UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Modelagem e simulação computacional do crescimento de tumores *in vitro*

Flávio Henrique Sant'Ana Costa

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Modelagem e simulação computacional do crescimento de tumores *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

*Versão corrigida da **Dissertação de
Mestrado** apresentada ao programa de
Pós-Graduação em 12/04/2012. A versão
original encontra-se disponível na Facul-
dade de Ciências Farmacêuticas de Ribeir-
ão Preto/USP*.

Área de Concentração: Química e Física
Biológica.

Flávio Henrique Sant'Ana Costa

Orientador:
Prof. Dr. Marco Antonio Alves da Silva

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Costa, Flávio Henrique Sant'Ana

Modelagem e simulação computacional do crescimento de tumores *in vitro*. Ribeirão Preto, 2012.

67 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: Silva, Marco Antonio Alves da.

1. Modelagem matemática. 2. Simulação computacional. 3. Crescimento de tumores.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Flávio Henrique Sant'Ana Costa

Título do Trabalho: Modelagem e simulação computacional do crescimento de tumores
in vitro

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica.

Orientador:

Prof. Dr. Marco Antonio Alves da Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

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

Agradecimentos

Ao professor Dr. Marco Antonio Alves da Silva, pela orientação.

Aos professores com quem pude conviver durante esse período.

Ao pessoal da casa 12 e aos amigos: Guilherme Thomaz Pereira Bracini, Rodrigo Antonio Faccioli, Renata de Oliveira Garcia Reis, Leandro Oliveira Bortot, Ricardo de Oliveira dos Santos Soares e Pablo Andrei Silva, pela convivência durante esse período.

Em especial à minha namorada Alana Brumatti Romanini pelo incentivo, dedicação e paciência.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Eduardo Aiello, e ao Dr. Marcelo Campos pela colaboração e sugestões ao longo deste trabalho.

Ao Hospital de Câncer de Barretos, por ceder o espaço para as realizações experimentais deste projeto.

À Capes pelo financiamento desse projeto.

Epígrafe

"Nem tudo o que pode ser contado conta, e
nem tudo o que conta pode ser contado."
Albert Einstein

Resumo

COSTA, F. H. S (**Modelagem e simulação computacional do crescimento de tumores *in vitro***). 2012. 67 f. [dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O crescimento de tumores vem chamando a atenção de físicos e matemáticos há mais de sessenta anos. Entretanto, a conversa com biólogos e a interação teoria-experimento têm aparecido apenas recentemente. Equações fenomenológicas e simulações computacionais continuam sendo uma ferramenta comum entre todos os modelos que conhecemos. Assim, nesse trabalho nós estudamos o problema do crescimento de tumores monocamada através das abordagens experimental, teórica e computacional, fortalecendo assim a interação teoria-experimento. Cultivamos células das linhagens HeLa (carcinoma cervical humano), HCT-15 (adenocarcinoma col retal humano), NIH-HN-13 (carcinoma de células escamosas humanas) e U-251 (glioblastoma neuronal humano), obtendo a dimensão fractal e o comportamento do raio médio com o número de células, além de analisarmos os dados da literatura para a linhagem HT-29 (adenocarcinoma col retal humano). A seguir nós modelamos a taxa de crescimento do raio médio através de uma curva sigmoide. A solução analítica dessa equação nos permitiu ajustar bem os dados obtidos experimentalmente, e os parâmetros obtidos serviram para a simulação Monte Carlo dinâmico. Para essa, transformamos a taxa de crescimento do raio em taxa de crescimento do número de células, cujos resultados novamente concordaram muito bem com os dados experimentais. A dimensão fractal dos agregados esteve entre $1,12 \leq d_f \leq 1,21$, e concordou com os dados da literatura. Novos resultados foram produzidos: *i*) O raio médio como uma função do número de células nos permitiu um ajuste do tipo $R_c(t) = a[N_c(t) - \tilde{N}_0]^{1/2} + \tilde{R}_0$, mais geral que a comumente aceita relação $R_c(t) = cN_c(t)^{1/2}$; e *ii*) os tempos de espera no procedimento MCD se distribuem log-normalmente (ou Gaussianamente em alguns casos), diferentemente da distribuição Poissoniana frequentemente assumida. A distribuição log-normal nos permitiu também conjecturar que um parâmetro μ , da relação $\langle \Delta t^{(nr)} \rangle \propto n_T^{-\mu}$, possa caracterizar o crescimento monocamada de tumores devido à sua estreita abrangência $0,69 \leq \mu \leq 0,81$. Nossos resultados nos permitiram concluir que diferentes condições de cultivo podem gerar diferentes respostas dos parâmetros, além disso, dois fenômenos podem caracterizar esse crescimento no âmbito mesoscópico: A competição por espaços livres e a cooperação entre as células.

Palavras-chave: crescimento de tumores; modelagem matemática; Monte Carlo dinâmico.

Abstract

COSTA, F. H. S (**Modelling and computational simulation of *in vitro* tumor growth**). 2012. 67 p. [Dissertation]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Tumor growth has been calling attention of physicists and mathematicians for more than sixty years. However, cross-talking with biologists and the interplay between theory and experiment have emerged just recently. Phenomenological equations and computational simulations are still the common toolbox among all the models we know. Thus, in this work, we have studied the problem of monolayer tumor growth through the experimental, theoretical and computational approaches, enhancing the interaction between theory and experiment. We cultivate HeLa (human cervical carcinoma), HCT-15 (human colorectal adenocarcinoma), NIH-HN-13 (human squamous cell carcinoma) and U-251 (human neuronal glioblastoma) cells, calculating the fractal dimension and the behavior of the mean radius with cell number, and analyzing the literature data from HT-29 (human colorectal adenocarcinoma) lineage. Then we modeled the growth rate of mean radius through a sigmoidal curve. The analytical solution of this equation allowed us to fit well the experimental data and the obtained parameters were used into dynamical Monte Carlo simulation. To do this, we transform the radius growth rate in number of cells growth rate, which again agreed with the experimental data. The fractal dimensions of the aggregates ranged from 1, $12 \leq d_f \leq 1,21$, and agree with the literature. New findings were produced: *i*) the mean radius as a function of the number of cells enabled us to adjust the function $R_c(t) = a[N_c(t) - \tilde{N}_0]^{1/2} + \tilde{R}_0$, differently from widely accepted relation $R_c(t) = cN_c(t)^{1/2}$; and *ii*) the waiting times in the MCD procedure are log-normally distributed (sometimes Gaussian), unlike the Poisson distribution often used. The lognormal distribution also allowed us to conjecture that a parameter μ , from the power law relation $\langle \Delta t^{(\text{nr})} \rangle \propto n_T^{-\mu}$, might characterize the tumor monolayer growth due to its narrow range $0,69 \leq \mu \leq 0,81$. Our findings led us to conclude that different culture conditions may produce different parameter responses, furthermore, two phenomenona can describe the growth in mesoscopic level: the competition for free space and the cooperation between cells.

Key-words: tumor growth; mathematical modelling; dynamical Monte Carlo.

Lista de Figuras

Fig. 1	Representação esquemática da formação de uma colônia de células. Em uma monocamada temos as células ativas (azuis) que são as mais externas na colônia, e as internas (verdes) que são inibidas por contato. Adaptado de [7].	20
Fig. 2	A taxa de crescimento de células HT-29 cultivadas <i>in vitro</i> (círculos pretos unidos por segmentos de reta) [10] e o ajuste sigmoidal (linha vermelha). As linhas tracejadas azuis mostram a taxa de crescimento inicial ($\omega(t \approx 0) = \alpha - \beta$) e sua saturação ($\omega(t \gg 0) = \alpha$). A obtenção dessa taxa é explanada no apêndice A .2.	29
Fig. 3	O perfil bidimensional de uma colônia de células HCT-15 com um tamanho de $389 \mu\text{m}$. A linha sólida preta mostra o perfil traçado, e a linha tracejada vermelha mostra a aproximação do raio médio por uma circunferência.	33
Fig. 4	Morfologia das linhagens celulares que cultivamos <i>in vitro</i> . Em (a) temos uma colônia de HeLa em uma escala de $\mathcal{E} = 100 \mu\text{m}$. (b) mostra um agregado de HCT-15 com $\mathcal{E} = 200 \mu\text{m}$. Na figura (c) mostramos uma colônia da linhagem HN-13 com $\mathcal{E} = 50 \mu\text{m}$, e na parte (d) temos células U-251 com $\mathcal{E} = 100 \mu\text{m}$	34
Fig. 5	A evolução temporal do raio médio (círculos pretos), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vermelha) e a simulação MCD (círculos abertos). Mostramos também a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 1,93 \mu\text{m/h}$. Os dados utilizados para o ajuste e simulação constam na tabela 1.	35
Fig. 6	A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células HeLa (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 2,63 \pm 0,05 \mu\text{m/h}$	35
Fig. 7	A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células HCT-15 (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 2,08 \pm 0,04 \mu\text{m/h}$	36

Fig. 8	A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células HN-13 (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 3,3 \pm 0,1 \mu\text{m/h}$	36
Fig. 9	A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células U-251 (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 1,86 \pm 0,04 \mu\text{m/h}$	37
Fig. 10	A expansão do raio médio ajustado pela equação (14) (linha sólida vermelha) para os dados experimentais (veja as figura de 6 à 9) e a simulação MCD (círculos abertos). Os parâmetros utilizados para o ajuste e a simulação estão na tabela 1.	38
Fig. 11	O raio médio $R_T(t)$ <i>versus</i> o tempo. Os círculos abertos indicam a simulação MCD; Os quadrados pretos representam a simulação MCD com tempo estimado de um processo de Poisson; 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.	40
Fig. 12	A distribuição de $\Delta t_p^{(25)}$ (círculos pretos) e o ajuste exponencial (linha sólida vermelha) com os parâmetros das células HT-29.	41
Fig. 13	A distribuição de tempos de espera estimados com a equação (17) para células HT-29 na configuração 25 células.	41
Fig. 14	A frequência normalizada contra $\Delta t^{(n_T)} / \langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$ nas configurações $n_T = 10^2, 10^3$ e 10^4 células. Ajustamos curvas lognormais (linhas tracejadas) e curvas gaussianas (linhas sólidas).	42
Fig. 15	Distribuição dos intervalos de tempo, com os parâmetros ajustados pelos dados experimentais que obtivemos, em $\Delta t^{(25)}$ para as células HeLa (quadrados), HCT-15 (círculos), HN-13 (triângulos), U-251 (estrelas) e os respectivos ajustes com curvas log-normais (linhas sólidas).	43
Fig. 16	Mostramos aqui a frequência normalizada <i>vs.</i> $\Delta t^{(2000)} / \langle \Delta t^{(2000)} \rangle$ (figuras geométricas) e os ajustes log-normais (linhas tracejadas), da mesma maneira que na figura 15.	43

Fig. 17	<i>Probability Plot</i> de células HT-29 para duas configurações de células. Em (a) temos a probabilidade por $\Delta t^{(25)}$; em (b) mostramos a probabilidade <i>versus</i> $\ln [\Delta t^{(25)}]$; em (c) plotamos a probabilidade contra $\Delta t^{(30000)} / \langle \Delta t^{(30000)} \rangle$; e (d) mostra a probabilidade vs. $\ln [\Delta t^{(30000)} / \langle \Delta t^{(30000)} \rangle]$. Em todas as figuras, a linha sólida vermelha é um ajuste linear.	45
Fig. 18	Ajuste linear para $\log_{10} [\langle \Delta t^{(nr)} \rangle]$ por $\log_{10} (n_T)$ para células HT-29.	46
Fig. 19	Ajuste linear para $\log_{10} [\langle \Delta t^{(nr)} \rangle]$ por $\log_{10} (n_T)$ para linhagens HeLa (quadrados), HCT-15 (círculos), HN-13 (triângulos) e U-251 (estrelas).	46
Fig. 20	O número de caixas normalizado pelo tamanho da caixa para várias colônias grandes escolhidas ao acaso. As linhas tracejadas mostram as dimensões $d_f = 1, 14 \pm 0, 01$ para células HeLa (a); $d_f = 1, 17 \pm 0, 01$ para HCT-15 (b); $d_f = 1, 12 \pm 0, 03$ (c) para HN-13 e $d_f = 1, 21 \pm 0, 01$ para as U-251 (d).	47
Fig. 21	O raio médio plotado contra o número de células (círculos pretos) e o ajuste com uma curva do tipo $R_c(t) = a[N_c(t) - \tilde{N}_0]^{1/2} + \tilde{R}_0$ (linha vermelha). Os parâmetros ajustados foram $a = 13, 5 \pm 0, 2 \mu\text{m}/\text{célula}^{1/2}$, $\tilde{N}_0 = 3, 95 \pm 0, 05$ células e $\tilde{R}_0 = 36 \pm 1 \mu\text{m}$	48
Fig. 22	A evolução da conformação de uma colônia de células HeLa desde um formato desconhecido até algo próximo do circular. Em (a) temos uma colônia com 8 células e $R_c = 80, 33 \mu\text{m}$ após 28,9 horas de cultivo. Observamos a formação de buracos, no interior das colônias, da ordem de grandeza do tamanho das células; em (b) mostramos a colônia com 97 células e $R_c = 191, 79 \mu\text{m}$ em 126,7 horas de experimento. Aqui a colônia ainda mantém um formato desconhecido, mas já sem a presença de buracos; (c) mostra a colônia com $R_c = 392, 14 \mu\text{m}$ após 213,3 horas de cultivo. Nesse momento ela já tem o formato que pode ser aproximado bem por um círculo. As medidas foram feitas com $\mathcal{E} = 50$ e $100 \mu\text{m}$	50
Fig. 23	Uma simulação típica de células HT-29, mostrando o perfil simulado (linha sólida preta) e a aproximação para um círculo (linha tracejada vermelha) com um raio de $2.262 \mu\text{m}$	51

- Fig. 24 A imagem instantânea de uma simulação de células HT-29, em $t \approx 1429$ horas, quando $n_T = 155.551$ células (superfície amarela), $n_0 = 6.509$ sítios (pontos pretos) e $R_T \approx 2230 \mu\text{m}$. A superfície branca denota os sítios $\tilde{n}_V$. A linha vermelha mostra uma área em que não existe mais nenhum sítio q , ela tem um raio de aproximadamente $1875 \mu\text{m}$ 51
- Fig. 25 A expansão típica de uma colônia de células HeLa, tomadas de 146,2, 170, 194 e 213,3 horas de cultivo, com $R_c = 224,08, 277,74, 338,24$ e $392,14 \mu\text{m}$ respectivamente. 52
- Fig. A .1 Um exemplo em que fizemos 100 simulações ($\mathcal{N} = 100$) para encontrar $f(\lambda)$, ($\mathcal{A} = f(\lambda)$). A cada passo, λ e $f(\lambda)$ eram incrementados de números aleatórios, i.e., $\lambda \rightarrow \lambda + \xi_1$, e $f_j(\lambda) = \cos(\lambda) + \xi_2$. Assim, aplicando os procedimentos descritos pelas equações (A .1)-(A .3), pudemos encontrar a média (círculos abertos) em (a). Também pode-se ver nessa figura as barras de erro, 5 simulações que plotamos como ilustração e o ajuste $f(\lambda) = a^* \cos[b^* \lambda + c^*]$ (linha vermelha), com $a^* = 0,942(0,004)$, $b^* = 0,998(0,001)$ e $c^* = 0,26(0,01)$. Em (b) realizamos o procedimento descrito na equação (A .4) (círculos pretos), e mostramos o ajuste senoidal $df(\lambda)/dt = -a_* \sin[b_* \lambda + c_*]$, com $a_* = 0,90(0,01)$, $b_* = 0,996(0,002)$ e $c_* = 0,28(0,02)$ 62
- Fig. B .1 Exemplo de gráficos Gaussianos. Em (a) mostramos uma curva gaussiana com o ajuste (linha vermelha) do tipo $\rho_g(x_p) = a' \exp[-b' x_p^2]$, com $a' = 79.664(2)$ e $b' = 0,49833(0,00003)$. Em (b) mostramos o procedimento descrito pela equação (B .1), e o ajuste linear (linha vermelha) tem uma inclinação de $1,018(0,004)$ 63
- Fig. B .2 Como na figura anterior, mostramos aqui os *Probability Plots* de simulações com os parâmetros ajustados para os dados experimentais. Em (a) temos a probabilidade por $\Delta t^{(25)}$ para células HCT-15 (quadrados), HN-13 (círculos), U-251 (triângulos) e HeLa (estrelas); em (b) mostramos a probabilidade *versus* $\ln[\Delta t^{(25)}]$; em (c) plotamos a probabilidade contra $\Delta t^{(2000)}/\langle \Delta t^{(2000)} \rangle$; e (d) mostra a probabilidade vs. $\ln[\Delta t^{(2000)}/\langle \Delta t^{(2000)} \rangle]$. Para todos os dados, as linhas coloridas que os acompanham são os respectivos ajustes lineares. 64
- Fig. C .1 Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de um círculo (b). 65

Fig. C .2 Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de Gosper (b).	66
Fig. C .3 Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de um conjunto Julia (b).	66
Fig. C .4 Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de Koch (b).	67
Fig. C .5 Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de Vicsek (b).	67

Lista de Tabelas

Tab. 1	Parâmetros característicos das linhagens celulares, usados para os ajustes dos dados experimentais e simulações.	39
Tab. 2	Tempo médio de espera das linhagens em algumas configurações de células.	42
Tab. C .1	As dimensões fractais teóricas de algumas figuras, e o nosso cálculo por <i>box-counting</i>	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

MCD	Monte Carlo dinâmico
ATCC	American type cell collection
FCFRP	Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto
DMEM	Dulbeco modified Eagle's medium
SBF	Soro fetal bovino
RPMI	Roswell park memorial institute
DIC	Differential interference contrast

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

1	Aspectos Gerais da Dinâmica Tumoral	19
1.1	A cultura de células como modelo experimental	19
1.2	O papel da modelagem matemática e a importância da interação teórico-experimental	21
1.3	A importância do problema e os objetivos desse trabalho	23
2	Modelo e Métodos	24
2.1	Experimentos <i>in vitro</i>	24
2.2	Monte Carlo dinâmico	25
2.3	O modelo de crescimento	28
2.4	Monte Carlo dinâmico aplicado ao modelo	28
3	Resultados e Discussões	32
3.1	As curvas de crescimento	32
3.2	As distribuições de tempos médios de espera	39
3.3	As dimensões fractais e as deformações celulares	44
3.4	As Limitações	49
4	Conclusões e Perspectivas	53
	Referências	56
	Apêndices	60
A	Médias	61
A.1	As médias temporais	61
A.2	As taxas de crescimento	61

B	<i>Probability Plot</i>	62
C	Dimensão Fractal	63

Capítulo 1

Aspectos Gerais da Dinâmica Tumoral

Embora outros fatores (ambientais, hábitos de vida, etc.) sejam importantes em muitos estágios da tumorigênese [1], o câncer é uma doença que envolve essencialmente alterações genéticas [2, 3]. Quando uma única célula [4] é capaz de quebrar as barreiras impostas pelo organismo contra erros, e adquirir as mutações necessárias [1, 2], ela passa a sustentar uma comunidade de células tumorais. Não se pode esperar, contudo, que todas as células dessa comunidade se comportem de maneiras completamente iguais, ou que tenham as mesmas mutações, pois o ambiente de interação local de cada uma é diferente e pode favorecer ou desfavorecer a proliferação e o adquirir de novas mutações [3].

O favorecimento está ligado às respostas da célula aos estímulos do suprimento de nutrientes advindos do tecido (O_2 , glicose, etc.) [3], das células vizinhas (sinalização parácrina [4]) ou de sua própria produção (sinalização autócrina [5]), ao passo que o desfavorecimento está ligado ao bloqueio dos receptores de fatores de crescimento por moléculas de adesão célula-célula (inibição por contato) e, de modo mais drástico, por uma nutrição inadequada das células [3]. Assim, para uma compreensão mecanicista dessas interações no nível de um conjunto de células, uma abordagem multidisciplinar em áreas como a matemática, a física e a biologia é requerido, como será argumentado logo adiante.

1.1 A cultura de células como modelo experimental

Experimentalmente, para estudar o desenvolvimento de um tumor, é muito útil dispor de um sistema-modelo que seja o mais livre possível de interferências do ambiente, para que algumas variáveis específicas sejam estudadas separadamente. Assim é indicada a cultura de células. No entanto, é fácil pensar que o metabolismo de uma célula em cultura funcione de maneira distinta de uma célula em um organismo, pois nesse ela faz parte de uma estrutura que mantém contato com outros tipos celulares, interferindo na manutenção de um microambiente que não pode ser totalmente reproduzido *in vitro* [6], e por esse motivo, a validade da cultura de células como modelo fisiológico das funções *in vivo* têm sido criticado [7]. Contudo, a busca por mecanismos básicos é dificultada quando vários eventos ocorrem simultaneamente e interferem uns nos outros [2, 3], o que favorece a utilização da cultura de células.

A maior parte das células em cultura provém de linhagens bem estabelecidas (elas

Figura 1: Representação esquemática da formação de uma colônia de células. Em uma monocamada temos as células ativas (azuis) que são as mais externas na colônia, e as internas (verdes) que são inibidas por contato. Adaptado de [7].

passaram por uma transição chamada de imortalização [3], o que faz com que, mantida as condições ideais, as células possuam a capacidade de se replicar indefinidamente) e crescem em monocamadas aderentes [7]. Não obstante, cultivos em esferas e/ou culturas primárias (em que as células são retiradas diretamente de um paciente) são possíveis, mas são procedimentos mais complicados [6–8]. A principal vantagem do cultivo de monocamadas é que elas podem ser diretamente vistas em microscópio, e por meio de técnicas não destrutivas como ensaios fotográficos e filmagens, pode-se contar o número de células, analisar a deformação celular e a variação do raio da colônia.

A manutenção das células aderentes requer a substituição periódica do meio de cultura, para possibilitar uma nutrição adequada da cultura, e eliminar os metabólitos secretados para o meio. Em se tratando de nutrientes, o meio de cultura geralmente é suplementado com soro, que contém em sua composição proteínas, lipídios, vitaminas e traços de alguns minerais. As células entram em um estado de dormência se esses nutrientes são retirados. O meio de cultura contém um indicador de pH (*Phenol red*) que faz com que o meio tenha aparência mais amarelada, facilitando encontrar o momento ideal para a sua troca; também é comum adicionar-se antibióticos e antimicóticos afim de minimizar as contaminações por fungos e bactérias [6, 7].

Além do meio, as células aderidas estão em contato com a placa de cultura e com as células adjacentes. Para que a aderência à placa ocorra, é necessário que haja reação cruzada com glicoproteínas e/ou cátions divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}), pois tanto as superfícies

das células quanto a da placa são carregadas negativamente. O fator importante é a carga líquida negativa, sendo as superfícies com maior carga negativa, as mais apropriadas para a aderência celular [6, 7]. As células também se ligam às suas vizinhas, através de moléculas de adesão. Essas moléculas exercem o papel de regular a comunicação entre as células [9]. Após as colônias de células atingirem certo tamanho, os receptores intermembranas são ocupados principalmente por moléculas de adesão célula-célula, inviabilizando a ligação de fatores de crescimento, o que faz com que a célula permaneça em um estado de dormência (quiescência) ou de *inibição por contato* [10]. Quando os receptores são liberados, as células voltam à se reproduzir normalmente [6].

Mostramos na figura 1 a representação de uma colônia de células. As células mais externas são as responsáveis pelo crescimento da colônia [11], ao passo que as mais internas entram em um estado de dormência [10], pois grande parte de seus receptores estão sendo ocupados por moléculas de adesão. É interessante ressaltar que, algumas células internas ainda mantêm a capacidade de se reproduzir¹ (apesar desse número ser bastante reduzido nas linhagens que apresentam inibição por contato [10]). Observamos também que as células mais internas são menores do que as células externas, devido à um gradiente de pressão vinda dessas. Além disso, também aparecem os espaços intercelulares, que são mais observados em colônias de tamanho pequeno, e depois tendem à desaparecer. O espaço vazio ao redor das células externas é um local propício para que as células-filhas se coloquem [12].

1.2 O papel da modelagem matemática e a importância da interação teórico-experimental

A modelagem matemática de problemas biológicos, como o crescimento de um tumor, exerce um papel fundamental nos experimentos básicos *in vitro* (ou *in vivo*) auxiliando na formulação de hipóteses sobre mecanismos e direcionando novos ensaios. Do ponto de vista clínico, acredita-se que a integração da modelagem com técnicas de imageamento, relações de resposta ao tratamento, bases moleculares, e ensaios preditivos, poderia acelerar o desenvolvimento de terapias mais específicas e mais efetivas [13–15].

Nesse sentido, existe um esforço científico para descobrir e compreender os mecanismos que agem nos níveis subcelular (microscópico), celular (mesoscópico) e tecidual (macroscópico) e como eles estão ligados entre si [16]. Esse esforço requer uma abordagem multidisciplinar em áreas como a matemática, a física e a biologia, para a criação

¹Algumas linhagens, não apresentam inibição por contato, apesar da dinâmica de crescimento ser parecida, em alguns aspectos, com aquelas que apresentam [12].

de modelos que possibilitem predições do comportamento de sistemas reais de interesse médico. Da mesma maneira, a teoria, a simulação e o experimento devem andar juntos de forma que os resultados/predições possam servir de motivação para novos estudos, afim de se estabelecer sistematicamente mecanismos e compreender fenômenos essenciais [13, 16].

Historicamente, o estudo matemático do crescimento de tumores têm sido desenvolvido desde o trabalho de Mayneord em 1932 (que foca na dinâmica do crescimento sob efeito de raios-X), passando pela epidemiologia e avançando em campos como a invasão, a vascularização e a sinalização complexa [1, 13, 14, 17, 18]. Os físicos, por sua vez, têm exercido o papel de fundamentar as bases matemáticas e, suas contribuições na compreensão dos mecanismos vêm sendo amplamente desenvolvidas, partindo dos trabalhos de Max Delbrück em genética molecular [14]. Para auxiliar essas duas abordagens, várias ferramentas numéricas, não menos importantes, têm aparecido, especialmente após o surgimento dos primeiros computadores. O primeiro trabalho nessa linha foi o de Eden, que, em 1958, desenvolveu um modelo simplificado para a morfogênese [19]. Assim, por serem ramos que se complementam, não vemos razões para separar matemática, física e simulação da biologia, tampouco desmembrar a interação teoria-experimento no contexto do crescimento de tumores.

Essa idéia toma ainda mais força quando percebemos que cada ramo da ciência possui seu limite de validade. Equações contínuas podem ser adequadas para descrever fenômenos macroscópicos, quando as propriedades de interesse variam suavemente. Elas se limitam, no entanto, à assumir que a população é homogênea, o que para certos ensaios é uma aproximação bastante grosseira [20–23]. O uso de simulação, por sua vez, permite que as interações célula-célula ou célula-ambiente sejam incluídas. É claro que para sistemas grandes ou altamente detalhados, essa abordagem torna-se bastante complicada [8, 24] e algumas vezes bastante dispendiosa para um computador tradicional [20–23]. O mesmo acontece com o experimento, que é a ferramenta que corrobora ou invalida uma teoria: alto custo de tempo e dinheiro e possível inexistência de tecnologia para sua realização [13].

Para estudar o comportamento coletivo de um conjunto de células (nível mesoscópico), as abordagens da simulação, equações contínuas e experimento tornam-se fortemente entrelaçadas, pois as aproximações feitas são bastante razoáveis. As taxas de crescimento, entendidas como um comportamento médio das cascatas bioquímicas intracelulares [23], interações célula-célula e entre célula-*espaço livre* podem ser encontradas, e a representação da célula como um elemento de uma matriz binária pode ser feita [19]. Baseados

nisso, fizemos experimentos *in vitro*, modelamos matematicamente dados obtidos, dando por fim um tratamento estocástico através do método Monte Carlo dinâmico (MCD).

1.3 A importância do problema e os objetivos desse trabalho

Os tumores malignos atingem milhões de pessoas anualmente em todo o mundo [25]. No Brasil, as estimativas para 2012 e 2013 são de 518.510 novos casos [26]. Assim, é muito útil estudar, sob um ponto de vista que possa trazer alguns *insights*, seus mecanismos de crescimento, uma vez que nossa compreensão frente à complexidade do problema ainda é relativamente pequena. Nossos objetivos aqui serão:

- Modelar por meio de equações contínuas o crescimento de tumores, comparando as previsões matemáticas com as taxas de crescimento e as curvas do raio médio de colônias cultivadas *in vitro*;

- Resolver numericamente, através do método MCD, as equações propostas dando uma interpretação espacial em termos dos meso-eventos que envolvem o problema;

- Calcular as dimensões fractais das colônias, obter a distribuição de tempos médios de espera das simulações parametrizadas através dos dados experimentais e analisar as deformações celulares.

Capítulo 2

Modelo e Métodos

Exporemos agora, os modelos e métodos experimentais e teóricos que utilizamos nesse trabalho. Os dados experimentais foram produzidos no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos e toda a teoria e simulação desenvolvida no laboratório de Física Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da universidade de São Paulo.

2.1 Experimentos *in vitro*

Nós cultivamos células do tipo HeLa (carcinoma cervical humano), U-251 (glioblastoma neuronal humano), HCT-15 (adenocarcinoma coloretal humano) (ATCC, Rockville, MD, EUA), e HN-13 (carcinoma de células escamosas humanas) (gentilmente cedido pelo MSc. Felipe Godoy (FCFRP-USP)). As células foram plaqueadas à baixa densidade (entre 500 e 2000 células/mL) em frascos de 25 cm² (TPP, Transadingen, Suíça). Para as linhagens HeLa, U-251 e HN-13 foram utilizados 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina, e a HCT-15 foi cultivada em 5 mL de RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram incubadas à 37 °C em uma atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂. Durante o experimento, sempre que necessário, o meio de cultura era cuidadosamente substituído.

Após 24 horas de cultura, várias colônias contendo entre 4 e 8 células foram escolhidas e fotografadas regularmente em várias resoluções ($\mathcal{E}$) com um microscópio invertido equipado com contraste de fase (Olympus, IX-71). As fotografias foram escaneadas com uma resolução final de 1,0 μm /pixel e os perfis de colônia foram traçados na mão com o auxílio do software *ImageJ*², gerando uma matriz binária de $\mathcal{L}_x \times \mathcal{L}_y$ pontos δ ($\delta = 1$, se o ponto está dentro dos limites da colônia, e $\delta = 0$ caso esteja fora), que foram usados para as análises subseqüentes. Calculou-se a área A_c das colônias diretamente com o software do microscópio (*CellSens*, aproximando o raio médio para o raio de um círculo através da relação $R_c(t) = \sqrt{A_c/\pi}$. Também contamos manualmente o número de células N_c em algumas amostras.

²<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

2.2 Monte Carlo dinâmico

Alguns processos, como o crescimento de tumor, têm como característica marcante a sua dinâmica temporal. Assim, é interessante sabermos qual a *trajetória* correta das grandezas de interesse ao longo da evolução do sistema. Isso pode ser feito com o método Monte Carlo dinâmico bastando saber quais as taxas corretas do problema e qual a relação entre o aceite de uma nova configuração do sistema e a variação real de tempo [27].

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

$$\frac{d}{dt}P_i(t) = \sum_j w_{j \rightarrow i} P_j(t) - \sum_j w_{i \rightarrow j} P_i(t), \quad (1)$$

em que $P_i(t)$ é a probabilidade de encontrar o sistema no estado i no tempo t e $w_{i \rightarrow j}$ é a probabilidade de transição entre i e j por unidade de tempo [28].

Podemos agora, escolher uma grandeza física macroscópica e extensiva $A(t)$, cujo valor esperado é dado pela soma de suas partes microscópicas, $A(t) = \langle A \rangle = \sum_i P_i(t) A_i$, com $\sum_i P_i(t) = 1$. Num modelo populacional, o número de células é uma quantidade adequada para ser representada por $A(t)$. Diferenciando ambos os lados deveremos ter

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}A(t) &= \sum_i A_i \frac{d}{dt}P_i(t) \\ &= \sum_i \sum_j w_{j \rightarrow i} P_j(t) (A_i - A_j). \end{aligned} \quad (2)$$

Assumindo que a *distância* entre dois estados seja dada pela quantidade mínima não-nula a , então a diferença $\Delta A_{ij} = A_i - A_j$ pode assumir apenas os valores $\pm a$, e assim, a equação (2) pode ser abordada como

$$\frac{d}{dt}A(t) = \sum_{(ij)'} w_{j \rightarrow i} P_j(t) a - \sum_{(ij)''} w_{j \rightarrow i} P_j(t) a, \quad (3)$$

em que $(ij)'$ indica os estados vizinhos (ij) que contribuem para o aumento da grandeza A , e $(ij)''$ aqueles que colaboram para a sua diminuição. A equação (3) pode ser imediatamente recolocada em termos de

$$\frac{d}{dt}A(t) = \sum_j \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^+ P_j(t) a - \sum_j \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^- P_j(t) a, \quad (4)$$

sendo i_{nn} os estados vizinhos mais próximos de j , e $w_{j \rightarrow i_{nn}}^{\pm}$ as probabilidades de transição por unidade de tempo que fazem com que A aumente (+) ou diminua (-). Podemos também pensar nas taxas mesoscópicas, ou seja, na média das probabilidades de transição por unidade de tempo sobre o conjunto dos estados i_{nn} no tempo t

$$r_j^+ = \langle w_{j \rightarrow i_{nn}}^+ \rangle = \frac{a \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^+}{A_j^\dagger}; \quad r_j^- = \langle w_{j \rightarrow i_{nn}}^- \rangle = \frac{a \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^-}{A_j}. \quad (5)$$

O conjunto dos i_{nn} representa as configurações acessíveis ao redor do tempo t . Utiliza-se aqui a idéia de ergodicidade tempo dependente [29]. Assim, a equação (4), em conjunto com as equações (5), pode ser substituída por

$$\frac{d}{dt}A(t) = \sum_j r_j^+ P_j(t) A_j^\dagger - \sum_j r_j^- P_j(t) A_j. \quad (6)$$

$A_j^\dagger$ é interpretada como a fonte de A_j , ou seja, à medida que $A_j^\dagger$ aumenta, A_j diminui e vice-versa [27].

A equação (3) pode ser aproximada com a forma discreta

$$\frac{\Delta A_{ij}}{\Delta t_k} \approx \sum_{(ij)} w_{j \rightarrow i} P_j(t_k) \Delta A_{ij}, \quad (7)$$

e, a cada passo k (um passo aqui significa uma simples tentativa de mudar o estado do sistema) teremos um incremento de tempo

$$\Delta t_k = \frac{1}{w_{t_k}^{\max} N}, \quad (8)$$

em que $w_{t_k}^{\max} = \sup \{w_{j \rightarrow i}\}$ e N é o número de elementos interagentes para a constituição de um novo estado. 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 à resolução correta da equação (7) se for aproximado um processo ideal ($k \rightarrow \infty$) [27].

Uma outra maneira de estimar o tempo de espera seria representá-lo através de uma média. Isso pode ser feito retomando a equação (4). Nela, quando estamos em um estado j , cada transição pode ser aproximada por $\Delta A / \Delta t \approx \pm \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^{\pm} a$, e, da equação (5), temos $r_j^+ A_j^\dagger \equiv a \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^+$ e $r_j^- A_j \equiv a \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^-$. Balanceando essas equações por

um fator f_e^k que é o número de eventos do tipo e que ocorrem num dado intervalo de tempo ao redor de t_k pelo número total de eventos, i.e., $f_e^k = n_e^k / \sum_e n_e^k$, teremos

$$\Delta t_k^e = \frac{f_e^k a}{r_j^e A_j^e}, \quad (9)$$

sendo que $r_j^e \in \{r_j^+, r_j^-\}$ e $A_j^e \in \{A_j^\dagger, A_j\}$. Essas quantidades vão depender se e é um evento de aumento ou diminuição da A . Relembramos que para a obtenção da equação (9) utilizamos a relação $\Delta A = \Delta A_{ij} = \pm a$. f_e^k deve obedecer a relação $\sum_e f_e^k = 1$. É possível mostrar que esse procedimento leva ao mesmo resultado da equação (8), uma vez que [27]

$$\Delta t_k = \sum_e \sum_{i_{nn}} \left(\frac{w_{j \rightarrow i_{nn}}^e}{w_{t_k}^{\text{máx}}} \right) \left(\frac{1}{N} \right) \Delta t_k^e. \quad (10)$$

Para rodar o procedimento Monte Carlo dinâmico, em uma dada configuração j , um elemento interagente é escolhido com uma probabilidade de $1/N$, e então tenta-se mudar seu *status* com a forma [30]

$$H_{j \rightarrow i_{nn}}^e = \frac{w_{j \rightarrow i_{nn}}^e}{w_{t_k}^{\text{máx}}}, \quad (11)$$

procedendo-se com a estimativa de Δt_k^e e o aumento ou redução de A . A escolha de $H_{j \rightarrow i_{nn}}^e$ faz com que se crie um processo de hierarquia que reproduz a frequência correta de eventos em um tempo t_k . É importante dizer que diferentes simulações geram diferentes tempos t_k no mesmo passo k . Podemos, contudo, considerar apenas os passos k' em que uma nova configuração é aceita, e fazendo uma interpolação linear do conjunto de dados de cada simulação, podemos amostrar médias no mesmo ponto do tempo [27]. Esse procedimento será mostrado no apêndice A .1. Omitiremos a partir daqui o índice k , e sempre que nos referirmos ao incremento de tempo, será considerado que um novo estado j do sistema foi aceito.

Outra abordagem comumente utilizada é estimar o tempo de espera *a priori*, retirando-o de uma distribuição de Poisson [30–34]. Aqui, o tempo de espera é dado por

$$\Delta t_p = - \frac{\ln(\xi)}{\sum_e \sum_{i_{nn}} w_{j \rightarrow i_{nn}}^e}, \quad (12)$$

em que ξ é um número aleatório tomado equiprovavelmente entre 0 e 1. Esse método têm sido usado algumas vezes no contexto do crescimento de tumores [22, 36]. Apesar de ser

possível mostrar que ele também gera uma solução para a equação mestra [32], restringe-se ao fato de assumir uma distribuição de probabilidades, ao passo que a abordagem de [27] pode gerar qualquer distribuição ao longo da simulação, e para nossos propósitos aqui, ela torna-se mais uma medida de interesse.

2.3 O modelo de crescimento

Começamos nossa modelagem mostrando na figura 2 o ajuste para os dados experimentais (círculos fechados pretos) [10] de uma equação (linha sólida vermelha) do tipo

$$\omega(t) = \alpha - \frac{\beta}{1 + \exp[\gamma(t - t_c)]}. \quad (13)$$

sendo $\omega(t) = dr(t)/dt$ a taxa de variação do raio médio, e com $\alpha > \beta$. Essa equação nos diz que inicialmente a taxa de crescimento é menor e constante $\omega(t) = \omega_0 = \alpha - \beta$ (linha inferior tracejada em azul), e reflete o fato de que as células não crescem imediatamente após a adição das mesmas à placa de cultura. Após certo tempo crítico t_c (note que $\omega(t_c) = \alpha - \beta/2$), a curva muda seu comportamento para uma taxa novamente constante (linha superior tracejada em azul), sendo γ um parâmetro que determina o quão rápido a taxa muda de $\alpha - \beta$ para α . A solução analítica da equação (13), com a condição $R(t = 0) = R_0$ é

$$R(t) = R_0 + \ln \left\{ \frac{\exp[-\gamma(t - t_c)] + 1}{\exp(\gamma t_c) + 1} \right\} + \alpha t. \quad (14)$$

Assim, temos duas equações fenomenológicas para o crescimento de tumores monocamadas. Elas refletem o fato de que, dada as condições ideais de cultivo, e após ultrapassada a transição $\alpha - \beta \rightarrow \alpha$, o raio das colônias cresce linearmente durante todo o restante do período de observação.

2.4 Monte Carlo dinâmico aplicado ao modelo

Para a implementação computacional, discretizamos o espaço através de uma rede de $M = L \times L$ sítios, e para nossos propósitos aqui, assumimos que cada um deles (n) pode assumir apenas os *status* tumoral T (representando uma única célula) ou vazio V , e localizar-se à uma distância $R_n(\hat{i}, \hat{j})^3$ do sítio central. Pensamos na probabilidade p_0

³ $R_n = \sqrt{\hat{i}^2 + \hat{j}^2}$, sendo que $n = T$ caso se trate de uma célula tumoral, e $n = V$ caso nos interessemos pela posição de um sítio vazio.

Figura 2: A taxa de crescimento de células HT-29 cultivadas *in vitro* (círculos pretos unidos por segmentos de reta) [10] e o ajuste sigmoidal (linha vermelha). As linhas tracejadas azuis mostram a taxa de crescimento inicial ($w(t \approx 0) = \alpha - \beta$) e sua saturação ($w(t \gg 0) = \alpha$). A obtenção dessa taxa é explanada no apêndice A .2.

de que um sítio vazio q seja preenchido dado que ele tenha apenas um sítio tumoral ao seu lado. $(1 - p_0)^{\eta_q}$ será então a probabilidade de q não ser ocupado em uma vizinhança de η tumores. Assim, a probabilidade por unidade de tempo de que q seja ocupado será $g_q \propto 1 - (1 - p_0)^{\eta_q}$ [35]. Podemos assumir que, efetivamente, $p_0 = p_0(t) = w(t)/\alpha$. Teremos, portanto, a probabilidade de transição por unidade de tempo

$$g_q(t) = b \left\{ 1 - \left[\left(\frac{\beta}{\alpha} \right) \frac{1}{1 + \exp[\gamma(t - t_c)]} \right]^{\eta_q} \right\}, \quad (15)$$

em que b é a frequência com que ocorre uma duplicação na colônia. Note que nessa abordagem, a chance de uma célula se reproduzir é proporcional à chance de um vazio se tornar ocupado.

Assim, em cada intervalo de tempo Δt , admitindo que apenas um evento ocorra, i.e., $a = |\Delta n_T| = |\Delta n_V| = 1$, podemos então escrever uma equação do tipo (6) para esse problema com a forma

$$\frac{d}{dt} n_T(t) = \sum_j \langle g(t) \rangle_{n_0^{(j)}} P_j(t) n_0^{(j)}, \quad (16)$$

em que $\sum_j(\dots)$ representa a soma sobre todas as possíveis configurações do sistema, acessíveis no tempo t . $\langle g(t) \rangle_{n_0^{(j)}} = \sum_{q=1}^{n_0^{(j)}} g_q(t)/n_0^{(j)}$ representa a taxa mesoscópica de aumento do número de células; com a mesma condição inicial, a probabilidade $P_j(t)$ é gerada após rodarmos $\mathcal{N}$ simulações independentes; e n_0 é o número de sítios vazios na interface colônia-meio (alguns desses sítios podem estar no interior da colônia). Aqui, $M = n_T + n_V$, sendo n_V o número de sítios vazios (n_0) que contribuem para o crescimento de n_T ($\eta_q > 0$), somado com aqueles ($\tilde{n}_V$) que não contribuem ($\eta_q = 0$). Assim, n_0 é interpretado como fonte de n_T . Negligenciamos a transição $T \rightarrow V$ (morte celular), pois as células dispõem de suprimento adequado de nutrientes, e o decréscimo na taxa de crescimento seria mínimo, uma vez que as células adjacentes logo tomariam o espaço deixado pela célula morta [21].

O tempo médio de espera entre o aumento de duas células pode ser estimado como

$$\Delta t^{(n_T)} = \frac{1}{\sum_{q=1}^{n_0^{(j)}} g_q(t)}. \quad (17)$$

O super-escrito (n_T) denotará o tempo médio de espera entre a $(n_T - \Delta n_T)$ e a (n_T) -ésima célula. Finalmente, para resolver corretamente a equação (16) deveremos utilizar a hierarquia dinâmica da equação (11) através da forma

$$H_q^{(j)} = \frac{1 - (1 - p_0)^{\eta_q}}{1 - (1 - p_0)^{\eta_{\text{máx}}}}, \quad (18)$$

com $\eta_{\text{máx}} = 8$. Operacionalmente, tenta-se mudar o *status* de um sítio q com a probabilidade H_q . Caso essa nova configuração seja aceita, o tempo é atualizado, $t \rightarrow t + \Delta t^{(n_T)}$; o número de células aumenta $n_T \rightarrow n_T + \Delta n_T$, e um novo raio médio é calculado por meio de $\langle R(t) \rangle = d_0 \sqrt{2} R_g$, com o raio de giro $R_g = \sqrt{(1/n_T) \sum_{T=1}^{n_T} (R_T - R_{cm})^2}$, sendo $R_{cm} = (1/n_T) \sum_{T=1}^{n_T} R_T$ o raio do centro de massa, e d_0 o diâmetro de uma única célula [21].

O procedimento de escolha de um sítio é o que se tem chamado *processo* de Eden [19]. Devido aos diferentes tipos de elementos interagentes N , forma-se os subtipos do processo de Eden [37]. São três os principais: (A) aquele que leva em conta todos os sítios vazios q , i.e., $N = n_0$, fazendo com que a chance de escolha de um sítio seja $1/n_0$; (B) que considera todas as ligações de cada célula, ou seja, $N = \sum_{q=1}^{n_0} \eta_q$; e (C) que conta a chance de escolha como $N = n_T^{(a)}$, em que $n_T^{(a)}$ é o número de células tumorais na borda da colônia. Nas versões (A) e (B) os sítios escolhidos são aqueles em que se depositará uma nova célula, ao passo que em (C), há ainda a escolha do sítio vazio que se depositará

a prole, fazendo com que a probabilidade de escolha de um q seja de $1/[n_T^{(a)}(\eta_{m\acute{a}x} - \eta_q)]$. Na aproximação para um círculo [10–12], $n_T^{(a)} \propto R$, e $n_0 \propto R + \delta R$. Assumindo que $R \gg \delta R$, então teremos $n_T^{(a)} \approx n_0$. Isso também justifica o fato de termos assumido $p_0 = p_0(t) = \omega(t)/\alpha$ na equação (15). Neste trabalho, a probabilidade de reprodução será dada por $H_q^{(j)}/n_0^{(j)}$, em tempos pequenos, e depois será dada simplesmente por $1/n_0^{(j)}$, uma vez que $H_q^{(j)} \rightarrow 1$ quando $t \gg 0$.

Capítulo 3

Resultados e Discussões

Utilizamos em nossas simulações $L = 500$ sítios, e $1/L \equiv d_0 = 10 \mu\text{m}$ [21]. Inicialmente uma única célula era colocada no centro da rede. A média amostrada em cada figura foi tomada de $\mathcal{N} = 200$ simulações, com erros estimados da ordem de 1%, o que faz com que nas figuras, as barras de erro sejam menores que os símbolos dos parâmetros medidos. As distribuições de tempos médios de espera foram construídas com $\mathcal{N} = 10^6$ trajetórias. A qualidade dessas simulações esteve ligada à escolha do gerador de números aleatórios, e neste trabalho escolhemos o gerador de L'Ecuyer, cuja sequência tem um período da $\mathcal{O}(10^{18})$ [38], dito o gerador *perfeito* de números aleatórios [39]. Utilizamos uma quantidade na $\mathcal{O}(10^5)$ de número aleatórios em uma simulação típica, o que nos faz considerar que todas as trajetórias são independentes. Consideramos aqui interações entre os primeiros e os segundos vizinhos, i.e., $0 \leq \eta_q \leq 8$. A escolha de $\eta_{\text{máx}} = 8$ foi feita pois rapidamente a colônia criava um buraco (em células HT-29, o número de células mínimo para surgir o primeiro buraco era de $n_T = 53 \pm 2$ células⁴). Mesmo a atualização periódica de $\eta_{\text{máx}}$ em termos da configuração j produziu os mesmos resultados obtidos para $\eta_{\text{máx}} = 8$.

A figura 3 mostra o perfil que traçamos com o auxílio do software *ImageJ*. Utilizamos $\mathcal{L}_x = 1340$ e $\mathcal{L}_y = 1024$, em $\mathcal{E} = 100 \mu\text{m}$. É interessante notar que em uma colônia grande (essa possui $R_c = 389 \mu\text{m}$) a aproximação circular é muito válida [10–12]. Mas, a rugosidade que aparece nas bordas se opõe à aproximação macroscópica de um círculo, uma vez que a fractalidade pode indicar uma agressividade maior ou menor [40–44], dependendo do tipo de tumor estudado. A figura 4 mostra a morfologia celular das linhagens que cultivamos *in vitro*. Devido às diferentes localizações nativas, elas mostram diferenças entre si, e isso deve ser refletido na fractalidade e na evolução temporal das colônias.

3.1 As curvas de crescimento

Na figura 5 mostramos a evolução temporal do raio médio de dados da literatura [10]. O ajuste com a equação (14), concordou precisamente com os dados experimentais (os pa-

⁴Para nos referirmos às medidas experimentais do raio e do número de células, nos reportaremos à R_c e N_c , ao passo que na simulação teremos n_T e R , essencialmente porque $N_c \neq n_T$ na maioria dos resultados.

Figura 3: O perfil bidimensional de uma colônia de células HCT-15 com um tamanho de $389 \mu\text{m}$. A linha sólida preta mostra o perfil traçado, e a linha tracejada vermelha mostra a aproximação do raio médio por uma circunferência.

râmetros utilizados para o ajuste são mostrados na tabela 1). A simulação MCD também esteve em perfeita concordância com a equação analítica e os resultados experimentais. Podemos concluir que esse tipo de simulação reflete corretamente os acontecimentos, pelo menos na escala mesoscópica, o que a torna uma ferramenta em potencial para o estudo mais aprofundado de populações tumorais. Podemos sustentar uma hipótese de cooperação através da figura 2, pois o ajuste sigmoidal (13) é, em geral, um sinal de que um evento deste tipo acontece [45].

Assim como na figura 5, notamos nas figuras de 6 à 9 que a abordagem teórica e na figura 10 a simulação MCD concordam muito bem com os experimentos *in vitro*. Os dados experimentais sofreram um deslocamento temporal para colapsarem todos na mesma curva, e utilizamos $R_0 = 0$. Isso pôde ser feito, pois não sabemos exatamente quando as células aderiram à placa de cultura, o que pode ter atrasado ou adiantado o crescimento de colônias diferentes. Esses comportamentos, no entanto, seguem a mesma curva (14). Os parâmetros utilizados para os ajustes e as simulações estão mostrados na tabela 1. Essas figuras mostram três fases do crescimento do raio médio [22]. Na primeira delas, o raio cresce à uma taxa de $\alpha - \beta$, relacionada com o fato de que as células estão à baixa densidade, e as ligações entre elas podem ser fracas, o que faz a taxa de crescimento ser menor nesse regime. Podemos generalizar a taxa anterior com a forma $\alpha - h\beta$, sendo

Figura 4: Morfologia das linhagens celulares que cultivamos *in vitro*. Em (a) temos uma colônia de HeLa em uma escala de $\mathcal{E} = 100 \mu\text{m}$. (b) mostra um agregado de HCT-15 com $\mathcal{E} = 200 \mu\text{m}$. Na figura (c) mostramos uma colônia da linhagem HN-13 com $\mathcal{E} = 50 \mu\text{m}$, e na parte (d) temos células U-251 com $\mathcal{E} = 100 \mu\text{m}$.

Figura 5: A evolução temporal do raio médio (círculos pretos), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vermelha) e a simulação MCD (círculos abertos). Mostramos também a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 1,93 \mu\text{m/h}$. Os dados utilizados para o ajuste e simulação constam na tabela 1.

Figura 6: A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células HeLa (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 2,63 \pm 0,05 \mu\text{m/h}$.

Figura 7: A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células HCT-15 (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 2,08 \pm 0,04 \mu\text{m/h}$.

Figura 8: A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células HN-13 (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 3,3 \pm 0,1 \mu\text{m/h}$.

Figura 9: A evolução temporal do raio médio de várias colônias de células U-251 (figuras geométricas coloridas), o ajuste com a equação (14) (linha sólida vinho) e a velocidade média da fase linear de expansão do raio (linha tracejada) com $\langle v \rangle = 1,86 \pm 0,04 \mu\text{m/h}$.

$h = 1/[1 + \exp(-\gamma t_c)]$. Para as células HT-29, HeLa e HN-13, $h \rightarrow 1$, ao passo que para HCT-15 e U-251, $h \approx 0,96$ e $h \approx 0,94$ respectivamente. O parâmetro h é importante para as células HCT-15, pois o ajuste com a equação (14) resultou em $\alpha = \beta$, o que levaria ω_0 à 0, e faria com que o sistema permanecesse estático. A segunda fase é caracterizada por uma transição entre um comportamento linear (menor) e outro (maior). Ela pode estar ligada à formação de ligações mais fortes entre as células, que ao se comunicarem, vão se organizando da melhor maneira possível [46]. A terceira fase é caracterizada por uma taxa α , e representa o comportamento linear superior. Esse comportamento, por sua vez, está relacionado principalmente com a reprodução pelas bordas da colônia [10]. Essa fase também é conhecida em esferóides [21] e tumores *in vivo* [47]. Note também que, $\langle v \rangle \neq \alpha$, pois para o cálculo de $\langle v \rangle$, fizemos um ajuste linear apenas com os últimos pontos de cada gráfico. Encontramos uma divergência dos dados da literatura [10] para a linhagem HeLa, uma vez que esperava-se $\langle v \rangle = 1,34 \pm 0,01 \mu\text{m/h}$, e obtivemos $\langle v \rangle = 2,63 \pm 0,05 \mu\text{m/h}$. Isso deve estar relacionado com as condições de cultivo, e como veremos mais adiante, a dimensão fractal também foi afetada.

O comportamento cooperativo deve estar relacionado, entre outras coisas, com o fato das células se organizarem da melhor maneira possível para se prevenir de um possível agente anti-tumoral [46]. As células mais frágeis se localizam nas bordas da colônia.

Figura 10: A expansão do raio médio ajustado pela equação (14) (linha sólida vermelha) para os dados experimentais (veja as figura de 6 à 9) e a simulação MCD (círculos abertos). Os parâmetros utilizados para o ajuste e a simulação estão na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros característicos das linhagens celulares, usados para os ajustes dos dados experimentais e simulações.

Linhagem	b	α	β	γ^{-1}	t_c	$\langle v \rangle$
HT-29	4,2	1,96 (0,01)	1,24 (0,03)	58 (10)	459 (8)	1,93 (0,01)
HeLa	8,8	4,4 (0,5)	3,8 (0,6)	54 (5)	294 (16)	2,63 (0,05)
HCT-15	6,4	2,9 (0,6)	2,9 (0,7)	62 (18)	166 (20)	2,08 (0,04)
HN-13	7,8	3,6 (0,1)	2,5 (0,1)	16 (2)	140*	3,3 (0,1)
U-251	5,7	2,6 (0,7)	1,9 (0,8)	69 (21)	214 (46)	1,86 (0,04)

As unidades de medida são células/h para $b \times 10^2$, $\mu\text{m/h}$ para α , β e $\langle v \rangle$, e h para γ^{-1} e t_c . Os erros nas medidas estão mostrados entre parênteses. *A linhagem HN-13 tem poucos dados, então ajustamos o parâmetro t_c em um valor exato, fazendo com que o erro nos outros parâmetros fossem os menores possíveis.

Elas são mais frágeis pois estão em fase de reprodução, e, estudos mostram que quando as células estão nessa fase, uma melhor resposta dos agentes quimioterápicos e radioterápicos é conseguida [10]. Assim, elas agem como *escudos* para as células internas, e à medida que a colônia cresce, mais células estão protegidas [46]. Retirada as células reprodutivas, as células da camada imediatamente adjacente voltam à fase de reprodução [6], ou seja, elas podem garantir a sobrevivência da colônia. Essa cooperatividade seria baseada então na troca proteção-sobrevivência.

3.2 As distribuições de tempos médios de espera

Nós comparamos na figura 11 o MCD com uma simulação que retirava os tempos de espera de uma distribuição de Poisson, e outra que calcula iterativamente a evolução temporal das colônias de células HT-29. O procedimento MCD foi descrito na seção 2.4; o mesmo foi feito para a estimativa por um processo de Poisson, mas utilizando o tempo como na equação (12), isto é, $\Delta t_p^{(\text{nr})} = -\ln(\xi) / \sum_{q=1}^{(n_0)} g_q(t)$ à cada configuração j ; o cálculo iterativo (método de Euler estocástico) da evolução temporal das colônias foi feito aproximando-se $R(t + \Delta t) \approx R(t) + \omega(t)\Delta t$, com Δt tirado da equação (8), $\Delta t = 1/(bn_0)$, dado que $(1 - p_0)^{\eta_{\text{máx}}} \approx 0$ a maior parte do tempo. Obtivemos também a distribuição de $\Delta t_p^{(25)}$, na figura 12, e ajustamos os dados com uma curva do tipo $z \exp[-\Delta t_p^{(25)}/\tau]$, obtendo $z = 495.100 \pm 500$ observações, e $\tau = 1,017 \pm 0,002$ horas. Como pode-se ver na figura 11, todos os métodos coincidem. Isso era esperado para o método de Euler estocástico, como provamos na equação (10). No entanto, para a estimativa do tempo de espera através da equação (12), a distribuição deve ser conhecida *a priori*. Assim, apesar da coincidência dos resultados entre as metodologias, acreditamos que a retirada dos tempos por um processo de Poisson é apenas uma aproximação para a solução da equação (16),

Figura 11: O raio médio $R_T(t)$ versus o tempo. Os círculos abertos indicam a simulação MCD; Os quadrados pretos representam a simulação MCD com tempo estimado de um processo de Poisson; 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.

mas que não reflete as características reais do processo que está ocorrendo.

As figuras 13 e 14 mostram as distribuições $\rho(u)$ de tempos médios de espera para algumas configurações celulares. Na primeira, com $u = u' = \Delta t^{(25)}$ ajustamos uma curva do tipo $\rho_l(u) = (\mathcal{A}/u) \exp \{-\mathcal{B}[\ln(u) - \ln(\langle u \rangle)]^2\}$ (linha tracejada azul) e outra do tipo $\rho_g(u') = \mathcal{A}' \exp[-\mathcal{B}'(u' - \langle u' \rangle)^2]$ (linha sólida vermelha). Os parâmetros encontrados foram de $\mathcal{A} = 168.700 \pm 600$ observações-hora, $\mathcal{B} = 35,4 \pm 0,3$, $\langle u \rangle = 1,023 \pm 0,002$, $\mathcal{A}' = 166 \times 10^3 \pm 3 \times 10^3$ observações, $\mathcal{B}' = 35 \pm 1 \text{ h}^{-2}$ e $\langle u' \rangle = 1,019 \pm 0,002$ horas. Na segunda, plotamos as distribuições normalizadas $f_l(u) = \rho_l(u)/\mathcal{A}$ e $f_g(u) = \rho_g(u)/\mathcal{A}$, contra $u = u' = \Delta t^{(n_T)}/\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$, para $n_T = 10^2, 10^3$ e 10^4 células. Encontramos os valores de $\mathcal{B} = 339,5 \pm 0,5$ e $\mathcal{B}' = 340 \pm 3$ para $n_T = 10^2$ células; $\mathcal{B} = 114,4 \pm 0,2$ e $\mathcal{B}' = 115 \pm 2$ para $n_T = 10^3$ células; e $\mathcal{B} = 47,8 \pm 0,2$ e $\mathcal{B}' = 48 \pm 2$ para $n_T = 10^4$ células.

As figura 15 e 16 mostram as distribuições $\rho_l(u)$ e $f_l(u)$ para simulações com os parâmetros ajustados pelos dados experimentais que obtivemos. Na primeira, com $u = \Delta t^{(25)}$, ajustamos as distribuições de células HeLa (linha vermelha), HCT-15 (linha verde), HN-13 (linha azul) e U-251 (linha rosa). Obtivemos $\mathcal{A} = 82.600 \pm 300, 76.500 \pm 300, 50.500 \pm 100$ e 68.900 ± 200 observações-hora e $\mathcal{B} = 33,8 \pm 0,3, 45,5 \pm 0,4, 35,2 \pm 0,2$ e $36,9 \pm 0,2$ respectivamente. Os valores de $\langle \Delta t^{(25)} \rangle$ estão na tabela 2, juntamente com valores de

Figura 12: A distribuição de $\Delta t_p^{(25)}$ (círculos pretos) e o ajuste exponencial (linha sólida vermelha) com os parâmetros das células HT-29.

Figura 13: A distribuição de tempos de espera estimados com a equação (17) para células HT-29 na configuração 25 células.

Figura 14: A frequência normalizada contra $\Delta t^{(n_T)} / \langle \Delta t^{(n_T)} \rangle$ nas configurações $n_T = 10^2, 10^3$ e 10^4 células. Ajustamos curvas lognormais (linhas tracejadas) e curvas gaussianas (linhas sólidas).

outras configurações de n_T . Na segunda figura, mostramos a distribuição $f_l(u)$, com $u = \Delta t^{(2000)} / \langle \Delta t^{(2000)} \rangle$. Aqui, obtivemos $\mathcal{B} = 145,5 \pm 0,4$ (linha tracejada vermelha), $171,4 \pm 0,3$ (linha tracejada verde), $169,7 \pm 0,3$ (linha tracejada azul) e $164,8 \pm 0,3$ (linha tracejada rosa), para as linhagens HeLa, HCT-15, HN-13 e U-251 respectivamente.

Tabela 2: Tempo médio de espera das linhagens em algumas configurações de células.

Linagem	$\langle \Delta t^{(25)} \rangle$	$\langle \Delta t^{(100)} \rangle$	$\langle \Delta t^{(500)} \rangle$	$\langle \Delta t^{(1000)} \rangle$	$\langle \Delta t^{(2000)} \rangle$
HT-29	1,023	0,424	0,164	0,109	0,067
HeLa	0,995	0,392	0,117	0,062	0,032
HCT-15	0,976	0,288	0,078	0,046	0,028
HN-13	0,648	0,267	0,080	0,038	0,021
U-251	0,830	0,319	0,102	0,060	0,036

Medidas em h. Os erros são $\leq 0,001$ horas.

Para testar se as curvas se ajustam às distribuições ρ_l e ρ_g , pode-se utilizar um método chamado de *probability plot*⁵. Ele indica o quanto a distribuição se aproxima de uma distribuição conhecida. Quanto mais próximos os dados estão de uma reta, melhor é o ajuste à distribuição. Na figura 17 (a) e (c) mostramos o comportamento de células HT-29 em $n_T = 25$ e 30.000 células. Nas figuras 17 (b) e (d) foi tomado o logaritmo da quantidade

⁵Veja o apêndice B .

Figura 15: Distribuição dos intervalos de tempo, com os parâmetros ajustados pelos dados experimentais que obtivemos, em $\Delta t^{(25)}$ para as células HeLa (quadrados), HCT-15 (círculos), HN-13 (triângulos), U-251 (estrelas) e os respectivos ajustes com curvas log-normais (linhas sólidas).

Figura 16: Mostramos aqui a frequência normalizada *vs.* $\Delta t^{(2000)} / \langle \Delta t^{(2000)} \rangle$ (figuras geométricas) e os ajustes log-normais (linhas tracejadas), da mesma maneira que na figura 15.

de interesse, o que significa testar o ajuste para uma distribuição log-normal. Também mostramos no apêndice B o comportamento das linhagens celulares que cultivamos *in vitro*, e elas geraram os mesmos resultados. Nas figuras em que n_T é pequeno ajustaram-se melhor à uma reta os dados do logaritmo, e para n_T grande, a distinção entre a normal e a log-normal foi menor, mas ainda parece-nos que a log-normal se ajusta melhor aos dados.

É interessante notar que, de uma distribuição de Poisson, poderíamos pensar na independência dos eventos envolvidos nesse processo. Mas, como vimos, curvas log-normais e Gaussianas se ajustam bem aos nossos dados, quando utilizamos os tempos de espera da equação (17), 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 $\Delta t^{(\text{nr})}$, 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 à probabilidade de escolha de um sítio q , e isso não faz com que $\Delta t^{(\text{nr})}$ mude consideravelmente dependendo de q . Mas, as interações locais não deixam de ter importância nessa região, especialmente para a fractalidade da colônia.

As figuras 18 e 19 mostram as médias dos incrementos de tempo em vários tamanhos da colônia de células, plotados em um gráfico di-log. Na primeira, temos o ajuste para células HT-29, com uma inclinação μ de $0,69 \pm 0,02$. Na segunda, ajustamos retas para células HeLa (linha vermelha), HCT-15 (linha verde), HN-13 (linha azul) e U-251 (linha rosa), gerando $\mu = 0,78 \pm 0,03$, $0,81 \pm 0,02$, $0,78 \pm 0,04$ e $0,72 \pm 0,01$ respectivamente. Podemos conjecturar que o valor μ caracterize o crescimento das linhagens celulares aderentes, devido ao seu intervalo estreito $0,69 \leq \mu \leq 0,81$. Assim, a relação $\langle \Delta t^{(\text{nr})} \rangle \propto n_T^{-\mu}$ deve ser característico dessas células crescendo em monocamada. Alguém pode tentar filmar, ou fotografar em curtos espaços de tempo para tentar avaliar experimentalmente essa característica. Novos estudos devem ser feitos nessa direção.

3.3 As dimensões fractais e as deformações celulares

Obtivemos a dimensão fractal⁶ (d_f) de vários clusters (com histórias diferentes) como mostramos na figura 20. Utilizamos aqui $\mathcal{L}_x = 1400$ e $\mathcal{L}_y = 1024$ para as colônias de HeLa e HCT-15, que também estavam todas em escala $\mathcal{E} = 100 \mu\text{m}$; para as células HN-13 utilizamos, $\mathcal{L}_x = \{516, 696, 810, 702, 864\}$, e $\mathcal{L}_y = \{540, 708, 852, 622, 972\}$, respectivamente,

⁶Veja o apêndice C .

Figura 17: *Probability Plot* de células HT-29 para duas configurações de células. Em (a) temos a probabilidade por $\Delta t^{(25)}$; em (b) mostramos a probabilidade *versus* $\ln [\Delta t^{(25)}]$; em (c) plotamos a probabilidade contra $\Delta t^{(30000)} / \langle \Delta t^{(30000)} \rangle$; e (d) mostra a probabilidade vs. $\ln [\Delta t^{(30000)} / \langle \Delta t^{(30000)} \rangle]$. Em todas as figuras, a linha sólida vermelha é um ajuste linear.

Figura 18: Ajuste linear para $\log_{10} [\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle]$ por $\log_{10} (n_T)$ para células HT-29.

Figura 19: Ajuste linear para $\log_{10} [\langle \Delta t^{(n_T)} \rangle]$ por $\log_{10} (n_T)$ para linhagens HeLa (quadrados), HCT-15 (círculos), HN-13 (triângulos) e U-251 (estrelas).

Figura 20: O número de caixas normalizado pelo tamanho da caixa para várias colônias grandes escolhidas ao acaso. As linhas tracejadas mostram as dimensões $d_f = 1,14 \pm 0,01$ para células HeLa (a); $d_f = 1,17 \pm 0,01$ para HCT-15 (b); $d_f = 1,12 \pm 0,03$ (c) para HN-13 e $d_f = 1,21 \pm 0,01$ para as U-251 (d).

Figura 21: O raio médio plotado contra o número de células (círculos pretos) e o ajuste com uma curva do tipo $R_c(t) = a[N_c(t) - \tilde{N}_0]^{1/2} + \tilde{R}_0$ (linha vermelha). Os parâmetros ajustados foram $a = 13,5 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{célula}^{1/2}$, $\tilde{N}_0 = 3,95 \pm 0,05$ células e $\tilde{R}_0 = 36 \pm 1 \mu\text{m}$.

todas com $\mathcal{E} = 200 \mu\text{m}$; nas células U-251, utilizou-se $\mathcal{L}_x = \{1024, 680, 750, 750, 654\}$, $\mathcal{L}_y = \{786, 512, 756, 756, 690\}$ em $\mathcal{E} = \{200, 50, 200, 100, 200\} \mu\text{m}$. A dimensão fractal variou entre 1,12 e 1,21, o que concorda com resultados da literatura em culturas de células com crescimento radial [10–12].

Para a medida do raio médio pela contagem do número de células Hela foi ajustado uma curva do tipo $R_c(t) = a[N_c(t) - \tilde{N}_0]^{1/2} + \tilde{R}_0$, sendo $\tilde{N}_0 = N_c(t = 0)$ e $\tilde{R}_0 = R_c(t = 0)$, como mostra a figura 21. Esse resultado foi gerado para uma colônia específica. Apesar de não mostrado aqui, outras colônias foram medidas, e o ajuste seguiu a mesma curva, alterando-se apenas os parâmetros a , $\tilde{N}_0$ e $\tilde{R}_0$. Esse ajuste é mais geral que a relação $R_c \propto N_c^{1/2}$ comumente aceita [11, 12], especialmente em tempos pequenos. Ela reflete o fato de que, inicialmente a colônia tem um formato desconhecido (observe a figura 22a), e também tem buracos de tamanhos que são da ordem do tamanho das células. A medida que a colônia cresce (figura 22b), suas células mais internas vão diminuindo de tamanho, e o empacotamento em tamanhos grandes gera uma forma mais circular (figura 22c). É interessante notar que o procedimento MCD (16) como propomos, está de acordo com uma simetria circular, ao menos em tempos grandes, pois, em uma dada configuração j nesse limiar teremos, $dn_T(t \gg 0)/dt = b\langle n_0 \rangle$, o que concorda com as escolhas de $n_T \propto R^2$ (observe a figura 23) e $n_0 \propto R$. A figura 24 mostra essa relação, pelo menos de forma

aproximada, uma vez que a maioria dos sítios n_0 tendem a ficar na borda da colônia.

A figura 25 mostra o perfil de uma colônia de células HeLa em vários tempos e com vários tamanhos. Todos os perfis foram traçados utilizando $\mathcal{L}_x = 1400$ e $\mathcal{L}_y = 1024$, em $\mathcal{E} = 100 \mu\text{m}$. Figuras como essa já são conhecidas na literatura [10–12]. O aspecto das colônias é como uma ampliação, ou seja, tanto a colônia grande quanto a colônia pequena são bem parecidas. Esses resultados mostram que as dimensões fractais podem realmente caracterizar uma dada linhagem celular [40–44], uma vez que escolhemos colônias diferentes e os resultados de d_f se aproximaram todos do mesmo valor para uma mesma linhagem. Existem, no entanto, indicações de que as dimensões são menores quando as colônias são menores [12, 44], mas isso necessita de uma investigação maior, e os nossos dados não permitiram avançar nesse campo. Algumas implicações médicas podem surgir desses *insights*. Acreditamos também que a d_f esteja ligada com às condições de cultivo, uma vez que dados da literatura [10] mostram que a linhagem HeLa tem $d_f = 1,30 \pm 0,03$ quando cultivada com meio RPMI 1640, e os nossos resultados são de $d_f = 1,14 \pm 0,01$ com meio de cultura DMEM.

3.4 As Limitações

Experimentalmente, nossa principal limitação foi no processo de contagem de células. Esse processo pôde ser feito manualmente para colônias pequenas, mas em colônias grandes tornou-se impraticável, devido a quantidade e ao tamanho de algumas células. A produção de programas específicos para isso deve ser um alvo para experimentos futuros, pois poderemos simular e comparar diretamente o número de células de uma colônia ao invés de fazer toda a transformação entre R e n_T que temos proposto aqui. Além disso, os perfis foram traçados na mão, e, portanto, estiveram sujeitos à erros no procedimento. Apesar do microscópio com contraste de fase que usamos, não conseguimos uma boa resposta para traçar o contorno em softwares específicos. Talvez esse problema possa ser resolvido com o uso de microscópios equipados com *DIC* (*differential interference contrast*), que realça o contorno, dando a sensação de tridimensionalidade na amostra. Outra possibilidade é a filmagem (*time lapse*) da evolução das células, podendo corroborar a idéia do tempo médio de espera de tumores monocamadas ser caracterizada pelo parâmetro μ .

Quanto ao modelo, ele não nos permitiu investigar qual o comportamento das células individuais, uma vez que encaramos a taxa de crescimento como um campo médio de interações [23] sobre os espaços vazios. A idéia é no futuro alterar o procedimento de escolha de Eden [37]. Não foi possível também reproduzir as dimensões fractais, nem o comportamento do raio médio com o número de células, pois as células foram encaradas

Figura 22: A evolução da conformação de uma colônia de células HeLa desde um formato desconhecido até algo próximo do circular. Em (a) temos uma colônia com 8 células e $R_c = 80,33 \mu\text{m}$ após 28,9 horas de cultivo. Observamos a formação de buracos, no interior das colônias, da ordem de grandeza do tamanho das células; em (b) mostramos a colônia com 97 células e $R_c = 191,79 \mu\text{m}$ em 126,7 horas de experimento. Aqui a colônia ainda mantém um formato desconhecido, mas já sem a presença de buracos; (c) mostra a colônia com $R_c = 392,14 \mu\text{m}$ após 213,3 horas de cultivo. Nesse momento ela já tem o formato que pode ser aproximado bem por um círculo. As medidas foram feitas com $\mathcal{E} = 50$ e $100 \mu\text{m}$.

Figura 23: Uma simulação típica de células HT-29, mostrando o perfil simulado (linha sólida preta) e a aproximação para um círculo (linha tracejada vermelha) com um raio de $2.262 \mu\text{m}$.

Figura 24: A imagem instantânea de uma simulação de células HT-29, em $t \approx 1429$ horas, quando $n_T = 155.551$ células (superfície amarela), $n_0 = 6.509$ sítios (pontos pretos) e $R_T \approx 2230 \mu\text{m}$. A superfície branca denota os sítios $\tilde{n}_V$. A linha vermelha mostra uma área em que não existe mais nenhum sítio q , ela tem um raio de aproximadamente $1875 \mu\text{m}$.

Figura 25: A expansão típica de uma colônia de células HeLa, tomadas de 146,2, 170, 194 e 213,3 horas de cultivo, com $R_c = 224,08, 277,74, 338,24$ e $392,14 \mu\text{m}$ respectivamente.

como *esferas duras*, ou seja, sem a capacidade de ter tamanhos variados e agir pressionando outras ou ser empurrada por elas, como é visto experimentalmente. Isso pode ser feito utilizando o modelo de Potts celular [8, 44], e deve ser nossa investida em breve. Por fim, também não simulamos os nutrientes explicitamente, e isso deve ser incluído em trabalhos futuros.

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas

Nesse trabalho, nós abordamos o crescimento de tumores cultivados *in vitro* por meio de uma perspectiva mesoscópica. Dentro desse contexto, duas características são importantes para as colônias celulares: *i*) sua dinâmica temporal e *ii*) a morfologia do agregado. A dinâmica temporal foi avaliada por meio de equações contínuas e simulações MCD e todos os resultados concordaram muito bem. As equações contínuas foram desenvolvidas à partir do ajuste da taxa de crescimento por uma curva sigmoideal. No método MCD, utilizamos um formalismo que nos permite construir as distribuições de tempos de espera ao longo da evolução do sistema [27], e com isso obtivemos curvas log-normais para os $\Delta t^{(\text{nr})}$. A morfologia foi investigada diretamente a partir dos dados produzidos experimentalmente, e obtivemos a dimensão fractal, o comportamento do raio médio com o número de células, e as expansões típicas do perfil das colônias. Medimos a dimensão fractal pelo método *box-counting* [48], e ela concordou com os dados existentes na literatura [10–12], nos permitindo caracterizar as linhagens específicas. Encontramos para o comportamento do raio médio pelo número de células uma curva mais geral que a comumente aceita $R_c \propto N_c^{1/2}$. As expansões típicas do perfil das colônias concordaram com as expansões encontradas na literatura [10–12].

O ajuste da taxa de crescimento com uma curva sigmoideal nos permitiu obter a equação fenomenológica (14). Adaptando ela aos dados obtidos, pudemos encontrar os valores de α , β , γ e t_c , que estão resumidos na tabela 1. As equações (13) e (14) possuem três fases distintas, uma em que a taxa de crescimento é $\alpha - \beta$. Em algumas linhagens como a HCT-15 e a U-251 o parâmetro β é reduzido de $h = 1/[1 + \exp(-\gamma t_c)]$ devido às escolhas de γ e t_c , fazendo com que na primeira fase a taxa seja $\alpha - h\beta$. A segunda fase reflete uma transição entre $\alpha - \beta$ e α . E a terceira fase é a linear com α . Deve-se notar que a velocidade média da fase linear $\langle v \rangle$ foi diferente de α , provavelmente devido ao número relativamente pequeno de dados que pudemos produzir para cada linhagem. Todas essas fases são caracterizadas pela equação (13), uma curva sigmoideal, que nos permite além de tudo supor uma cooperação entre as células, que precisa ser melhor investigada.

Utilizando o método MCD, pudemos encontrar as distribuições de tempos médios de espera, que podem ser utilizadas como mais um parâmetro interessante para estudar o que acontece nessas colônias tumorais. Isso não é possível se tomarmos o tempo de espera de uma distribuição assumida *a priori*, como uma Poissoniana [22, 36]. Mostramos

que as simulações, tanto Poissoniana, quanto utilizando o tempo de espera da equação (17) concordam em nossa modelagem. No entanto, devemos ressaltar que o processo pode não ser verdadeiramente Poissoniano, sendo apenas um artifício para a solução correta da equação mestra. Utilizando aquela equação, geramos a distribuição de tempos de espera em vários n_T e ajustamos os dados com distribuições log-normais (ρ_l e f_l) e Gaussianas (ρ_g e f_g), significando que os processos envolvidos não são independentes. Verificamos que as distribuições log-normais se ajustam melhor à nossos dados do que as Gaussianas. Isso deve-se ao fato de que a escolha de um sítio q específico muda razoavelmente o comportamento de $\Delta t^{(\text{nr})}$ e isso está ligado às interações locais na região de poucas células da evolução temporal. Para tamanhos grandes, a escolha de um q não altera muito $\Delta t^{(\text{nr})}$, pois $g_q \rightarrow b$ nesse limite, e a aproximação de uma Gaussiana torna-se melhor. Resumimos na tabela 2 $\langle \Delta t^{(\text{nr})} \rangle$ de ρ_l para as linhagens que cultivamos *in vitro*. Percebemos que o tempo médio de espera decai com o número de células através da lei de potência $\langle \Delta t^{(\text{nr})} \rangle \propto n_T^{-\mu}$, e que para todas as linhagens estudadas aqui, μ existe numa abrangência estreita de valores, $0,69 \leq \mu \leq 0,81$, fazendo-nos conjecturar que esse parâmetro possa ser uma característica intrínseca do crescimento de linhagens celulares em monocamada.

Morfolologicamente, a dimensão fractal nos permitiu caracterizar as linhagens específicas, fortalecendo a idéia de que uma dimensão possa indicar um tipo de célula [10–12, 40–44]. Nossos valores residiram entre $1,12 \leq d_f \leq 1,21$ [10–12]. Em especial, o valor de d_f da linhagem HeLa foi de $1,14 \pm 0,01$ com $\langle v \rangle = 2,63 \pm 0,05 \mu\text{m/h}$ quando cultivado com DMEM, ao passo que dados da literatura [10] nos mostram $d_f = 1,30 \pm 0,03$ e $\langle v \rangle = 1,34 \pm 0,01 \mu\text{m/h}$ quando cultivado com RPMI 1640, o que nos permite concluir que as condições de cultivo também são determinantes para a dinâmica e morfologia das linhagens celulares. A d_f pode também caracterizar a agressividade da amostra em questão, uma vez que a linhagem U-251 teve a maior dimensão fractal e os glioblastomas estão relacionados com as menores taxas de sobrevida entre os tumores estudados [49].

Ajustamos uma relação do tipo $R_c(t) = a[N_c(t) - \tilde{N}_0]^{1/2} + \tilde{R}_0$ para a relação raio-células, mais geral que a comumente aceita $R_c(t) = cN_c(t)^{1/2}$ [11, 12]. Essa equação reflete o fato de que, inicialmente existem vários buracos no interior da colônia, e que esses buracos são tão grandes quanto uma célula. As colônias também tem um formato irregular, e depois de certo tempo elas adquirem a simetria circular [12]. Os perfis traçados também parecem nos dar indicações de um efeito hereditário, que pode ser justificado pela carga genética passada da célula-mãe às células-filhas. A equação que propomos tem uma implicação sutil, que é o fato de evitar um pulso durante o surgimento da primeira célula. Ela deve

ser melhor investigada em trabalhos futuros, especialmente na zona de poucas células.

Assim, nosso modelo e nossas investigações experimentais nos dão conta de pelo menos dois indícios principais no nível mesoscópico: *i*) Individualmente as células podem competir por espaços livres [10]. Isso pode ser percebido em nosso modelo se observarmos que a chance de um sítio q ser preenchido por algum de seus vizinhos é de $1/\eta_q$. Inicialmente, essa competição parece ser maior, especialmente pelo crescimento irregular, o que faz com que a mudança de comportamento de $\Delta t^{(\text{nr})}$ seja razoavelmente drástica (e, portanto, possamos ajustar uma curva log-normal) em n_T 's pequenos. Alguém poderia argumentar que esse é um artifício do modelo que usamos, mas experimentalmente, a taxa pequena, a formação de buracos no interior da colônia em tempos curtos e o ajuste de $R_c(t)$ versus $N_c(t)$ reforçam nossa idéia de competição; *ii*) No nível da colônia, as células podem cooperar [46]. Isso é evidenciado pelo ajuste sigmoidal da equação (13). Esse ajuste também nos permite concluir que transita-se de uma fase em que as ligações célula-célula são mais fracas (há a formação de buracos), e seu formato é indefinido para uma fase em que as ligações fazem com que as células internas sejam inibidas por contato, fornecendo a garantia de sobrevivência da amostra, e que as células exteriores continuem em reprodução, agindo como protetoras das células internas em caso de algum ataque anti-tumoral. O empacotamento em colônias radiais também reforça essa idéia.

Por fim, poderíamos sugerir terapias que se preocupem mais com essas três marcas mesoscópicas do que com características subcelulares especificamente. Seria interessante verificar quais são os mecanismos microscópicos, quais as vias bioquímicas desencadeadas em cada tipo de interação celular para aí podermos compreender como essas interações afetam os processos mesoscópicos. Também seria interessante verificar como as células se comportam durante a deprivação de nutrientes, e como as distribuições de tempos de espera são afetadas, além de ser essencial buscar um meio experimental de obter as distribuições para comprovar as características do parâmetro μ .

Referências

- [1] Michor F, Iwasa Y, Nowak MA. Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:197-205.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
- [4] Axelrod R, Axelrod DE, Pienta HJ. Evolution of cooperation among tumor cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(36):13474-13479.
- [5] Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature*. 1985;313:745-747.
- [6] Peres CM, Curi R. Como Cultivar Células. 2005;Guanabara Koogan.
- [7] Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 2005;Wiley:5^a edição.
- [8] Jiang Y, Pjesivac-Grbovic J, Cantrell C, Freyer JP. A multiscale model for avascular tumor growth. *Biophys J*. 2005;89:3884-3894.
- [9] Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:737-744.
- [10] Brú A, Albertos S, Subiza JL, García-Asenjo JL, Brú I. The universal dynamics of tumor growth. *Biophys J*. 2003;85:2948-2961.
- [11] Brú A, Pastor JM, Feraud I, Brú I, Melle S, Berenguer C. Super-rough dynamics on tumor growth. *Phys Rev Lett*. 1998;81(18):4008-4011.
- [12] Huergo MAC, Pasquale MA, González PH, Bolzán AE, Arvia AJ. Dynamics and morphology characteristics of cell colonies with radially spreading growth fronts. *Phys Rev E*. 2011;84:021917.
- [13] Byrne HM. Dissecting cancer through mathematics: From the cell to the animal model. *Nat Rev Cancer*. 2011;10:221-230.
- [14] Michor F, Liphardt J, Ferrari M, Widom J. What does physics have to do with cancer? *Nat Rev Cancer*. 2011;11:657-670.

- [15] Stewart RD, Li XA. BRGT: Biologically guided radiation therapy - The future is fast approaching! Med Phys. 2007;34(10):3739-3751.
- [16] Preziosi L. Cancer Modelling and Simulation. 2003;CRC Press.
- [17] Araujo RP, McElwain DLS. A history of study of solid tumour growth: The contribution of mathematical modelling. B Math Biol. 2004;66:1039-1091.
- [18] Roose T, Chapman SJ, Maini PK. Mathematical models of avascular tumor growth. SIAM Rev. 2007;49(2):179-208.
- [19] Eden M. A probabilistic model for morphogenesis. Symposium on Information Theory in Biology. 1958; Pergamon Press.
- [20] Byrne H, Drasdo D. Individual-based and continuum models of growing cell populations: A comparison. J Math Biol. 2009;58:657-687.
- [21] Drasdo D, Höhme S. A single-cell-based model of tumor growth *in vitro*: Monolayers and spheroids. Phys Biol. 2005;2:133-147.
- [22] Radszuweit M, Block M, Hengstler JG, Schöll E, Drasdo D. Comparing the growth kinetics of cell populations in two and three dimensions. Phys Rev E. 2009;79:051907.
- [23] Drasdo D, Höhme S, Block M. On the role of physics in the growth pattern formation of multi-cellular systems: What can we learn from individual-cell based models? J Stat Phys. 2007;128(1/2):287-345.
- [24] Piotrowska MJ, Angus SD. A quantitative automaton model of *in vitro* multicellular spheroid tumour growth. J Theor Biol. 2009;258:165-178.
- [25] Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA-Cancer J Clin. 2011;61:69-90.
- [26] Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>; Acesso em: 20/12/2012.
- [27] Aiello OE, da Silva MAA. New approach to dynamical Monte Carlo methods: Application to an epidemic model. Physica A. 2003;327:525-534.
- [28] Binder K. Monte Carlo Methods in Statistical Physics. 1986;Springer-Verlag:2ª edição.

- [29] Binder K, Heermann DW. Monte Carlo Simulation in Statistical Physics: An Introduction. 1988;Springer-Verlag.
- [30] Aiello OE, Haas VJ, daSilva MAA, Caliri A. Solution of deterministic-stochastic epidemic models by dynamical Monte Carlo method. *Physica A*. 2000;282:546-558.
- [31] Fichtorn KA, Weinberg WH. Theoretical foundations of dynamical Monte Carlo simulations. *J Chem Phys*. 1991;95(2):1090-1096.
- [32] Prados A, Brey JJ, Sánchez-Rey B. A dynamical Monte Carlo algorithm for master equations with time-dependent transition rates. *J Stat Phys*. 1997;89(3/4):709-734.
- [33] Bortz AB, Kalos MH, Lebowitz JL. A new algorithm for Monte Carlo simulation of Ising spin systems. *J Comput Phys*. 1975;17:10-18.
- [34] Gillespie DT. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *J Comput Phys*. 1976;22:403-434.
- [35] Cardy JL, Grassberger P. Epidemic models and percolation. *J Phys A-Math Gen*. 1985;18:L267-L271.
- [36] Block M, Schöll E, Drasdo D. Classifying the expansion kinetics and critical surface dynamics of growing cell populations. *Phys Rev Lett*. 2007;99:248101.
- [37] Jullien R, Botet R. Scaling properties of the surface of the Eden model in $d = 2, 3, 4$. *J Phys A-Math Gen*. 1985;18:2279-2287.
- [38] L'ecuyer, P. Efficient and portable combined random number generators. *Commun ACM*. 1988;31(6):742-774.
- [39] Press WH; Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP. Numerical Recipes in Fortran 77: The Art of Scientific Computing. 1992;Cambridge University Press: 2ª edição.
- [40] Mashiah A, Wolach O, Sandbank J, Uziel O, Raanani P, Lahav M. Lymphoma and leukemia cells possess fractal dimensions that correlate with their biological features. *Acta Haematol-Basel*. 2008;199:142-150.
- [41] Ferro DP, Falconi MA, Adam RL, Ortega MM, Lima CP, Souza CA, Lorand-Metze I, Metze K. Fractal characteristics of May-Grünwald-Giemsa stained chromatin are independent prognostic factors for survival in multiple myeloma. *Plos One*. 2011;6(6):e20706.

- [42] Esgiar AN, Naguib RNG, Sharif BS, Bennett MK, Murray A. Fractal analysis in the detection of colonic cancer images. *IEEE T Inf Technol B*. 2002;6(1):54-58.
- [43] Al-Kadi OS. Texture analysis of aggressive and nonaggressive lung tumor CE CT images. *IEEE T Bio-Med Eng*. 2008;55(7):1822-1830.
- [44] Poplawski NJ, Agero U, Gens JS, Swat M, Glazier JA, Anderson ARA. Front instabilities and invasiveness of simulated avascular tumors. *B Math Biol*. 2009;71:1189-1227.
- [45] Hammes GG. Thermodynamics and kinetics for the biological sciences. 2000;Wiley - Interscience.
- [46] Deisboeck TS, Couzin ID. Collective behavior in cancer cell populations. *Bioessays*. 2009;31:190-197.
- [47] Mandonnet E, Delattre J, Tanguy M, Swanson KR, Carpentier AF, Duffau H, Cornu P, Effenterre RV, Alvord EC, Capelle L. Continuous growth of mean tumor diameter in a subset of grade II gliomas. *Ann Neurol*. 2003;53(4):524-528.
- [48] Buczkowski S, Kyriacos S, Nekka F, Cartilier L. The modified box-counting method: Analysis of some characteristic parameters. *Pattern Recogn*. 1998;31(4):411-418.
- [49] Harpold HLP, Alvord EC, Swanson KR. The evolution of mathematical modeling of glioma proliferation and invasion. *J Neuropath Exp Neur*. 2007;66(1):1-9.

A Médias

A .1 As médias temporais

Como foi dito na seção 2 .2 a equação (6) representa a evolução temporal da quantidade média A , assim, devemos prover na prática uma maneira de calcular a média. Em tese, após $\mathcal{N}$ passadas pelo tempo t , a probabilidade $P_j(t)$ é encontrada, mas na prática, o que se faz é somar todos os valores em um dado tempo e fazer a média. De fato, nesse contexto,

$$\langle A \rangle = \frac{\sum_{j=1}^{\mathcal{N}} A_j}{\mathcal{N}}. \quad (\text{A .1})$$

Essencialmente estaremos interessados em calcular uma média para o raio da simulação, e então $\langle A \rangle = R(t)$ na equação (A .1). Garantindo que diferentes experimentos são independentes, podemos calcular o erro para as quantidades envolvidas no processo para cada tempo t como

$$\Xi = \sqrt{\frac{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}{\mathcal{N}}}. \quad (\text{A .2})$$

É importante relembrar que à cada passo aceito k' (em nossa modelagem, por coincidência $k' = n_T$), o tempo t pode estar em um lugar diferente, pois os tempos de espera estão distribuídos com alguma forma específica. Assim, para estarmos em um mesmo tempo t e poder aplicar as equações (A .1) e (A .2), devemos executar um processo de interpolação entre $t_{k'}$ e $t_{k'+1}$ para cada t que exista entre aqueles dois valores, então teremos

$$A = \left(\frac{A_{k'+1} - A_{k'}}{t_{k'+1} - t_{k'}} \right) (t - t_{k'}) + A_{k'}. \quad (\text{A .3})$$

A .2 As taxas de crescimento

Para encontrar as taxas de crescimento, calculamos a derivada naquele ponto da seguinte forma

$$\omega_l(t) = \frac{1}{2} \left[\frac{R_c^{(l+1)} - R_c^{(l)}}{t_{l+1} - t_l} + \frac{R_c^{(l)} - R_c^{(l-1)}}{t_l - t_{l-1}} \right], \quad (\text{A .4})$$

em que l é o número do dado experimental. Após isso, uma curva sigmoidal do tipo (15) é ajustada. A figura A .1 mostra os procedimentos descritos acima para um caso específico.

Figura A .1: Um exemplo em que fizemos 100 simulações ($\mathcal{N} = 100$) para encontrar $f(\lambda)$, ($\mathcal{A} = f(\lambda)$). A cada passo, λ e $f(\lambda)$ eram incrementados de números aleatórios, i.e., $\lambda \rightarrow \lambda + \xi_1$, e $f_j(\lambda) = \cos(\lambda) + \xi_2$. Assim, aplicando os procedimentos descritos pelas equações (A .1)-(A .3), pudemos encontrar a média (círculos abertos) em (a). Também pode-se ver nessa figura as barras de erro, 5 simulações que plotamos como ilustração e o ajuste $f(\lambda) = a^* \cos[b^* \lambda + c^*]$ (linha vermelha), com $a^* = 0,942(0,004)$, $b^* = 0,998(0,001)$ e $c^* = 0,26(0,01)$. Em (b) realizamos o procedimento descrito na equação (A .4) (círculos pretos), e mostramos o ajuste senoidal $df(\lambda)/dt = -a_* \sin[b_* \lambda + c_*]$, com $a_* = 0,90(0,01)$, $b_* = 0,996(0,002)$ e $c_* = 0,28(0,02)$.

B Probability Plot

O *normal probability plot* é feito plotando-se o inverso da função cumulativa, contra o parâmetro de interesse. O parâmetro x_p é calculado encontrando-se o inverso da integral

$$p = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_p} \exp(-s^2/2) ds. \quad (\text{B .1})$$

Assim, para cada p , existe um x_p característico. p é retirado de uma distribuição normal padrão. Assim, a reta com o parâmetro de interesse significa a normalidade da amostra. Outro caso que usamos aqui é plotar x_p pelo logaritmo da variável de interesse, que pode acusar a existência de uma distribuição log-normal. Todo esse procedimento foi feito com o auxílio dos softwares *Origin* 6.0 e 8.0⁷. A figura B .1 mostra exemplos do procedimento descrito acima e na figura B .2 mostramos o comportamento dos *probability plots* normal e log-normal para os dados gerados apartir das linhagens que cultivamos *in vitro*.

⁷<http://www.originlab.com>

Figura B .1: Exemplo de gráficos Gaussianos. Em (a) mostramos uma curva gaussiana com o ajuste (linha vermelha) do tipo $\rho_g(x_p) = a' \exp[-b'x_p^2]$, com $a' = 79.664(2)$ e $b' = 0,49833(0,00003)$. Em (b) mostramos o procedimento descrito pela equação (B .1), e o ajuste linear (linha vermelha) tem uma inclinação de $1,018(0,004)$.

C Dimensão Fractal

Diferentemente da noção usual de dimensão, a dimensão fractal (d_f) pode ter valores não inteiros. O método mais usado para avaliar as dimensões é o *box-counting* [40, 48]. Neste método, a imagem é colocada em uma grade de tamanhos d_B , e depois é contado a quantidade de quadrados N_B necessários para cobrir a imagem. Aqui, a imagem é dividida em duas categorias de pixels: os vazios $\delta = 0$ e os que contem um pedaço da imagem $\delta = 1$, e para nossos propósitos, estaremos interessados apenas no número de caixas N_B^* que estão na borda da imagem, e isso nos fará excluir da contagem as caixas cuja quantidade de pixels for igual a área, i.e. $\sum_l \delta_l = d_B \times d_B$, sendo l o compartimento que abriga um dado conjunto de pixels. A computação pode ser feita várias vezes usando diversos tamanhos de d_B , e d_f é calculada usando a seguinte fórmula

$$d_f = - \lim_{d_b \rightarrow 0} \frac{\log(N_B^*)}{\log(d_B)}. \quad (\text{C .1})$$

Na prática, plotamos num gráfico log-log N_B^* por d_B e avaliamos a inclinação de uma regressão linear.

Existem, no entanto, três parâmetros necessários à se definir antes da computação do número de caixas [40, 48]: *i*) A disposição da grade; *ii*) os cortes superior e inferior; e *iii*) a abrangência de d_B . O primeiro critério será a resposta à pergunta: qual o menor valor

Figura B .2: Como na figura anterior, mostramos aqui os *Probability Plots* de simulações com os parâmetros ajustados para os dados experimentais. Em (a) temos a probabilidade por $\Delta t^{(25)}$ para células HCT-15 (quadrados), HN-13 (círculos), U-251 (triângulos) e HeLa (estrelas); em (b) mostramos a probabilidade *versus* $\ln [\Delta t^{(25)}]$; em (c) plotamos a probabilidade contra $\Delta t^{(2000)} / \langle \Delta t^{(2000)} \rangle$; e (d) mostra a probabilidade vs. $\ln [\Delta t^{(2000)} / \langle \Delta t^{(2000)} \rangle]$. Para todos os dados, as linhas coloridas que os acompanham são os respectivos ajustes lineares.

Figura C .1: Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de um círculo (b).

$\mathcal{L}^{(\min)}$ em x e em y que tenha $\delta = 1$? Após respondermos à essa pergunta, disporemos nossa grade com início em $\{\mathcal{L}_x^{(\min)}, \mathcal{L}_y^{(\min)}\}$. O critério *ii*) é estabelecido empiricamente, e aqui, utilizamos $20 \leq d_B \leq \lfloor \mathcal{L}^{(\max)}/4 \rfloor$, sendo $\mathcal{L}^{(\max)} = \sup \{\mathcal{L}_x, \mathcal{L}_y\}$. A última condição para o cálculo correto de d_f é estabelecer a abrangência de d_B . Isso poderá ser alcançado, pegando d_B do critério anterior e avançando sempre de uma unidade. Assim, após ζ medidas, estabelece-se a regra de excluir os pontos $\zeta + 1$ que satisfizerem a relação $N_{B(\zeta+1)}^* = N_{B(\zeta)}^*$. As figuras abaixo e a tabela C .1 mostram alguns exemplos de cálculos da dimensão fractal e a concordância de nossos dados com resultados teóricos.

Tabela C .1: As dimensões fractais teóricas de algumas figuras, e o nosso cálculo por *box-counting*.

Figura	d_f teórica	d_f <i>box-counting</i>
Círculo	1,00	1,01 (0,01)
Ilha de Gosper	1,13	1,13 (0,01)
Conjunto Julia $Z^2 + 1/4$	1,08	1,08 (0,01)
Floco de Neve de Koch	1,26	1,27 (0,02)
Fractal de Vicsek	1,46	1,45 (0,01)

Todas as medidas são da borda da imagem.

Figura C .2: Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de Gosper (b).

Figura C .3: Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de um conjunto Julia (b).

Figura C .4: Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de Koch (b).

Figura C .5: Os dados (círculos pretos), a dimensão fractal (linha vermelha) (a) e a figura de Vicsek (b).