabelecidas como as células HeLa. Da mesma forma que o meio de cultura influencia algumas propriedades celulares, outros fatores tais como a concentração de soro [58], CO_2 e glicose [20, 35], têm sido reportados como modificadores da taxa de crescimento em esferóides, influenciando principalmente a disponibilidade de fatores de crescimento [59]. Isso deve ser também válido para o desenvolvimento de monocamadas, uma vez que as células respondem diretamente aos estímulos gerados pelos fatores de crescimento.

Nosso resultado para a taxa de crescimento de células HeLa também discorda do resultado de Huergo *et al.* (2012) [26]: $\alpha = 5 \pm 1 \mu\text{m/h}$. Nesse caso, além dos diferentes meios de cultura, a diferença entre os procedimentos experimentais está no número de passagens. Enquanto usamos baixas passagens (entre 2 e 20), Huergo *et al.* usaram células com passagem 44. Campbell *et al.* (2002) [60], mostraram que o número de passagens está diretamente relacionado com o decréscimo na expressão do receptor de estrogênio alfa ($\text{ER}\alpha$) em células GH3/B6/F10 (tumor pituitário de camundongo) - uma diferença de apenas 4 passagens pode reduzir significativamente a expressão de $\text{ER}\alpha$; esse receptor está relacionado com a proliferação celular [61]. Apesar de $\text{ER}\alpha$ não estar expresso em células HeLa [62], a comparação de nossos resultados com os de Huergo *et al.* sugere que o número de passagens exerce um papel importante na regulação da taxa de crescimento. Geralmente, baixas passagens são recomendadas no estudo das células [63].

Os dados experimentais mostrados na Fig. 4.3 ajustam-se bem com a função dada pela Eq. (4.5), mostrando uma boa concordância com nossa modelagem para a taxa de crescimento. Uma inspeção na Eq. (4.1) e na sua integral, Eq. (4.5), revela três estágios de crescimento da colônia. A primeira região é o estágio em que a colônia cresce linearmente com o tempo, uma vez que $\omega(t) \approx \omega_0$. A segunda, próxima de t_c , é uma região de transição, e a terceira região é onde o raio converge para o regime linear assintótico, com inclinação α . Acreditamos que pode-se relacionar essa mudança de regime com a transição morfológica, como observado em células da linhagem celular MDCK (Mardin-Darby rins caninos) [25], e isso poderia ocorrer em todas as células aderentes.

A condição de crescimento em nosso modelo é trivial, $\alpha \geq \beta$, implicando que $\Gamma \leq 1$; $\Gamma = 1$ é possível por causa do fator $f_0 = [1 + \exp(-\gamma t_c)]^{-1}$, que multiplica β , em $t = 0$. Isso satisfaz a condição de crescimento $\omega_0 > 0$, embora usualmente $f_0 \rightarrow 1$. Na segunda região de crescimento, pode-se trocar o parâmetro $f_0\beta$ por um parâmetro efetivo β_{eff} ,

que definimos como $\beta_{\text{eff}} = f\beta$, com $f = \{1 + \exp[\gamma(t - t_c)]\}^{-1}$. Podemos relacionar esse parâmetro com as protruções e vales, na frente de crescimento, e alguns buracos dentro do agregado, resultando em uma colônia não-circular. De certa forma, β_{eff} tem a ver com a medida da razão de aspecto, tal como estudado por Huergo *et al.* (2011) [24]. Note que $\beta_{\text{eff}} \rightarrow f_0\beta$ quando $t \ll t_c$, e $\beta_{\text{eff}} \rightarrow 0$ quando $t \gg t_c$, ou seja, para tempos longos, o formato do agregado se torna próximo ao circular.

Outro ponto importante é que a taxa de crescimento proposta (Eq. (4.1)) não leva à saturação da curva de crescimento, em concordância com a literatura [12, 14, 24, 26, 29, 53, 64, 65]. A saturação não é um mecanismo do agregado em si; ela acontece devido às condições de contorno do frasco de cultura. Esse fato contrasta com o perfil de crescimento Gompertziano [20, 35, 66, 67], em que a saturação é esperada. Portanto, é possível que nossa modelagem não se aplique ao crescimento de esferóides, onde tipicamente a curva de Gompertz aparece. Existe, entretanto um contraponto que é o trabalho de Drasdo e Höhme (2005) [53], em que o plote do número de células $N_T^{1/3}$ por t resultou em um ajuste linear. Assim, é fato que uma discussão maior a respeito da saturação do crescimento de esferas deve ser realizado, mas ela foge do escopo de nosso trabalho.

Figura 4.4: O raio R como uma função da raiz quadrada do número de células HeLa (esquerda) e B16-F10 (direita), e o ajuste linear (linha sólida azul escura).

A Fig. 4.4 mostra o comportamento do raio médio R como uma função do número de células N_T . Podemos encontrar que a função $R = R_0 + a\sqrt{N_T}$ ajusta-se bem aos dados experimentais [24]. O parâmetro R_0 seria, presumivelmente, o raio da colônia, obtido por extrapolação, em uma situação em que não há células. Entretanto, isso não faz sentido para o sistema em consideração, uma vez que se requer pelo menos uma célula tumoral

para começar o processo de crescimento, e então definir uma colônia. Podemos trocar o raio da primeira célula pela relação $R_{\text{eff}} = R_0 + a$, e assim obter $R = R_{\text{eff}} + a(\sqrt{N_T} - 1)$.

O parâmetro R_{eff} , é diferente de r_0 da Eq. (4.5); r_0 é interpretado como o raio de uma única célula no momento da adesão à placa de cultura, ao passo que R_{eff} é o raio da primeira célula extrapolado das medidas experimentais. O espalhamento (do termo em inglês *spreading*) da célula, em contato com a superfície da placa de cultura, explica a diferença entre essas duas medidas [22, 68]. Como podemos ver na Fig. 4.4, o R_{eff} das células HeLa é aproximadamente duas vezes o valor das células B16-F10, e pode-se relacionar isso com o fato de que as células HeLa podem se espalhar mais do que as células B16-F10. Isso também implica que elas tenham tamanhos e formatos diferentes.

Observando novamente a Fig. 4.1, mostrada no início do Cap. 4, podemos ver uma mudança no formato da colônia ao longo da evolução temporal: de uma forma geométrica inespecífica para um formato circular. Também, como descrito por Huergo *et al.* (2011, 2012) [24, 26], podemos notar que o tamanho característico da célula depende de sua posição no agregado. Adicionalmente, observamos que em colônias grandes, existem células se empilhando e formando múltiplas camadas (figura não mostrada). Em colônias pequenas, nos estágios iniciais, o desvio dos agregados do formato circular é acompanhado da formação de buracos. Esses buracos, em colônias grandes, são rapidamente preenchidos, não afetando diretamente a dinâmica de crescimento.

A diferença de tamanhos característicos das células, observados nos agregados, está relacionada com a transição morfológica [25]. Nesse processo, a compressão exercida pelas células externas, causa redução de área, aumento da densidade local e parada do ciclo celular, nas células internas. Além disso, quando essas sofrem suficiente estresse, o empilhamento começa, causado tanto pelo mecanismo de compressão quanto pela habilidade das células de escapar da *anoikis* (morte celular causada pela perda do contato célula-substrato). Em células B16-F10, mecanismos moleculares coordenados protegem as células da *anoikis* [69, 70].

Na Fig. 4.5 mostramos uma curva de crescimento de três colônias de células HCT-115. Colapsamos o raio médio, *pré* empilhamento, das colônias em uma única curva, com os mesmos parâmetros mostrados na Fig. 4.3. As linhas tracejadas mostram a região da curva de crescimento em que o empilhamento torna-se evidente. Estimamos que esse efeito torna-se perceptível ao redor do tempo $t_{\text{pile}} = 287 \pm 9$ h com um raio médio

Figura 4.5: O raio médio para três colônias de células HCT-115 ajustadas com os mesmos parâmetros mostrados na Fig. 4.3.

de $r_{pile} = 380 \pm 30 \mu\text{m}$.

Como descrito na teoria de Galle *et al.* (2005) [23], a mudança comportamental na região linear assintótica da curva de crescimento, como mostrado na Fig. 4.5 para células HCT-115, sugere a formação de múltiplas camadas. Essa mudança no comportamento pode estar relacionada com a baixa energia de adesão entre as células e a placa de cultura, a compressão exercida nas células, e a habilidade dessa linhagem celular de escapar da *anoikis*. Estudos também sugerem que a sinalização bioquímica e as mutações genéticas encontradas em diversos tipos de tumores de cólon (HCT-115 é uma linhagem de células colorretais), exerçam um papel fundamental para esse efeito. Esses fatores combinados podem levar à uma propensão para a formação de múltiplas camadas [71, 72].

Um fato que contrasta com a mudança de comportamento na terceira região de crescimento é que a redução da velocidade não é evidente para células B16-F10 e outras linhagens: HeLa [26], Vero [24] e SW-480 [27], embora os mecanismos requeridos para a formação de múltiplas camadas sejam os mesmos que em células HCT-115. Possivelmente, isso deve-se a baixa energia de coesão célula-célula [27].

Fazendo transformações nos conjuntos de dados, usando as Eqs. (4.2)-(4.4), encontramos um comportamento sigmóide comum para as linhagens celulares, como mostrado na Fig. 4.6. Na Tab. 4.1 estão os parâmetros usados para construir essa figura.

É necessário comparar a janela de tempo usada nesse trabalho com a utilizada

Figura 4.6: O colapso dos dados usando as variáveis reduzidas da taxa e do tempo (Eqs. (4.2) e (4.3), respectivamente) em uma única curva (linha sólida azul escura, Eq. (4.4)) para cinco tipos de células. Os parâmetros usados estão sumarizados na Tab. 4.1.

Tabela 4.1: Os parâmetros usados na Fig. 4.6.

Linhagem	α ($\mu\text{m}/\text{h}$)	Γ	γ^{-1} (h)	t_c (h)
HT-29	1,96 (1)	0,633	60 (10)	459 (8)
HeLa	2,5 (1)	0,64	9 (7)	205 (6)
HCT-115	2,5 (3)	0,96	40 (10)	127 (8)
HN-13	3,6 (1)	0,70	16 (2)	140 (*)
B16-F10	6,2 (4)	0,95	27 (5)	140 (5)

(·) denota o erro estatístico no último algarismo significativo;

(*) o valor foi mantido fixo.

por Brú *et al.* (2003) [12]: eles puderam trabalhar com uma janela de tempo de aproximadamente 1400 horas, enquanto aqui, utilizamos aproximadamente 330 horas. Para fazer com que os conjuntos de dados tivessem o mesmo tamanho, utilizamos os dados de HT-29 até aproximadamente $\tau = 7$. Apesar disso, o comportamento sigmoidal para $\tau > 7$ também é compatível com a Eq. (4.4). Para ver com mais detalhes, pode-se observar a Fig. 4.2, em que a taxa de crescimento sigmoidal não-reduzida de HT-29 é ajustada até $t = 1400$ h [16], o que corresponde a $\tau \approx 19$, em unidades reduzidas.

Como podemos ver na Fig. 4.6, as flutuações na taxa reduzida da linhagem HT-29, são maiores que nas outras linhagens celulares. Essas diferenças são devidas ao número de colônias utilizadas para construir a taxa de crescimento. Enquanto utilizamos uma média de cinco (HCT-115) ou quatro (HeLa, B16-F10, NIH-HN-13) colônias, na construção da taxa de crescimento das células HT-29 usamos apenas um conjunto de dados [12].

Colapsos em curvas *universais* podem ser obtidos em diversas propriedades de culturas celulares, e.g., o comportamento fractal dos agregados [12, 14, 24, 26, 73], crescimento ontogênico [30, 74], espalhamento de uma única célula [22, 68] e atividade de locomoção [75]. Entretanto, até onde sabemos, essa é a primeira vez que se observa o colapso de funções da taxa crescimento, mostrando o mesmo comportamento para várias linhagens celulares. Acreditamos que isso acontece para qualquer linhagem aderente de células crescendo *in vitro*; exemplos são células MDCK [25] e HCT-116 [27], e pode ser estendido para outros sistemas, formando múltiplas camadas [24, 26, 27] ou esferóides [53].

Esse comportamento sigmoidal comum sugere a existência de mecanismos cooperativos e competitivos, uma vez que esse formato característico aparece em taxas de reações bioquímicas em que esses mecanismos estão presentes. Acreditamos que seja essencial a formação de um núcleo crítico, estabilizado por forças coesivas, que favorece a adesão à placa de cultura [22, 23, 27].

As células podem facilmente se destacar do agregado, se as forças coesivas forem fracas e, portanto, elas são importantes para estabilizar o *cluster*. Além disso, a força adesiva total aumenta dependendo do número de células que se juntam, dessa forma, essa natureza cooperativa entre as duas forças exerce um papel importante na regulação da taxa de crescimento. Depois que as células formam um núcleo crítico, as forças coesivas comprimem as células internas, afetando sua capacidade de se espalhar e o seu tamanho médio. Assim, acreditamos que a relação entre forças adesivas e coesivas seja, também, a principal causa da transição morfológica.

Outros mecanismos cooperativos podem existir, além daquele entre forças adesivas e coesivas, como a cooperação por meio do compartilhamento de produtos difusivos [15]. A competição, por outro lado, ocorre principalmente por meio da busca por espaço na borda da colônia [16], uma vez que as células internas tornam-se quiescentes [12, 25]. Acredita-se que esse mecanismo, em colônias aderentes, é mais importante do que outros possíveis fatores competitivos, como o consumo de nutrientes [12] e, portanto, hipotetizamos que

as células proliferativas buscam por posições com o menor número de contatos com suas vizinhas. O trabalho de Costa *et al.* (2013) [16] suporta essa hipótese com simulações em uma rede por meio da adição de um termo, na probabilidade de transição, dependente do número de sítios locais. Mostramos de maneira detalhada essas simulações na Sec. 4.5.

Nossa abordagem para a taxa sigmoidal efetiva considera, implicitamente, possíveis efeitos de morte celular, fundamentando modelos em que a morte celular não é explicitamente levada em conta [16, 29, 45, 53], uma vez que os buracos são rapidamente preenchidos [76], sem afetar diretamente a cinética da população [77].

Note que por meio da relação entre o raio médio e o número de células, mostrada na Fig. 4.4, podemos encontrar $dR(t)/dt \propto N_T^{-1/2} dN_T/dt$ [14]. Com essa relação, e usando a primeira parte da Eq. (4.1) obtemos

$$\frac{d}{dt}N_T \propto \omega(t)\sqrt{N_T}, \quad (4.6)$$

que representa uma reação química $Q \rightarrow T$ com taxa $\omega(t)$; Q representa um local (espaço livre) que pode ser preenchido por uma célula filha, e T é uma célula tumoral. Esse processo é análogo a preencher um sítio vazio em uma rede [16]. Como Q está próximo da borda da colônia, temos a relação $[Q] \propto N_T^{1/2}$, que eventualmente resulta na Eq. (4.6). Essa descrição da taxa de crescimento pode estar relacionada com a taxa de crescimento da massa de células isoladas [78, 79]. Na Fig. 4.7, apresentamos um diagrama esquemático para resumir de maneira simplificada a modelagem que utilizamos para descrever o crescimento de tumores.

Figura 4.7: Diagrama esquemático resumindo nossa modelagem. Fizemos uma representação pictórica dos agregados em diferentes tempos, e para dois valores de γ . Bem no começo, as células possuem grande mobilidade e as colônias crescem com uma taxa $\omega \approx \alpha - \beta$; após isso, as células formam um agregado com formato irregular. Próximo do tempo crítico t_c , após a formação de um núcleo crítico, um agregado com formato mais circular aparece. Isso é seguido pela transição morfológica, i.e., a compactação das células internas (o leitor é referido a Fig. 4.1 e aos trabalhos de Huergo *et al.* (2011, 2012) [24, 26], para ver alguns padrões reais), e conforme os agregados se expandem, o crescimento torna-se linear com uma taxa constante α , dirigido pelas células da borda.

4.4 Monte Carlo Dinâmico Aplicado ao Modelo de Crescimento

Para simular o crescimento de um tumor, discretizamos o espaço representando-o através de uma rede bidimensional com $M = L \times L$ sítios, e assumimos que cada sítio pode assumir apenas os *status* tumoral T ou vazio V . Definimos a probabilidade p_0 de que um sítio vazio q seja preenchido dado que ele tenha apenas um vizinho tumoral ao seu lado, sendo, portanto, $(1 - p_0)$ a chance de não haver o preenchimento. Dessa forma, em uma vizinhança contendo η_q tumores, a chance de preenchimento do sítio q por um de seus vizinhos será dada por

$$p_0 + p_0(1 - p_0) + \cdots + p_0(1 - p_0)^{\eta_q - 1} = 1 - (1 - p_0)^{\eta_q}. \quad (4.7)$$

Com isso, a probabilidade por unidade de tempo de q ser ocupado será proporcional a Eq. (4.7), ou seja, $g_q \propto 1 - (1 - p_0)^{\eta_q}$. Essa probabilidade por unidade de tempo, g_q , carrega tanto as informações *locais* quanto as *globais* do sistema a cada instante; o termo η_q relaciona-se com as informações locais em um dado instante; as informações globais, por outro lado, serão representadas por p_0 e nesse contexto assumimos que $p_0 = p_0(t) = \omega(t)/\alpha$, sendo $\omega(t)$ a taxa experimental obtida através da Eq. (4.1); consequentemente teremos a taxa de transição para cada sítio vazio com a forma

$$g_q(t) = b \left\{ 1 - \left[\left(\frac{\beta}{\alpha} \right) \frac{1}{1 + \exp[\gamma(t - t_c)]} \right]^{\eta_q} \right\}, \quad (4.8)$$

sendo b a frequência, no regime de tempos longos, com que um novo sítio T é adicionado ao sistema. Aqui, η_q pode variar entre um e η_{max} , com $\eta_{max} = 8$, ou seja, uma vizinhança de Moore [80]. A taxa de transição, na literatura sobre propagação epidêmica, comumente leva em conta as contribuições locais e globais separadamente [36, 42].

Consideramos que em cada intervalo de tempo Δt apenas um evento pode ocorrer, e então a *distância* entre os estados será dada por $a = |\Delta n_T| = |\Delta n_V| = 1$. As grandezas n_T e n_V representam o número de sítios⁴ com *status* de tumor, e n_V o número de sítios com *status* vazio. Podemos escrever uma equação estocástica de *movimento*, seguindo a

⁴O número de sítios é diferente do número de células, portanto, denotamos n_T como o número de sítios na simulação e N_T como número de células reais. Alguns trabalhos, como o de Jiang *et al.* (2005) [35] propõem uma relação entre o número de sítios e o número de células, mas não faremos isso nesse trabalho.

Eq. (2.6), para esse problema como

$$\frac{d}{dt}n_T(t) = \sum_j \langle g(t) \rangle_{n_0^{(j)}} P_j(t) n_0^{(j)}, \quad (4.9)$$

em que $\sum_j (\cdot)$ representa a soma sobre todas as possíveis configurações j do sistema, acessadas no tempo t , após várias simulações. $\langle g(t) \rangle_{n_0^{(j)}} = \sum_{q=1}^{n_0^{(j)}} g_q(t) / n_0^{(j)}$ representa a taxa mesoscópica de aumento do número de sítios T ; com a mesma condição inicial, a probabilidade $P_j(t)$ é gerada após rodarmos $\mathcal{M}$ simulações independentes; e n_0 é o número de sítios vazios na interface colônia-meio (alguns desses sítios podem estar no interior da colônia). Omitimos a partir daqui o sobrescrito j , para simplificarmos nossa notação, e quando nos referirmos a uma gradeza específica, estaremos tratando ela em uma configuração j genérica.

Aqui, $M = n_T + n_V$, e $n_V = n_0 + \tilde{n}_V$, ou seja, a quantidade de sítios vazios pode ser dividida em n_0 , i.e., sítios vazios que contribuem para o crescimento de n_T ; e $\tilde{n}_V$, que são os sítios vazios que não contribuem para o crescimento de n_T . Note que assim, nossos elementos *interagentes* serão os sítios de $\{n_0\}$, isto é, $N = n_0$ na Eq. (2.10). A característica *local* dos elementos com *status* V é que para os sítios do conjunto $\{n_0\}$, o número de vizinhos tumores é $\eta_q > 0$, e para os sítios em $\{\tilde{n}_V\}$, $\eta_q = 0$. n_V é interpretada com fonte de n_T , ou seja, se um aumenta, o outro diminui e vice-versa [16], no entanto, como $g_q(t) = 0$ para os sítios do conjunto $\{\tilde{n}_V\}$, apenas os sítios n_0 participam da *dinâmica* do sistema, e, portanto, podem ser escritos como $A_j^\dagger$ na Eq. (4.9). Negligenciamos a transição $T \rightarrow V$ (morte celular), pois assumimos que as células dispõem de suprimento adequado de nutrientes, e o decréscimo na taxa de crescimento seria pequeno, uma vez que as células adjacentes logo tomariam o espaço deixado pela célula morta [53].

O tempo de espera entre dois eventos pode ser estimado através de uma equação com a forma da Eq. (2.14); para o nosso problema:

$$\Delta t^{(n_T)} = \frac{1}{\sum_{q=1}^{n_0} g_q(t)}. \quad (4.10)$$

Como apenas um tipo de evento pode ocorrer nesse sistema, que é o evento de aparecimento de um novo sítio tumoral na colônia, temos $f_e = 1$. O sobrescrito (n_T) denotará o tempo de espera entre o (n_T) -ésimo e o $(n_T + 1)$ -ésimo sítio. E, finalmente, para resolver corretamente a Eq. (4.9) deveremos utilizar uma hierarquia dinâmica, na

forma da Eq. (2.11):

$$\begin{aligned} H_q(t) &= \frac{g_q(t)}{\max [g_q(t)]} \\ &= \frac{1 - (1 - p_0)^{\eta_q}}{1 - (1 - p_0)^{\eta_{\max}}}, \end{aligned} \quad (4.11)$$

em que $\max [g_q(t)]$ denota o maior valor possível de $\{g_q(t)\}$. Operacionalmente escolhe-se com probabilidade $(1/n_0)$ um sítio do conjunto $\{n_0\}$, e tenta-se mudar seu *status* com a probabilidade $H_q(t)$. Essa tentativa é feita comparando-se $H_q(t)$ com um número aleatório ξ , uniformemente distribuído entre $[0, 1)$. Se $H_q(t) < \xi$ a nova configuração é aceita, e de outra forma ela é rejeitada e o processo recomeça; em caso de aceite da nova configuração, o tempo avança, $t \rightarrow t + \Delta t^{(\text{nt})}$; as variáveis n_T , n_V , n_0 e $\{\eta_q\}_{\text{Moore}}$ são atualizadas: $n_T \rightarrow n_T + 1$, $n_V \rightarrow n_V - 1$ e $n_0 \rightarrow n_0 + \Delta n_0$. O incremento Δn_0 é uma variável que depende da localização do sítio q . Quanto maior η_q , menor Δn_0 . Uma das possíveis configurações é quando $\eta_q = \eta_{\max}$: nesse caso $\Delta n_0 = -1$ pois o sítio está em um *buraco* e após a atualização de n_T ele é retirado do conjunto $\{n_0\}$. O termo $\{\eta_q\}_{\text{Moore}}$ representa uma atualização do número de vizinhos de cada um dos elementos em volta do sítio q ; Por fim um novo raio médio é calculado e a taxa $\sum_q g_q(t)$ é atualizada.

A probabilidade de ocupação de um sítio vazio é de H_q/n_0 quando t é pequeno, e para tempos grandes, essa probabilidade é de $1/n_0$, recobrando um dos procedimentos clássicos dos modelos tipo Eden [81]. Na Fig. 4.8 mostramos a transição entre duas configurações possíveis. Acima temos a primeira configuração, com um sítio tumoral no centro da rede, e após $\Delta t = [8b(1 - \Gamma)]^{-1}$ o sistema poderá adquirir uma das configurações mostradas a direita. Nesse caso, como a chance de escolha de um sítio do conjunto $\{n_0\}$ é uniforme, então as probabilidades $P_j(\Delta t^{(1)})$ de encontrar o sistema em algum desses estados após o tempo Δt será de $1/2$. As configurações passam a se complicar e eventualmente o sistema pode adquirir a configuração mostrada abaixo, com um *buraco* rodeado de sítios cheios. Nesse caso, a chance de escolha do *buraco* será de $1/17$ e $H_q = 1$, uma vez que $\eta_q = 8$. Na Fig. 4.9 mostramos resumidamente um fluxograma da simulação computacional através dos passos descritos nos métodos acima.

Figura 4.8: Acima mostramos a configuração inicial do sistema de tumores (quadrados pretos) e sua vizinhança (círculos) em rede. Após Δt , ele pode assumir algum dos estados indicados. No primeiro caso, teremos $\Delta n_0 = 4$ e no segunda caso, $\Delta n_0 = 2$. Abaixo mostramos uma configuração em que $n_T = 8$ sítios e $n_0 = 17$, essa configuração tem um *buraco* ao centro. O sistema pode então assumir a nova configuração mostrada a direita, atualizando $\Delta n_0 = -1$.

4.4.1 O Cálculo do Raio Médio e da Taxa Mesoscópica

O raio médio de uma colônia, em um instante, é dado por $\langle r \rangle = \sqrt{2}d_0r_g$, em que d_0 é o diâmetro de uma única célula, e r_g é o raio de giro, $r_g = \sqrt{(1/n_T) \sum_{T=1}^{n_T} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t)]^2}$, $\vec{r}_T$ a localização do sítio T na rede, e $\vec{r}_{cm}(t) = (1/n_T) \sum_{T=1}^{n_T} \vec{r}_T$ o centro de massa. Definimos então $S(t) \equiv \sum_{T=1}^{n_T} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t)]^2$. Quando o sistema cresce de apenas um sítio num

Figura 4.9: Fluxograma descrevendo o procedimento computacional adotado.

intervalo de tempo Δt , podemos calcular a grandeza $\vec{\delta}$, definida por:

$$\begin{aligned}\vec{\delta} &\equiv \Delta \vec{r}_{cm} \\ &= \vec{r}_{cm}(t) - \vec{r}_{cm}(t - \Delta t).\end{aligned}\tag{4.12}$$

Para otimizar o cálculo de r_g , ao invés de passar por todos os sítios T , vamos considerar a função $S'(t)$, dada por

$$S'(t) = S(t - \Delta t) + [\vec{r}_{n_T} - \vec{r}_{cm}(t)]^2.\tag{4.13}$$

Neste contexto, $S(t - \Delta t) = \sum_{T=1}^{(n_T-1)} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t - \Delta t)]^2$. Usando a Eq. (4.12), podemos reescrever a Eq. (4.13) como

$$S'(t) = \sum_{T=1}^{n_T-1} \{[\vec{r}_T - [\vec{r}_{cm}(t) - \vec{\delta}]]^2 + [\vec{r}_{n_T} - \vec{r}_{cm}(t)]^2\}.\tag{4.14}$$

Após alguma manipulação algébrica, temos

$$\begin{aligned}S'(t) &= \sum_{T=1}^{n_T-1} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t)]^2 + [\vec{r}_{n_T} - \vec{r}_{cm}(t)]^2 \\ &\quad + 2\vec{\delta} \cdot \sum_{T=1}^{n_T-1} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t)] + \sum_{T=1}^{n_T-1} \vec{\delta}^2.\end{aligned}\tag{4.15}$$

Considerando que

$$\begin{aligned} \sum_{T=1}^{n_T-1} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t)]^2 + [\vec{r}_{n_T} - \vec{r}_{cm}]^2 &= \sum_{T=1}^{n_T} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t)]^2 \\ &= S(t), \end{aligned} \quad (4.16)$$

e que, por definição, $\sum_{T=1}^{n_T} [\vec{r}_T - \vec{r}_{cm}(t)] = 0$, obtemos uma forma alternativa para $S(t)$ a partir da Eq. (4.15):

$$S(t) = S'(t) + 2\vec{\delta} \cdot [\vec{r}_{n_T} - \vec{r}_{cm}(t)] - \vec{\delta}^2(n_T - 1). \quad (4.17)$$

A Eq. (4.17) é útil devido ao ganho no tempo de computação, uma vez que não necessitamos passar por todos os sítios T a cada atualização do sistema, como esperado pela definição de r_g ; podemos usar apenas o valor de n_T para atualizar r_g . É possível mostrar também que, em um sistema que esteja diminuindo, a Eq. (4.17) pode ser escrita como

$$S(t) = S'(t) - 2\vec{\delta} \cdot [\vec{r}_{n_T+1} - \vec{r}_{cm}(t)] - \vec{\delta}^2(n_T + 1). \quad (4.18)$$

Isso nos permite a generalização

$$S(t) = S'(t) + 2\Delta n_T \vec{\delta} \cdot [\vec{r}_{n_T(t)} - \vec{r}_{cm}(t)] - \vec{\delta}^2 n_T(t - \Delta t), \quad (4.19)$$

em que $\Delta n_T = n_T(t) - n_T(t - \Delta t)$.

Também de maneira a otimizar o tempo de CPU, na estimativa do tempo de espera (Eq. (4.10)), a taxa de crescimento pode ser recolocada como

$$\sum_q g_q(t) = b \sum_{\eta=1}^{\eta_{max}} n_\eta [1 - (1 - p_0)^\eta], \quad (4.20)$$

sendo n_η o número de sítios vazios com η vizinhos tumorais. Podemos notar que $\sum_{\eta=1}^{\eta_{max}} n_\eta = n_0$, relação importante quando $p_0 \rightarrow 1$. Dessa forma, a atualização fica simplificada a apenas η_{max} elementos, ao invés de passar por todos os q elementos para achar a taxa de crescimento (observe que $\eta_{max} \ll n_0$ a maior parte do tempo).

4.5 Os Ingredientes Básicos da Simulação Computacional

Para estudar o modelo estocástico, introduzido na Sec. 2.2, usamos uma rede de $L = 500$ sítios. A relação entre o tamanho de um sítio e o diâmetro de uma célula foi

definido como $1/L \equiv d_0 = 10 \mu\text{m}$ [53]. Inicialmente coloca-se um único sítio tumoral no centro da rede. Escolhemos $\eta_{max} = 8$ para calcular $\max[g_q(t)]$, uma vez que rapidamente um buraco aparece na colônia. O número de sítios com *status* T requeridos para aparecer o primeiro sítio vazio, ou seja, um sítio q com $\eta_q = 8$, foi de aproximadamente $n_T = 53$. Mesmo atualizando η_{max} a cada configuração, os resultados obtidos para a curva de crescimento foram os mesmos que para $\eta_{max} = 8$.

Nas Figs. 4.10 e 4.12, fizemos médias com $\mathcal{M} = 200$ simulações, com os erros estimados em aproximadamente 1%, o que faz com que as barras de erro sejam menores que os símbolos das grandezas medidas. A qualidade dessas simulações está ligada a escolha do gerador de números aleatórios, e neste trabalho escolhemos o gerador de L'Ecuyer, cuja sequência tem um período de $\mathcal{O}(10^{18})$ [82]. Utilizamos uma quantidade na $\mathcal{O}(10^5)$ de números aleatórios em uma simulação típica, o que nos faz considerar que todas as trajetórias são independentes.

Figura 4.10: Evolução temporal do raio médio dos agregados da linhagem HT-29. Podemos ver a boa concordância entre os dados experimentais, a Eq. (4.5) e a simulação DMC.

A Fig. 4.10 mostra uma ótima concordância entre os dados experimentais, o ajuste usando a Eq. (4.5) e a simulação DMC. Assim, acreditamos que a Eq. (4.8) representa os mecanismos básicos pelos quais os sítios vazios são preenchidos. O procedimento DMC reproduz apropriadamente os eventos na escala mesoscópica, fazendo-o uma ferramenta potencial para mais estudos em populações com células tumorais. Pode-se notar que a abordagem estocástica, Eq. (4.9), reproduz a simetria circular em tempos longos, pois

$dn_T/dt = b\langle n_0 \rangle$, uma vez que $\omega(t)/\alpha \rightarrow 1$ nesse limite. Isso concorda com as escolhas de $n_T \propto r^2$ e $n_0 \propto r$ [14]. Na Fig. 4.11 mostramos que essas relações concordam com os dados gerados e com perfis de colônia encontrados na literatura [12, 14, 24, 26, 44]. Além disso, a simetria foge da circularidade em tempos iniciais, uma vez que $\langle g(t) \rangle$ torna-se dependente de η_q de uma maneira complicada, o que concorda, pelo menos qualitativamente, com a literatura.

Figura 4.11: Um perfil de colônia típico obtido em simulação. Aqui, $t \approx 1.429$ horas, $n_T = 155.551$ e $n_0 = 6.509$ sítios. A maioria dos sítios vazios, nesse ponto, está na borda da colônia.

Comparamos na Fig. 4.12 o procedimento DMC com uma simulação que retirava os tempos de espera de uma distribuição de Poisson, e outra que calculava iterativamente a evolução temporal de colônias de células HT-29. Para a estimativa por um processo de Poisson, o tempo de espera foi calculado através de [42, 43]

$$\Delta t_p^{(n_T)} = -\frac{\ln(\xi)}{\sum_{q=1}^{n_0} g_q(t)}; \quad (4.21)$$

o cálculo iterativo (método de Euler estocástico) da evolução temporal das colônias foi feito aproximando-se $r(t + \Delta t_e) \approx r(t) + w(t)\Delta t_e$, com $\Delta t_e = \{\max[g_q(t)]n_0\}^{-1}$. Obtivemos e ajustamos a distribuição de $\Delta t_p^{(25)}$ na parte direita da Fig. 4.12. Como podemos ver, os três métodos coincidem. Isso era esperado para o método de Euler estocástico, pois

$$\Delta t_e = \sum_q \left\{ \frac{g_q(t)}{\max[g_q(t)]} \right\} \left(\frac{1}{n_0} \right) \Delta t^{(n_T)}, \quad (4.22)$$

Figura 4.12: A esquerda temos o raio médio *versus* o tempo. Os círculos abertos indicam a simulação DMC; os quadrados pretos representam a simulação KMC; e a linha contínua indica a solução pelo método de Euler estocástico. Os parâmetros utilizados aqui foram os mesmos usados para o ajuste de células HT-29 (vide Fig. 4.10). A direita temos a distribuição de $\Delta t_p^{(25)}$ (círculos pretos) e o ajuste exponencial (linha sólida vermelha).

ou seja, o incremento de tempo por Euler estocástico é equivalente a probabilidade média de um incremento por DMC, $\Delta t_e = \langle H_q(t) \rangle \Delta t^{(n_T)}$. Para o processo de Poisson, a curva coincidiu pois $\Delta t^{(n_T)}$ é a média da distribuição Poissoniana. No entanto, para a estimativa por um processo de Poisson, a distribuição é conhecida *a priori*. Assim, apesar da coincidência dos resultados entre as metodologias, acreditamos que a retirada dos tempos de espera por um processo de Poisson é apenas uma aproximação para a solução da equação mestra, mas que não reflete as características reais da dinâmica tumoral.

4.6 Considerações sobre os tempos de espera

Suponha que todas as células estejam sincronizadas e dupliquem simultaneamente; assim, o tempo para que uma nova camada radial de células possa se formar deve ser o produto do número de sítios vazios pelo tempo de espera. Entretanto, como isso não ocorre (as células não estão sincronizadas), deve-se acrescentar ao produto $n_0 \Delta t^{(n_T)}$ uma multiplicação pela probabilidade média de ocupação de um sítio vazio $\langle H_q \rangle$, i.e.,

$$t_{ciclo} = n_0 \Delta t^{(n_T)} \langle H_q \rangle. \quad (4.23)$$

Devemos considerar p_0 quando $t \rightarrow 0$, pois nessa região ele irá representar bem o que acontece com células não agregadas. Assim, $p_0 = 1 - \Gamma$, e então o resultado da Eq. (4.23)

é

$$t_{ciclo} = \frac{1}{b(1 - \Gamma_{\eta_{max}})}. \quad (4.24)$$

Observamos que, para células HT-29 [16], o resultado dessa equação é que o tempo médio de ciclo é $t_{ciclo} \approx 24$ horas, o que condiz com resultados experimentais [83,84]. Ressaltamos que a obtenção do parâmetro b foi feita ajustando-o computacionalmente por tentativa e erro.

Figura 4.13: A distribuição de tempos de espera estimados com a Eq. (4.10) para células HT-29 nas configurações: 25 sítios (esquerda) e $n_T = 10^2$, 10^3 e 10^4 sítios (direita). Na segunda parte, plotamos a frequência observada, normalizada pelo seu valor máximo, por $\Delta t^{(n_T)} / \langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$. As curvas ajustadas são log-normais (linhas tracejadas) e Gaussianas (linhas sólidas). Para verificar a diferença dos ajustes com os dados experimentais, plotamos abaixo o resíduo quando $n_T = 25$ sítios e quando $n_T = 10^5$ sítios.

O tempo de espera calculado através da Eq. (4.10) nos permitiu gerar os dados dispostos na Fig. 4.13, após 10^6 trajetórias independentes. Ajustamos a curva $\rho_m(\tau) = a_m(\tau) \exp \{-b_m[f_m(\tau)]^2\}$ aos dados obtidos através da simulação. O índice m indica o

Tabela 4.2: Os parâmetros ajustados de ρ_m da Fig. 4.13.

Sítios	25	10^2	10^3	10^4	10^5
b_g	42	48	114	340	974
b_l	35,7	47,8	113,9	339,5	947
$\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$	1,10	0,47	0,117	$1,62 \times 10^{-2}$	$4,56 \times 10^{-3}$
Os erros são menores do que 1%.					

tipo de curva: Gaussiana ($m = g$) e log-normal ($m = l$). A função $f_m(\tau)$ se comporta como

$$f_m(\tau) = \begin{cases} \tau - c_g, & m = g \\ \ln(\tau) - \ln(c_l), & m = l \end{cases}, \quad (4.25)$$

sendo $a_g(\tau) = \text{const}$ e $a_l(\tau) = \text{const}/\tau$. Na primeira parte da Fig. 4.13, plotamos o número de observações contra $\tau = \Delta t^{(25)}$; a direita, o número de observações foi normalizado pelo seu máximo e foi plotado contra $\tau = \Delta t^{(n_T)}/\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$. Com poucos sítios preenchidos, a curva log-normal ajusta-se melhor aos dados da simulação, enquanto em um *cluster* grande, não há muita distinção entre ambas. No *cluster* grande podemos fazer a aproximação $\ln(\tau) \approx \tau - 1 + \mathcal{O}(\tau^2)$, uma vez que a distribuição tende a ficar bastante concentrada ao redor de $\tau = 1$; com isso, a segunda expressão na Eq. (4.25) torna-se

$$\rho_l \approx \exp[-b_l(\tau - 1)^2], \quad (4.26)$$

ou seja, uma Gaussiana. É possível notar também que os valores de b_l e b_g se aproximam bastante nesse limite. Os parâmetros obtidos no ajuste com as Eqs. (4.25) aos dados experimentais estão na Tab. 4.2.

Analisando uma distribuição de Poisson, como a obtida na parte direita da Fig. 4.12, é possível sugerir a independência dos eventos envolvidos no fenômeno do crescimento de tumores. No entanto, como vimos, curvas log-normais e Gaussianas se ajustam bem aos dados gerados pela simulação, quando utilizamos os tempos de espera da Eq. (4.10), refletindo o fato de que, provavelmente há certa dependência entre os eventos.

Quando a colônia tem um número de células pequeno, a escolha de um sítio q pode mudar razoavelmente o comportamento de $\Delta t^{(n_T)}$, o que faz com que uma distribuição

log-normal seja melhor ajustada. Isso ressalta a importância das interações locais, ao menos nessa faixa de tempos. Por outro lado, quando a colônia é grande, o tempo de espera passa a ser proporcional a probabilidade de escolha de um sítio q , e isso não faz com que $\Delta t^{(n_T)}$ mude consideravelmente dependendo de q . Contudo, as interações locais não deixam de ter importância nessa região, visto que a fractalidade da colônia parece exercer um papel importante no desenvolvimento da mesma [12, 14, 24, 26].

Figura 4.14: O comportamento dos tempos de espera médios e do parâmetro μ . A figura da esquerda mostra um ajuste linear de $\log [\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle]$ por $\log (n_T)$ para células HT-29. A direita, plotamos o valor de μ para vários valores de Γ , e um ajuste polinomial de segunda ordem (linha sólida vermelha), usando os parâmetros t_c e γ da linhagem HT-29. As barras de erros referem-se aos erros nos ajustes lineares de cada valor de Γ .

A Fig. 4.14 mostra as médias dos incrementos de tempo simulados com vários tamanhos e em vários valores de Γ , plotados em um gráfico di-log. Na primeira parte temos o ajuste para células HT-29, com uma inclinação μ de -0.69 ± 0.02 . Havíamos obtido para as células HeLa, HCT-115 e HN-13, valores de $\mu = -0.78 \pm 0.03$, -0.81 ± 0.02 e -0.78 ± 0.04 , respectivamente, numa abrangência de $n_T \approx 10^3$ sítios [44]. Havíamos também conjecturado que o valor μ pudesse caracterizar o crescimento das linhagens celulares aderentes [16], devido ao seu estreito intervalo, $-0.69 \leq \mu \leq -0.81$. Propusemos então, que a relação

$$\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle \propto n_T^\mu \quad (4.27)$$

devesse ser característica dessas células crescendo em monocamada.

Na parte direita da Fig. 4.14 foram plotados os valores de μ para várias escolhas de Γ , e então foi ajustada uma curva do tipo $\mu = a_\mu \Gamma^2 + b_\mu$. As barras de erro evidenciam duas regiões aparentemente distintas; uma cujo ajuste pela Eq. (4.27) parece razoável,

que vai até valores que se aproximam de $\Gamma = 0,7$; e uma região em que o ajuste parece deixar de valer, i.e., quando $\Gamma > 0,7$, apesar de os erros não passarem de 6% do valor de μ nessa região.

Por um lado, o ajuste quadrático mostrado na Fig. 4.14 nos permite calcular de maneira simples o tempo de investigação de algum evento característico, bastando para isso somar os diversos incrementos de tempo médios da Eq. (4.27) no intervalo n_T de interesse⁵. Por outro lado, o aumento progressivo das barras de erro nos encoraja a maiores investigações dos tempos de espera.

Figura 4.15: A riqueza de detalhes no comportamento de $\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$ e $\langle t^{(n_T)} \rangle$ versus n_T com $\Gamma = 0,9$; t_c e γ são os mesmos ajustados para a linhagem HT-29. Dividimos os dados obtidos em quatro regiões, cada uma com suas inclinações μ (a esquerda) e μ_T (a direita).

Na Fig. 4.15, mostramos um espaço $\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$ - n_T e $\langle t^{(n_T)} \rangle$ - n_T mais completo, com $\Gamma = 0,9$. Podemos dividir esse espaço em quatro regiões distintas, com seus μ característicos. Essas regiões foram empiricamente determinadas para os seguintes valores de t : $t_c/2$ (I-II), t_c (II-III) e $3t_c/2$ (III-IV). Na quarta região, um dos argumentos que usamos para propor a Eq. (4.6), i.e., $[Q] \propto n_T^{1/2}$, devido ao fato de os sítios vazios se localizarem prioritariamente nas bordas da colônia, nos levam a esperar que $\mu_{(IV)} \approx -0,5$, uma vez que a colônia tende a ser circular nesse limite (veja também as Figs. 4.1 e 4.11). É possível também estender a conjectura da Eq. (4.27) para o tempo médio, $\langle t^{(n_T)} \rangle \propto n_T^{\mu_T}$. No entanto, esperaríamos que $\langle t^{(n_T)} \rangle \propto n_T^{\mu+1}$, o que não acontece quando dividimos os

⁵Esse tempo de um evento característico, t_{ev} , na aproximação discreta, pode ser tratado como $t_{ev} \propto \{[\mathcal{B}_{1-\mu}(n_T^{(0)} + \Delta n_T) - \mathcal{B}_{1-\mu}(n_T^{(0)})]\}$, sendo $\mathcal{B}_n(x) = 1^{n-1} + 2^{n-1} + \dots + (x-1)^{n-1}$ um número de Bernoulli [85].

dados nessas regiões. Ressaltamos, contudo, que para os ajustes realizados como na parte esquerda da Fig. 4.14, essa relação é válida, pois nossas simulações indicam que $\mu_T - \mu \approx 1$.

Figura 4.16: Ajustes com equações contínuas, ligando as quatro regiões anteriormente delimitadas na Fig. 4.15. A esquerda, plotamos $\ln(\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle) - \ln(\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle_{(IV)})$ contra $\ln(n_T)$ (círculos pretos), ajustados pela equação (4.28) (linha sólida vermelha) e a direita temos $\ln(\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle)$ versus $\ln(n_T)$ (círculos pretos), ajustados pela equação (4.29) (linha sólida vermelha). Os parâmetros usados na simulação são os mesmos da Fig. 4.15.

Podemos tentar analisar os dados de $\Delta t^{(n_T)}$ fazendo outra transformação, e plotar $\ln[\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle] + \mu_{(IV)} \ln(n_T) - b_{(IV)}$ por $\ln(n_T)$ (parte esquerda da Fig. (4.16)). Para obtê-la, usamos preliminarmente $b_{(IV)} = 0,55$ e $\mu_{(IV)} = 0,518$, que eram os valores do ajuste com a Eq. (4.27) ($\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle = b_{(IV)} n_T^{\mu_{(IV)}}$) na quarta região. No entanto, como levamos em conta todos os dados gerados agora, não só a região (IV), os parâmetros mudaram levemente de valores. Usaremos a partir de agora a definição análoga à Eq. (4.27), i.e., $\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle_{(IV)} \equiv b'_{(IV)} n_T^{\mu_{(IV)}}$, com $b'_{(IV)} = \exp[b_{(IV)}]$, assim é possível encontrarmos uma outra curva sigmoidal, como indica a primeira parte da Fig. 4.16. Trabalhando algebricamente com os parâmetros, teremos

$$\begin{aligned} \ln[\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle] - \ln[\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle_{(IV)}] &= \alpha' + \frac{\beta'}{1 + \exp\{\gamma'[\ln(n_T) - \ln(n_{T(c)})]\}} \\ &= \frac{\beta'}{1 + a' n_T^{\gamma'}}, \end{aligned} \quad (4.28)$$

em que, $a' = n_{T(c)}^{-\gamma'}$, e já usamos o fato de que $\alpha' \approx 0$, como pode ser notado na mesma figura. Voltando ao espaço linear, obteremos

$$\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle = b' \exp\left(\frac{\beta'}{1 + a' n_T}\right) n_T^{-1/2}. \quad (4.29)$$

Inserimos diretamente na Eq. (4.29), os valores de $\gamma' \approx 1$ e $\mu_{(IV)} \approx 0,5$, gerados pelo ajuste mostrado na Fig. 4.16; A constante $b' \approx 1,34$ aparece como um fator de balanço da proporcionalidade do número de células ativas com o perímetro da colônia no limite de grandes colônias. Note que nesse limite teremos $b'\sqrt{n_T} = n_0$ que é o resultado de uma comparação entre as equações (4.29) e (4.10).

4.6.1 Experimentos de *Time Lapse*

Figura 4.17: O tempo de espera experimental, *coarse-grained*, para quatro colônias de células B16-F10 (figuras geométricas), e o ajuste linear (linha sólida verde). Esse resultado se mostra qualitativamente em concordância com os resultados *in silico*, como os mostrados na Fig. 4.14.

Procedemos em uma série de experimentos com células B16-F10 para avaliar nossas considerações teóricas a respeito dos tempos de espera. Para a construção dos dados mostrados na Fig. 4.17, calculamos o tempo decorrido entre duas quantidades de células e estimamos o tempo médio de aparecimento de cada uma através da relação $\Delta t^{(N_T)} = \Delta t / \Delta N_T$, como descrito na Sec. 4.1.1. Note que utilizamos nossa convenção de que N_T (letras maiúsculas) indicam o número de células reais, não o número de sítios como nas Secs. 4.5 e 4.6. Assim, o ajuste com uma curva análoga a Eq. (4.27) resulta em

$$\langle \Delta t^{(N_T)} \rangle \propto \frac{1}{N_T}. \quad (4.30)$$

Aproximamos o expoente por um, já que o ajuste gerou $\mu_C = -1,07 \pm 0,08$. Esse resultado concorda qualitativamente com os dados obtidos *in silico* como os da Fig. 4.14.

Lembramos que não podemos comparar a Fig. 4.17 com as Figs. 4.15 e 4.16, pois as regiões em que dividimos essas figuras não são nítidas nos dados experimentais. Além disso, a comparação entre as Figs. 4.17 e 4.14 não pode ser direta pois, como dissemos anteriormente, nossos sítios não representam células individuais. Contudo, qualitativamente elas concordam: há um decaimento com uma lei de potência do tempo de espera com o número de células ou com o número de sítios.

Também realizamos experimentos de *time lapse*, em que as células foram acompanhadas com *lapses* de 10 minutos. Nessa abordagem, acreditamos ter um intervalo de tempo mais acurado do que a metodologia *coarse-grained*. A Fig. 4.18 mostra a média dos tempos de espera em vários tamanhos de colônia, nos experimentos de *time lapse*. As médias foram feitas sobre cinco⁶ colônias de células B16-F10. Na parte da direita, mostramos as figuras das abordagens *time lapse* e *coarse-grained* sobrepostas. Essa figura nos sugere que essas abordagens são equivalentes.

Figura 4.18: A esquerda o tempo de espera medido através de experimentos de *time lapse*, e a direita a sua comparação com a medida de tempos de espera *coarse-grained*.

A Fig. 4.19 mostra uma comparação entre os dados da simulação Monte Carlo dinâmico e os tempos de espera *coarse-grained* de células B16-F10. Apesar de N_T e n_T diferirem, a inclinação $\mu_C = -1,07 \pm 0,08$ dos dados experimentais é bem próxima a de $\mu = -0,981 \pm 0,002$ da simulação Monte Carlo, o que nos leva a sugerir que o tempo de espera, característica essencial nos métodos Monte Carlo dinâmico e Monte

⁶Cada média foi realizada sobre no máximo cinco dados experimentais. Esse número foi controlado pelos diferentes avanços no tempo das colônias e também pelo fato de haver algumas *simultaneidades* dentro dos *lapses* de 10 minutos.

Figura 4.19: A comparação entre o tempo de espera *coarse-grained* e o tempo de espera obtido através da simulação Monte Carlo dinâmico, utilizando $b = 0,140$.

Carlo cinético, é representado corretamente, não sendo um mero artefato teórico para a resolução de equações diferenciais. Acreditamos que a pequena diferença encontrada nos valores das inclinações deve-se ao fato de não representarmos o formato das células na rede, como no modelo de Potts celular [34, 35].

PROBABILIDADE DE CONTROLE TUMORAL

Considere um sistema com dois compartimentos, U e Q , representando, respectivamente, as células ativas (células se preparando para a duplicação) e células quiescentes (aquelas em um estado de repouso), sujeitas a um tratamento com radiação. Um conjunto de equações diferenciais de campo médio para descrever esse sistema é [37]:

$$\begin{aligned}\frac{du}{dt} &= -\mu u + \gamma q - \Gamma_u(t)u \\ \frac{dq}{dt} &= 2\mu u - \gamma q - \Gamma_q(t)q,\end{aligned}\tag{5.1}$$

em que μ é a taxa de reprodução ($U \rightarrow 2Q$), γ é a taxa de ativação ($Q \rightarrow U$), e $\Gamma_u(t)$ e $\Gamma_q(t)$ são as taxas de morte das células ativas e quiescentes, respectivamente, resultado do tratamento com radiação. Usaremos $\Gamma_u(t) = \Gamma_u = \text{const}$ e $\Gamma_q(t) = \Gamma_q = \text{const}$, que são consequência de uma taxa de morte constante devido a radiação. Vamos nos referir ao sistema (5.1) como modelo DH (Dawson e Hillen).

Três fatos experimentais formam a base desse sistema: *i*) células ativas e quiescentes possuem diferentes sensibilidades a radiação, sendo as células ativas mais sensíveis que as quiescentes [86], i.e., $\Gamma_u > \Gamma_q$; *ii*) células ativas dividem-se em duas células quiescentes; o termo $2\mu u$ que aparece na Eq. (5.1) representa esse evento; *iii*) a taxa de morte devido aos danos causados pela radiação é muito maior do que a morte natural em ambos os compartimentos [37].

Para o sistema descrito acima, Dawson e Hillen (2006) [37] deduziram uma equação

para o TCP. Com Γ_q e Γ_u constantes, pode-se escrever essa equação na forma

$$\begin{aligned}
 TCP(t) = & [1 - e^{-(\mu+\Gamma_u)t}]^{u_0} \times [1 - e^{-(\gamma+\Gamma_q)t}]^{q_0} \\
 & \times \exp \left[-\gamma e^{-(\mu+\Gamma_u)t} \int_0^t q(t') e^{(\mu+\Gamma_u)t'} dt' \right] \\
 & \times \exp \left[\mu e^{2(\gamma+\Gamma_q)t} \int_0^t u(t') e^{2(\gamma+\Gamma_q)t'} dt' \right] \\
 & \times \exp \left[-2\mu e^{(\gamma+\Gamma_q)t} \int_0^t u(t') e^{(\gamma+\Gamma_q)t'} dt' \right],
 \end{aligned} \tag{5.2}$$

em que $u(0) = u_0$ e $q(0) = q_0$ são as condições iniciais. É preciso destacar que os termos $\int_0^t (\cdot)$ têm soluções exatas, uma vez que podemos resolver as Eqs. (5.1) analiticamente.

5.1 Aplicação do Método DMC

Consideramos primeiro o modelo DH de crescimento, i.e., com $\Gamma_q = \Gamma_u = 0$. Com isso, a Eq. (5.1) é simplificada para

$$\begin{aligned}
 \frac{du}{dt} &= -\mu u + \gamma q \\
 \frac{dq}{dt} &= 2\mu u - \gamma q.
 \end{aligned} \tag{5.3}$$

Essa equação representa as reações $Q \xrightarrow{\gamma} U$ e $U \xrightarrow{\mu} 2Q$. O primeiro termo do lado direito da equação dq/dt representa a ocorrência de eventos simultâneos, através da mudança do *status* ativo para o de quiescente e a adição de outro elemento quiescente à população. Mostramos nos próximos tópicos como é possível abordar esse problema com DMC. Primeiro, usamos diretamente a metodologia de Aiello e da Silva (2003) [36], sem o uso de eventos simultâneos (nsDMC). Em seguida usamos nossa abordagem generalizada para lidar com eventos simultâneos (sDMC); depois introduzimos os termos de morte e também o procedimento de reescala (rDMC); finalmente, obtemos a probabilidade de controle tumoral usando sDMC e rDMC.

5.1.1 Modelando com Eventos Simples

Para simular as Eqs. (5.3), assumimos que cada elemento de uma rede de $M = L \times L$ sítios pode assumir um dos seguintes *status*: ativo U , quiescente Q , e um estado intermediário, que chamaremos de *mitótico* $\mathbb{M}$. O último *status* foi adicionado para

evitar eventos simultâneos, ele é interpretado com um estado efetivo e virtual. Também assumimos a lei de conservação $M = u + q + m$. Assim, podemos reconstruir os mecanismos de reação com as taxas apropriadas:

em que $2\mu u/m$ é a taxa efetiva de transição entre os *status* mitótico e quiescente. Podemos representar essas reações através das equações de campo médio:

$$\begin{aligned} \frac{du}{dt} &= \gamma q - \mu u \\ \frac{dq}{dt} \left(\frac{2\mu u}{m} \right) &= m - \gamma q \\ \frac{dm}{dt} &= \mu u - \left(\frac{2\mu u}{m} \right) m. \end{aligned} \tag{5.5}$$

Se introduzirmos a grandeza número de células tumorais, $n_T = u + q$, podemos perceber que o sistema (5.5) é equivalente ao (5.3), uma vez que $dn_T/dt = \mu u$ em ambos os casos.

Analizando as Eqs. (5.5), podemos notar que em cada compartimento (U , Q ou $\mathbb{M}$) da população, podem ocorrer eventos que aumentam (+) ou diminuem (−) seu número de elementos. Dessa forma, de acordo com a Eq. (3.4), podemos escrever as equações estocásticas para esse sistema como

$$\begin{aligned} \frac{du}{dt} &= \langle r_u^+ u^+ \rangle - \langle r_u^- u^- \rangle \\ \frac{dq}{dt} &= \langle r_q^+ q^+ \rangle - \langle r_q^- q^- \rangle \\ \frac{dm}{dt} &= \langle r_m^+ m^+ \rangle - \langle r_m^- m^- \rangle, \end{aligned} \tag{5.6}$$

de maneira similar ao trabalho de Aiello e da Silva (2003) [36]. Comparando as Eqs. (5.5) com as Eqs. (5.6), pode-se identificar as taxas mesoscópicas: $r_u^+ = r_q^- = \gamma$, $r_u^- = r_m^+ = \mu$ e $r_q^+ = r_m^- = 2\mu u/m$, e suas respectivas fontes: $u^+ = q^- = q$, $u^- = m^+ = u$ e $q^+ = m^- = m$. A distância entre os estados $a^{(e)}$ é unitária nesse caso, independente do tipo de evento. Note que assumimos que as taxas mesoscópicas e as microscópicas são iguais, para reproduzir o campo médio. Adicionalmente, note que podemos fazer $\mathcal{N}_j^{(e)} = A_j^{(e)}$, com $A_j^{(e)} \in \{u_j^{(e)}, q_j^{(e)}, m_j^{(e)}\}$ na Eq. (3.2), recobrando o cálculo das taxas mesoscópicas do trabalho de Aiello e da Silva [36].

Para resolver o sistema (5.6), procede-se pela escolha randômica de um sítio, com probabilidade $(1/M)$. Na sequência, calcula-se a probabilidade $H_{j \rightarrow i_e}$ derivada da Eq. (3.9):

$$H_{j \rightarrow i_e} = \frac{r_j^{(e)}}{r_{\max}}, \quad (5.7)$$

com $r_{\max} = \max \{\mu, \gamma, 2\mu u/m\}$. Se a nova configuração é aceita, calculamos o tempo de espera médio, dado pela Eq. (3.12), com $f_e^k = 1/3$. O fator f_e^k está ligado ao número de reações que podem acontecer no sistema, Eqs. (5.4).

Figura 5.1: A curva de crescimento das células ativas ($u(t)$), quiescentes ($q(t)$) e o número total de células ($n_T(t) = u(t) + q(t)$), para o modelo DH sem os parâmetros de morte. As linhas em cores representam as soluções exatas, e os símbolos geométricos representam as soluções numéricas obtidas usando o método DMC não-simultâneo (nsDMC). A concordância entre as soluções numéricas e exatas são excelentes.

Na Fig. 5.1 mostramos o resultado obtido com simulações nsDMC em uma rede de $L = 120$ sítios, com a configuração inicial $u_0 = q_0 = 10$ células tumorais (randomicamente distribuídas), e $m_0 = 14380$ sítios mitóticos. Escolhemos os valores de u_0 e q_0 apropriadamente, para não incorrer em grandes erros sistemáticos causados pelos tempos de espera. Usamos as taxas $\mu = 0,0655 \text{ dia}^{-1}$ e $\gamma = 0,0476 \text{ dia}^{-1}$ [37], e calculamos a média através de 200 simulações. As barras de erro são menores do que os símbolos da figura e correspondem a menos de 3% dos valores médios. Note que pode-se melhorar esses resultados simplesmente aumentando o número de simulações. O sistema (5.3) admite solução exata que é uma combinação linear de duas funções exponenciais; essas

funções competem entre si no começo (note o desvio de $u(t)$ do comportamento linear até por volta de 50 horas), e converge para uma exponencial simples em tempos longos. Comparando os resultados numéricos com os exatos, concluímos que eles concordam bem, com desvios estimados de até 6% da solução exata para $n_T(t)$.

5.1.2 O Modelo de Crescimento com Eventos Simultâneos

Agora, simulamos as Eqs. (5.3) diretamente, em um procedimento que denominamos de DMC simultâneo (sDMC). Para escrever as equações estocásticas para esse sistema, devemos notar que $a^{(u+)} = a^{(u-)} = a^{(q-)} = 1$ (eventos não simultâneos) e $a^{(q+)} = 2$ (eventos simultâneos). Dessa forma, podemos escrever

$$\begin{aligned}\frac{du}{dt} &= a^{(u+)} \langle r_u^+ u^+ \rangle - a^{(u-)} \langle r_u^- u^- \rangle \\ \frac{dq}{dt} &= a^{(q+)} \langle r_q^+ q^+ \rangle - a^{(q-)} \langle r_q^- q^- \rangle\end{aligned}\tag{5.8}$$

em que $r_u^+ = r_q^- = \gamma$ e $r_u^- = r_q^+ = \mu$ são as taxas mesoscópicas, e, $u^+ = q^- = q$ e $u^- = q^+ = u$ são as fontes. O sistema também obedece a lei de conservação para o número total de elementos: $M = q + u + n_V$, em que n_V é o número de sítios vazios (na prática, os elementos n_V substituem os elementos m de nsDMC).

Para realizar o procedimento sDMC, escolhemos os sítios tumorais, com probabilidade $(1/n_T)$, e tentamos mudar a configuração com a probabilidade de transição dada pela Eq. (5.7), em que $r_{\max} = \max\{\mu, \gamma\}$. Se a nova configuração é aceita, calculamos o tempo de espera usando a Eq. (3.12), com $f_e^k = 1/2$ e $A_{jk}^{(e)} \in \{u, q\}$. Se a escolha for da transição $U \rightarrow Q$, então também escolhemos um sítio vazio com probabilidade $(1/n_V)$, onde colocaremos um novo sítio Q .

Usamos os mesmos parâmetros descritos na última seção, e os resultados foram similares aos da Fig. 5.1, então não mostramos a figura de sDMC para esse caso. As barras de erro são menores que 2% dos valores médios. Comparando os resultados da simulação com as soluções exatas, concluímos que elas concordam muito bem, com desvios alcançando 0,7% para $n_T(t)$. Observamos pouca distinção entre os resultados de sDMC e nsDMC, mas grandes diferenças no desvio da solução exata para grandes $n_T(t)$, ao redor de nove vezes para a mesma quantidade de simulações. Enfatizamos que a metodologia sDMC é uma abordagem direta do problema, enquanto nsDMC é um esquema artificial em que tivemos que construir um processo virtual para usar aquele formalismo.

5.1.3 O Modelo DH Completo com Eventos Simultâneos

Para o modelo DH completo, descrito pelas Eqs. (5.1), podemos escrever as seguintes reações:

As duas primeiras reações do sistema (5.9) foram discutidas na seção anterior; As duas últimas reações representam os eventos de morte para as células quiescentes e ativas, respectivamente; Φ representa um status vazio, cujo reservatório tem um total de n_V elementos. Nesse modelo há novos eventos, cujas distâncias são definidas por $a^{(\Phi q)} = a^{(\Phi u)} = 1$. Os sobrescritos (Φq) e (Φu) representam os eventos que resultam em sítios vazios devido a morte das células com status Q e U , respectivamente. Assim, reescrevemos as Eqs. (5.6) com os termos adicionais:

$$\begin{aligned}
 \frac{du}{dt} &= a^{(u+)} \langle r_u^+ u^+ \rangle - a^{(u-)} \langle r_u^- u^- \rangle - a^{(\Phi u)} \langle r_u^\Phi u^\Phi \rangle \\
 \frac{dq}{dt} &= a^{(q+)} \langle r_q^+ q^+ \rangle - a^{(q-)} \langle r_q^- q^- \rangle - a^{(\Phi q)} \langle r_q^\Phi q^\Phi \rangle.
 \end{aligned} \tag{5.10}$$

Ganhamos também duas novas taxas mesoscópicas e fontes, além das discutidas na Sec. 5.1.2; são elas: $r_u^\Phi = \Gamma_u$ e $r_q^\Phi = \Gamma_q$, e $u^\Phi = u$ e $q^\Phi = q$.

Como usualmente, o procedimento sDMC começa com a escolha aleatória de um sítio do conjunto $\{n_T\}$; uma vez que as Eqs. (5.10) nos mostram uma competição entre a mudança (e duplicação) de *status* e a morte, escolhemos entre esses eventos com igual probabilidade; a probabilidade de transição, Eq. (5.7) é calculada com $r_{\max} = \max\{\mu, \gamma, \Gamma_u, \Gamma_q\}$; Se a nova configuração é aceita, dependendo do tipo de evento adicionamos ao tempo t um dos seguintes tempos de espera médios (baseados na Eq. (3.12)): $\Delta t_k^{(u-)} = f/\mu u$, $\Delta t_k^{(q-)} = f/\gamma q$, $\Delta t_k^{(\Phi u)} = f/\Gamma_u u$ ou $\Delta t_k^{(\Phi q)} = f/\Gamma_q q$, com $f = f_e^k = 1/4$.

Na Fig. 5.2 mostramos os resultados do modelo DH completo usando simulações sDMC em uma rede de $M = 120 \times 120$ sítios. Inicialmente, dispomos radomicamente $u_0 = q_0 = 5000$ células e $n_V(0) = 4400$ sítios vazios. Note que o número inicial de células,

Figura 5.2: As curvas de $u(t)$, $q(t)$ e $n_T(t)$ obtidas resolvendo o modelo DH completo com o método sDMC (símbolos geométricos); também plotamos as soluções exatas para a Eq. (5.1) (linhas em cores).

$n_T(0) = u_0 + q_0$, poderia ser colocado em uma rede de 100×100 completamente preenchida. Entretanto, necessita-se de espaço extra com sítios vazios para permitir a duplicação em estágios iniciais da evolução do sistema, mesmo em casos em que $\Gamma_u \gg \mu$; se usarmos uma rede de 100×100 esse requerimento não seria completado, e consequentemente as Eqs. (5.1) não seriam adequadas para descrever a evolução do sistema.

Para as simulações sDMC usamos as mesmas taxas μ e γ das últimas seções, e adicionalmente $\Gamma_q = 0,4265 \text{ dia}^{-1}$ e $\Gamma_u = 1,5040 \text{ dia}^{-1}$ [37]; Os dados da simulação mostram que as barras de erro antes de 225 horas (com $u(t) \approx 3$ células) correspondem a menos 5% dos valores médios. Depois disso, por volta de 460 horas, os erros relativos em $q(t)$, por exemplo, podem alcançar perto de 48% ($q(t) \approx 0,27 \pm 0,13$ células). Comparando a solução exata $n_T(t)$ com os dados numéricos, há um desvio de até 3% até as 225 horas, e aproximadamente 52% ao redor de 460 horas ($n_T^{(\text{sDMC})} = 0,35542$ células e $n_T^{(\text{exata})} = 0,73635$ células). Claramente, podemos observar que o procedimento sDMC não gera resultados adequadamente precisos após certo tamanho crítico, especialmente quando os valores são menores do que um.

5.1.4 Aplicações do Redimensionamento

As aplicações de DMC têm alguns limites de precisão, sendo um deles o de população pequena; quando a simulação alcança um tamanho crítico pequeno (ou começa com um tamanho pequeno), as estimativas dos tempos de espera médios tornam-se pobres, e erros sistemáticos grandes podem aparecer no processo de integração numérica. Outro limite é quando o sistema alcança um tamanho crítico muito grande (ou começa com um tamanho muito grande); nesse caso a computação em rede torna-se muito dispendiosa. Em ambos os limite aplicamos o sDMC com redimensionamento (denominamos rDMC) ao modelo DH.

Um Sistema Alcançando um Tamanho Crítico Pequeno

Simulamos o sistema descrito e com as condições usadas na Sec. 5.1.3 e redimensionamos o sistema com um fator $\lambda = 10$, sempre que o sistema alcançasse um tamanho crítico de $n_T^{(c)} = 1000$ sítios (10% do valor inicial). Após η redimensionamentos, temos $\lambda(\eta) = 10^\eta$. O fator de escala foi escolhido arbitrariamente, mas note que quanto maior o fator, mais o sistema cresce, diminuindo a eficiência da simulação.

Figura 5.3: Nessa figura mostramos as curvas de $u(t)$ do modelo DH completo: a solução exata (linha vermelha), as soluções numéricas obtidas por sDMC (quadrados) e com rDMC (círculos). A linha pontilhada ressalta o limite crítico, $u(t) = 1$, em que o resultado de sDMC desvia significativamente da solução exata.

Na Fig. 5.3 mostramos o resultado do procedimento de redimensionamento. As

barras de erro obtidas pelo procedimento rDMC antes das 225 horas, são menores que os símbolos na figura, correspondendo a menos de 1% dos valores médios. Em aproximadamente 460 horas, os erros podem alcançar um máximo de 2%. Entretanto, notamos que para o mesmo número de simulações, $\mathcal{M} = 200$, os resultados dos dois métodos (sDMC e rDMC) são diferentes, mostrando uma vantagem para o uso do método rDMC. Comparando os resultados obtidos por rDMC, estimamos desvios de até 4% do resultado exato de $u(t)$, até as 225 horas, e 11% ao redor de 460 horas. A combinação de λ e $n_T^{(c)}$ pode ser usada para melhorar os resultados da simulação. No caso que estamos discutindo, a quantidade $n_T = 1000$ células ocorreu ao redor do tempo $t = 90$ horas ($u(t) \approx 55$ células e $q(t) \approx 945$ células); note que os procedimentos sDMC e rDMC antes desse tempo são exatamente os mesmos.

Um Sistema Muito Grande

Simulamos o sistema descrito acima, com os mesmos parâmetros, exceto a condição inicial do número de células. Aqui, usamos $q_0 = u_0 = 5 \times 10^7$ células, como proposto por Dawson e Hillen (2006) [37], baseado em uma estimativa de Wyatt *et al.* (2003) [87]. Para o redimensionamento, usamos o fator $\lambda_1 = 10^{-4}$, assim, inicialmente o sistema original é redimensionado para um sistema em que $u_0^{(1)} = q_0^{(1)} = 5000$ sítios e $n_V^{(1)}(0) = 4400$ sítios. Quando o sistema alcança $n_T^{(c,\eta)} = 1000$ sítios, reescalamos o sistema com $\lambda_2 = \lambda_3 = \dots = 10$, e, portanto, $\lambda(\eta) = 10^{\eta-5}$.

Na Fig. 5.4 mostramos os resultados do uso do procedimento de redimensionamento a um sistema muito populoso. Os erros relativos nos resultados da simulação são menores que 3%. Em particular, na região do primeiro (que ocorre por volta de 72,5 horas) para o segundo reescalamiento, os erros relativos são menores que 0,9%. A estimativa dos desvios da solução exata de $n_T(t)$ é de até 20% em $t = 1000$ horas; para $t < 72,5$ h, os desvios estimados são de aproximadamente 1%.

Um Sistema Crescendo com Poucas Células

Também simulamos o sistema descrito na Sec. 5.1.2, em que distribuimos randomicamente pela rede $u_0 = q_0 = 1$ células tumorais e $n_V(0) = 14398$ sítios vazios. Como o sistema começa pouco populado, usamos um fator $\lambda_1 = 100$ para redimensioná-lo, então inicialmente o sistema têm $u_0^{(1)} = q_0^{(1)} = 100$ sítios e $n_V^{(1)}(0) = 14200$ sítios vazios.

Figura 5.4: As curvas para as células ativas, $u(t)$, e para o número total de células, $n_T(t)$, como uma função do tempo para o modelo DH completo com um número muito grande de sítios: as soluções exatas (linhas) e as soluções numéricas rDMC (símbolos geométricos).

Quando o sistema alcança o tamanho crítico de $n_T^{(c,1)} = 5000$ sítios, mudamos o fator de escala para $\lambda_2 = 10^{-1}$. Usamos também $\lambda_3 = \lambda_2$ após $n_T^{(c,2)} = 5000$ sítios, e após $\eta = 3$ não reescalamos mais o sistema.

Figura 5.5: Nessa figura mostramos as curvas de $u(t)$ para o modelo DH sem as taxas de morte: solução exata (linhas vermelhas), soluções numéricas sDMC (quadrados) e rDMC (círculos). Dividimos o gráfico em duas regiões: a de crescimento inicial, até 150 horas e em tempos depois das 500 horas.

Na Fig. 5.5 mostramos os resultados do procedimento de redimensionamento em

um sistema pouco populado no começo do processo de duplicação. As barras de erro nos valores simulados de rDMC antes de 150 horas, tempo em que cortamos o gráfico para melhor visualização dos resultados, correspondem a menos de 0,4% dos valores médios; as barras de erro de sDMC, na mesma faixa, são de aproximadamente 6%. Após 150 horas, os erros usando a técnica rDMC foram menores que 1% e com sDMC foram menores que 8%. Comparando rDMC com a solução exata, estimamos desvios de 0,5% nas primeiras 150 horas, contra 15% com sDMC; e aproximadamente 3% para 7900 horas (rDMC) contra 5% (sDMC).

5.1.5 Obtenção das Curvas de TCP

No começo desse capítulo, introduzimos a equação do TCP (Eq. (5.2)), derivada por Dawson e Hillen (2006) [37], para o caso específico das taxas de morte, devido a radiação, constantes. Diferenciando essa equação em relação ao tempo, podemos encontrar a distribuição de tempos para a extinção de um tumor, $f(t)$. Usamos o método sDMC e obtemos a distribuição realizando $\mathcal{M} = 10^7$ simulações. Sempre que $n_T(t) = 0$, registramos o tempo t , e então obtemos a distribuição de probabilidades dividindo o número de contagens pelo valor máximo observado.

Figura 5.6: A distribuição de tempos em que as células tumorais são extintas, obtida para o modelo DH completo: a solução exata $f_e(t)$ (linha vermelha) e a simulação sDMC $f_s(t)$ (círculos).

Na Fig. 5.6, mostramos a distribuição de probabilidades obtida exatamente, $f_e(t)$, e através da simulação sDMC, $f_s(t)$. Realizamos a simulação sDMC usando as mesmas

condições usadas para obter os resultados mostrados na Fig. 5.2. Podemos observar um deslocamento de aproximadamente 20% na simulação ($t_s = 393,97$ h), em relação ao resultado exato ($t_e = 472,73$ h), e também para o tempo de pico, $t_s^{(p)} = 344,67$ h contra $t_e^{(p)} = 443,57$ h. Adicionalmente, calculamos a curva de TCP usando a formulação Gong *et al.* [88], i.e., para cada simulação, e para cada passo de tempo, define-se um indicador do sucesso do tratamento, $S_l(t)$, como uma função delta de Kronecker $S_l(t) = \delta_{n_T(t),0}^{(l)}$, em que

$$\delta_{n_T(t),0}^{(l)} = \begin{cases} 0, & n_T \neq 0 \\ 1, & n_T = 0 \end{cases}. \quad (5.11)$$

Pode-se estimar o TCP após $\mathcal{M}$ simulações independentes como

$$TCP(t) = \frac{1}{\mathcal{M}} \sum_{l=1}^{\mathcal{M}} S_l(t). \quad (5.12)$$

Figura 5.7: Curvas de TCP do modelo DH completo: a solução exata $TCP_e(t)$ (linha vermelha) e a simulação sDMC $TCP_s(t)$ (círculos).

Mostramos na Fig. 5.7 as curvas de TCP obtidas pelo procedimento descrito pela Eq. (5.12). Aqui, também observamos um deslocamento do resultado da simulação em relação a solução exata. Isso acontece porque os passos de tempo são pobremente avaliados quando o tamanho do sistema é pequeno, como foi mostrado na Fig. 5.3. Isso também explica o desvio encontrado para $f_s(t)$ em relação a $f_e(t)$ mostrado na Fig. 5.6.

Figura 5.8: Na parte esquerda dessa figura, mostramos a distribuição de tempos obtida através do método rDMC (círculos pretos), sDMC (círculos azuis) e a solução exata (linha vermelha). A direita mostramos o TCP, no mesmo esquema de cores e símbolos da figura a esquerda. Deslocamos os dados de sDMC para coincidir $f_s(t)$ e $f_e(t)$; fizemos o mesmo deslocamento $TCP_s(t)$, mostrado na parte direita da figura.

Na Fig. 5.8, mostramos a distribuição de tempos e o TCP obtidos exatamente e pelas simulações sDMC e rDMC. Na parte esquerda vemos $f_s(t)$, $f_r(t)$ e $f_e(t)$. Deslocamos $f_s(t)$ em 90 horas para que as curvas coincidisse. Esse deslocamento é aproximadamente a média entre o deslocamento de pico $\Delta t^{(p)} = t_e^{(p)} - t_s^{(p)} = 98,89$ h e o deslocamento no valor médio $\Delta t^{(m)} = \langle t_e \rangle - \langle t_s \rangle = 78,76$ h. Na figura a direita mostramos as curvas de TCP, em que também deslocamos de 90 horas os dados de $TCP_s(t)$. Trabalhando com a técnica rDMC, alteramos as condições $n_T(t) \neq 0$ e $n_T(t) = 0$ na Eq. (5.11), para $n_T(t) \geq 1$ e $n_T(t) < 1$, vinculadas a $\delta_{n_T(t)}^{(l)} = 0$ e $\delta_{n_T(t)}^{(l)} = 1$, respectivamente. Com isso, os resultados da simulação e a solução exata concordam bem para os valores de tempo médio tanto para $f_r(t)$ quanto $TCP_r(t)$. Entretanto, a largura da distribuição $f_r(t)$ não é a mesma de $f_e(t)$, e conseqüentemente, a curva de $TCP_r(t)$ não concorda totalmente com os resultados exatos. Por outro lado, as curvas $f_s(t)$ e $TCP_s(t)$, relacionadas ao método sDMC têm a largura e a forma bem próximas ao resultado exato. Essa dicotomia aparece do fato de $TCP_e(t)$ vir de uma equação de campo médio macroscópica (Eqs. (5.1) e (5.2)), as quais resolvemos discretizando o sistema. Com a técnica rDMC, a aproximação para o contínuo é melhor, enquanto sDMC mantém as características discretas do número de células, mantendo a correspondência correta. A solução exata das equações macroscópicas (5.1), levará $TCP_r(t)$ a uma função do tipo Heaviside, uma vez que a condição $n_T(t) < 1$ ocorre quase sempre no mesmo ponto do eixo do tempo. Antes desse tempo, temos algumas

células e depois elas são extintas, portanto, a distribuição de tempos será uma função do tipo delta.

Comentários Finais

CONCLUSÃO

Nesse trabalho, modelamos o crescimento de tumores *in vitro* com uma taxa do tipo sigmoidal [17]. Ajustando os dados experimentais do raio médio, obtivemos os quatro parâmetros da função sigmoidal. Através do colapso em uma única curva (Eq. (4.4)), mostramos que a taxa de crescimento sigmoidal representa bem a dinâmica de várias linhagens celulares. Não levamos em conta os efeitos da proliferação e difusão explicitamente, como feito por Simpson *et al.* (2013) [13] e Treolar *et al.* (2014) [89], pois existem dificuldades intrínsecas para se determinar univocamente os parâmetros de proliferação e difusão [31, 32]. Portanto, assumimos uma taxa efetiva representada por uma função contínua, também evitando funções do tipo passo, como por exemplo em Radszuweit *et al.* (2009) [29]. A taxa de crescimento que propomos é composta por quatro parâmetros: ω_0 , α , t_c e γ , e eles são, respectivamente, as taxas inicial e final, o instante em que a taxa é igual a $\alpha - \beta/2$ (relacionado com a transição morfológica, como observado por Puliafito *et al.* (2012) [25]), e o parâmetro γ que nos diz o quão rápido a taxa de crescimento tende a α . Reportamos os parâmetros usados para os ajustes na Tab. 4.1, entretanto devemos enfatizar que esses parâmetros não são absolutos para cada linhagem, uma vez que deslocamos arbitrariamente as curvas de crescimento mostradas na Fig. 4.3.

O colapso das curvas das taxas de crescimento para diferentes linhagens celulares, mostrado na Fig. 4.6, sugere que a Eq. (4.1) representa um comportamento *universal* das colônias aderentes crescendo *in vitro*. Acreditamos que esse comportamento possa ser estendido a outras células crescendo em monocamadas [25, 27], bem como em multicamadas [24, 26, 27], e, possivelmente em esferóides [53]. Mais ainda, o formato sigmoidal, como discutido aqui, sugere que mecanismos como a competição e a cooperação

entre as células dentro de um agregado estão geralmente presentes.

Também modelamos estocasticamente o crescimento de tumores *in vitro* usando uma abordagem mesoscópica [16]. Avaliamos a dinâmica temporal através de simulações DMC, sendo que todos os resultados concordaram com a equação contínua para o raio médio (Eq. (4.5)) e com os dados experimentais.

Usando o procedimento DMC [36], encontramos distribuições de tempos de espera não-Poissonianas. Mostramos que ambas as simulações, a Poissoniana e nossa abordagem, concordam. Entretanto, notamos que o processo discutido acima não pode ser verdadeiramente Poissoniano; essa é apenas uma abordagem numérica que gera a solução correta para a equação mestra [42, 43]. Construimos a distribuição de tempos de espera para vários valores de n_T , e ajustamos esses dados com distribuições log-normais e Gaussianas, o que significa que os eventos envolvidos no processo são de alguma maneira dependentes entre si; observamos que curvas log-normais, geralmente, ajustam-se melhor aos nossos dados do que as curvas Gaussianas. Encontramos que o tempo médio de espera decai com o número de sítios através de uma lei de potência: $\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle \propto n_T^{-\mu}$. Conjecturamos que o valor do expoente μ pode ser uma característica intrínseca do crescimento de monocamadas [16]. Realizamos alguns experimentos, *Coarse-Grained* e *Time-Lapse* para avaliar os tempos de espera, e mostramos que a lei de potência do tempo médio de espera concorda qualitativamente com os resultados obtidos em simulação, para células B16-F10.

Estudamos o valor de μ para alguns valores de $\Gamma = \beta/\alpha$ e notamos que, quando $\Gamma > 0,7$, dentro das condições assumidas para os parâmetros t_c e γ (utilizamos os parâmetros da linhagem HT-29, Fig. 4.10), é possível que haja um desvio da lei de potência conjecturada. Utilizando $\Gamma = 0,9$, mostramos que o tempo de espera pode ser desmembrado em quatro regiões, e cada uma delas apresentou um parâmetro μ característico. Após subtraírmos os dados obtidos na quarta região das demais, foi possível um ajuste sigmoidal, que culminou na proposição de uma equação contínua para explicar $\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$, Eq. (4.29).

Acreditamos que os mecanismos básicos que fazem um modelo minimalista funcionar para o crescimento de tumores monocamada *in vitro*, na escala mesoscópica, é a busca competitiva por espaços vazios e mecanismos cooperativos intrínsecos. Esses mecanismos cooperativos podem estar relacionados com vários fatores, tais como o

consumo de nutrientes e forças adesivas/coesivas.

Por fim, desenvolvemos uma técnica DMC para abordar sistemas com eventos simultâneos, e a apresentamos no Cap. 3, aplicando-a a um modelo de crescimento de tumores com dois compartimentos (modelo DH). Nesse modelo, a mudança de *status* de uma célula ativa para quiescente, ocorre concomitantemente com a criação de outra célula quiescente, isto é, o processo de duplicação acontece. Nossa abordagem para lidar com o modelo DH difere da metodologia desenvolvida por Aiello e Silva (2003) [36] para eventos simples, em que se permite a ocorrência de somente um desses eventos dentro da menor escala de tempo. Também abordamos o problema da simulação em sistemas pequenos, em que a adição de erros ao longo do processo de integração numérica pode levar a desvios significativos na trajetória do sistema; redimensionando o sistema ao longo da simulação, superamos esse obstáculo. Outro inconveniente das simulações, é resolver sistemas muito grandes; nesse caso, também podemos usar o método de redimensionamento. Obtemos, para o modelo DH, a distribuição de tempos de extinção e o TCP.

Distinguimos dentro de nossa modelagem com o método Monte Carlo dinâmico, três classes de simulações numéricas: o método nsDMC, para abordar sistemas sem usar eventos simultâneos; sDMC, para sistemas com eventos simultâneos e rDMC, para sistemas com eventos simultâneos e usando os procedimentos de redimensionamento. A técnica nsDMC usa a mesma metodologia, desenvolvida por Aiello e Silva (2003) [36], para sistemas em que podem ocorrer eventos simultâneos. Como mostramos, podemos simular tais sistemas com esse método, mas devemos assumir a existência de um *status* intermediário para os elementos do sistema; esse *status* não é necessariamente real, e pode ser que seja necessário definir taxas efetivas. Utilizando a técnica sDMC, podemos simular diretamente o sistema representado pelas Eq. (5.1). Para o modelo DH, essa abordagem diminuiu nove vezes o desvio da solução exata, quando comparada com nsDMC.

Quando comparamos os dados numéricos gerados pelas simulações, o desvio dos resultados sDMC da solução exata é de até 30 vezes aqueles obtidos por rDMC. Mostramos também que a técnica rDMC para sistemas grandes pode concordar com a solução exata com um desvio de até 1%. Assim, podemos usá-la para balancear entre custo computacional e resultados precisos o suficiente, para as simulações. Entretanto, quando tentamos obter as curvas de TCP e a distribuição de tempos de extinção $f(t)$, tanto sDMC quanto rDMC não foram capazes de prever satisfatoriamente todas as características dos

resultados exatos. A técnica sDMC subestimou o tempo médio para o TCP, mas o formato e a largura da função $f_s(t)$ concordaram bem com a distribuição exata. Por outro lado, com rDMC, pudemos reproduzir o tempo médio da distribuição exata, mas o formato da distribuição tende a uma função do tipo delta. Esse resultado era esperado, uma vez que a solução exata das Eqs. (5.1) para os tempos de extinção deve ser uma função delta.

Assim, podemos concluir que o desenvolvimento teórico-experimental ao nível mesoscópico foi capaz de gerar novos *insights* para o problema do crescimento de tumores. A curva sigmoideal da taxa de crescimento que propomos, pode guardar informações de interesse para a modelagem nessa área, especialmente no âmbito de competição e cooperação entre as células. Além disso, a *simultaneidade* dos processos de duplicação celular, nos levou ao desenvolvimento de uma teoria mais compreensiva para a simulação Monte Carlo dinâmico de processos Markovianos.

Nosso trabalho também sugere diversas linhas que podem pautar novos ensaios nessa área de pesquisa. A maioria dessas linhas se embasa em resolver alguns limites que nossos modelos não puderam alcançar. Um deles é a concordância quantitativa entre a lei de potência dos tempos de espera médios e os dados experimentais. Nesse caso, a representação das células através de um modelo como o Potts-celular poderia superar essa dificuldade. Outra linha é sobre um estudo aprofundado da dicotomia entre as técnicas sDMC e rDMC na obtenção das distribuições de tempos de extinção e TCP e incluir interações locais entre os elementos. Por fim, também sugerimos que experimentos em outros sistemas biológicos possam ser feitos, a fim de comparar o parâmetro μ entre os tumores monocamadas e esses novos sistemas.

REFERÊNCIAS¹

- [1] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000.
- [2] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, p. 646–674, 2011.
- [3] BRAY, F. The evolving scale and profile of cancer worldwide: much ado about everything. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 25, p. 3–5, 2016.
- [4] PREZIOSI, L. *Cancer Modelling and Simulation*. Boca Raton: CRC Press, 2003.
- [5] MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1805, p. 105–117, 2010.
- [6] MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*, v. 12, p. 323–334, 2012.
- [7] ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- [8] LAUBENBACHER, R. et al. A systems biology view of cancer. *BBA Reviews Cancer*, v. 1796, p. 129–139, 2009.
- [9] ROCKNE, R. et al. Predicting the efficacy of radiotherapy in individual glioblastoma patients *in vivo*: a mathematical modeling approach. *Physics in Medicine and Biology*, v. 55, p. 3271–3285, 2010.
- [10] JOINER, M.; van der Kogel, A. *Basic Clinical Radiobiology*. 4. ed. London: Hodder Arnold, 2009.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

-
- [11] DELSANTO, P. P. et al. Bridging the gap between mesoscopic and macroscopic models: The case of multicellular tumor spheroids. *Physical Review Letters*, v. 94: 148105, 2005.
- [12] BRÚ, A. et al. The universal dynamics of tumor growth. *Biophysical Journal*, v. 85, p. 2948–2961, 2003.
- [13] SIMPSON, M. J. et al. Quantifying the roles of cell motility and cell proliferation in a circular barrier assay. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 10, p. 20130007, 2013.
- [14] BRÚ, A. et al. Super-rough dynamics on tumor growth. *Physical Review Letters*, v. 81 (18), p. 4008–4011, 1998.
- [15] AXELROD, R.; AXELROD, D. E.; PIENTA, K. J. Evolution of cooperation among tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 103 (36), p. 13474–13479, 2006.
- [16] COSTA, F. H. S. et al. Basic ingredients for mathematical modeling of tumor growth *in vitro*: Cooperative effects and search for space. *Journal of Theoretical Biology*, v. 337, p. 24–29, 2013.
- [17] COSTA, F. H. S.; CAMPOS, M.; SILVA, M. A. A. da. The universal growth rate behavior and regime transition in adherent cell colonies. *Journal of Theoretical Biology*, v. 387, p. 181–188, 2015.
- [18] PERES, C. M.; CURI, R. *Como Cultivar Células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- [19] PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, p. 839–845, 2007.
- [20] FREYER, J. P.; SUTHERLAND, R. M. Regulation of growth saturation and development of necrosis in emt6/ro multicellular spheroids by the glucose and oxygen supply. *Cancer Research*, v. 46, p. 3504–3512, 1986.

-
- [21] MUELLER-KLIESER, W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, v. 36, p. 123–139, 2000.
- [22] CUVELIER, D. et al. The universal dynamics of cell spreading. *Current Biology*, v. 17, p. 694–699, 2007.
- [23] GALLE, J.; LOEFFLER, M.; DRASDO, D. Modeling the effect of deregulated proliferation and apoptosis on the growth dynamics of epithelial cell populations *in vitro*. *Biophysical Journal*, v. 88, p. 62–75, 2005.
- [24] HUERGO, M. A. C. et al. Dynamics and morphology characteristics of cell colonies with radially spreading growth fronts. *Physical Review E*, v. 89: 021917, 2011.
- [25] PULIAFITO, A. et al. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, p. 739–744, 2012.
- [26] HUERGO, M. A. C. et al. Growth dynamics of cancer cell colonies and their comparison with noncancerous cells. *Physical Review E*, v. 85: 011918, 2012.
- [27] GALLE, J.; HOFFMAN, M.; AUST, G. From single cells to tissue architecture - a bottom-up approach to modelling the spatio-temporal organisation of complex multi-cellular systems. *Journal of Mathematical Biology*, v. 58, p. 261–283, 2009.
- [28] AMAR, M. B.; CHATELAIN, C.; CIARLETTA, P. Contour instabilities in early tumor growth models. *Physical Review Letters*, v. 106: 148101, 2011.
- [29] RADSZUWEIT, M. et al. Comparing the growth kinetics of cell populations in two and three dimensions. *Physical Review E*, v. 79: 051907, 2009.
- [30] GUIOT, C. et al. Does tumor growth follow a “universal law”? *Journal of Theoretical Biology*, v. 225, p. 147–151, 2003.
- [31] MAINI, P. K.; MCELWAIN, D. L. S.; LEAVESLEY, D. I. Traveling wave model to interpret a wound-healing cell migration assay for human peritoneal mesothelial cells. *Tissue Engineering*, v. 10, p. 475–482, 2004a.
- [32] MAINI, P. K.; MCELWAIN, D. L. S.; LEAVESLEY, D. I. Traveling waves in a wound healing assay. *Applied Mathematics Letters*, v. 17, p. 575–580, 2004b.

- [33] EDEN, M. A probabilistic model for morphogenesis. In: *Symposium on Information Theory in Biology*. New York: Pergamon Press, 1958.
- [34] GRANER, F.; GLAZIER, J. A. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Physical Review Letters*, v. 69 (13), p. 2013–2016, 1992.
- [35] JIANG, Y. et al. A multiscale model for avascular tumor growth. *Biophysical Journal*, v. 89, p. 3884–3894, 2005.
- [36] AIELLO, O. E.; da Silva, M. A. A. New approach to dynamical Monte Carlo methods: application to an epidemic model. *Physica A*, v. 327, p. 525–534, 2003.
- [37] DAWSON, A.; HILLEN, T. Derivation of the tumour control probability (tcp) from a cell cycle model. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, v. 2-3, p. 121–141, 2006.
- [38] COSTA, F. H. S.; da Silva, M. A. A. A generalization of the dynamical Monte Carlo method for systems with simultaneous events: application to tumor growth. *A ser submetido*, 2016.
- [39] NEWMAN, M. E. J.; BARKEMA, G. T. *Monte Carlo Methods in Statistical Physics*. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- [40] BINDER, K. Applications of Monte Carlo methods to statistical physics. *Reports on Progress in Physics*, v. 60, p. 487–559, 1997.
- [41] LANDAU, D. P.; BINDER, K. *A Guide to Monte Carlo Simulations in Statistical Physics*. New York: Cambridge University Press, 2009.
- [42] AIELLO, O. E. et al. Solution of deterministic-stochastic epidemic models by dynamical Monte Carlo method. *Physica A*, v. 282, p. 546–558, 2000.
- [43] FICHTHORN, K. W.; WEINBERG, W. H. Theoretical foundations of dynamical Monte Carlo simulations. *Journal of Chemical Physics*, v. 95 (2), p. 1090–1096, 1991.
- [44] COSTA, F. H. S. *Modelagem e Simulação Computacional do Crescimento de Tumores in vitro*. Dissertação (Mestrado) — FCFRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

-
- [45] BLOCK, M.; SCHÖLL, E.; DRASDO, D. Classifying the expansion kinetics and critical surface dynamics of growing cell populations. *Physical Review Letters*, v. 99: 248101, 2007.
- [46] FONG, E.; TZLIL, S.; TIRRELL, D. A. Boundary crossing in epithelial wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107 (45), p. 19302–19307, 2010.
- [47] Van Kampen, N. G. *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*. Amsterdam: North-Holland, 2007.
- [48] AIELLO, O. E. *Simulação Monte Carlo para Sistemas Dinâmicos*. Tese (Doutorado) — FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- [49] GIANNINI, M. Job search mechanism and individual behaviour. *Computational Economics*, v. 27, p. 89–113, 2006.
- [50] DEVRIES, P. L. *A First Course in Computational Physics*. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- [51] SWENDSEN, R. H. Monte carlo renormalization group. *Physical Review Letters*, v. 42 (14), p. 859–861, 1979.
- [52] WILSON, K. G. The renormalization group: Critical phenomena and the kondo problem. *Reviews of Modern Physics*, v. 47 (4), p. 773–840, 1975.
- [53] DRASDO, D.; HOËME, S. A single-cell-based model of tumor growth *in vitro*: monolayers and spheroids. *Physical Biology*, v. 2, p. 133–147, 2005.
- [54] TZIAMPAZIS, E.; SAMBANIS, A. Modeling of cell culture processes. *Cytotechnology*, v. 14, p. 191–204, 1994.
- [55] OSTGAARD, K. et al. Effects of steroids and different culture media on cell cycle of the androgen-sensitive human cell line nhik3025. *Journal of Cell Science*, v. 48, p. 281–190, 1981.
- [56] HAGMANN, S. et al. Different culture media affect growth characteristics, surface markers distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 14, p. 223, 2013.

- [57] LI, N. F. et al. A modified medium that significantly improves the growth of human normal ovarian surface epithelial (ose) cells *in vitro*. *Laboratory Investigation*, v. 84, p. 923–931, 2004.
- [58] DURAND, R. E. Variable radiobiological response of spheroids. *Radiation Research*, v. 81, p. 85–99, 1980.
- [59] GOUSTIN, A. S. et al. Growth factors and cancer. *Cancer Research*, v. 46, p. 1015–1029, 1986.
- [60] CAMPBELL, C. H. et al. Regulation of the membrane estrogen receptor- α : role of cell density, serum, cell passage number, and estradiol. *The FASEB Journal*, v. 116, p. 1917–1927, 2002.
- [61] RAZANDI, M. et al. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ers) originate from a single transcript: studies of $er\alpha$ and $er\beta$ expressed in chinese hamster ovary cells. *Molecular Endocrinology*, v. 13, p. 307–319, 1999.
- [62] FLUORIOT, G. et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha ($her-\alpha$) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress $her-\alpha$ function 1. *The EMBO Journal*, v. 19, p. 4688–4700, 2000.
- [63] MASTERS, J. R. W. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- [64] BYRNE, H.; DRASDO, D. Individual-based and continuum models of growing cell populations: a comparison. *Journal of Mathematical Biology*, v. 58, p. 657–687, 2009.
- [65] DRASDO, D.; HOEHME, S.; BLOCH, M. On the role of physics in the growth and pattern formation of multi-cellular systems: What we can learn from individual-cell based models? *Journal of Statistical Physics*, v. 128, p. 287–345, 2007.
- [66] LAIRD, A. K. Dynamics of tumor growth. *British Journal of Cancer*, v. 18, p. 490–502, 1964.
- [67] WINSOR, C. P. The gompertz curve as a growth curve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 18 (1), p. 1–8, 1932.

- [68] ODENTHAL, T. et al. Analysis of initial cell spreading using mechanistic contact formulations for a deformable cell model. *PLOS Computational Biology*, v. 9, p. e1003267, 2013.
- [69] GOUNDIAM, O.; NAGEL, M. D.; VAYSSADE, M. Study of cancer survival using an anti-adhesive substratum. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, Engineering Supplement 1, p. 105–106, 2008.
- [70] GOUNDIAM, O.; NAGEL, M. D.; VAYSSADE, M. Growth and survival signalling in b16f10 melanoma cells in 3d culture. *Cell Biology International*, v. 34, p. 385–391, 2010.
- [71] YAN, Z. et al. Oncogenic *ki-ras* but not oncogenic *ha-ras* blocks integrin β 1-chain maturation in colon epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 30928–30936, 1997.
- [72] PLACZEK, W. J. et al. A survey of the anti-apoptotic *bcl-2* subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of *bcl-2* antagonists in cancer therapy. *Cell Death & Disease*, v. 1, p. e40, 2010.
- [73] HUERGO, M. A. C. et al. Morphology and dynamic scaling of cell colonies with linear growth fronts. *Physical Review E*, v. 82: 031903, 2010.
- [74] GUIOT, C. et al. The dynamic evolution of the power exponent in a universal growth model of tumors. *Journal of Theoretical Biology*, v. 240, p. 459–463, 2006.
- [75] CZIRÓK, A. et al. Exponential distribution of locomotion activity in cell cultures. *Physical Review Letters*, v. 81, p. 3038–3041, 1998.
- [76] ANON, E. et al. Cell crawling mediates collective cell migration to close undamaged epithelial gaps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, p. 10891–10896, 2012.
- [77] ROLLI, C. G. et al. Switchable adhesive substrates: Revealing geometry dependence in collective cell behavior. *Biomaterials*, v. 33, p. 2409–2418, 2012.
- [78] MIR, M. et al. Optical measurement of cycle-dependent cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, p. 13124–13129, 2012.

- [79] SON, S. et al. Direct observation of mammalian cell growth and size regulation. *Nature Methods*, v. 9, p. 910–913, 2012.
- [80] MOREIRA, J.; DEUTSCH, A. Celular automaton models of tumor development: A critical review. *Advances in Complex Systems*, v. 5 (2 & 3), p. 247–267, 2002.
- [81] JULLIEN, R.; BOTET, E. Scaling properties of the surface in the eden model in $d = 2, 3, 4$. *Journal of Physics A*, v. 18, p. 2279–2287, 1985.
- [82] PRESS, W. H. et al. *Numerical Recipes in Fortran 77: The Art of Scientific Computing*. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1992.
- [83] TONKINSON, J. L. et al. Cell cycle modulation by a multitargeted antifolate, ly231514, increases in the cytotoxicity and antitumor activity of gencitabine in ht29 colon carcinoma. *Cancer Research*, v. 59, p. 3671–3676, 1999.
- [84] CALABRO-JONES, P. M. et al. Time-dose relationships for 5-fluorouracil cytotoxicity against human epithelial cancer cells in vitro. *Cancer Research*, v. 42, p. 4413–4420, 1982.
- [85] JOLLEY, L. B. W. *Summation of Series*. 2. ed. New York: Dover Phoenix Editions, 2005.
- [86] PAWLIK, T. M.; KEYOMARSI, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v. 59 (4), p. 928–942, 2004.
- [87] WYATT, R. M.; BEDDOE, A. H.; DALE, R. G. The effects of delays in radiotherapy treatment on tumour control. *Physics in Medicine and Biology*, v. 48, p. 139–155, 2003.
- [88] GONG, J. et al. Are more complicated tumour control probability models better? *Mathematical Medicine and Biology*, v. 30, p. 1–19, 2013.
- [89] TREOLAR, K. K. et al. Are *in vitro* estimates of cell diffusivity and cell proliferation rate sensitive to assay geometry? *Journal of Theoretical Biology*, v. 356, p. 71–84, 2014.