

INFORMAÇÕES GERAIS DO TRABALHO

Título do Trabalho: Um modelo matemático para a angiogênese em tumores sólidos

Autora: Dandara Lorryne do Nascimento; Maria Elizabeth de Gouvea

Palavras-chave: Modelo Matemático; Proteínas; Angiogênese.

Campus: Formiga

Tipo de bolsa: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

Área do Conhecimento (CNPq): Equações diferenciais ordinárias; Modelagem matemática; Microbiologia; Angiogênese.

RESUMO

Quando um grupo de células, por alguma razão, necessita de sangue oxigenado, tem início um processo complexo que faz com que essas células liberem substâncias químicas que estimulam a criação de novos vasos sanguíneos. Este processo é chamado de angiogênese. A angiogênese é de vital importância para o desenvolvimento de embriões e para a restauração de regiões lesionadas, mas é também o processo que permite o crescimento de tumores sólidos. Estudos experimentais mostram que, enquanto os vasos sanguíneos desenvolvidos por um tecido sadio formam uma rede harmônica, com vasos fortes e bem estruturados, os vasos desenvolvidos para alimentar um tumor formam uma rede de numerosos vasos raquíticos. O objetivo inicial desta pesquisa é compreender a dinâmica biológica envolvida nos sinais que regulam a produção de vasos sanguíneos e, em particular, compreender alguns modelos matemáticos existentes para tal. Os modelos a serem apresentados neste trabalho são descritos por um conjunto de equações diferenciais ordinárias de primeira ordem existentes na literatura (BOARETO et al, 2015a). As análises numéricas e gráficas feitas utilizaram o *software MatLab*. Os resultados obtidos nessa etapa reproduzem parte dos resultados da literatura, mas também mostram que determinados fatores merecem ser estudados com mais atenção. Entre esses fatores, destaca-se a influência da concentração inicial de uma proteína específica, denominada NICD, para a evolução do modelo e a utilização das funções de Hill para modelar situações em que o aumento ou a diminuição da concentração dessa proteína e de outras a ela relacionadas é importante. Nessa etapa, através da revisão bibliográfica feita, pôde-se adquirir conhecimento sobre o comportamento de algumas das proteínas que participam da dinâmica do sistema de construção de vasos sanguíneos. Esse conhecimento foi essencial para compreender as equações desenvolvidas nos modelos já existentes e será crucial para a próxima etapa desta pesquisa que pretende propor um modelo matemático que investigue se características exclusivas das células tronco podem alterar os mecanismos de sinalização que levam à angiogênese típica de um tumor.

INTRODUÇÃO:

Para sobreviver, qualquer célula de um organismo vivo, inclusive a tumoral, precisa de oxigênio e dos nutrientes transportados pela corrente sanguínea. Quando essa alimentação falta, tem início um processo no qual as células “asfíxiadas” liberam fatores de crescimento angiogênico. Um desses fatores é o

fator de crescimento endotelial vascular, usualmente designado por VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que promove o crescimento de novos vasos sanguíneos em direção a uma população de células carente de sangue oxigenado (BOARETO et al , 2015b).

Nessa situação de hipoxia, os fatores angiogênicos induzem a formação de uma semente e, uma célula endotelial próxima a essa semente adquire a função de ponta (célula *tip*) do vaso que se formará. A célula *tip* desenvolve protuberâncias (*filopodia*) e migra em direção ao crescimento do gradiente de concentração dos fatores de crescimento. As células que seguem a célula *tip* adotam outro fenótipo e proliferam-se para construir o lúmen do novo vaso. Essas células são denominadas células *stalk* (GEUDENS I.; GERHADT H, 2011). Um balanço bem regulado entre a migração de células *tip* e a proliferação de células *stalk* é fundamental para a formação de boas sementes (PHNG L.; GERHARDT H., 2009).

A escolha do destino de uma célula como *tip* ou *stalk* é controlada por um processo de sinalização devido ao gene conhecido como Notch. Notch contém uma proteína transmembrana que funciona como receptora de ligantes presentes nas superfícies das células vizinhas. O processo de sinalização é ativado quando Notch de determinada célula interage com os ligantes Delta ou Jagged¹ de uma célula vizinha. Esse processo é denominado por ligação *trans* (BOARETO et al , 2015b). Essa combinação resulta na produção de NICD (*Notch Intracelular Domain*) que penetra no núcleo da célula e modula a formação de vários genes que participam do processo de sinalização, incluindo os ligantes Delta e Jagged. Todavia, neste processo, a produção de proteínas Notch e Jagged é diferenciada e há uma tendência de restringir a produção da proteína Delta (BOARETO et al , 2015b).

Entretanto, quando um receptor Notch interage com ligantes da mesma célula, nenhum NICD é produzido e tanto o ligante quanto o receptor são descartados. Este processo é denominado inibição *cis*.

Em um organismo rico em proteínas Delta, as células que contêm Notch ou Delta na superfície se intercalam como em um tabuleiro de xadrez e esse processo é conhecido por “inibição lateral”. Nos organismos ricos em proteínas Jagged, observa-se a “indução lateral” no qual células semelhantes se alinham.

Essa descrição leva a esperar um padrão que se repete a cada duas células: células *tip* muito próximas umas das outras poderiam resultar na formação de muitos vasos. No entanto, na angiogênese, duas células *tip* ficam separadas por algumas células *stalk*, com concentrações baixas de Delta, mas alta concentração de Jagged (indução lateral) indicando que a sinalização Notch-Jagged pode decidir a distância entre duas células adjacentes.

Nesse cenário, seria então admissível esperar que o crescimento acelerado de vasos sanguíneos fosse resultado da produção excessiva de Delta e que um aumento na produção de Jagged contribuísse para o aumento da distância entre as células *tip* (ZOLNERKEVIC, 2016). No entanto, resultados experimentais obtidos por Benedito et al (2009) e Suchting et al (2007) contrariam essas expectativas. Benedito et al (2009) mostraram que altas taxas de produção de Jagged leva à produção de maior número de células *tip* enquanto Suchtings et al (2007) mostraram que uma alta produção de Delta acaba por desacelerar a formação de novas sementes.

¹ Delta e Jagged também são duas proteínas e atuam como ligantes à proteína Notch.

O modelo matemático desenvolvido por Boareto et al (2015b) busca entender como as interações entre as sinalizações enviadas por Notch-Delta-Jagged e VEGF determinam as escolhas entre células *tip* e *stalk*. Os resultados sugerem que vasos raquíticos como os que caracterizam a alimentação de tumores são formados por células híbridas, com propriedades intermediárias entre *tip* e *stalk*, como resultado de alta produção de Jagged (ZOLNERKEVIC, 2016).

Estudos feitos em pacientes acometidos por leucemia originaram o paradigma de que os tumores são fruto da ação de células tronco cancerígenas (LAPIDOT et al., 1994). A ideia básica é que uma pequena população especial de células tumorais que adquiriram habilidades exclusivas das células tronco, como autorrenovação e diferenciação, é capaz de iniciar e manter um tumor. Células tronco cancerígenas têm sido identificadas em diversos tipos de tumores sólidos, conforme mostram Bonnet e Dick (1997), Al-Hajj et al (2003) e Singh et al (2004) e, por isso, um grande esforço tem sido feito para desvendar as características fenotípicas de células tronco cancerígenas em tumores sólidos.

Neste sentido, o principal objetivo desse trabalho é analisar modelos matemáticos e computacionais que investiguem as interações nos diversos processos microscópicos que determinam a formação de novos vasos sanguíneos e sua possível dependência com a natureza das células que constituem o tumor.

METODOLOGIA:

Primeiramente, foi feita uma revisão bibliográfica sobre o tema, utilizando-se artigos e livros de relevância sobre o tema.

O estudo detalhado dos modelos desenvolvidos por Boareto et al (2015a) e Boareto et al (2015b), levou, primeiramente, ao modelo que descreve a dinâmica entre Notch, Delta e NICD. Para este modelo, foram reproduzidos os resultados obtidos por aqueles pesquisadores obtendo os possíveis estados de equilíbrio do modelo. Foi também analisada a evolução temporal dessas proteínas.

Posteriormente, foi acrescentada a proteína Jagged ao modelo e a obtenção das curvas de equilíbrio está em fase de conclusão. Todos os modelos matemáticos foram descritos por equações diferenciais de primeira ordem e a modelagem computacional utilizou o *software MatLab*, que permitiu a análise gráfica dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Designando a concentração das proteínas Notch, Delta e NICD por N , D e I , respectivamente, o modelo proposto por Boareto et al (2015a) e Boareto et al (2015b) para descrever a evolução temporal dessas proteínas consiste das equações descritas a seguir:

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

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

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

onde N_0 e D_0 estão relacionadas à produção temporal de cada tipo de célula (Notch ou Delta), k_t e k_c representam, respectivamente, a taxa de associação da proteína (Notch na Equação (1) e Delta na Equação

(2) nos processos de ativação *trans* e de inibição *cis* e γ é a taxa de degradação, suposta igual para Notch e Delta. Para NICD, a taxa de degradação é representada por γ_I . D_{ext} representa a concentração média de Delta na vizinhança de determinada célula. Da mesma forma, N_{ext} representa a concentração média de Notch externa à célula. $H^-(I)$ e $H^+(I)$ são as equações negativa e positiva de Hill², respectivamente, descritas pelas Equações (4) e (5) a seguir:

$$H^+(I) = \frac{1}{1 + \left(\frac{I}{I_0}\right)^{n_N}} + \delta_N \frac{\left(\frac{I}{I_0}\right)^{n_N}}{1 + \left(\frac{I}{I_0}\right)^{n_N}} \quad (4)$$

$$H^-(I) = \frac{1}{1 + \left(\frac{I}{I_0}\right)^{n_D}} \quad (5)$$

Nas Equações acima, I_0 , n_D , n_N e δ_N são constantes e seus valores, assim como o de outros parâmetros do modelo estão dispostos na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 – Valores dos parâmetros

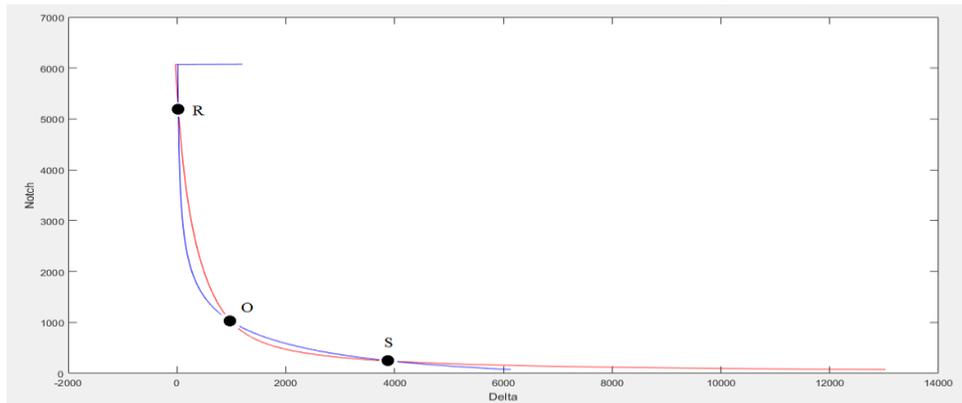
Variáveis	Valores utilizados
N_0	500
D_0	1000
I_0	200
k_t	$5 \cdot 10^{-5}$
k_c	$5 \cdot 10^{-4}$
N_{ext}	500
D_{ext}	1500
γ	0.1
γ_I	0.5
n_D, n_N, δ_N	2

Fonte: Boareto et al, 2015a

Os pontos de equilíbrio do sistema representado pelas Equações (1)-(3) podem ser obtidos a partir dessas equações e estão representados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Pontos de equilíbrio

² Segundo Fragoso Junior, Ferreira e Marques (2009), a Equação de Hill é eficiente para descrever variações de estado e, também é útil para modelar uma produção de substâncias quando suas origens estão sendo reguladas por outras



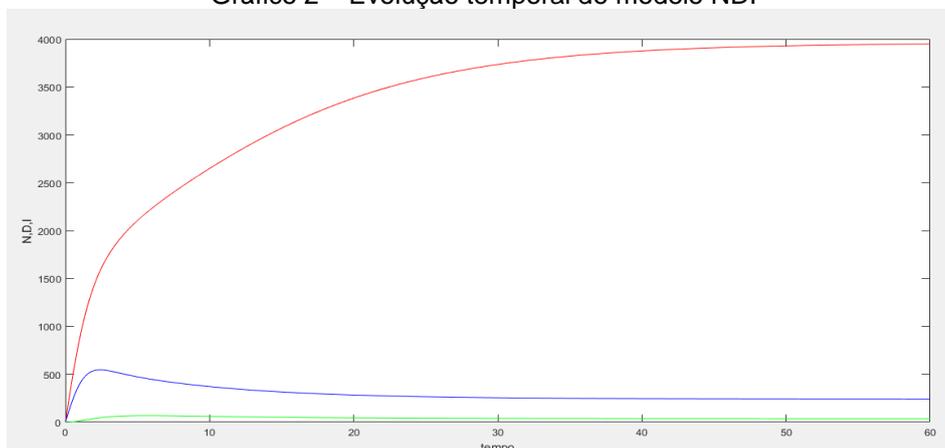
Fonte: as próprias autoras.

No Gráfico 1, a curva vermelha foi obtida impondo ($\frac{dN}{dt} = \frac{dI}{dt} = 0$) e a curva azul, das condições ($\frac{dD}{dt} = \frac{dI}{dt} = 0$). Os pontos de equilíbrio estão representados pelos pontos R, O e S sendo $R \approx (22, 5200)$, $S \approx (3600, 275)$ e $O \approx (1100, 1025)$. Vale notar que a designação R corresponde a um estado com alta concentração de Notch e baixa concentração de Delta caracterizando uma célula receptora, enquanto o estado S corresponde a uma alta concentração de Delta e, portanto, a uma célula emissora de proteínas. Foi feita a análise do comportamento das concentrações de Notch, Delta e NICD nas vizinhanças dos pontos de equilíbrio R, S e O para determinar a natureza - estável ou instável - do equilíbrio.

Na vizinhança do ponto R, constatou-se que, independentemente do valor inicial de I, o sistema tende a retornar a este ponto caracterizando um equilíbrio estável. Comportamento semelhante é também observado na vizinhança do ponto S. Na vizinhança do ponto O, o comportamento é completamente diferente uma vez que, em sua vizinhança, o sistema caminha para o ponto R ou para o ponto S: em O, o equilíbrio é instável. É importante destacar que, na vizinhança de O, a concentração inicial de NICD desempenha papel determinante na evolução do sistema para o estado R ou S: se o valor inicial da concentração de NICD é pequeno, o sistema tende ao estado S, mas para uma concentração inicial alta de NICD o sistema tende a R.

A evolução temporal de cada população do modelo NDI é mostrada no Gráfico 2 onde todas as populações iniciais foram consideradas nulas.

Gráfico 2 – Evolução temporal do modelo NDI



Fonte: as próprias autoras.

No Gráfico 2, a curva vermelha representa a proteína Delta, a azul representa Notch e a verde representa NICD. Conclui-se que, para concentrações iniciais baixas de NICD, o estado de equilíbrio alcançado pelo modelo corresponde ao estado S, rico em Delta. Partindo de valores iniciais maiores para NICD (em torno de 500), observa-se que o modelo evolui para um estado rico em Notch, isto é, para o estado R. Há, então, uma forte influência do valor inicial de NICD, como poderia ser esperado uma vez que é esta população que desencadeia o processo de ativação das demais proteínas.

Por fim, ao introduzir a proteína Jagged (J) nesse sistema, que será chamado de “modelo NDJI”, apenas a Equação (2) permanecerá inalterada. Para a dinâmica de Notch, Jagged e NICD, tem-se:

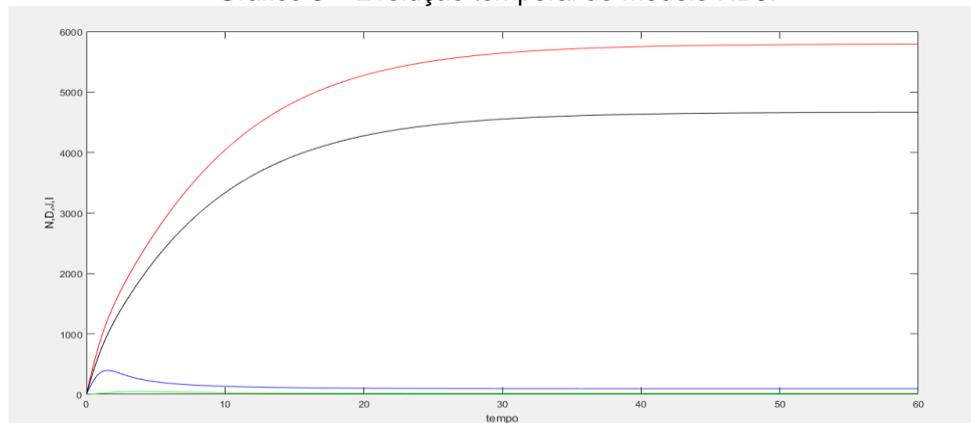
$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^+(I) - k_t N(D_{ext} + J_{ext}) - k_c N(D + J) - \gamma N \quad (6)$$

$$\frac{dJ}{dt} = J_0 H^+(I) - k_t N_{ext} J - k_c N J - \gamma J \quad (7)$$

$$\frac{dI}{dt} = k_t N(D_{ext} + J_{ext}) - \gamma I \quad (8)$$

Para construir o gráfico do modelo NDJI utilizou-se $J_{ext} = 1750$ e $D_{ext} = 0$. A evolução temporal do modelo representado pelas Equações (2), (6)-(8) é mostrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Evolução temporal do modelo NDJI



Fonte: as próprias autoras.

No Gráfico 3, a curva vermelha representa Delta, a azul representa Notch, a preta representa Jagged e, finalmente, a verde representa NICD. Pode-se observar que tanto D quanto J crescem mais rapidamente do que N e I. Para obtenção desse gráfico, os valores iniciais das concentrações foram considerados nulos.

O próximo passo desta pesquisa será analisar os novos pontos de equilíbrio descritos por esse novo sistema e a influência das funções de Hill para cada uma das proteínas.

CONCLUSÕES:

Nessa etapa, através da revisão bibliográfica feita, adquiriu-se conhecimento sobre o comportamento de algumas das proteínas que participam do “caminho Notch”. Esse conhecimento foi

essencial para entender as equações desenvolvidas nos modelos propostos por Boareto et al (2015a) e Boareto et al (2015b), onde pôde-se reproduzir, com sucesso, parte dos resultados obtidos por aqueles pesquisadores. Nossa análise revelou que algumas suposições do modelo merecem ser estudadas com mais atenção. Entre essas suposições, destacamos a influência da concentração inicial de NICD para a evolução do modelo e a utilização das funções de Hill para modelar situações em que o aumento ou diminuição da concentração de determinada proteína é importante.

Os próximos passos previstos para o desenvolvimento dessa pesquisa são analisar os pontos de equilíbrio do sistema ao introduzir a proteína Jagged, analisar o comportamento do modelo para diferentes valores da concentração inicial de NICD e entender quais fatores podem influenciar essa concentração. Além disso, pretende-se analisar a influência das funções de Hill utilizadas e/ou propor uma forma alternativa de modelagem e, por fim, verificar a possibilidade de introduzir no modelo as diferenças devido às características de células tronco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 7, p. 3983, 2003. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/100/7/3983> >. Acesso em 28 jul. 2018.

BENEDITO, R. et al. The Notch ligands DLL4 and Jagged have opposing effects on angiogenesis. **Cell**. v. 137, n. 6, p. 1124-1135, 2009. Disponível em: < [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(09\)00324-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867409003249%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(09)00324-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867409003249%3Fshowall%3Dtrue) >. Acesso em 28 jul. 2018.

BOARETO, Marcelo. et al. Jagged–Delta asymmetry in Notch signaling can give rise to a Sender/Receiver hybrid phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 112, n.5, p. 402-409, Jan. 2015a. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4321269/> >. Acesso em 28 jul. 2018.

BOARETO, Marcelo. et al. Jagged mediates differences in normal and tumor angiogenesis by affecting tip-stalk fate decision. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 112, n.29, p. 836-844, Jul. 2015b. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4517227/> >. Acesso em 28 jul. 2018.

BONNET, D.; DICK, J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Natural Medicine**. v. 3, n. 7, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212098> >. Acesso em 28 jul. 2018.

FRAGOSO JUNIOR, Carlos Ruberto; FERREIRA, Tiago Finkler; MARQUES, David da Motta. **Modelagem Ecológica em Ecossistemas Aquáticos**. São Paulo: Oficina de textos, 2009.

GEUDENS, I.; GERHARDT, H. Coordinating cell behavior during blood vessel formation. **Development**. v. 138, n. 21, p. 4569-4583, 2011. Disponível em: < <http://dev.biologists.org/content/138/21/4569> >. Acesso em 28 jul. 2018.

LAPIDOT, T et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature international journal of the science**. v. 367, p. 645-648, 1994. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/367645a0> >. Acesso em 28 jul. 2018.

PHNG, L.; GERHARDT, H. Angiogenesis: A team effort coordinated by Notch. **Developmental Cell**. v. 16, n. 2, p. 196-208, 2009. Disponível em: < [https://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807\(09\)000434?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1534580709000434%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807(09)000434?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1534580709000434%3Fshowall%3Dtrue) >. Acesso em 28 jul. 2018.

SINGH, S. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature international journal of the science**. v.432, p. 396 - 401, 2004. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature03128> >. Acesso em 28 jul. 2018.

SUCHTING, S et al. *The Nothc ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 9, p. 3225-3230, 2007. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/104/9/3225>>. Acesso em 28 jul. 2018.

ZOLNERKEVIC, I. A Fome do Câncer. **Revista Fapesp**. ed. 239, p.55-57, 2016. Disponível em: < <http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/01/12/a-fome-do-cancer/>>. Acesso em 28 jul. 2018.