

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Simulação do Ciclo de Vida Social da ameba *Dictyostelium discoideum* *

Daniel Schardosim Calovi

Tese de doutorado realizada sob orientação do Prof. Leonardo Gregory Brunnet e apresentada ao Instituto de Física da UFRGS em preenchimento dos requisitos parciais para obtenção de grau de Doutor em Ciências

Porto Alegre
23 de Maio de 2011

*Trabalho financiado pela Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Leonardo G. Brunnet pelos 4 anos de orientação, nos quais uma relação de amizade e colaboração surgiu junto com o novo tema de pesquisa aqui apresentado.

Gostaria também de agradecer o apoio do Centro Nacional de Super Computação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CESUP-UFRGS), cujos recursos computacionais foram essenciais para a conclusão desse trabalho e aos seus funcionários Luíz Fernando Fernandez e Lindolfo Meira pelos suporte ao cluster nas mais variadas horas do dia e noite.

Devo agradecer também aos amigos em especial do #JABC cujo apoio emocional permitiu manter o bom humor mesmo nos períodos mais complicados, assim como aos colegas da sala M203 pelo clima de descontração (especialmente nas sextas-feiras) e também a ocasional ajuda em assuntos acadêmicos.

Agradecimentos especiais vão aos corretores adicionais desse trabalho (Ana e Samir), responsáveis por muitas das crases e vírgulas empregadas corretamente e pela ajuda em prazos demasiadamente curtos, motivo pelo qual algumas (em vez das muitas) podem ter escapado.

Resumo

Nesse trabalho temos como objetivo simular diversos estágios da ameba *Dictyostelium discoideum* durante o seu ciclo de vida social. Tal organismo apresenta um ciclo de vida típico no qual se comporta como uma ameba Eucarionte, alimentando-se de bactérias e dividindo-se por mitose. É quando as fontes de nutrientes no ambiente se tornam escarças que tem início o ciclo de vida social no qual as amebas começam a emitir um sinal químico que guiará as mesmas com objetivo de formar agregados com aproximadamente 50 mil amebas. Dentro de tal agregado as amebas se diferenciam e formam um ser pluricelular na forma de uma lesma que tem como objetivo transportar as amebas para uma região com maior probabilidade de sobrevivência. Para simular tal organismo iremos mesclar dois modelos diferentes para reproduzir a sinalização química entre as amebas e o seu movimento. O modelo utilizado para descrever a sinalização química do composto Adenosina Monofosfato cíclico 3'5' foi desenvolvido de acordo com a análise dos processos bioquímicos envolvidos e os parâmetros foram obtidos experimentalmente. A movimentação das amebas é implementada através de um modelo de animóides com velocidade fixa onde o ângulo de movimento varia de acordo com regras simples que já provaram ser eficientes na simulação desde grupos de animais a processos de segregação celular.

Nessa tese mostraremos como o método utilizado para resolver o modelo de sinalização química não é somente mais eficiente numericamente, como também é capaz de apresentar diversas das propriedades da ameba vistas nos experimentos até o momento da agregação, entre elas: sincronização; adaptação; formação de espirais; padrões de reação difusão. Ao implementarmos o movimento das amebas verificamos outras propriedades como: caminhos preferenciais de deslocamento até o centro do agregado (*streaming*); formação de *mound* e movimento coletivo circular. Nesse trabalho além de conseguirmos unir diversas propriedades em um único modelo, também conseguimos demonstrar que a origem do movimento helicoidal coletivo das amebas dentro da lesma pode ser proveniente de simples propriedades físicas ao contrário de algumas vertentes que afirmam ser proveniente da quimiotaxia em um sistema com ondas de sinal químico helicoidal.

Abstract

In this work we aim to simulate different stages of the amoeba *Dictyostelium discoideum* through its social cycle. This organism has a typical life cycle in which it behaves like an Eukaryotic amoeba, feeding on bacteria and reproducing through mitosis. It is when the sources of nutrients in the environment become scarce that the social cycle begins. In this cycle the amoebae start to emit a chemical signal that will guide them to form aggregates with approximately 50 thousand amoebae. Within such aggregate the amoebae differentiate themselves to create a multicellular being in the form of a slug, which aims to transport the amoebae to a region with a higher probability of survival. In order to simulate such organism we have merged two different models to reproduce the chemical signaling among amoebae and their movement. The model chosen to describe the chemical signaling of the compound cyclic Adenosine Monophosphate 3'5' has been developed according to the biochemical processes and the parameters obtained experimentally. The amoebae movement is implemented through a boids model with fixed speed where the angle of movement varies according to simple rules that have proven effective in other simulations of animal groups and cellular segregation.

In this thesis we show how the method used to solve the model chemical signaling is not only numerically more efficient, but also capable of reproducing several properties of the amoeba seen in experiments until the aggregation stage, including: synchronization, adaptation, spiral formation and reaction-diffusion patterns. Upon implementation of amoeba movement we verified other properties such as streaming, mound formation and collective rotational movement. In this thesis we in addition to uniting several properties in a single model, were also able to demonstrate that the origin of the helicoidal movement within the slug can come from simple physical properties, in contrast to some studies which claim the origin to be from chemotaxis in a system with scroll waves of chemical signaling.

Conteúdo

Lista de Figuras

1	Introdução	p. 0
2	Modelo de Martiel-Goldbeter sobre a sinalização de AMPc	p. 6
2.1	Modelos de Goldbeter	p. 6
2.2	Adaptações ao modelo de MG	p. 10
3	Implementação da sinalização química	p. 12
3.1	Resolução das equações de MG	p. 12
3.2	Simulações em sinalização de AMPc	p. 17
4	Modelo de animóides	p. 29
4.1	Modelo de Reynolds	p. 29
4.2	Modelo de Vicsek	p. 29
4.3	Modelo de Gregoire	p. 32
4.4	Modelo de Belmonte	p. 33
5	Implementação do movimento	p. 38
5.1	Modelos bidimensionais	p. 38
5.2	Simulações em duas dimensões	p. 40
5.2.1	Modelo descontínuo de caroço-duro grande	p. 40
5.2.2	Modelo contínuo de caroço-duro grande	p. 43

5.2.3	Modelo descontínuo de caroço-duro pequeno	p. 45
5.3	Simulações em três dimensões	p. 48
6	Movimento Rotacional	p. 55
6.1	Origem do movimento rotacional	p. 55
7	Conclusões e Perspectivas	p. 68
7.1	Conclusões	p. 68
7.2	Perspectivas	p. 76
	Bibliografia	p. 78

Lista de Figuras

- 2.1 Representação esquemática do ciclo de produção de AMPc como proposto por Martiel e Goldbeter p. 9
- 3.1 Comparação entre a concentração de AMPc obtida simulando 3 amebas no modelo de Nagano [1] através do método de Runge-Kutta de 4^a e a nossa aproximação usando funções de Green. Dados representados por linhas e pontos, respectivamente. Na base podemos ver as curvas de nível para ambos os resultados, para melhor comparação entre os resultados p. 16
- 3.2 Projeções do espaço de fase para uma única ameba. A esquerda temos a projeção $\beta (10^{-7}M) \times \gamma (10^{-7}M)$ e a direita temos a projeção $\beta (10^{-7}M) \times \rho$. Como pode-se notar, a relação entre β e γ para a mesma ameba é quase linear, portanto iremos utilizar apenas a segunda projeção ($\beta \times \rho$). p. 18
- 3.3 Projeção do espaço de fase $\beta_j (10^{-7}M) \times \rho_j$ para quatro amebas (cada uma representada por uma uma linha de cor diferente) distribuídas em quadrados com lados medindo 3, 5 e 15σ respectivamente. Os símbolos indicam as condições iniciais em que cada ameba começou. p. 19
- 3.4 Velocidade de onda em mm/min para cada uma das linhas de amebas na simulação. A velocidade foi medida considerando o intervalo de tempo que levou para que a concentração máxima de AMPc da linha anterior levou para chegar a que está sendo medida. Resultados das ultimas linhas foram omitidos devido a efeitos de bordas. Cada linha representa uma simulação com um espaçamento diferente entre as amebas (8, 24, 27, 28σ). p. 21
- 3.5 Velocidade média da onda em mm/min referente à simulação anterior (como visto na Fig. 3.4), que consiste em uma onda se propagando numa grade regular de amebas, onde cada simulação foi realizada com um espaçamento diferente. A média apresentada aqui foi calculada antes do sistema chegar a sincronização. Podemos notar que os dados se ajustam bem a uma lei de potência do tipo $ax^\lambda + b$ onde $\lambda \approx -0.541172$ p. 22

- 3.6 A concentração de AMPc referente a coluna central da grade de amebas é mostrada verticalmente, o brilho representa a concentração de AMPc e o tempo evolui da esquerda para a direita. Essa simulação foi feita com um espaçamento de 24σ e com uma condição inicial de dez pulsos. p. 23
- 3.7 Concentração média da amplitude de AMPc para diferentes números de onda (unidades em $10^{-7}M \times \sigma^{-1}$. Conjuntos de 20, 16 e 10 pulsos foram escolhidos como condições iniciais numa grade retangular (9×80), i.e., conjuntos de 4, 5 e 8 valores equidistantes no *ciclo padrão* foram utilizados. Para cada conjunto de pulsos, simulações foram feitas com espaçamentos diferentes, resultando em múltiplos valores para alguns dos números de onda. p. 25
- 3.8 Concentração de AMPc (unidades em $10^{-7}M \times \text{mm}$) para uma grade quadrada contendo 18×18 amebas (com espaçamento de 13σ entre elas). Na esquerda podemos ver os 36 estados iniciais sorteados aleatoriamente do *ciclo padrão* e que foram distribuídos em grupos de 9 amebas. Na direita temos a evolução desse estado inicial após 110 min de simulação, onde podemos ver que a configuração do sistema evoluiu para uma espiral. p. 26
- 3.9 Concentração de AMPc (unidades em $10^{-7}M \times \text{mm}$) para uma grade quadrada contendo 30×30 amebas (com espaçamento de 20σ entre elas). Os 100 estados iniciais foram sorteados aleatoriamente através do *ciclo padrão* e que foram distribuídos em grupos de 9 amebas. Após 20 min de simulação, podemos observar um complexo padrão de reação-difusão. p. 26
- 3.10 Concentração de AMPc (unidades em $10^{-7}M \times \text{mm}$) para uma grade quadrada contendo 60×60 amebas (com espaçamento de 5σ entre elas). Os 400 estados iniciais foram sorteados aleatoriamente através do *ciclo padrão* e que foram distribuídos em grupos de 9 amebas. Após 18 min de simulação, podemos observar um complexo padrão de reação-difusão em uma escala similar aos experimentos. p. 28
- 4.1 Representação gráfica das regras de movimento propostas por Reynolds[2]:
a) separação, cada animóide tenta se manter a uma distância mínima dos outros para evitar colisões; b) alinhamento, tendem a alinhar-se segundo o ângulo médio de movimento de seus vizinhos; c) coesão, tendem a se manter perto dos seus vizinhos, formando assim um bando e dificultando a dispersão de seus membros p. 30

- 4.2 Representação dos animóides para as condições de movimento aleatório (esquerda) e movimento coletivo (direita). Resultados obtidos em [3] onde o movimento coletivo foi obtido em (b) após aumentar a densidade enquanto se diminuiu o ruído do sistema. p. 31
- 4.3 Parâmetro de ordem v_a como definido na Eq. (4.3) em função do ruído (esquerda) e em função da densidade (direita). Figura retirada de [3]. p. 32
- 4.4 Espaço de parâmetros ($\beta \times \alpha$) para o sistema de Gregoire *et al.*, onde as legendas significam: S sólido, MS sólido com movimento, L líquido, ML Líquido com movimento, G gás, MG gás com movimento e a linha tracejada representa a transição entre movimento coletivo. Figura retirada de [4]. . . . p. 34
- 4.5 Representação da evolução de um agregado com 800 partículas. As diferentes cores representam os dois tipos de células modeladas aqui (ectodérmicas e endodérmicas). O número de iterações até o estágio visto nas figuras é: a) $T=0$; b) $T=3 \times 10^3$; c) $T=3 \times 10^3$; d) $T=2 \times 10^7$. Figura retirada de [5]. p. 35
- 4.6 Variação do parâmetro de ordem como definido na Eq. (4.8) em função do número de iterações para valores diferentes do parâmetro α . Podemos ver uma lei de potência para certos valores do parâmetro referente ao movimento coletivo cujo expoente é dado por $\lambda = 0,18 \pm 0,02$. Figura retirada de [5]. . . p. 36
- 4.7 a) Figura mostrando simulações com diferentes números de partículas, as quantidades γ_1 e tempo são reescaladas para $\gamma^* = \gamma_1 N^\mu$ e $T^* = t/N^\nu$ (os dados originais são mostrados na inserção); b) valor assintótico do parâmetro de ordem em função do número de partículas, onde a linha tem a inclinação $\mu = 0,32 \pm 0,01$; c) Tempo de saturação em função do número de partículas, sendo a inclinação da curva dada por $\nu = 1,77 \pm 0,04$. Figura retirada de [5]. p. 37
- 5.1 Relação da acurácia da quimiotaxia das amebas *Dictyostelium discoideum* em função da concentração de AMPc, como medido por Fisher *et al.* em [6]. p. 40
- 5.2 500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada com lado medindo 1 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) $T=0$; b) $T=5$ min; c) $T=25$ min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital a animação dessa simulação pode ser visualizada no material suplementar #1 p. 42

- 5.3 500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada com lado medindo 0,45 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 5 min; c) T=15 min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital a animação dessa simulação pode ser visualizada no material suplementar #2 p. 42
- 5.4 Trajetórias das amebas referentes a simulação vista na Fig. 5.3 durante um período de 40 minutos de simulação utilizando o *MDCG*. Podemos ver um comportamento circular no movimento interno das amebas, provavelmente oriundo da competição entre as contribuições de curto alcance (força de interação) e longo alcance (quimiotaxia). p. 44
- 5.5 5040 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada com lado medindo 1 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 10 min; c) T=34 min. Simulação realizada utilizando o *MCCG* de interações entre amebas. Na versão digital a animação dessa simulação pode ser visualizada no material suplementar #3 . p. 46
- 5.6 Simulação realizada utilizando o *MDCP*, como visto na Eq. (5.3) com o raio de caroço-duro agora descrito por $d_c = 0,1\sigma$. As amebas foram distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado medindo 0,32 mm e o estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. Temos duas figuras: a) configuração inicial para ambas as simulações; b) configuração final do agregado em $T = 75$ min. Na versão digital o vídeo da simulação pode ser encontrado no material suplementar #4 p. 48
- 5.7 Simulações em três dimensões para casos com contribuições diferentes que simulam tendência de adesão com o solo. As amebas foram distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado medindo 0,45 mm e o estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. Temos três figuras: a) configuração inicial para ambas as simulações; b) configuração final para o caso com a contribuição de adesão ao solo em $G = 0,25$; c) configuração final para o caso com a tendência de adesão ao solo em $G = 0,5$. Simulações realizadas utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. p. 50

- 5.8 Simulação com 500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado 1 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 25 min; c) T=170 min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #5 p. 50
- 5.9 Simulação com 2500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado medindo 0,71 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra quatro diferentes estágios da simulação: a)T=0; b) T=19 min; c) T=33 min; d) T= 75 min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #6 p. 52
- 5.10 Simulação com 480 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado 0,33 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 2 min; c) T=6 min; d) T=20 min. Simulação realizada utilizando o *MCCG* de interações entre amebas. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #7 p. 53
- 5.11 Simulação com 504 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado 0,31 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 5 min; c) T=13,3 min; d) T=100 min. Simulação realizada utilizando o *MDCP* de interações entre amebas Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #8 p. 54
- 6.1 Simulação de 2000 animóides. O cilindro representa a barreira implementada para contê-los e as diferentes cores servem apenas para melhor visualizar o movimento de animóides específicos. Os parâmetros utilizados foram: $\alpha = 0$; $\delta = 1$; $\nu = 1$ e $\eta = 1$ p. 58

- 6.2 Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1; \alpha = 0; \nu = 1; \varepsilon = 0$. Podemos notar que as componentes y e z dominam sobre a componente x devido a disposição do cilindro ao longo do eixo X , sendo assim os animóides acabam se locomovendo mais na região de maior extensão em vez de sincronizarem num movimento rotacional p. 58
- 6.3 Histograma e um ajuste Gaussiano $(A/\sigma) \exp[-0.5\frac{((x)-x)^2}{\sigma^2}]$ para a distribuição dos valores de L_x (para parâmetros $\nu = 1 \eta = 1$ e $\alpha = 0$) em tres casos distintos de compressão: a) $\delta = 0,5$; b) $\delta = 1,0$; c) $\delta = 1,5$ p. 59
- 6.4 Histogramas da componente x do momento angular em função de α para simulações com: $\delta = 0,5$ superior; $\delta = 1,0$ central; $\delta = 1,5$ inferior. Simulações para 2000 amebas com parâmetros $\nu = 1$ e $\varepsilon = 0$. A componente L_x foi limitada em 0,3 para melhor visualização dos dados. p. 60
- 6.5 Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1; \alpha = 2; \nu = 1; \varepsilon = 0$. Apesar da indicação de movimento circular apresentados na Fig. 6.4 ao analisarmos as componentes y e z verificamos que estas tem uma amplitude maior que componente x , indicando que ainda não temos um movimento rotacional estabelecido. Na versão digital essa simulação pode ser vista no material suplementar #9. p. 62
- 6.6 Histograma do componente L_x para uma simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1,1; \alpha = 0,9; \nu = 5; \varepsilon = 0; Q = 0,2$ p. 63
- 6.7 Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1,1; \alpha = 0,9; \nu = 5; \varepsilon = 0; Q = 0,2$. Na versão digital podemos visualizar tal simulação no material suplementar #10 p. 63
- 6.8 Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1,1; \alpha = 1,0; \nu = 5; \varepsilon = 0; Q = 0,2$. Na versão digital podemos visualizar tal simulação no material suplementar #11 p. 64

- 6.9 Histogramas da componente x do momento angular em função de v onde a componente L_x foi limitada em 0,5 para melhor visualização dos dados. Simulações para 2000 amebas com parâmetros $\alpha = 1,0$ $\varepsilon = 0$ $\delta = 1,1$ p. 65
- 6.10 Módulo da média de L_x para diferentes valores de α em simulações com os seguintes parâmetros: $v = 5$; $\eta = 1$; $Q = 0,2$; $\delta = 1,1$. A ampliação da região na qual o sistema apresenta movimento rotacional com as instabilidades descritas anteriormente de maneira que para valores de $\alpha \approx 1$ temos a sincronização do sistema inteiro no estado rotacional. p. 66
- 6.11 Cumulante de Binder, definido como $\frac{1}{2} (3 - \langle L_x^4 \rangle / \langle L_x^2 \rangle^2)$, em função do parâmetro α para simulações com os seguintes parâmetros: $v = 5$; $\eta = 1$; $Q = 0,2$; $\delta = 1,1$. Pode-se ver na ampliação que ocorre aumento abrupto do cumulante para $\alpha > 0,85$. A inclinação negativa aparente em valores menores ($\alpha < 0,85$) indicaria coexistência de fases. Resultados para as simulações com $\alpha \geq 1$ confirmam a sincronização total do sistema no novo estado. . . . p. 67

1 *Introdução*

A especialização excessiva da ciência ao longo do século XX impediu que técnicas desenvolvidas nos diferentes ramos se disseminassem. Nos últimos anos tem havido uma reaproximação entre as diferentes áreas da ciência, surgindo uma nova classe de trabalhos de pesquisa onde procedimentos de diferentes áreas são usados para avançar o conhecimento científico. No caso específico das colaborações entre físicos e biólogos vemos sistemas biológicos cujo estudo não pode se limitar ao laboratório devido ao número excessivo de variáveis envolvidas nos experimentos ou, em alguns casos, porque simplesmente ainda não é possível fazer as medidas necessárias à compreensão da propriedade investigada. É nesse contexto que físicos tem colaborado na elaboração de modelos para descrever tais propriedades utilizando um conjunto limitado de regras ou hipóteses. O objetivo é identificar os fatores essenciais, filtrando ao máximo o número de variáveis desnecessárias, apesar dessas sempre estarem presentes em um experimento. Da mesma maneira, virtualmente não existem limites para as simulações numéricas, o que nos coloca ao alcance de informações experimentalmente inacessíveis. Esta tese insere-se nesse contexto de interdisciplinaridade, abordando o estudo o ciclo de vida social da ameba *Dictyostelium discoideum*.

Um dos primeiros trabalhos a relatar as características sociais da ameba foi publicado em 1940 por Raper [7]. Desde então ela tem sido o foco de inúmeros pesquisadores pois, como iremos mostrar a seguir, é um organismo modelo para se estudar processos biológicos complexos, tais como: estruturação e reestruturação de organismos pluri-celulares, e.g., morfogênese e regeneração; diferenciação celular; quimiotaxia; apoptose, i.e., morte celular programada; segregação celular; transdução de sinais químicos. Muitos desses processos podem ser replica-

dos em condições controladas de laboratório.

A *Dictyostelium discoideum* é uma ameba eucarionte unicelular que em seu ciclo natural vive em solos úmidos, mais especificamente em matéria orgânica em decomposição. Sua dieta é composta preferencialmente por bactérias e sua reprodução ocorre por mitose. O ciclo social dessa ameba inicia quando faltam os nutrientes mínimos para a sua sobrevivência na região onde estão localizadas. Nessa situação, elas emitem um sinal químico oscilante, a Adenosina Monofosfato cíclico 3'5' (AMPC), que é detectado e reemitido pelas outras amebas na região. Quando realizado em laboratório aproximadamente 10^7 amebas [8] são distribuídas em uma placa de Petri e após certo transiente [9], há percolação do sinal químico formando-se padrões típicos de sistemas de reação-difusão (espirais e misturas de espirais), tais como encontrados na reação química de Belousov-Zhabotinsky [10, 11].

Uma vez estabelecida a configuração espaço-temporal do sinal químico, as amebas começam a se movimentar na direção positiva do gradiente de concentração. As estruturas espaciais geradas pelas oscilações de AMPC na placa de Petri são detectadas pelas amebas como vários centros diferentes de oscilação de maneira que, em conjunto com a quimiotaxia, resultam em várias regiões de agregação. Tais regiões de agregação são, na verdade, uma das ferramentas de auto-regulação para o número de amebas que cada agregado terá [12]. Ao se locomoverem para os centros de oscilação as amebas se organizam em caminhos preferenciais de locomoção chamados de *streams*. Dentro desses caminhos preferenciais, as amebas se locomovem em uma velocidade maior do que quando isoladas.

À medida que se aglomeram no centro de oscilação local, elas formam um agregado tridimensional na forma de uma calota esférica (chamada *mound* em inglês). Uma vez formada essa estrutura, as amebas, originalmente idênticas, se diferenciam em pré-caule e pré-esporo e, ao finalizar tal diferenciação, as do tipo pré-caule são segregadas para o topo do agregado, formando uma ponta nessa estrutura. À medida que essa ponta começa a se estender para fora, segue ao encontro do substrato. As do tipo pré-esporo seguem as pré-caule, de maneira que o agregado acaba adquirindo a forma de uma lesma. Tal lesma começa, então, a migrar para uma região onde as amebas tenham melhores condições de sobrevivência.

A lesma então formada está envolta em uma camada glico-proteica produzida pela ponta. À medida que a mesma se desloca pelo substrato, é criado um túnel por onde as amebas deslocam-se que acaba sendo deixado para trás uma vez que todas as amebas tenham passado. A lesma guia sua migração através de estímulos do ambiente, como temperatura, luminosidade e a concentração de substâncias químicas. Internamente, as amebas apresentam dois tipos distintos de movimento: movimento helicoidal pelas amebas pré-caule e linear pelas pré-esporo. Uma vez que a lesma tenha atingido o local desejado, as amebas pré-caule se fixam no solo e formam um caule, enquanto as pré-esporo sobem tal estrutura para formar esporos, cuja função é disseminar as amebas na nova região.

Para englobarmos num único modelo as diversas propriedades descritas acima, precisamos ter em mente as diferentes escalas de tempo e espaço envolvidas em cada um dos processos. Primeiramente, a dinâmica de detecção e produção de AMPc por uma única ameba foi modelada por Martiel e Goldbeter (MG) [13]. Eles utilizaram um conjunto de três equações para descrever os processos bioquímicos intra e extra-celulares envolvidos. Os parâmetros do modelo foram obtidos através de experimentos. A seguir necessitamos descrever também a difusão no espaço do AMPc produzido pelas amebas de maneira a representar a sinalização entre as mesmas. Nesse contexto, Tyson [14, 15] utilizou o modelo de MG considerando uma ou várias amebas em cada sítio de uma grade, por onde a difusão do sinal químico era calculada. Por fim, é necessário modelar o comportamento coletivo para podermos reproduzir as propriedades, como os caminhos preferenciais de locomoção e os movimentos helicoidais observados nos experimentos.

Como vimos, o movimento das amebas é guiado pelo gradiente de AMPc que, por sua vez, não é um campo químico estacionário. Ou seja, estamos frente a um fenômeno onde a dinâmica envolve a interação de duas escalas espaço-temporais diferentes: a dinâmica interna de produção de AMPc e a sua difusão [13, 14, 15], sendo que ambas ocorrem em períodos muito menores do que a movimentação celular [8, 16]. Essa última depende não só do gradiente, como também da concentração de AMPc [6]. Ao mesmo tempo, o AMPc é produzido individualmente pelas amebas e a interação de movimento entre elas, bem como sua sensibi-

lidade ao gradiente químico, acontece tipicamente na escala de tamanho de uma célula. Por outro lado, a distribuição de AMPc no espaço pode chegar à ordem de centímetros. Portanto, se queremos construir um modelo para descrever o fenômeno, ele deve contemplar toda a extensão das escalas espaço-temporais observados.

Até o momento, a literatura tem vários exemplos de trabalhos que utilizam o modelo de MG para descrever a dinâmica de AMPc, conseguindo descrever corretamente o movimento das amebas e sua agregação. No entanto, ao discretizar o espaço com uma grade com sítios de tamanho da ordem celular, não são bem sucedidos em reproduzir toda a gama de padrões espaciais da concentração de AMPc no estágio anterior à agregação [17, 18, 19, 1]. Também há casos onde a sinalização foi simplificada em prol de alguma outra característica do ciclo social [20, 21, 22, 23, 24], de maneira que esses trabalhos reproduzem alguma característica específica até o estágio de agregação das amebas, mas não todas as propriedades do mesmo. Como exemplo principal de modelos multi-facetados temos Marée e colaboradores [25, 26, 27], que descrevem com sucesso todos os estágios do ciclo de vida social, mas que necessitam de modelos diferentes para cada estágio.

As equações diferenciais propostas por MG são de fácil implementação numérica e não geram maiores dificuldades, mas isso muda radicalmente ao adicionarmos a difusão ao modelo e esta é a chave para conseguirmos unir as diferentes escalas envolvidas no problema. Os métodos usuais de resolução numérica para a equação da difusão baseiam-se na discretização espacial numa grade, resolvendo a equação para cada um dos sítios nessa grade. Dessa maneira, é fácil ver que, à medida que aumentamos a extensão da área de simulação, ou diminuimos a resolução espacial, ou aumentamos o número de dimensões espaciais da simulação, o tempo de simulação aumenta drasticamente. O impacto é tão grande que apenas um trabalho utilizou uma discretização que fosse menor que a área de uma ameba [1].

Neste trabalho propomos o modelo de MG com adição de difusão de AMPc, que se utiliza de um método à base de funções de Green para resolver analiticamente a parte espacial da equação da difusão. Ou seja, independente de qualquer discretização do sistema. Dessa maneira, o tempo de integração das equações dependerá do número total de amebas, e não mais das di-

mensões características do sistema. A dependência no número de amebas, que em princípio também limitaria as simulações, pode ser amenizada utilizando-se processamento numérico em paralelo. Como será mostrado, o método escolhido é facilmente paralelizável, diminuindo assim significativamente o tempo de simulação.

Como temos um sistema que independe da discretização espacial, é natural modelar o seu movimento usando espaço contínuo. Assim, escolhemos um modelo de agentes móveis, como publicado por Vicsek *et al* [3], baseado no trabalho em animação gráfica de Reynolds. Tal modelo já provou ser eficaz para modelar o meio celular [28] e para explicar segregação celular [5]. Mesclando as nossas propostas para a sinalização e movimentação das amebas, teremos simulações que podem ter um grande número de indivíduos e, ainda assim, não perder os detalhes finos da sinalização. Como contra exemplo temos trabalhos anteriores que se utilizaram de um grande número de amebas, mas com uma grande discretização da difusão do AMPc [18, 19] ou, então, trabalhos com uma fina discretização, mas que foram obrigados a utilizar uma quantidade pequena de amebas [1].

Devemos salientar que este trabalho envolve simulações em duas e três dimensões, de maneira que a visualização de certas simulações, através de vídeos em material suplementar, traz um grande benefício ao leitor. Dessa maneira, acompanha esta tese uma cópia digital da mesma. Sempre que mencionado sobre a existência de um material suplementar para a simulação em questão, teremos junto os endereços eletrônicos (*links*) para os mesmos. As menções ao material suplementar são sempre numeradas e os arquivos nomeados de acordo com tal numeração.

No próximo capítulo iremos apresentar uma revisão detalhada do modelo de Martiel e Goldbeter [13] e da adaptação proposta por Nagano para incluir a difusão [1]. No capítulo 3, vamos mostrar a nossa proposta para a resolução do problema utilizando funções de Green, para então expor os experimentos numéricos que reproduzem as diversas propriedades referentes à sinalização química. Após termos analisado em detalhe essas propriedades do nosso modelo, vamos fazer uma revisão do modelo de animóides no capítulo 4, para podermos entender as diferentes abordagens aos sistemas estudados, de forma a melhor compreender o impacto nas mudanças propostas no atual trabalho. No capítulo 5, mostraremos os resultados obtidos ao

incluirmos a movimentação das amebas. O capítulo 6 explicitará o movimento circular observado nas simulações, e servirá como uma contra proposta para a atual conjectura da origem do movimento helicoidal das amebas encontrado dentro da lesma durante a sua migração. Por fim, no capítulo 7, iremos mostrar as nossas conclusões sobre os resultados obtidos com nossa formulação do modelo e possíveis extensões do mesmo.

2 Modelo de Martiel-Goldbeter sobre a sinalização de AMPc

Primeiramente identificado em 1962 por Shaffer como sendo AMPc [29], o sinal químico catalisador da agregação está presente em quase todas as etapas do ciclo da ameba. Nesse capítulo iremos revisar em detalhe as suas características. Num primeiro momento apresentaremos uma revisão [30] dos trabalhos de Goldbeter [31, 32, 33] para que possamos entender melhor como o modelo utilizado por ele em 1987 [13] chegou a sua forma final. Veremos também adaptações feitas ao modelo para incluir difusão do sinal químico no espaço.

2.1 Modelos de Goldbeter

Apesar de existirem trabalhos sobre a ameba desde o ano de 1940 [7], foi em 1970 que uma abordagem teórica foi usada para tentar entender os processos da ameba, no trabalho publicado por Keller e Segel [34]. Tal trabalho trata sobre a interação quimiotática das amebas durante a sua agregação e propõe que tal processo ocorre devido a uma instabilidade gerada na quebra de simetria da distribuição espacial de AMPc. O impacto de tal trabalho pode ter ganhado impulso devido à área, em ascensão, de auto-organização espaço-temporal em sistemas químicos fora do equilíbrio, como exemplificado pelas oscilações e ondas na reação química de Belousov-Zhabotinsky [10, 11].

Publicados quase simultaneamente, dois trabalhos [35, 36] foram fundamentais para inspirar o primeiro trabalho teórico de Goldbeter para a modelagem da dinâmica de sinalização entre as amebas. Rossomando e Sussman [35] analisaram os processos bioquímicos na produção de

AMPC, verificando a dependência dos pulsos da enzima catalisadora Adenilato Ciclase para a conversão de Adenosina Trifosfato (ATP) em AMPc. Através de experimentos com espalhamento de luz, Gerisch e Hess [36] mostraram a existência de oscilações na concentração de AMPc extracelular e que uma fonte externa de AMPc pode deslocar a fase das oscilações. Foi baseado nesses trabalhos que, em 1975, Goldbeter [31] propôs seu primeiro modelo para descrever a sinalização de AMPc.

No mesmo ano, dois novos trabalhos esclareceram mais detalhes sobre os detalhes específicos da sinalização. Gerisch, Roos e colaboradores [37, 38] continuaram focando nas propriedades de meio excitável e determinaram o período de oscilação. Também encontraram os limites de estímulos externos para os quais as células que não oscilassem naturalmente pudessem retransmitir os sinais de AMPc. Após o estímulo, as células previamente excitadas voltavam ao seu estado quiescente, confirmando assim a analogia da sinalização com um meio excitável.

Com base nesses novos dados, Goldbeter e Segel [32] colaboraram em um novo modelo que pretendia estudar relação entre a pulsos externos e as oscilações espontâneas de AMPc. Apesar de especular-se na época que a diferença entre os dois regimes (oscilação espontânea e transmissão) ocorresse devido a dois mecanismos moleculares distintos, Goldbeter e colaboradores exploraram a possibilidade de apenas um mecanismo regulador para ambos os regimes, controlado por um único parâmetro. O modelo consiste de três variáveis: concentração extracelular de AMPc, e as concentrações intracelulares de ATP e AMPc.

Para conseguir os comportamentos distintos desejados, o modelo se baseia na realimentação (*positive feedback*) de AMPc externo, i.e., quando uma molécula externa se liga aos receptores nas membranas da célula a enzima Adenilato Ciclase reage com o ATP para produzir AMPc. Este é então transportado para o meio externo onde, novamente, interagirá com os receptores, causando a realimentação da produção do sinal químico. Para termos um pulso, esse ciclo deve chegar ao fim após um determinado período. Em seu modelo, Goldbeter e Segel propõem que a realimentação se encerraria quando a concentração de ATP ficasse abaixo de uma determinada quantidade, ativando, então, o estado quiescente, até que a célula tivesse novamente a quantidade necessária de ATP para reiniciar o processo. Detalharemos ainda nessa seção os processos

bioquímicos aqui mencionados.

Em 1979, Gerisch [39] observou em seus experimentos que as amebas passam por quatro estágios: quiescente absoluto; retransmissão de pulsos externos; emissão espontânea de pulsos; e, por fim, a volta ao estado de apenas retransmitir os pulsos externos. Para reproduzir esse comportamento, Goldbeter e Segel [33] apresentaram um novo modelo, onde os parâmetros do sistema seguiam uma trajetória no espaço de parâmetros (*developmental path*). A trajetória proposta por eles correspondia a um aumento progressivo da atividade das enzimas Adenilato Ciclase e Fosfodiesterase (enzimas responsáveis pela degradação do AMPc através da quebra das ligações fosfodiésteres e da ativação de produção de AMPc intracelular, respectivamente), resultado esse que foi observado por Loomis [40]. Anos mais tarde numa colaboração com Lauzeral e Halloy [41], a mesma proposta de *developmental path* foi utilizada mas, dessa vez, com o modelo final de MG.

Como mencionado anteriormente, os modelos de 1977 e 1980 utilizavam como mecanismo para interromper a realimentação de AMPc a queda nos níveis de ATP, mas análises posteriores revelaram que tal conjectura seria falha. Evidências experimentais mostravam que as concentrações de ATP intracelular estavam na ordem de grandeza de mM, enquanto os de AMPc estavam em μM . Além disso, medidas [42] mostraram que as variações na concentração de ATP durante o processo eram mínimas. Como mecanismo alternativo para a regulação dos pulsos, Devreotes e Sherring [43] mostraram que ao se ligar nos receptores da membrana celular, o AMPc induz uma modificação covalente na forma de uma fosforilação reversível dessensibilizando o receptor, sendo tal processo e a sua eventual ressensibilização, portanto, um bom candidato a mecanismo regulador dos pulsos.

Seguindo essa linha de pensamento, em 1987 Martiel e Goldbeter propuseram um modelo de três variáveis: concentração interna de AMPc, concentração externa de AMPc, e fração de receptores ativos. Como podemos ver na Fig. 2.1, o AMPc externo se liga ao receptor no estado ativo (R), que se torna dessensibilizado (D), ativando assim a enzima Adenilato Ciclase (C), que é a responsável em transformar ATP em AMPc, que será então transportado para fora da ameba, difundido através da membrana, iniciando o ciclo de amplificação. Quando a fração



Figura 2.1: Representação esquemática do ciclo de produção de AMPc como proposto por Martiel e Goldbeter

de receptores ativos estiver abaixo de certo limiar, o processo que ativa a enzima (C) deixa de ocorrer, interrompendo assim a transformação de ATP em AMPc, marcando a entrada da ameba no regime refratário até que receptores suficientes voltem a se sensibilizar. A degradação do AMPc ocorre devido a sua hidrolisação pela enzima fosfodiesterase, presente dentro e fora da célula, assim como no transporte através da membrana celular. Tal ciclo pode ser descrito matematicamente como:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{k_t}{h}\beta - k_e\gamma, \quad (2.1)$$

$$\frac{d\beta}{dt} = \phi(\rho, \gamma) - (k_i + k_t)\beta, \quad (2.2)$$

$$\frac{d\rho}{dt} = f_2(\gamma)(1 - \rho) - f_1(\gamma)\rho, \quad (2.3)$$

sendo $\phi(\rho, \gamma)$, $f_1(\gamma)$ e $f_2(\gamma)$ descritos por:

$$f_1(\gamma) = \frac{k_1 + k_2\gamma}{1 + \gamma}, \quad f_2(\gamma) = \frac{k_{-1} + \lambda_1 k_{-2}\gamma}{1 + \lambda_1\gamma},$$

$$\phi(\rho, \gamma) = \frac{\lambda_2 + Y^2}{\lambda_3 + Y^2}, \quad Y = \frac{\rho\gamma}{1 + \gamma},$$

onde γ e β são respectivamente as concentrações externas e internas de AMPc (em unidades de $10^{-7}M$) e ρ é a fração de receptores ativos. Os parâmetros utilizados no trabalho de MG são, em sua grande maioria, extraídas de experimentos e podem ser visualizadas na tabela 2.1.

Com esse modelo, Martiel e Goldbeter foram capazes de reproduzir com sucesso o período e amplitude de oscilação como vistos em laboratório, assim como os limiares de concentração de AMPc que devem ser inseridos para causar um pulso em amebas no estado quiescente.

Parâmetros	Valores usados
λ_1	10
λ_2	0.18
λ_3	463.5
h	5
k_1	0.036 min^{-1}
k_{-1}	0.36 min^{-1}
k_2	0.666 min^{-1}
k_{-2}	0.00333 min^{-1}
k_i	1.7 min^{-1}
k_t	0.9 min^{-1}
k_e	5.4 min^{-1}

Tabela 2.1: Tabela com os parâmetros utilizados no artigo de MG [13].

Reproduziram também períodos refratários para que estímulos periódicos não diminuam a amplitude das oscilações, adaptação a estímulos constantes e periódicos nos mesmos patamares experimentais, assim como a adaptação do sistema em produzir AMPc sem utilizar a enzima Adenilato Ciclase, quando as amebas são imersas em uma solução com AMPc e cafeína.

2.2 Adaptações ao modelo de MG

Dois anos após sua publicação, Tyson *et al* [14, 15] adaptaram o modelo de Goldbeter com objetivo de incluir difusão espacial do AMPc. Nesse trabalho, foram medidas a frequência, velocidade e forma da onda, mas o trabalho pretendia estudar apenas o sinal químico, portanto as amebas não se moviam no seu modelo. Em 1998 Nagano [1] seguiu essa mesma linha e publicou um estudo que utilizava as equações de MG e considerava o movimento das amebas.

Sua adaptação utilizava os mesmos parâmetros que o trabalho de MG, com exceção do parâmetro h (responsável pela razão de AMPc produzida internamente e que é difundido através da membrana) e da constante de difusão que não estava presente no trabalho original. Para simular a difusão do AMPc, Nagano também propôs que a concentração de AMPc dentro da ameba se daria por uma distribuição gaussiana, onde o valor central seria dado por β_j que é a concentração interna da j -ésima ameba como calculada por MG. Ambas as adaptações podem

ser vistas em:

$$\frac{d\gamma(\vec{x}, t)}{dt} = \frac{k_t}{h}\beta(\vec{x}, t) - k_e\gamma(\vec{x}, t) + D\nabla^2\gamma(\vec{x}, t), \quad (2.4)$$

$$\beta(\vec{x}, t) = \sum_{j=1}^N \beta_j(t) \exp\left[-\frac{4}{\sigma_0^2}(\vec{x} - \vec{x}_j)^2\right], \quad (2.5)$$

$$\frac{d\beta_j}{dt} = \phi(\rho_j, \gamma_j) - (k_i + k_t)\beta_j, \quad (2.6)$$

$$\frac{d\gamma_j}{dt} = \frac{k_t}{h}\beta_j - k_e\gamma_j, \quad (2.7)$$

$$\frac{d\rho_j}{dt} = f_2(\gamma_j)(1 - \rho_j) - f_1(\gamma_j)\rho_j, \quad (2.8)$$

onde $\sigma_0=0,01$ mm é o diâmetro da ameba, $D = 0,024$ mm²/min é a constante de difusão para o AMPc e h que foi utilizado como parâmetro livre, $h=0,104$. Para resolver a equação da difusão, Nagano discretiza o espaço de maneira que cada ameba ocupe nove células ($dx = \sigma/3$) e, até a publicação do trabalho referente a essa tese [44], era o único trabalho que resolveu espacialmente as equações de MG utilizando um tamanho de célula menor do que uma ameba.

A razão pela qual Nagano foi o primeiro a utilizar tal discretização nove anos após o primeiro trabalho contendo as equações de MG ter sido publicado, e ainda assim se manter o único com tal grau de detalhe por mais 12 anos se deve ao custo computacional de tal escolha. Como veremos em maiores detalhes no próximo capítulo, métodos usuais para a resolução da equação da difusão se tornam excessivamente demorados ao adotarmos um detalhamento maior da concentração de AMPc.

Ao longo dos anos outros trabalhos utilizaram adaptações do modelo de Martiel e Goldbeter, mas sempre com discretizações de no mínimo um diâmetro celular. Entre tais trabalhos, dois grupos se destacam: propostas para estudar as propriedades da sinalização química propondo uma trajetória evolutiva para os parâmetros envolvidos [41, 45] e análises de propriedades físicas durante a locomoção e interação entre as amebas [46, 47, 48].

3 Implementação da sinalização química

Nesse capítulo mostraremos os detalhes da implementação e resolução numérica das equações de MG, com a adição de difusão espacial do AMPc conforme proposto por Nagano [1]. Nosso modelo propõe uma aproximação por função de Green, de maneira que a resolução numérica do mesmo independa das propriedades espaciais do sistema. Uma vez definido o método de resolução, mostraremos diversas simulações, que tem como objetivo entender as propriedades de sinalização entre as amebas e, é claro, reproduzir eventos observados em experimentos.

3.1 Resolução das equações de MG

Para resolver as equações de MG (com ou sem difusão) temos que recorrer a métodos numéricos de solução de equações diferenciais. Apesar de termos uma infinidade de métodos diferentes, é importante escolher qual deles melhor se adapta ao problema e que tenha ao mesmo tempo um desempenho razoável na hora de resolvê-lo. Métodos usuais de resolução (Euler, Runge-Kutta, Crank-Nicholson) baseiam-se na discretização do espaço e tempo para resolver o problema apresentado. Ao considerarmos a discretização espacial, é fácil notar que o tempo de resolução do sistema está diretamente ligado ao tamanho do sistema, a sua discretização e ao número de dimensões espaciais que o problema contém. Métodos espectrais como transformadas de Fourier, apesar de apresentarem bom desempenho numérico, dependem do tamanho do sistema, de forma que sistemas de grande extensão, discretização fina e três dimensões tornam-se demasiadamente lentos e complicados de serem resolvidos.

Ao utilizar os métodos descritos acima para o problema da difusão de AMPc, teremos como solução a concentração de AMPc em todo o espaço. Tal característica é geralmente desejada, mas para resolver o modelo de MG precisamos apenas das concentrações de AMPc dentro e na vizinhança imediata de cada célula. Sendo assim tais métodos, além de lentos, teriam uma eficiência muito baixa pois, de todos os dados calculados, precisaríamos apenas de uma parcela pequena e o resto seria descartado. A ideia para superar essa dificuldade consiste em utilizar a linearidade da equação da difusão e resolver individualmente a difusão do AMPc para cada ameba e então somar essas contribuições. Mais especificamente, se calcularmos a quantidade de AMPc emitido pela j -ésima ameba no instante S , que consegue chegar na localização \vec{x} no tempo t , precisaremos apenas somar as contribuições análogas das outras n amebas para termos exatamente a concentração de AMPc nas coordenadas desejadas. Considerando que o método que apresentaremos é capaz de resolver analiticamente a parte espacial do problema, nos restaria apenas a integração numérica na dimensão temporal, o que também significa que o cálculo numérico independe da extensão espacial do problema.

A implementação de tal método requer o uso de funções de Green. As funções de Green foram uma ferramenta matemática concebida em 1830 pelo matemático britânico George Green, e são utilizadas para resolver equações diferenciais não homogêneas sujeitas à condições de contorno definidas. Cabe aqui fazermos uma pequena revisão de tal método para melhor compreensão da aproximação que iremos propor.

Seja L um operador diferencial linear associado a uma equação não homogênea

$$Lu(x) = f(x). \quad (3.1)$$

Define-se como Função de Green $G(x, s)$ associada a esse operador, a função que satisfaz

$$LG(x, s) = \delta(x - s), \quad (3.2)$$

onde δ é a função delta de Dirac,

$$\int \delta(x - s)f(s) ds = f(x) = Lu(x). \quad (3.3)$$

Usando a definição da Função de Green acima teremos,

$$Lu(x) = \int LG(x,s)f(s) ds. \quad (3.4)$$

Como o operador L é linear e opera somente na variável x , podemos removê-lo de dentro da integral, obtendo a seguinte igualdade:

$$Lu(x) = L \int G(x,s)f(s) ds, \quad (3.5)$$

de maneira que:

$$u(x) = \int G(x,s)f(s) ds. \quad (3.6)$$

Portanto, uma vez tendo determinada a função de Green de um determinado operador diferencial, podemos descobrir a solução da equação diferencial não-homogênea resolvendo a integral da Eq. (3.6), o que pode ser muito mais simples do que resolver a equação diferencial original. Vale notar que o mesmo procedimento é expansível para problemas com duas ou três dimensões espaciais.

Considerando as equações de MG adaptadas por Nagano, a nossa expressão $Lu(x,y) = f(x,y)$ é dada por:

$$\left(\frac{\partial}{\partial t} + k_e - D\nabla^2 \right) \gamma(\vec{x}, t) = \frac{k_t}{h} \beta(\vec{x}, t). \quad (3.7)$$

Sendo assim, a solução da Eq. (2.4) é dada pela equação:

$$\gamma(\vec{x}, t) = \sum_{j=1}^N \int_0^t \int_{-\infty}^{\infty} G(\vec{x} - \vec{x}_j - \vec{y}, t - s) f_j(\vec{y}, s) ds d\vec{y}, \quad (3.8)$$

onde $G(\vec{x} - \vec{x}_j - \vec{y}, t - s)$ é a função de Green associada ao operador diferencial da Eq. (3.7), $f_j(\vec{y}, s)$ é a j -ésima fonte de AMPc no sistema e \vec{x}_j é a posição da fonte. A função de Green associada ao problema de difusão com condições de contorno de Dirichlet (o campo tendendo a zero a uma distância infinita da origem) e um termo de degradação é dado por:

$$G(\vec{x} - \vec{x}_j - \vec{y}, t - s) = \frac{1}{(4\pi D(t-s))^{\frac{d}{2}}} \exp\left(-\frac{(\vec{x} - \vec{x}_j - \vec{y})^2}{4D(t-s)} - k_e(t-s)\right), \quad (3.9)$$

onde d é a dimensão do sistema. A solução da função de Green para a equação da difusão pode

ser vista em [49] e sua extensão pode ser facilmente verificada aplicando o operador da Eq. 3.7 à Eq. 3.9.

Como estamos interessados somente na dinâmica de AMPc extra-celular, vamos assumir que a concentração intra-celular é homogênea e pode ser descrita por¹:

$$f_j(\vec{y}, s) = \begin{cases} \frac{k_t}{2h} \beta_j(s) & \rightarrow \|\vec{y}\| \leq R_\sigma \\ 0 & \rightarrow \|\vec{y}\| > R_\sigma, \end{cases} \quad (3.10)$$

onde $R_\sigma = 0.005$ mm é o raio da ameba. Substituindo as Eqs. (3.9) e (3.10) na Eq. (3.8) obtemos:

$$\gamma(\vec{x}, t) = \sum_{j=1}^N \int_0^t \frac{c_j(s)}{(4\pi D(t-s))^{\frac{d}{2}}} \int_{\vec{x}_j - R_\sigma}^{\vec{x}_j + R_\sigma} \exp\left(\frac{-z_j^2}{4D(t-s)} k_e(t-s)\right) d\vec{z} ds, \quad (3.11)$$

sendo $c_j(s) = \frac{k_t}{2h} \beta_j(s)$ a quantidade de AMPc que a j -ésima ameba gerou no instante $t-s$ e $\vec{z} = \vec{x} - \vec{x}_j - \vec{y}$. Integrando a Eq. (3.11) em \vec{z} , obtemos:

$$\gamma(\vec{x}, t) = \sum_{j=1}^N \int_0^t \frac{c_j(s)}{2^{2d}} \prod_{l=1}^d \left[\operatorname{erf}\left(\frac{\kappa_{j,l} + R_\sigma}{\sqrt{4D(t-s)}}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{\kappa_{j,l} - R_\sigma}{\sqrt{4D(t-s)}}\right) \right] e^{-k_e(t-s)} ds, \quad (3.12)$$

onde $\kappa_{j,l}$ é a distância entre o ponto medido e a j -ésima ameba na coordenada cartesiana l .

Como mencionado, a Eq. (3.12) contém uma solução analítica para a parte espacial do problema. Dessa maneira temos somente o produto de diferenças de funções erro e a integração temporal a serem resolvidas numericamente, ambas de simples solução numérica. O termo $c_j(s)$ entretanto, nos obriga a manter um histórico do AMPc criado pelas amebas, fato que normalmente nos impossibilitaria de usar tal solução. Felizmente o termo de degradação da Eq (3.12) $\exp[-k_e(t-s)]$ tem um efeito tão significativo que apenas os últimos instantes de emissão terão uma real influência sobre o sistema. Testes foram feitos em sistemas idênticos, variando apenas o tamanho do histórico, de maneira que conseguimos determinar um tamanho ideal de histórico, para uma precisão na concentração de 10^{-6} . O valor para o tempo mínimo de histórico foi de $T_{\min} = 0.6$ minutos para os parâmetros originais.

¹A baixas concentrações celulares, o uso de uma função delta de Dirac para a concentração certamente simplificaria ainda mais a abordagem.

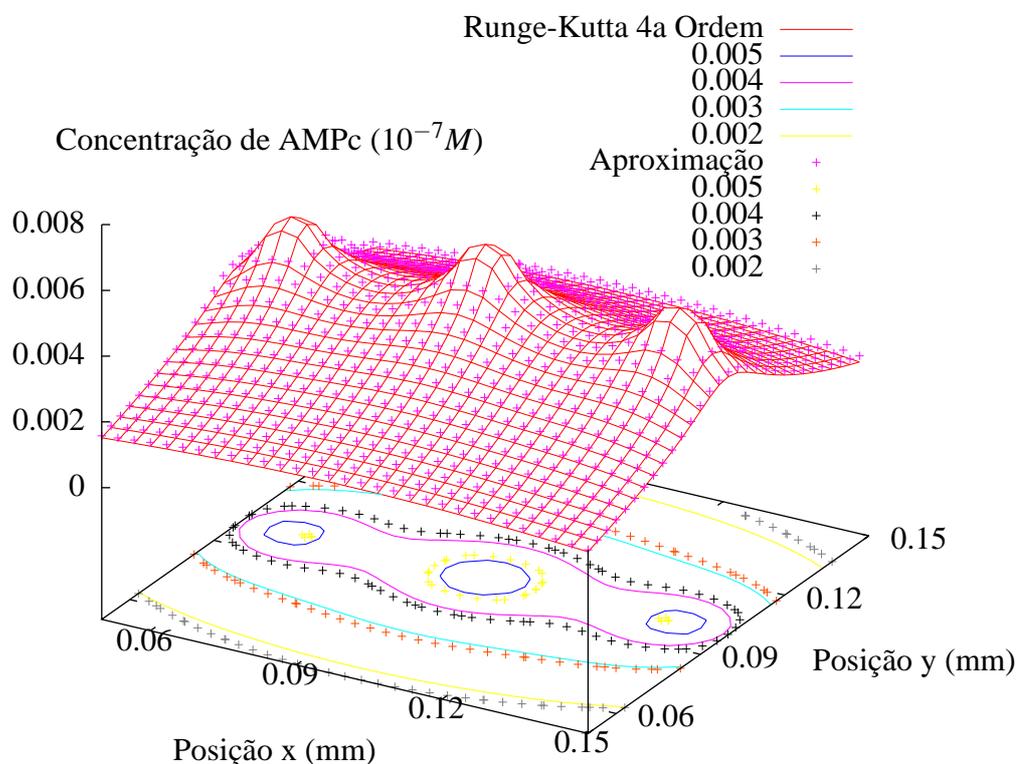


Figura 3.1: Comparação entre a concentração de AMPc obtida simulando 3 amebas no modelo de Nagano [1] através do método de Runge-Kutta de 4^a e a nossa aproximação usando funções de Green. Dados representados por linhas e pontos, respectivamente. Na base podemos ver as curvas de nível para ambos os resultados, para melhor comparação entre os resultados

Na Fig. 3.1 podemos ver a comparação entre métodos de Runge-Kutta de 4^a ordem e a nossa aproximação através de funções de Green. Ao calcular a concentração de AMPc para o caso de três amebas afastadas 4σ entre si, ambas as simulações foram feitas de acordo com o trabalho de Nagano [1]. Analisando a figura, podemos ver que as principais diferenças entre os resultados ocorrem na região intracelular. Tal diferença existe devido a dois fatores diferentes: no modelo de Nagano a concentração intracelular de AMPc é modelada por uma gaussiana e na aproximação que introduzimos a concentração é mantida constante dentro de cada célula; justamente na região intracelular onde teremos uma pior precisão numérica para o método de Runge-Kutta devido a discretização do espaço ($dx = \sigma/3$).

Como havíamos proposto, a Eq. (3.12) independe das características espaciais do problema (extensão, discretização e dimensionalidade). Poderíamos argumentar que existe uma dependência na dimensionalidade do problema, uma vez que o produtório depende dessa característica, mas tal termo só influencia no produto das diferenças de funções erro, o que é computacionalmente desprezível. Apesar da independência espacial da Eq. (3.12), deve-se notar que o tempo de resolução da mesma escala com N^2 , sendo N o número de amebas. Tal fato normalmente dificultaria a resolução de sistemas com grandes números de amebas, porém este problema pode ser amenizado utilizando a técnica de programação em paralelo. Para o atual problema, a implementação desse recurso é relativamente fácil, já que a solução para cada uma das amebas independe das outras. Uma vez implementado, a linearização do problema é teoricamente possível no caso de termos N processadores para a simulação, mas como para a maioria dos casos teremos mais amebas do que processadores, o tempo de resolução escala com a proporção $N(N/CPU_s)$, que torna viável a resolução de sistemas com até 5mil partículas. Todas as simulações utilizando programação em paralelo foram realizadas no Centro Nacional de Super Computação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CESUP-UFRGS).

3.2 Simulações em sinalização de AMPc

Agora que temos um algoritmo eficiente e paralelizável para a resolução da dinâmica do AMPc, podemos realizar alguns testes para estudar diferentes propriedades da sinalização entre as amebas. Uma vez que nesse primeiro momento estamos interessados somente na dinâmica do AMPc, ao longo deste capítulo as amebas serão estáticas e estudaremos o efeito recíproco do AMPc difundido no espaço entre as amebas e a dinâmica interna de cada uma delas. A distribuição espacial das amebas é de grande importância nesse estudo e para termos idéia das escalas envolvidas, as distâncias serão dadas em unidades de $\sigma = 0.01'$ mm, que como visto anteriormente é o diâmetro típico de uma ameba. Vale notar que, inicialmente, seguiremos os passos de Nagano [1] e utilizaremos os parâmetros publicados por MG, com a exceção da difusão $D = 0.024 \text{ mm}^2/\text{min}$ e do parâmetro h - responsável por regular a quantidade de AMPc produzido internamente que chega ao meio extra-celular - que foi tomado como parâmetro livre

(aqui $h = 0.025$). Tal valor do parâmetro garante que haverá resposta oscilatória das amebas a uma excitação externa a partir de uma concentração crítica das mesmas. Diferentes parâmetros serão utilizados mais adiante, para melhor adaptar as simulações à realidade.

Antes de começarmos a apresentar as simulações, dois pontos devem ser salientados. Primeiramente, podemos ver que existe uma diferença conceitual entre as Eqs. (2.2) e (2.5). Uma vez que no trabalho de Martiel e Goldbeter não havia sinalização entre amebas, não havia motivos para o índice j nas variáveis, mas ao acrescentar difusão, e portanto a sinalização entre elas, o índice se torna essencial. Assim, a partir desse momento adotaremos o índice para todos os casos onde estejamos nos referindo a propriedades de amebas específicas.

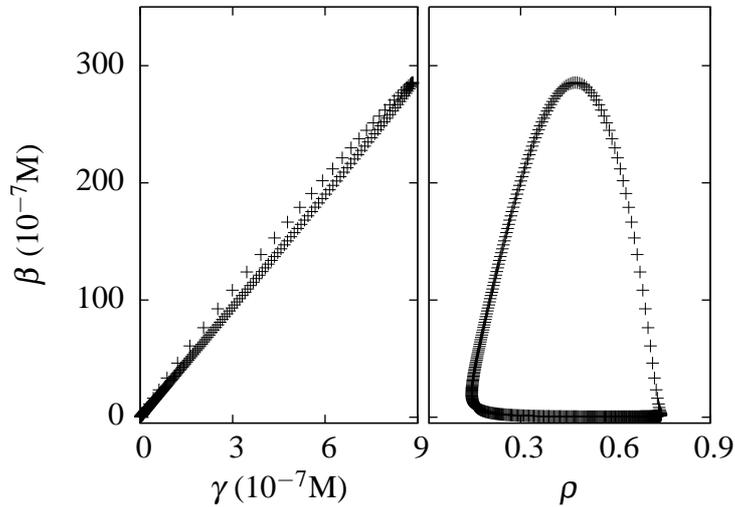


Figura 3.2: Projeções do espaço de fase para uma única ameba. A esquerda temos a projeção $\beta (10^{-7}M) \times \gamma (10^{-7}M)$ e a direita temos a projeção $\beta (10^{-7}M) \times \rho$. Como pode-se notar, a relação entre β e γ para a mesma ameba é quase linear, portanto iremos utilizar apenas a segunda projeção ($\beta \times \rho$).

O segundo ponto está relacionado ao espaço de fases do problema². Esse espaço tem três dimensões, como visto nas Eqs. (2.1) a (2.3). Entretanto, a relação entre as variáveis β e γ é quase linear (Fig. 3.2) e podemos nos focar apenas na projeção de $\beta \times \rho$ (Fig. 3.2b). Essa figura nos mostra os diferentes estágios do modelo, e caso visualizássemos a evolução do ciclo, notaríamos que o sistema gasta uma quantidade maior de tempo na região $\beta \approx 0$. A maior permanência nesse estágio se deve ao tempo de ressensibilização dos receptores de AMPc. Uma

²Análise para apenas uma única ameba isolada no espaço

vez que uma fração mínima de receptores é ativada, ocorre um pulso. De agora em diante nos referiremos a esse ciclo como *ciclo padrão*, pois usaremos seus dados como condições iniciais das amebas. Vale notar que, como todas amebas utilizam os mesmos parâmetros, para que não sigam exatamente a mesma evolução (sincronização) desde o início, colocamos suas condições iniciais em diferentes regiões do espaço de fase.

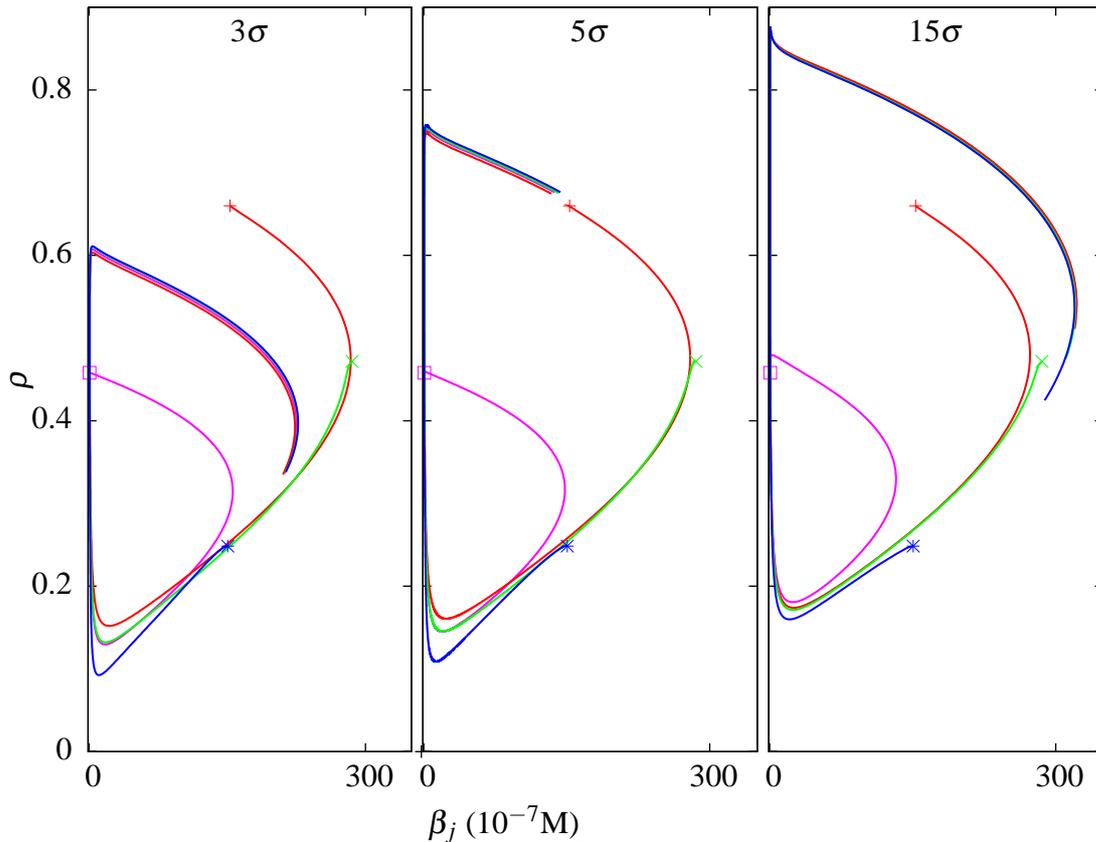


Figura 3.3: Projeção do espaço de fase $\beta_j (10^{-7}M) \times \rho_j$ para quatro amebas (cada uma representada por uma linha de cor diferente) distribuídas em quadrados com lados medindo 3, 5 e 15σ respectivamente. Os símbolos indicam as condições iniciais em que cada ameba começou.

Para melhor exemplificar a evolução do sistema, estudamos a sincronização de 4 amebas distribuídas em quadrados de lado 3, 5 e 15σ respectivamente. Suas condições iniciais foram obtidas através de quatro regiões distintas do ciclo padrão. Podemos ver os resultados na Fig. 3.3 onde temos a projeção do espaço de fase $\beta_j \times \rho_j$ para as diferentes simulações. Deve-se notar que ao final de um pulso, o ciclo das quatro amebas estão sincronizados num mesmo ciclo-limite (similar a projeção do espaço de fase $\beta_j \times \rho_j$ apresentado na Fig. 3.2 a direita) para cada uma das simulações, e se tratando de um ciclo-limite, o mesmo irá se repetir indefinida-

mente. Podemos ver que a ameba cuja condição inicial é representada por um quadrado acaba tendo o seu ciclo antecipado (tendo em vista o ciclo-limite no qual ela se estabiliza) devido ao acoplamento dos ciclos com as amebas restantes. Outra consequência importante do acoplamento entre as amebas é a mudança no período de oscilação de acordo com a proximidade entre si: quanto mais perto uma das outras, menor o período de oscilação. Ao mesmo tempo em que o período é encurtado, também vemos na projeção do espaço de fase uma redução na área coberta pelos ciclos-limite. Tal redução tem origem na âmago do modelo de MG, i.e., a dependência da intensidade dos pulsos com a fração de receptores ativos. Quanto mais denso o sistema, maior a concentração de AMPc na região das amebas, o que resulta em menos receptores ativos e um pulso de menor amplitude, i.e, um ciclo-limite de menor área. Ao aumentarmos ainda mais a densidade de amebas o ciclo continua sua redução até chegar em um ponto no espaço de fase, onde terá uma produção mínima de AMPc, mas constante.

Considerando a influência que o acoplamento das amebas teve nos resultados desse experimento numérico, fica clara a importância de estudarmos mais a fundo tal relação. Vamos então propor um experimento para medir a velocidade de propagação de uma onda de AMPc. Como queremos estudar a propagação de uma onda em uma única direção, poderíamos usar um sistema unidimensional. O problema em tal sistema é que os resultados seriam válidos apenas para essa análise, uma vez que as simulações desejadas serão de no mínimo duas dimensões espaciais. Dessa maneira criaremos um sistema quase unidimensional, i.e., distribuiremos as amebas numa grade 80×9 para termos um sistema com densidades e acoplamentos bidimensionais, mas com um número reduzido de amebas. Cronologicamente tal arranjo foi necessário antes de implementarmos a programação em paralelo.

A onda será propagada da seguinte forma: a primeira das 80 linhas será colocada em uma condição inicial de pulso originada do *ciclo padrão* enquanto as demais linhas receberão uma condição inicial no estado quiescente, mas receptivo a um pulso ($\beta_j = 0$ e $\rho_j = 0.9$). Como teremos efeitos de borda devido às condições de contorno que difundem o AMPc ao infinito (Dirichlet com o campo tendendo a zero a uma distância infinita da origem), analisaremos apenas os resultados da coluna central e excluiramos os resultados das últimas linhas.

Devido a função de Green utilizada, não podemos mudar as condições de contorno, que ainda são

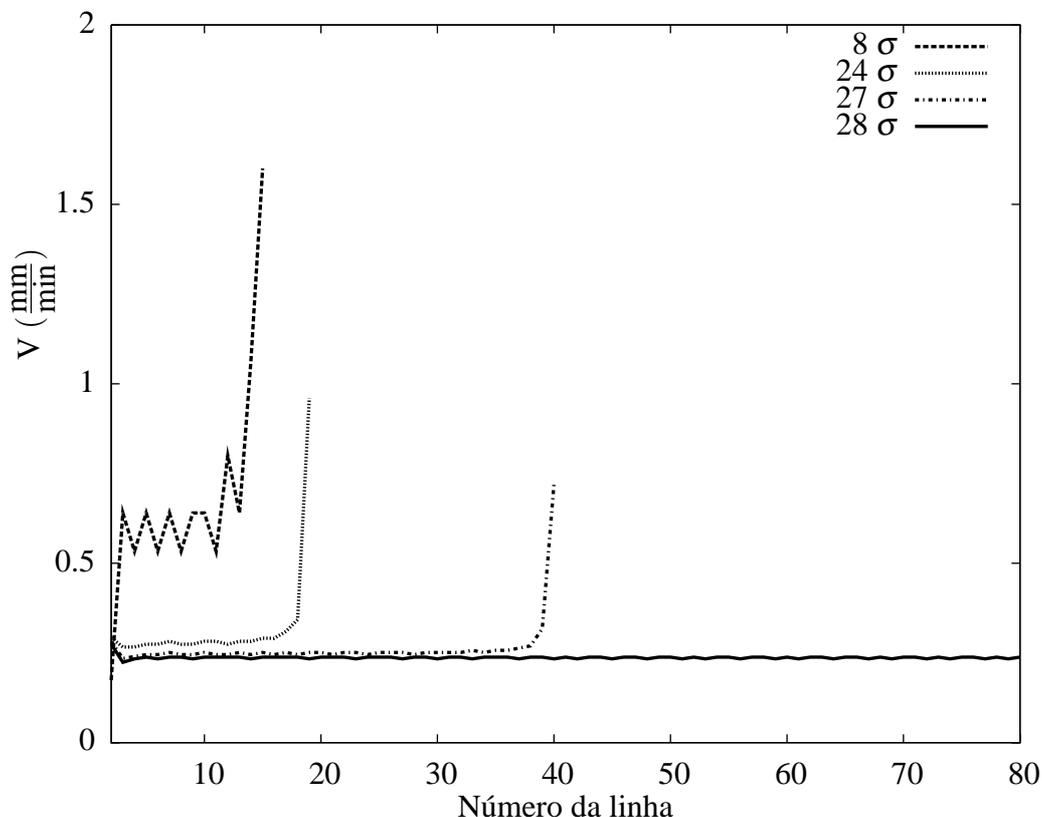


Figura 3.4: Velocidade de onda em mm/min para cada uma das linhas de amebas na simulação. A velocidade foi medida considerando o intervalo de tempo que levou para que a concentração máxima de AMPc da linha anterior levou para chegar a que está sendo medida. Resultados das ultimas linhas foram omitidos devido a efeitos de bordas. Cada linha representa uma simulação com um espaçamento diferente entre as amebas (8σ , 24σ , 27σ , 28σ).

Para obtermos a velocidade, mediremos o intervalo de tempo que leva para cada linha chegar ao máximo de concentração de AMPc em relação a linha anterior. Simulações serão feitas para valores diferentes de espaçamento entre as amebas com objetivo de verificar o efeito da densidade na velocidade. Tais resultados podem ser vistos na Fig 3.4, onde vemos que quanto menor o espaçamento, maior a velocidade de propagação da onda. Também podemos notar que para resultados com espaçamentos menores que 27σ , a velocidade eventualmente diverge. Isso acontece pois, para valores abaixo desse limiar, as amebas estão em uma densidade suficiente para que ocorra uma oscilação espontânea, essa ocorre em todas as linhas que ainda não

oscilaram, gerando assim uma indeterminação na velocidade. Também podemos ver que altas densidades antecipam a região em que o pulso sincronizado ocorre. Para espaçamentos entre 28 e 33σ o sistema propaga pulsos colocados nas suas condições iniciais, mas não é denso o suficiente para gerar pulsos espontâneos. No caso limite temos os sistemas com espaçamento maiores que 33σ , onde o pulso degrada antes de excitar a próxima linha de amebas.

Outra propriedade importante observada nas simulações para os sistemas com espaçamentos menores que 27σ , é que após a propagação da primeira onda, que tinha como origem a primeira linha de amebas, as próximas se originaram em linhas subsequentemente posteriores a primeira, de maneira que eventualmente a onda é gerada no meio do sistema, i.e., se tivéssemos uma grade quadrada de amebas, teríamos uma onda circular ou *target wave*.

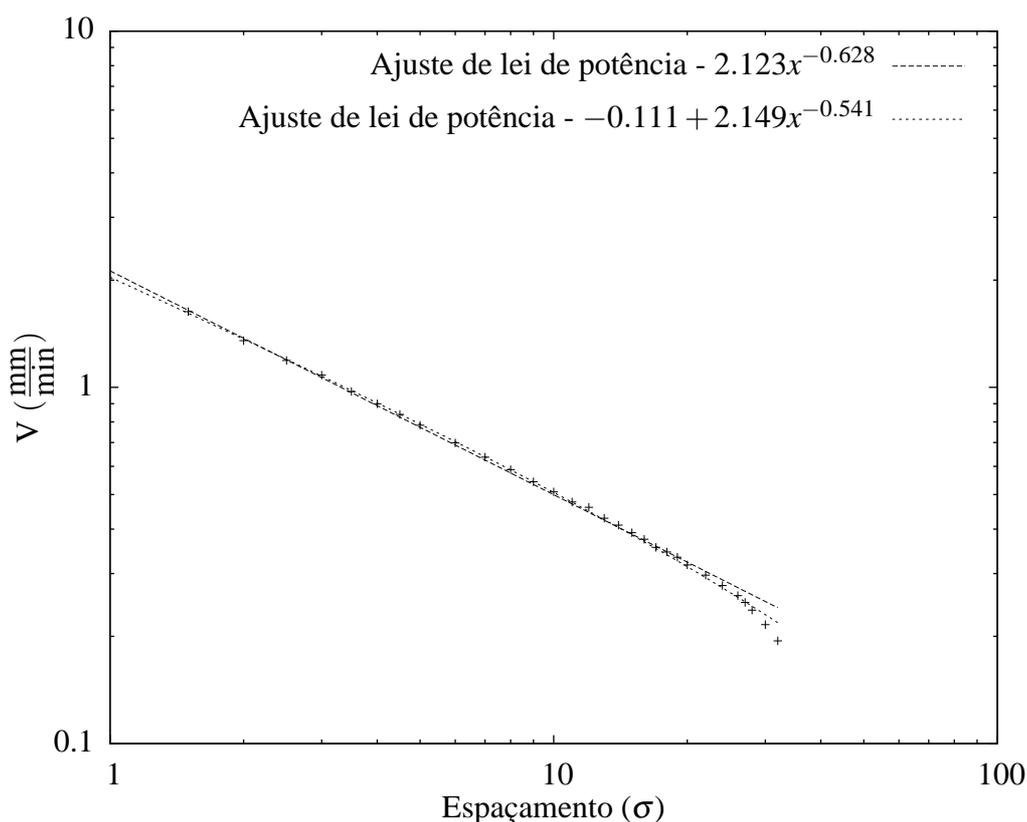


Figura 3.5: Velocidade média da onda em mm/min referente à simulação anterior (como visto na Fig. 3.4), que consiste em uma onda se propagando numa grade regular de amebas, onde cada simulação foi realizada com um espaçamento diferente. A média apresentada aqui foi calculada antes do sistema chegar a sincronização. Podemos notar que os dados se ajustam bem a uma lei de potência do tipo $ax^\lambda + b$ onde $\lambda \approx -0.541172$.

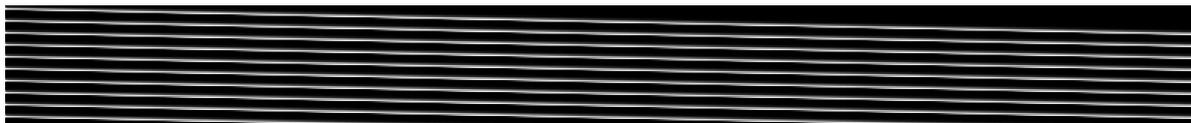


Figura 3.6: A concentração de AMPc referente a coluna central da grade de amebas é mostrada verticalmente, o brilho representa a concentração de AMPc e o tempo evolui da esquerda para a direita. Essa simulação foi feita com um espaçamento de 24σ e com uma condição inicial de dez pulsos.

Na Fig. 3.5 podemos ver a velocidade média para cada espaçamento, desconsiderando os dados referentes ao pulso espontâneo do sistema. Podemos ver que o decaimento da velocidade pode ser descrito por uma lei de potência do tipo $f(x) = ax^\lambda + c$ onde $\lambda = -0,541$ ou $f(x) = ax^\lambda$ com $\lambda = -0,628$. Vale notar que, com a excessão dos últimos três pontos do gráfico, o ajuste representa bem os dados medidos. Tais pontos correspondem justamente a mudança de regime na propagação da onda ($\sigma \geq 28$) onde o sistema deixa de ter um pulso espontâneo e começa a somente propagar pulsos impostos na condição inicial. As velocidades obtidas aqui estão na mesma ordem de grandeza dos experimentos, que variam entre 0,25 mm/min e 0,5 mm/min [8].

Além de sabermos como a densidade das amebas afeta a velocidade de propagação do AMPc, vimos que na Fig.3.3 que a densidade afeta a amplitude da oscilação. Para estudarmos tal comportamento vamos utilizar novamente o arranjo de 80 amebas, mas dessa vez iremos destruir conjuntos de pulsos na coluna central e analisar a amplitude dos mesmos em relação ao número de onda. Iremos realizar três conjuntos de simulações com diferentes quantidades de pulsos (20, 16 e 10); e como para cada conjunto de simulações ainda podemos variar o espaçamento entre as amebas, teremos diferentes resultados para o mesmo número de onda. Como exemplo podemos citar os casos com espaçamento de 24σ onde podemos ter números de onda $\kappa_{10} = 2\pi\sigma^{-1}/192$, $\kappa_{16} = 2\pi\sigma^{-1}/120$, $\kappa_{20} = 2\pi\sigma^{-1}/96$ para simulações de 10, 16 e 20 pulsos respectivamente. Distribuimos os pulsos na condição inicial tomando um conjunto de dados do *ciclo padrão* que, junto com o número de pulsos, preencha exatamente as 80 linhas da simulação, i.e., para o conjunto de simulações de 20 pulsos iremos tomar 4 valores referentes a regiões distintas do *ciclo padrão*, repetindo-os 20 vezes preenchendo todas as linhas do sistema.

Como as condições de contorno impostas pela função de Green não são periódicas, não podemos armar o sistema periodicamente em apenas duas dimensões. Dessa maneira uma vez que o pulso chega ao final do sistema ele irá desaparecer em vez de reiniciar no outro lado, ferramenta comum em análises desse estilo [50]. Na Fig. 3.6 podemos ver um exemplo dessa simulação, onde a coluna central é representada na vertical, o brilho representa a concentração de AMPc e o tempo evolui da esquerda para a direita. Esse exemplo consiste de 10 pulsos com espaçamentos de 24σ , o que resulta num número de onda $\kappa_{10} = 2\pi\sigma^{-1}/192 \approx 3.27\text{mm}^{-1}$.

É importante citar que esses experimentos tem limitações em ambos extremos de número de onda. Como foi citado anteriormente, espaçamentos maiores que 33σ apresentam dissipação dos pulsos antes que os mesmos excitem a próxima linha de amebas, limitando assim os dados para números de onda pequenos. O limite superior de número de onda ocorre devido à densidade de amebas. Como foi visto na Fig. 3.3 quando temos uma alta concentração de AMPc acumulado no sistema, a projeção do espaço de fase $\beta \times \rho$ tende a se contrair em um ponto. Dessa maneira, em simulações de alta densidade todas as amebas acabam em tal região e com isso sincronizando-as, desfazendo a configuração inicial dos pulsos e portanto impossibilitando a medida do número de onda para altas densidades e/ou pulsos.

Na Fig. 3.7 podemos ver os resultados para os três conjuntos de simulação, onde a concentração de AMPc pelo número de onda apresenta um comportamento de supressão das oscilações em altos números de onda. Tal comportamento é típico de meios excitáveis contínuos perto de uma instabilidade. A forma da curva gerada pelos conjuntos de simulações também lembra o exemplo prototípico da equação complexa de Ginzburg-Landau [51], mas devido as limitações em ambos os limites do número de onda originadas pela dinâmica do AMPc, não podemos fazer uma comparação quantitativa entre os casos. Apenas qualitativamente sabemos tratarem-se de bifurcações de Andronov-Hopf em meios difusivos [52].

Agora que temos um melhor entendimento sobre o funcionamento das equações propostas por MG, podemos simular comportamentos mais complexos da dinâmica de AMPc, como por exemplo os padrões de reação-difusão relacionados a concentração do sinal químico encontrados em experimentos [53]. Nessa simulação, iremos distribuir as amebas igualmente espaçadas

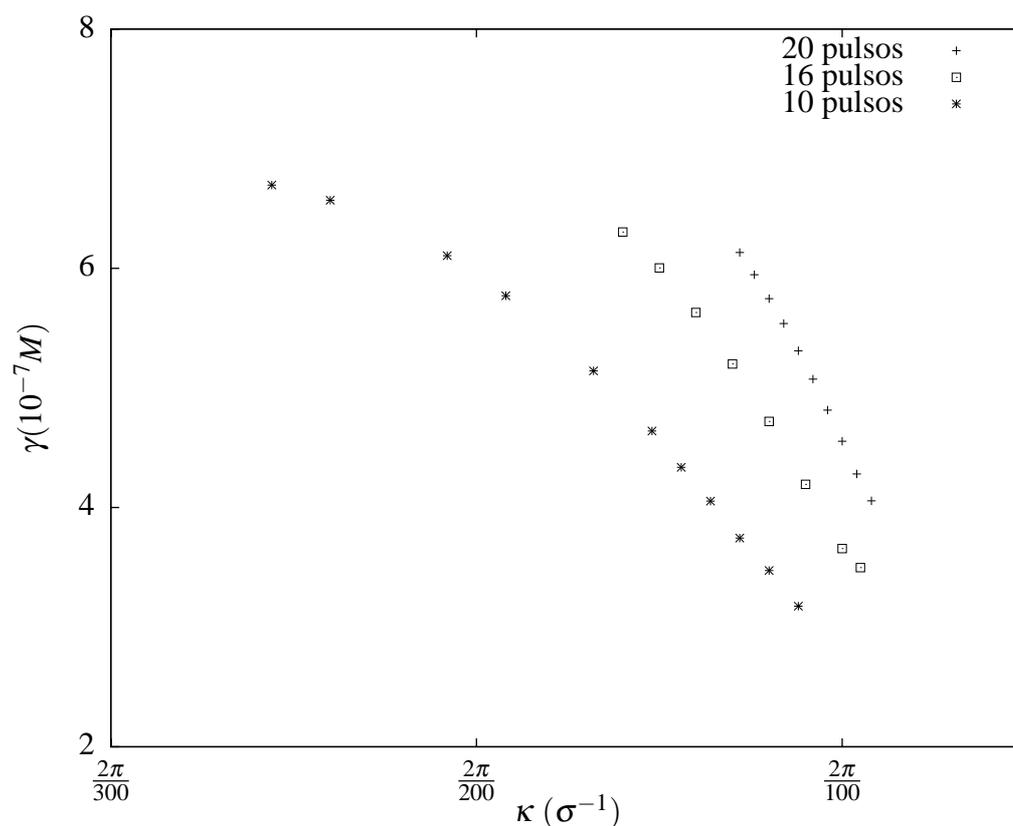


Figura 3.7: Concentração média da amplitude de AMPc para diferentes números de onda (unidades em $10^{-7}M \times \sigma^{-1}$). Conjuntos de 20, 16 e 10 pulsos foram escolhidos como condições iniciais numa grade retangular (9×80), i.e., conjuntos de 4, 5 e 8 valores equidistantes no *ciclo padrão* foram utilizados. Para cada conjunto de pulsos, simulações foram feitas com espaçamentos diferentes, resultando em múltiplos valores para alguns dos números de onda.

em uma grade quadrada. Para distribuir as condições iniciais, não podemos simplesmente distribuir aleatoriamente dados do *ciclo padrão* por todas as amebas. Precisamos gerar uma diferença de fase inicial para que o sistema não sincronize automaticamente. Tal problema é resolvido dividindo a grade de amebas em B quadrados, cada quadrado contendo 9 amebas, onde cada um dos B conjuntos de amebas irá receber uma condição inicial aleatória do *ciclo padrão*. Como exemplo desse procedimento temos na Fig. 3.8 um sistema de 324 amebas com espaçamento de 13σ , e tal sistema é dividido em 36 caixas de condições iniciais aleatórias, cada caixa contendo 9 amebas.

Para um sistema de maior extensão, como o visto na Fig. 3.9, conseguimos reproduzir o comportamento desejado de reação-difusão. A figura mostra o estado do sistema após uma

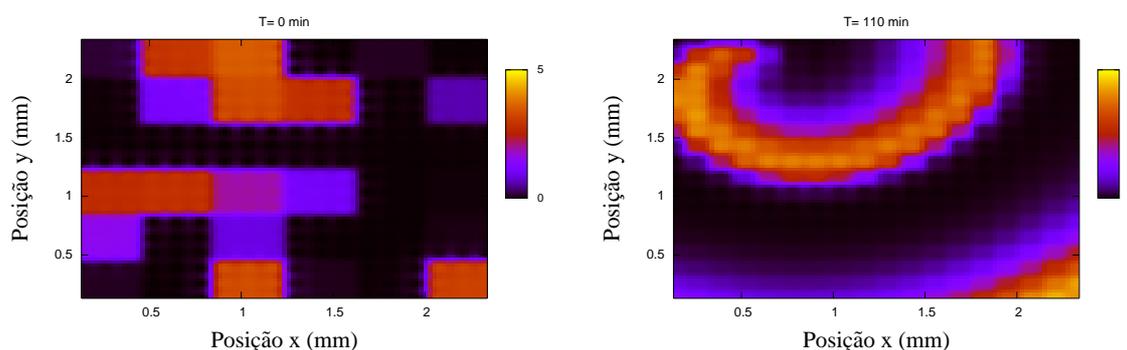


Figura 3.8: Concentração de AMPc (unidades em $10^{-7}M \times \text{mm}$) para uma grade quadrada contendo 18×18 amebas (com espaçamento de 13σ entre elas). Na esquerda podemos ver os 36 estados iniciais sorteados aleatoriamente do *ciclo padrão* e que foram distribuídos em grupos de 9 amebas. Na direita temos a evolução desse estado inicial após 110 min de simulação, onde podemos ver que a configuração do sistema evoluiu para uma espiral.

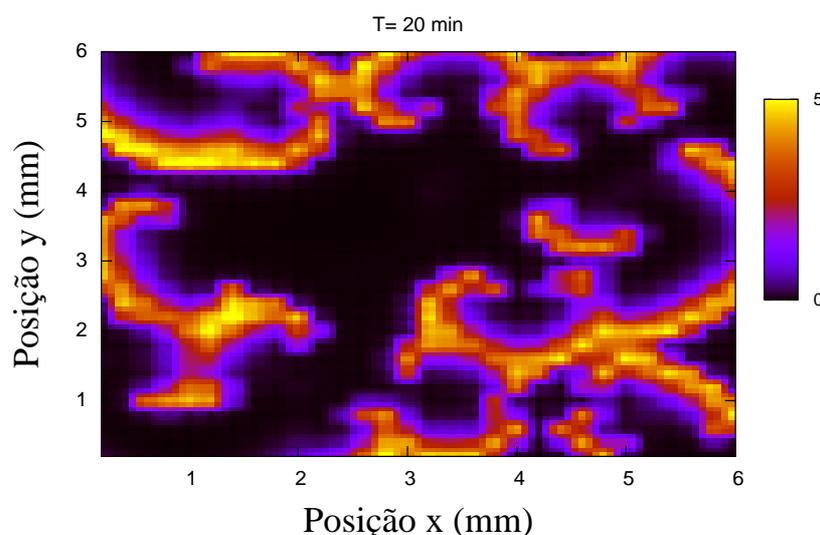


Figura 3.9: Concentração de AMPc (unidades em $10^{-7}M \times \text{mm}$) para uma grade quadrada contendo 30×30 amebas (com espaçamento de 20σ entre elas). Os 100 estados iniciais foram sorteados aleatoriamente através do *ciclo padrão* e que foram distribuídos em grupos de 9 amebas. Após 20 min de simulação, podemos observar um complexo padrão de reação-difusão.

evolução de 20 min, com 900 amebas espaçadas 20σ entre si e com 100 caixas de condições iniciais aleatórias do *ciclo padrão*. Diversas simulações foram feitas com diferentes espaçamentos e quantidades de amebas para descobrirmos quais fatores influenciam na configuração final em

que o sistema vai se estabilizar. As análises mostram que sistemas com espaçamento menores que 12σ sempre evoluem para uma *target wave*, enquanto simulações com espaçamentos acima desse valor podem sustentar configurações mais complexas, como espirais ou misturas de espirais. A quantidade de amebas e extensão do sistema influencia a probabilidade de obtermos comportamentos mais complexos que uma *target wave*. Sistemas mais extensos e com mais amebas apresentam comportamentos desse tipo com maior probabilidade.

Apesar de termos reproduzido com sucesso os padrões de reação e difusão, as figuras acima têm uma densidade de amebas e extensão espacial muito maiores dos que as vistas nos experimentos. Na verdade foi relatado [53] que a maior distância de interação entre as amebas se dá em torno de 6σ , sendo 5σ a maior distância inter-celular que permite a agregação. Tal discrepância com os resultados aqui apresentados se devem ao uso dos mesmos parâmetros utilizados por Goldbeter (a exceção do parâmetro livre h). Tais parâmetros foram coletados a mais de 20 anos e portanto necessitariam ser revistos, outro fator a se considerar é que tais parâmetros são para uma determinada variedade de *Dictyostelium* que hoje em dia não é mais utilizado. Deve-se considerar também que em seu trabalho original, Martiel e Goldbeter apesar de utilizarem dados experimentais para a maioria dos seus parâmetros, tiveram que adaptar quatro deles para que os seus resultados reproduzissem com exatidão os experimentos. Em outros trabalhos na literatura nem todos os autores mantiveram os mesmos parâmetros conforme publicados originalmente, mas entre os parâmetros alterados aquele que mais se destaca é o parâmetro $k_e = 5.4 \text{ min}^{-1}$, responsável pela degradação do AMPc. Tal parâmetro tem variações de $k_e = 9 \text{ min}^{-1}$ até $k_e = 120 \text{ min}^{-1}$ como pode ser visto em [17, 18, 19].

Para o nosso caso, devemos considerar que um dos fatores de maior impacto na resolução do problema é o tamanho do histórico a ser mantido para a sua resolução, e tal grandeza é regulada justamente pela degradação do AMPc. Dessa maneira fizemos uma varredura no espaço de parâmetros $k_e \times h$, lembrando que h é o parâmetro livre do nosso sistema e que regula a quantidade de AMPc produzido internamente chega ao meio extra-celular. Dessa maneira procuramos pelo conjunto de parâmetros tal que conseguíssemos reproduzir com espaçamentos de 5σ o que antes só era reproduzido por espaçamentos maiores que 12σ . Devido ao grande custo computa-

cional de tal espaço de parâmetros, procuramos um conjunto de valores para os parâmetros tal que tivéssemos a menor variação em k_e . De maneira que chegamos a:

$$K_e = 5.4\text{min}^{-1} \longrightarrow 30.4\text{min}^{-1},$$

$$h = 0.025 \longrightarrow 0.06.$$

Com essas mudanças foi possível realizar simulações com as dimensões vistas em experimentos como pode ser visto na Fig. 3.10.

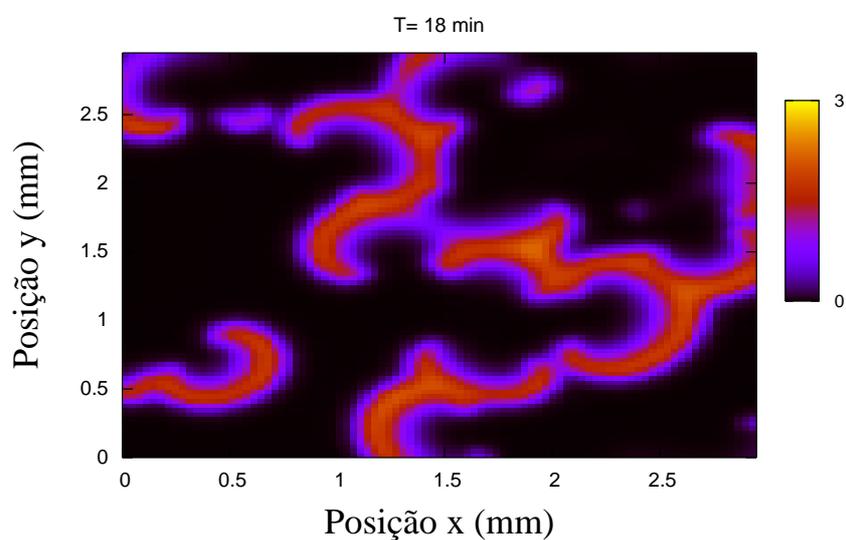


Figura 3.10: Concentração de AMPc (unidades em $10^{-7}\text{M} \times \text{mm}$) para uma grade quadrada contendo 60×60 amebas (com espaçamento de 5σ entre elas). Os 400 estados iniciais foram sorteados aleatoriamente através do *ciclo padrão* e que foram distribuídos em grupos de 9 amebas. Após 18 min de simulação, podemos observar um complexo padrão de reação-difusão em uma escala similar aos experimentos.

4 *Modelo de animóides*

Após termos analisado em detalhe as propriedades de sinalização das amebas, vamos apresentar nesse capítulo uma revisão sobre os trabalhos relacionados ao modelo de animóides, mostrando sua evolução desde a proposta original de Reynolds até a versão formulada nesse trabalho. Apresentaremos também trabalhos alternativos cujos resultados são relevantes aos encontrados nas simulações apresentadas no capítulo 5 e que justificam a escolha de tal modelo para a movimentação das amebas.

4.1 **Modelo de Reynolds**

Em 1986 o cientista da computação Craig W. Reynolds criou um modelo para descrever realisticamente o comportamento de um bando de pássaros e peixes em seu trabalho de animação digital [54]. Para modelar o movimento desses grupos, Reynolds propôs que os animóides se movimentassem mudando o ângulo do seu movimento de acordo com três regras simples. Tais regras podem ser visualizadas na Fig. 4.1 e são: a) separação; cada animóide tenta se manter a uma distância mínima dos outros para evitar colisões; b) alinhamento; os animóides tendem a alinhar o ângulo de seu movimento com os vizinhos; c) coesão; eles tendem a se manter perto dos seus vizinhos, formando assim um bando e dificultando a dispersão de seus membros.

4.2 **Modelo de Vicsek**

Quase dez anos depois de Reynolds, Vicsek e colaboradores [3] incluíram ruído nesse modelo e estudaram a transição de fase para o movimento coletivo. Desenvolveram uma versão

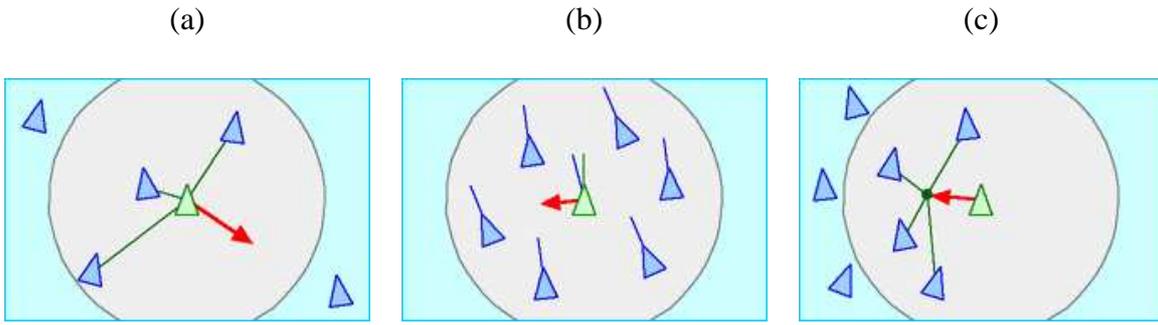


Figura 4.1: Representação gráfica das regras de movimento propostas por Reynolds[2]: a) separação, cada animóide tenta se manter a uma distância mínima dos outros para evitar colisões; b) alinhamento, tendem a alinhar-se segundo o ângulo médio de movimento de seus vizinhos; c) coesão, tendem a se manter perto dos seus vizinhos, formando assim um bando e dificultando a dispersão de seus membros

simplificada do proposto por Reynolds: os animóides mantêm o módulo da velocidade v_0 fixo; a cada passo de tempo fixo Δt , o ângulo de movimento é calculado segundo a média dos ângulos dos vizinhos, somando-se também uma perturbação aleatória; um sistema bidimensional é utilizado com condições de contorno periódicas. Para descrever a variação do ângulo de movimento de cada animóide no tempo t e o seu deslocamento utilizaram:

$$\theta_i(t) = \langle \theta(t-1) \rangle_r + \eta \Delta \theta, \quad (4.1)$$

$$\vec{x}_i(t) = \vec{x}_i(t-1) + \vec{v}_i(t) \Delta t \quad (4.2)$$

onde a média dos ângulos é feita entre os vizinhos de cada partícula (incluindo-se a direção da velocidade da partícula em questão) dentro de uma distância inferior a um raio r . A contribuição aleatória é dada pela distribuição angular uniforme $\Delta \theta$ dentro do intervalo $[-\pi, +\pi]$, com intensidade controlada pelo parâmetro η . Variando a densidade dos animóides e o valor do parâmetro η esse modelo produz duas fases características de desordem e de alinhamento global do movimento (Figs. 4.2a e 4.2b [3], respectivamente).

Para analisar a transição entre os comportamentos aleatórios e ordenados, define-se o parâmetro de ordem v_a , dado por:

$$v_a = \frac{1}{Nv_0} \left| \sum_{i=1}^N \vec{v}_i \right|. \quad (4.3)$$

Quando todos os animóides estiverem alinhados, o parâmetro v_a terá o valor 1, e no caso de

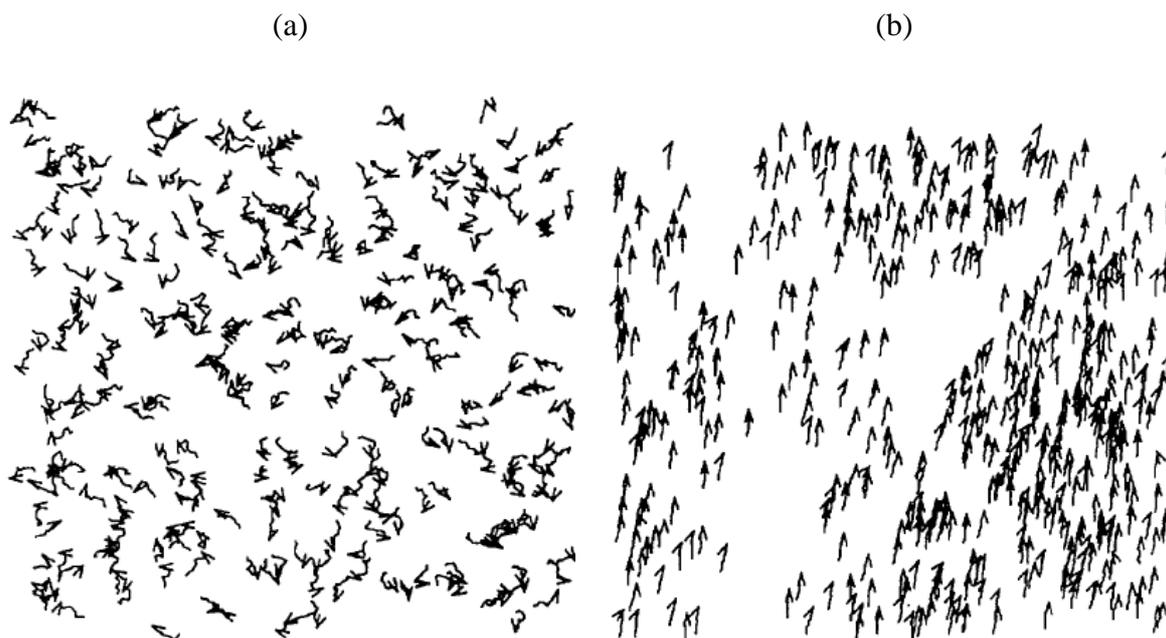


Figura 4.2: Representação dos animóides para as condições de movimento aleatório (esquerda) e movimento coletivo (direita). Resultados obtidos em [3] onde o movimento coletivo foi obtido em (b) após aumentar a densidade enquanto se diminuiu o ruído do sistema.

movimentação em direções aleatórias, será próximo a zero. É importante notar que, em casos de movimento coletivo rotacional, esse parâmetro não indicaria a presença de movimento coletivo pois as velocidades iriam se cancelar. Para tais casos rotacionais, calcular o momento angular do sistema representaria melhor a transição do movimento. Nas Figs. 4.3a e 4.3b [3] podemos ver como o ruído e a densidade influenciam na transição do comportamento aleatório para o ordenado. Vicsek afirma que as transições mostradas nessa figura são de segunda ordem dada a transição suave de um estado para o outro, mas Gregoire *et al.* [28] refutam tal afirmação, afirmando que tal transição acontece devido a problemas de tamanho finito nas simulações feitas por Vicsek e colaboradores. Em seu trabalho Gregoire *et al.* mostram uma transição de fase descontínua ao variarmos o ruído. A real natureza de tal transição continua em debate e parece controversa [55, 56]. Trabalhos teóricos recentes sugerem que a transição seria de segunda ordem, mas o sistema apresentaria instabilidade frente a perturbações de longo comprimento de onda ao entrar no estado ordenado, o que causaria a quebra de coerência e a consequente coexistência de fases, típica de transições de primeira ordem [57].

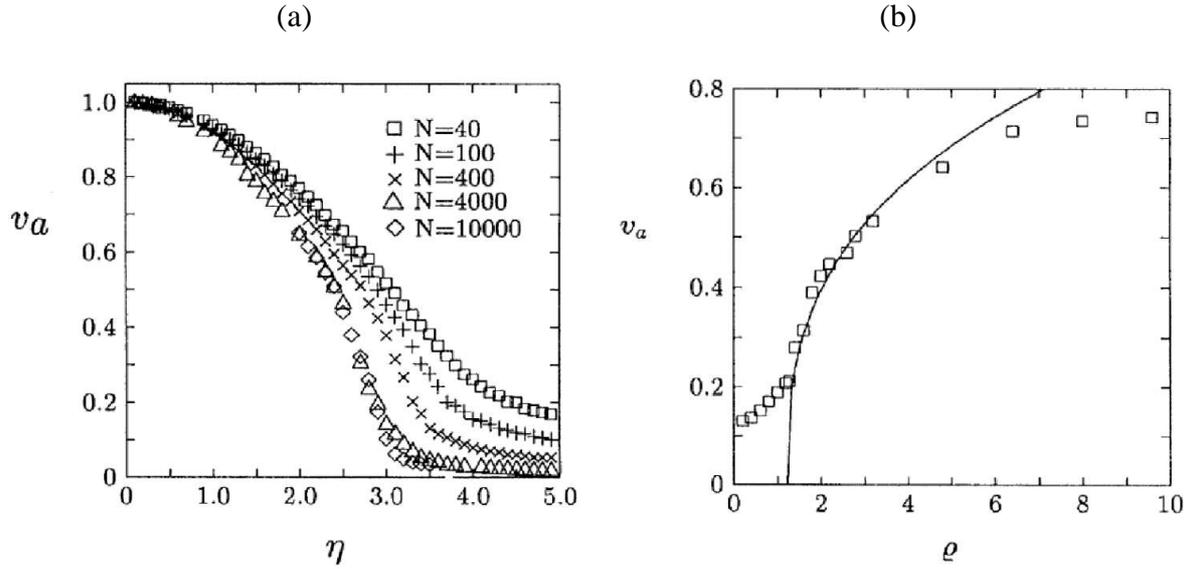


Figura 4.3: Parâmetro de ordem v_a como definido na Eq. (4.3) em função do ruído (esquerda) e em função da densidade (direita). Figura retirada de [3].

4.3 Modelo de Gregoire

Gregoire *et al* [4] também utilizaram um modelo de animóides, mas decidiram incrementar o modelo ao adicionar propriedades físicas como volume e adesão ao mesmo. Para modelar ambas as forças, foi utilizada uma força de interação \vec{f}_{ij} ao cálculo do ângulo de movimento, de maneira que temos:

$$\theta_i(t) = \arg \left[\alpha \sum_{j \sim i} \vec{v}_j(t) + v \sum_{j \sim i} \vec{f}_{ij} + N_i \eta \vec{u}_i(t) \right]. \quad (4.4)$$

Para identificar os vizinhos de cada partícula de maneira mais precisa foi utilizado o método de Voronoy para criar um mosaico no espaço, de maneira que cada célula do mosaico corresponde a uma partícula. As partículas vizinhas à analisada são definidas pelas células do mosaico em contato com a mesma. Uma vez identificados os vizinhos, tal lista de interação é usada para realizar os cálculos dependentes de interações físicas, como visto na equação anterior. Além do novo método para determinar os vizinhos, esse modelo apresenta três parâmetros adicionais: α , o parâmetro responsável pelo alinhamento do ângulo de movimento; N_i , o número de vizinhos da partícula i ; v , a intensidade da força de adesão e a força de repulsão \vec{f}_{ij} . Essa força é definida

por:

$$\vec{f}_{ij} = \vec{e}_{ij} \begin{cases} \infty & \text{se } r_{ij} < r_c, \\ -\frac{1}{4} \frac{r_{ij} - r_e}{r_a - r_e} & \text{se } r_c < r_{ij} < r_a, \\ -1 & \text{se } r_a < r_{ij} < r_0, \end{cases} \quad (4.5)$$

onde \vec{e}_{ij} é o vetor unitário apontando da partícula i para a j e r_{ij} é a distância entre tais partículas. Os diversos limites de r_c, r_e, r_a e r_0 representam os diversos estágios da força implementada, passando de uma repulsão do tipo caroço duro (*hardcore*) até o limite r_c , uma força de repulsão/atração linear em torno da região de equilíbrio r_e , até o limite r_a , e uma atração fixa até a distância r_0 .

Além de detectar as fases de movimento coletivo e aleatório, com a inclusão de volume foi possível identificar estados sólido, líquido e gasoso como pode ser visto na Fig. 4.4. As legendas tem o seguinte significado: S sólido; MS sólido com movimento; G gás; MG gás com movimento e a linha tracejada representa a transição entre o movimento coletivo e o movimento desordenado.

4.4 Modelo de Belmonte

Para simular a agregação e segregação celular através de adesão diferenciada, Belmonte *et al.*[5] utilizaram um modelo de animóides baseado naquele proposto por Gregoire e colaboradores. Para melhor representar os processos acima descritos, algumas alterações foram necessárias. Primeiramente, para simular a segregação celular, é necessário definir dois tipos diferentes de células, e com isso, definir como serão as suas interações. Dessa maneira a equação que descreve a variação do ângulo de movimento das células, tem parâmetros com índices ij de maneira a explicitar que a interação entre células iguais e diferentes não será necessariamente a mesma, como podemos ver em:

$$\theta_i(t) = \arg \left[\sum_{j \sim i} \left(\alpha \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + v_{ij} f_{ij} \vec{e}_{ij}(t) \right) + \eta \vec{u}_i(t) \right]. \quad (4.6)$$

Pode-se notar que analogamente a Eq. 4.4, α_{ij} se refere ao peso do alinhamento de velocidades, v_{ij} à interação de contato entre as células i e j e, por fim, η ao peso dado ao ruído do sistema. A

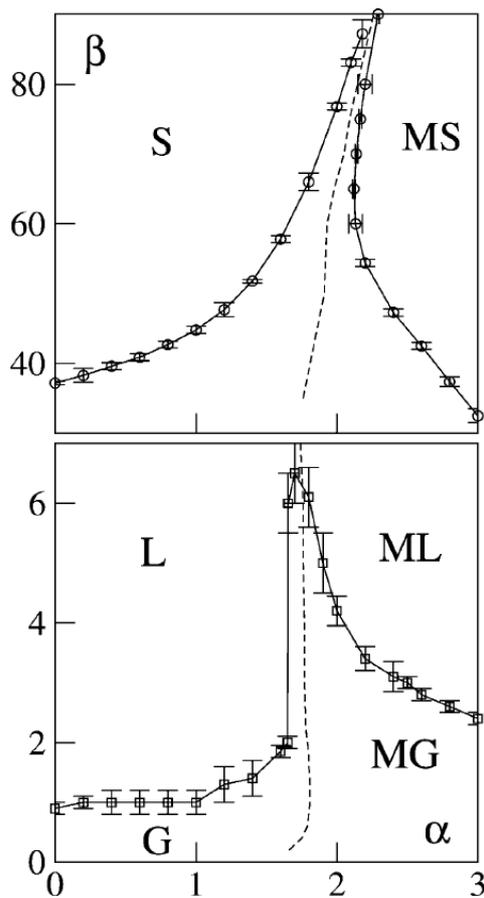


Figura 4.4: Espaço de parâmetros ($\beta \times \alpha$) para o sistema de Gregoire *et al.*, onde as legendas significam: S sólido, MS sólido com movimento, L líquido, ML Líquido com movimento, G gás, MG gás com movimento e a linha tracejada representa a transição entre movimento coletivo. Figura retirada de [4].

força de interação entre as células f_{ij} também foi modificada para melhor representar o contato entre as células:

$$f_{ij} = \begin{cases} \infty & \text{se } r_{ij} < r_c, \\ 1 - \frac{r_{ij}}{r_e} & \text{se } r_c < r_{ij} < r_0, \\ 0 & \text{se } r_{ij} > r_0. \end{cases} \quad (4.7)$$

Podemos notar que temos novamente uma repulsão tipo *hardcore* abaixo de uma distância mínima r_c , e após tal distância temos apenas uma região de repulsão e atração linear em torno da distância de equilíbrio r_e . Vale notar que a zona de atração aqui é contínua, ao contrário da apresentada no modelo de Gregoire na Eq. 4.5. Outra diferença entre esses modelos é a maneira de calcular a sua vizinhança. Enquanto o modelo anterior utilizava um mosaico calculado por

Voronoy, Belmonte e colaboradores contabilizam como vizinhos todos aqueles dentro de uma região de raio r_0 , e também diferentemente do modelo proposto por Gregoire *et al.*, o ruído não é proporcional ao número de vizinhos de cada partícula.

A adesão diferenciada foi modelada através da interação de células ectodérmicas (tecido externo) e células endodérmicas (tecido interno), sendo elas representadas respectivamente pelas cores cinza e preto, como pode ser visto na Fig. 4.5. As diferentes propriedades de cada célula são implementadas como uma diferença no parâmetro v_{ij} dependendo de quais células estão interagindo, mais especificamente: $v_{pp} > v_{cp} = v_{pc} > v_{cc}$. Tal diferença nos parâmetros de adesão faz com que os animóides tendam a se agrupar e, dependendo da relação entre os parâmetros, criar uma camada externa que engloba totalmente a outra variedade de célula.

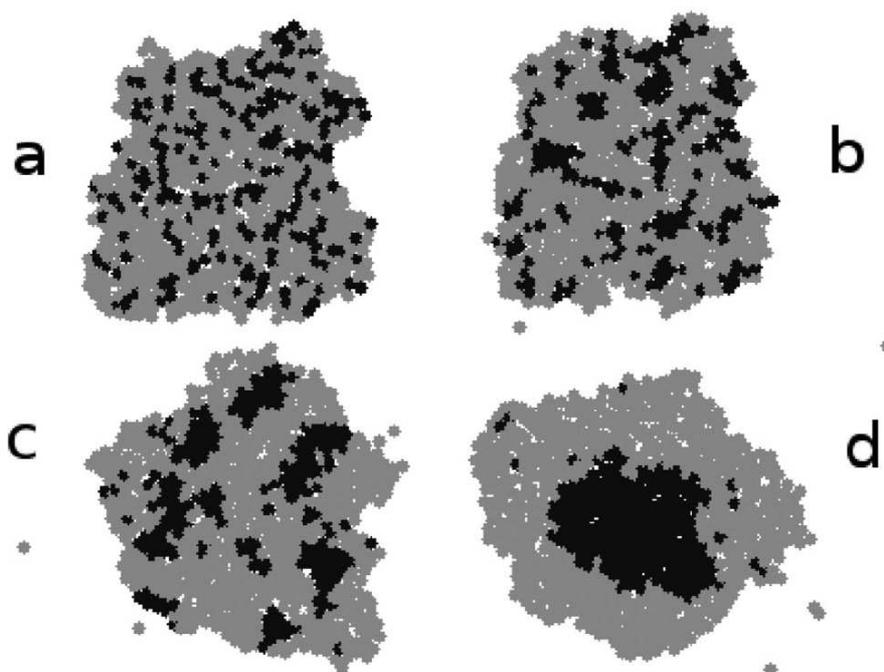


Figura 4.5: Representação da evolução de um agregado com 800 partículas. As diferentes cores representam os dois tipos de células modeladas aqui (ectodérmicas e endodérmicas). O número de iterações até o estágio visto nas figuras é: a) $T=0$; b) $T=3 \times 10^3$; c) $T=3 \times 10^3$; d) $T=2 \times 10^7$. Figura retirada de [5].

Para medir a segregação celular, foi definido um parâmetro de ordem γ_i como a a média da

fração de células de variedade diferente comparadas a vizinhança total de cada partícula:

$$\gamma_i = \left\langle \frac{n_{\neq}}{n_{=} + n_{\neq}} \right\rangle, \quad (4.8)$$

de maneira que em um agregado totalmente segregado, γ_i deve tender a zero, mas sem nunca alcançar tal limite, independentemente do número de partículas envolvidas na simulação. Uma vez tendo definido um parâmetro de ordem, testes foram feitos para determinar qual a influência do parâmetro α e da quantidade de células na segregação dos animóides. Podemos ver na Fig. 4.6 a evolução do parâmetro de ordem em função do tempo para simulações com 6400 partículas para simulações com diferentes valores para o parâmetro α . Fica claro por essa figura que o movimento coletivo auxilia na segregação dos animóides, mais especificamente para $\alpha = 0,01$ até $\alpha = 0,015$. Para tais valores, vemos que após um determinado transiente, temos uma lei de potência descrevendo o decaimento de γ , enquanto para valores menores de α o decaimento é apenas logarítmico.

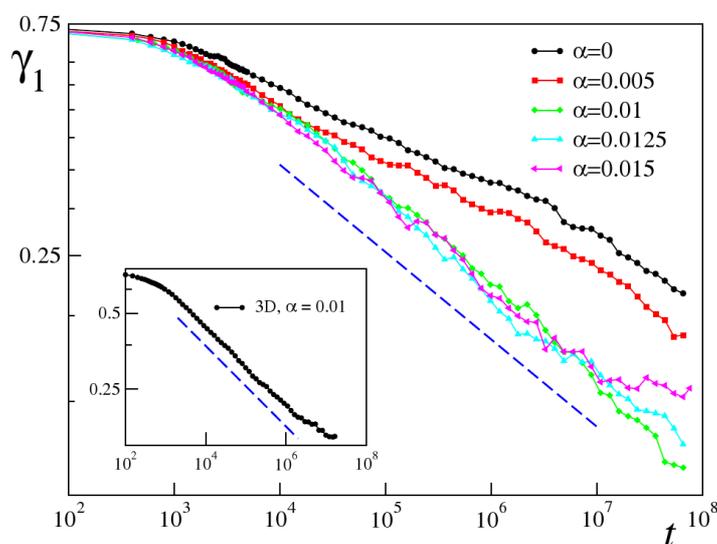


Figura 4.6: Variação do parâmetro de ordem como definido na Eq. (4.8) em função do número de iterações para valores diferentes do parâmetro α . Podemos ver uma lei de potência para certos valores do parâmetro referente ao movimento coletivo cujo expoente é dado por $\lambda = 0,18 \pm 0,02$. Figura retirada de [5].

Na inserção da Fig. 4.7 temos novamente γ em função do tempo de simulação, mas agora cada simulação tem uma quantidade diferente de partículas, podemos ver que a medida que se aumenta N , mais lenta se torna a segregação. No gráfico principal da mesma figura temos

os mesmos dados corrigidos pela expressão que modela como o número de partículas afeta a segregação ($t = t/N^v$) de maneira que todas as curvas se sobrepõem como se fossem um único conjunto de dados. De maneira similar, leis de potência similares são encontradas nas relações de parâmetro de ordem e tempo de saturação com o número de partículas.

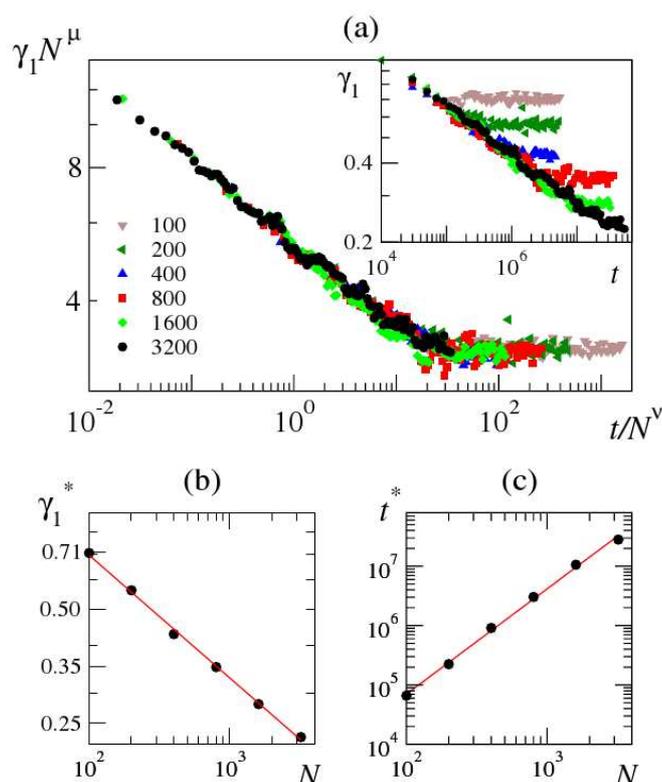


Figura 4.7: a) Figura mostrando simulações com diferentes números de partículas, as quantidades γ_1 e tempo são rescaladas para $\gamma^* = \gamma_1 N^\mu$ e $T^* = t/N^v$ (os dados originais são mostrados na inserção); b) valor assintótico do parâmetro de ordem em função do número de partículas, onde a linha tem a inclinação $\mu = 0,32 \pm 0,01$; c) Tempo de saturação em função do número de partículas, sendo a inclinação da curva dada por $v = 1,77 \pm 0,04$. Figura retirada de [5].

5 *Implementação do movimento*

Com um conhecimento geral sobre o modelo de animóides, descreveremos aqui o modelo para o movimento das amebas utilizado nesse trabalho, assim como as simulações de agregações em densidades normais e baixas, que reproduzem comportamentos da ameba vistos em experimentos. Definiremos também as mudanças necessárias para as simulações em três dimensões, onde mostraremos novamente resultados para densidades normais e baixas. Por fim mostraremos o movimento circular encontrado e como ele pode ser explicado e reproduzido numa escala maior pelo modelo de animóides.

5.1 Modelos bidimensionais

Ao implementarmos o movimento nas amebas, vale lembrar que a solução obtida na Eq. (3.12) é válida somente para amebas estacionárias. Ao considerarmos movimento, a posição não é mais constante, e portanto teríamos que dispor igualmente de um histórico de posição de cada ameba, assim como fizemos com a emissão do AMPc, o que, apesar de viável dentro da mesma abordagem, não seria essencial ao problema. Experimentos sobre a velocidade de propagação da onda de AMPc e da velocidade da ameba, mostram que a primeira é em torno de 25 vezes maior que a segunda [8, 16], permitindo-nos, então, desprezar os efeitos de deslocamento das fontes.

Considerando o sucesso do modelo apresentado por Belmonte e colaboradores [5] para descrever a segregação celular, vamos nos basear em grande parte no seu modelo para a implementação das regras de movimento, mas a especificidade da ameba *Dictyostelium discoideum*

e do modelo de sinalização já implementado, tornam-se necessárias várias alterações. Como diferença inicial, devemos nos lembrar que para resolvermos analiticamente a parte espacial da equação da difusão, ficamos vinculados à condição de contorno imposta pela função de Green, i.e., considerando que a Eq. (3.9) tenha condições de contorno de Dirichlet indo a zero a uma distância infinita da origem, não podemos utilizar as condições periódicas.

Apesar de termos dois tipos diferentes de amebas no ciclo social (pré-caule e pré-esporo), nesse trabalho não exploramos tal característica. Todas as amebas terão, portanto, parâmetros idênticos. Para representar a agregação das amebas, algo essencial a ser implementado nas regras de movimento é a quimiotaxia, i.e., a tendência das amebas se locomoverem na direção do gradiente do sinal químico de AMPc. Num primeiro momento introduzimos a quimiotaxia como uma soma dos vetores de emissão de AMPc, i.e., a soma dos $N - 1$ vetores que ligam a i -ésima ameba às demais e cujos módulos são dados pela quantidade de AMPc emitido pelas j -ésimas amebas a chegar na i -ésima. Devido a inclusão dessa nova regra de locomoção, iremos inicialmente descartar a tendência ao alinhamento das amebas ($\alpha = 0$), e dessa maneira mais adiante poderemos reintroduzi-la quando tivermos conhecimento detalhado das propriedades do modelo utilizado.

As amebas continuam a ter o módulo de velocidade fixo e seu valor escolhido de acordo com experimentos [16], de maneira que $V_0 = 20 \mu\text{mm}/\text{min}$. Sendo assim, em duas dimensões a i -ésima ameba pode ter sua cinética descrita pela sua posição \vec{x}_i^t e pelo ângulo de movimento θ_i^t . As equações responsáveis por definir o ângulo a cada novo instante de tempo e o seu deslocamento pode ser escrito como:

$$\theta_i^{t+\Delta t} = \arg \left[\sum_{j \approx i} (v f_{ij}^t \vec{e}_{ij}^t + \alpha \vec{v}_j^t) + \eta \vec{u}_i^t + \varepsilon g_i(\vec{\gamma}) \frac{\nabla \vec{\gamma}}{|\nabla \vec{\gamma}|} \right], \quad (5.1)$$

$$\vec{x}_i(t) = \vec{x}_i(t-1) + \vec{v}_i(t) \Delta t. \quad (5.2)$$

onde a soma em $j \approx i$ se refere aos j -ésimos vizinhos da i -ésima partícula, f_{ij}^t é o módulo da força radial entre as amebas i e j na direção \vec{e}_{ij}^t que vai da partícula j até a i , e o parâmetro v controla o peso dessa contribuição. O parâmetro η controla o ruído que no caso bidimensional é implementado através do vetor unitário \vec{u}_i^t com distribuição angular aleatória uniformemente

distribuída. O último termo é referente a quimiotaxia, onde temos uma contribuição unitária na direção do gradiente do sinal químico, com um parâmetro de controle ε multiplicado pela função escalar dependente da concentração de AMPc $g_i(\vec{\gamma}^i)$. Tal função foi implementada, pois segundo experimentos [6], a eficiência de quimiotaxia é altamente dependente da concentração de AMPc no sistema. Dessa maneira construímos a função $g_i(\vec{\gamma}^i)$ interpolando linearmente os dados da Fig. 5.1, oriunda da Ref. [6], para obtermos uma curva contínua de eficiência da quimiotaxia. Na Eq. (5.2) podemos ver como se dá o deslocamento das amebas, onde $\vec{v}_i(t)$ é um vetor com módulo constante e só varia o ângulo de movimento.

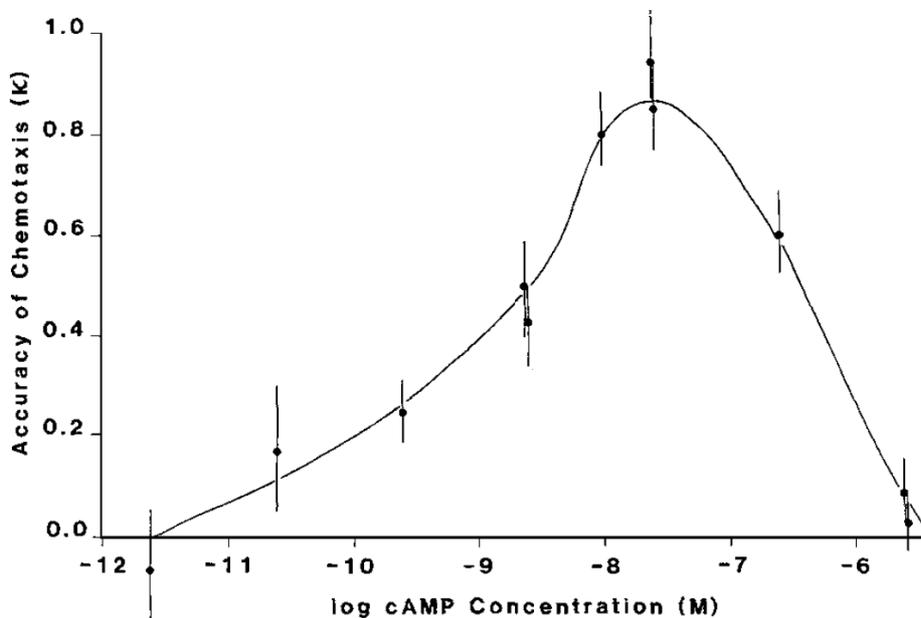


Figura 5.1: Relação da acurácia da quimiotaxia das amebas *Dictyostelium discoideum* em função da concentração de AMPc, como medido por Fisher *et al.* em [6].

5.2 Simulações em duas dimensões

5.2.1 Modelo descontínuo de caroço-duro grande

Como primeira proposta da força de interação entre as amebas, utilizamos como força radial um modelo equivalente ao de Belmonte e colaboradores, adaptando-o às dimensões da ameba. Temos portanto, uma repulsão do tipo caroço duro (*hardcore*) para distâncias menores que $d_c = 0,75\sigma$ e por uma força elástica no intervalo $d_c < r < d_0 = 1,125\sigma$ dividida pelo raio

de equilíbrio $r = d_e = \sigma$, de maneira que valores inferiores a r_e nesse intervalo representam repulsão entre as amebas e para valores superiores uma atração. Iremos nos referir a esse arranjo para as interações entre amebas como *Modelo descontínuo de caroço-duro grande*, ou *MDCG*, e o mesmo pode ser definido como:

$$f_{ij} = \begin{cases} \infty & \text{if } r_{ij} < d_c, \\ 1 - \frac{r_{ij}}{d_e} & \text{if } d_c < r_{ij} < d_0, \\ 0 & \text{if } r_{ij} > d_0, \end{cases} \quad (5.3)$$

Testes preliminares foram feitos para determinar como os parâmetros da Eq. (5.3) afetam o comportamento das simulações. Dois regimes extremos são facilmente localizados: i) o regime de domínio da quimiotaxia; ii) regime de domínio da força elástica. Caso a quimiotaxia domine o sistema, as amebas uma vez agregadas vão se aproximar até o limite do seu núcleo (d_c) fazendo com que o agregado se comporte como discos rígidos comprimidos. O outro caso extremo ocorre quando a força elástica domina o sistema: uma vez agregadas, as amebas se manterão distanciadas em torno do ponto de equilíbrio d_e , e se comportarão como partículas em uma grade de molas, vibrando em torno do seu ponto de equilíbrio.

Após escolher um regime intermediário aos dois casos citados na sessão anterior ($\nu = 8, \eta = 1$ e $\varepsilon = 4$), vamos realizar dois experimentos para ver como a extensão da região de distribuição das amebas afeta sua agregação. Faremos, então, uma simulação em baixa densidade com 500 amebas por mm^2 e outra com densidade de $2,45 \times 10^3$ por mm^2 . Experimentos encontrados na literatura estão na mesma ordem de grandeza do segundo caso proposto (5×10^3 por mm^2 [58]).

Na Fig. 5.2 podemos ver diferentes momentos da agregação para baixa densidade inicial de amebas. A Fig. 5.2a mostra a distribuição inicial das 500 amebas numa região quadrada de 1 mm^2 , após 5 min (Fig. 5.2b) podemos ver indícios de formação de caminhos preferenciais de deslocamento *streaming*. Após 25 min do início da simulação (Fig. 5.2c), as amebas já estão praticamente organizadas em pequenos agregados, mas ainda é possível ver um conjunto menor de amebas se fundindo com outro. Na Fig. 5.3 temos a simulação de densidade similar

a experimentos, onde distribuimos as 500 amebas em uma região quadrada com lados medindo 0,45 mm. Podemos ver na Fig. 5.3c que, ao contrário da simulação anterior, as amebas formam um único agregado após 15 min de evolução. Na versão digital, animações de ambas simulações podem ser visualizada no material suplementar #1 e material suplementar #2 respectivamente.

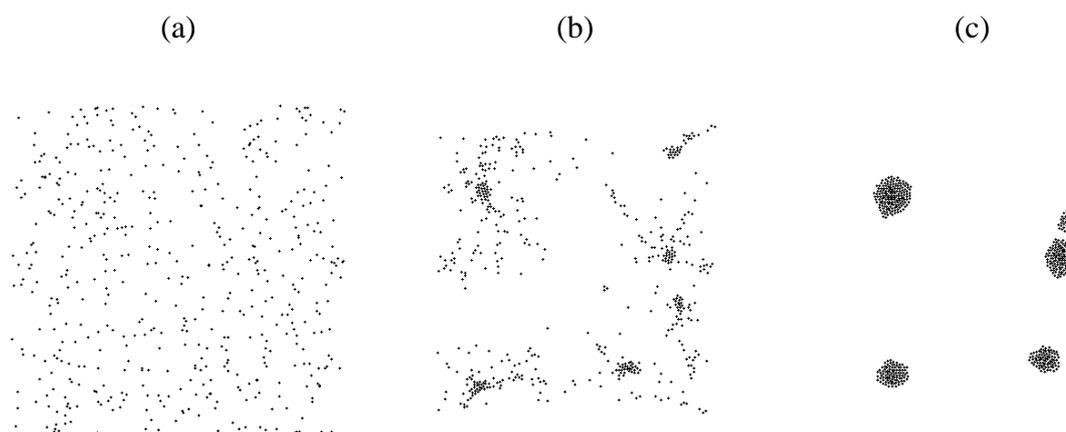


Figura 5.2: 500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada com lado medindo 1 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 5 min; c) T=25 min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital a animação dessa simulação pode ser visualizada no material suplementar #1

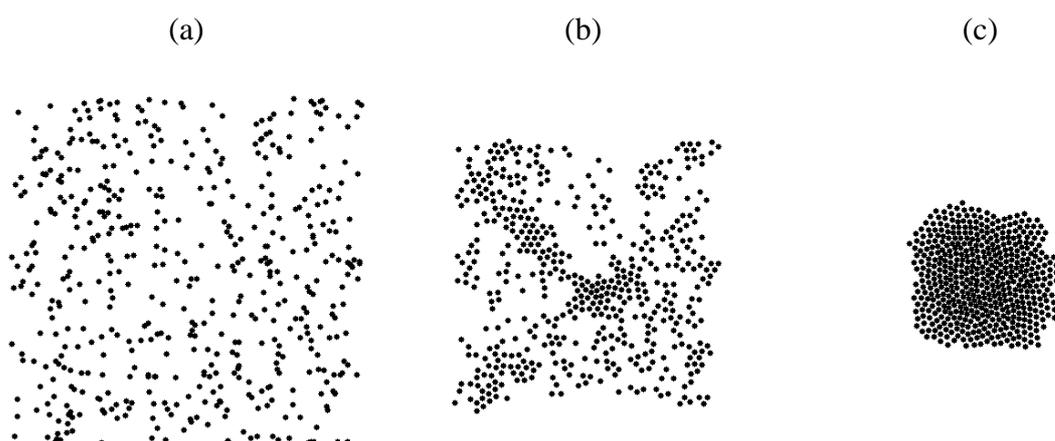


Figura 5.3: 500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada com lado medindo 0,45 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 5 min; c) T=15 min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital a animação dessa simulação pode ser visualizada no material suplementar #2

Além dos exemplos de agregação, testes também mostraram dois comportamentos interessantes no regime de competição entre a força elástica e a quimiotaxia. Um deles acontece no limiar onde a quimiotaxia e a força elástica estão em equilíbrio somente durante a fase refratária das amebas. Nesse limiar, a concentração de AMPc é tão baixa que não existe uma contribuição relevante para a quimiotaxia, mas quando ocorre um pulso essa contribuição supera a força elástica. Tal comportamento faz com que as amebas se contraíam diminuindo o tamanho do agregado, o que resulta numa oscilação do tamanho do agregado sincronizado com os pulsos de AMPc. Tal comportamento peculiar não é observado em experimentos, e portanto devemos evitar tal configuração de parâmetros. Como as próprias equações de MG nos mostraram no capítulo 2 e verificamos no capítulo 3, determinadas densidades de amebas resultam na suspensão das oscilações, reduzindo a amplitude do ciclo como visto na Fig. 3.3, de maneira que temos uma produção constante, mas mínima de AMPc. O valor do parâmetro livre para esse conjunto de simulações ($h = 0,025$) foi escolhido de forma que não existam oscilações quando o agregado atingir o tamanho de algumas dezenas de amebas.

Outro comportamento interessante é encontrado na região de equilíbrio entre as forças elásticas e de quimiotaxia, acontecendo nos casos onde temos um único agregado. Quando observamos a evolução do movimento das amebas por 40 minutos (Fig. 5.4), vemos que existe uma quebra de simetria no movimento rotacional das amebas. Essa rotação pode ser tanto no sentido horário como anti-horário, sendo equiprovável para ambos.

5.2.2 Modelo contínuo de caroço-duro grande

As simulações apresentadas acima utilizam os mesmos parâmetros originais do trabalho de MG, mas, como já mencionamos, alterações nos parâmetros precisam ser feitas para termos situações mais próximas da realidade (capítulo 3). Após uma série de simulações, além de se alterar tais parâmetros, ficou claro que precisávamos adaptar certas características do modelo de movimento, em especial a força de repulsão nos casos de grande número de partículas.

Como temos quimiotaxia implementada no nosso modelo (Eq. (5.1), ao formar um agre-

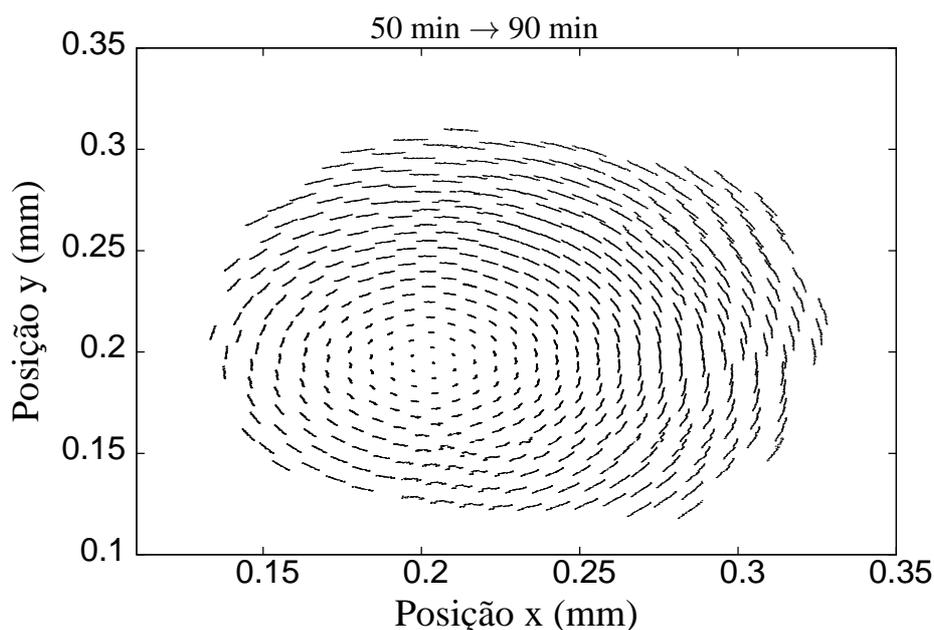


Figura 5.4: Trajetórias das amebas referentes a simulação vista na Fig. 5.3 durante um período de 40 minutos de simulação utilizando o *MDCG*. Podemos ver um comportamento circular no movimento interno das amebas, provavelmente oriundo da competição entre as contribuições de curto alcance (força de interação) e longo alcance (quimiotaxia).

gado as células tendem a se comprimir e, como mencionamos anteriormente, devemos escolher valores intermediários para os parâmetros da Eq. 5.1 para evitar comportamentos extremos. Entretanto, se temos um grande número de amebas num mesmo agregado, as regiões externas exercem pressão sobre a região central e, quanto maior o número de partículas, maior é a pressão acumulada naquelas localizadas na região central. O *MDCG* utilizado para as interações elásticas acarreta que, após uma certa quantidade de amebas, teremos o comportamento de discos sob compressão na região central do agregado. Para evitar tal comportamento precisamos alterar o perfil do módulo da força de interação f_{ij} , para que a região de repulsão deixe de ser linear até a região de caroço-duro, mas tenha uma repulsão inversamente proporcional a distância do tipo $1/(r - r_c)$ de forma a ir suavemente a valores infinitos de força, de forma a evitar que as interações entre as amebas se tornem uma soma de infinitos, iremos nos referir a esse modelo como *Modelo contínuo de caro-duro grande*, ou *MCCG*. Sendo assim, a expressão da força é

descrita da seguinte forma:

$$f_{ij} = \begin{cases} \infty & \text{if } r_{ij} < d_c, \\ \frac{1}{r_{ij} - r_c} & \text{if } d_c < r_{ij} < d_e \\ 1 - \frac{r_{ij}}{d_e} & \text{if } d_e < r_{ij} < d_0, \\ 0 & \text{if } r_{ij} > d_0. \end{cases} \quad (5.4)$$

Tal alteração na força se mostrou eficiente para simulações com um grande número de amebas (Fig. 5.5a), sem com isso perder os comportamentos prévios de formação de deslocamentos em caminhos preferenciais e movimento rotacional. No entanto, essa mudança não é suficiente para descrever com perfeição a movimentação e formação de caminhos preferenciais de deslocamento das amebas. Como podemos ver na figura 5.5b, temos os indícios de formação de caminhos de deslocamento preferenciais na simulação, mas após algum tempo, as regiões que deveriam ser dos caminhos preferenciais, se tornaram um agregado comprido e largo demais se comparado com experimentos [53] (Figs. 5.5c e 5.5d). Na versão digital também podemos visualizar a animação de tal simulação no material suplementar #3. A origem desse problema está localizada justamente na idealização do volume de cada ameba. Em experimentos, podem-se ver amebas subindo umas sobre as outras e deformando-se para minimizar o espaço entre elas em caminhos preferenciais. No atual modelo de interação impomos um volume esférico rígido mínimo que resulta na organização das amebas em uma rede hexagonal, quando sob pressão. Mesmo quando formam estruturas que se assemelham aos caminhos preferenciais de movimento (*streams*), elas ocupam um espaço muito maior do que o observado em laboratório. Além disso, a mobilidade das amebas em direção ao centro de oscilação fica limitada devido a esse volume excluído.

5.2.3 Modelo descontínuo de caroço-duro pequeno

Considerando o comportamento experimental e os dois modelos anteriores (*MDCG* e *MCCG*), precisamos dar maior elasticidade ao volume de cada ameba de forma a impedir sua cristalização em uma rede hexagonal. Também, deve-se evitar a situação limite em que as amebas estejam

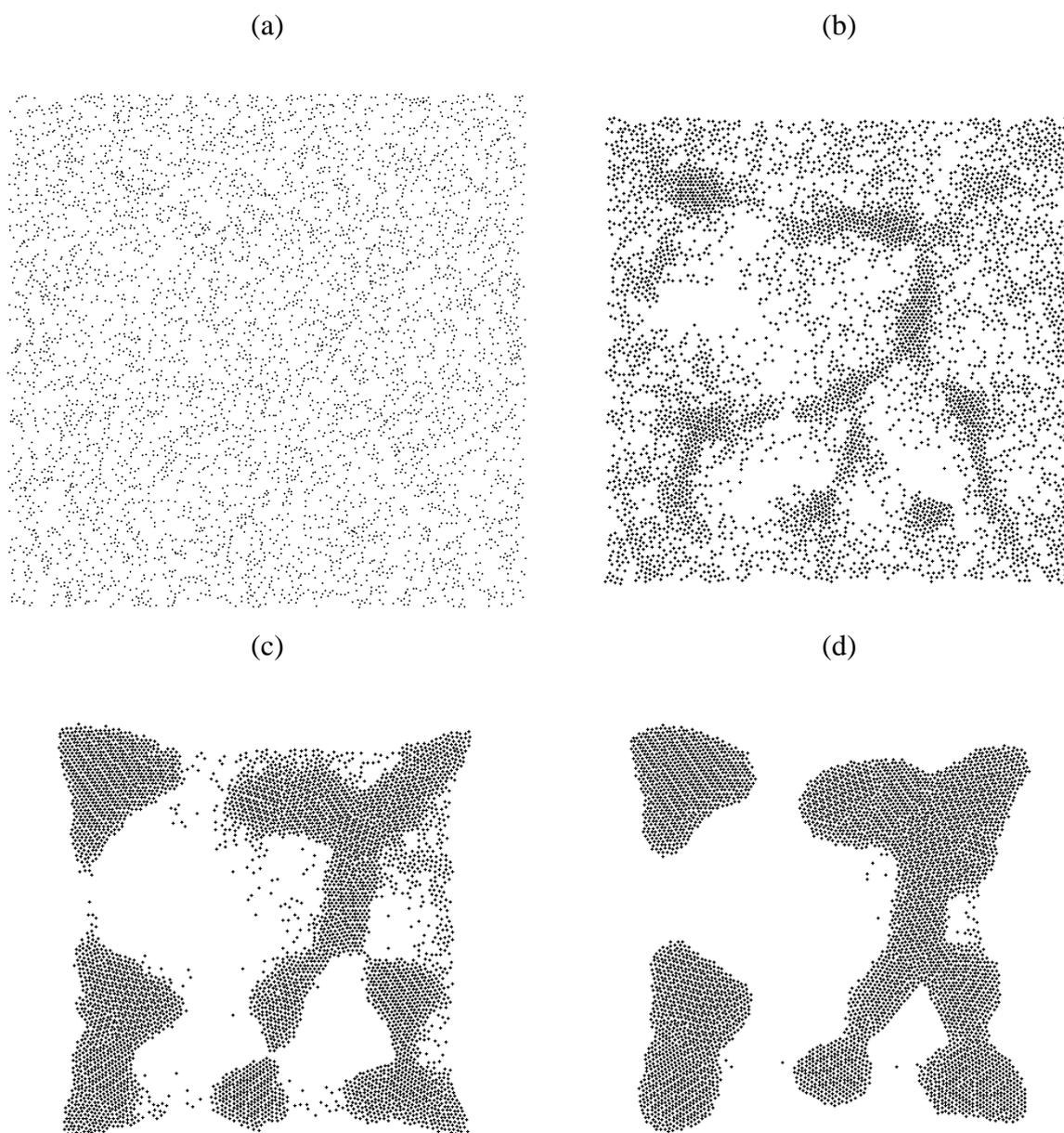


Figura 5.5: 5040 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada com lado medindo 1 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) $T=0$; b) $T=10$ min; c) $T=34$ min. Simulação realizada utilizando o *MCCG* de interações entre amebas. Na versão digital a animação dessa simulação pode ser visualizada no material suplementar #3

todas interagindo na região de repulsão do tipo caroço-duro, como visto no *MDCG*. Após alguns testes vimos que para resolver tal problema precisávamos apenas diminuir a região de caroço-duro do *MDCG* para $d_c = 0,1\sigma$. Dessa maneira as amebas podem se contrair muito

mais, simulando a elasticidade enquanto mantém uma região de caroço-duro grande o suficiente para não se atravessarem. Em altas compressões a elasticidade adicional permite que as amebas continuem se movendo com uma certa facilidade, evitando a cristalização em uma rede hexagonal. Tendo adotado um modelo tão elástico, tivemos também de redefinir como calculamos os vizinhos. Dessa maneira em vez das amebas interagirem com todos dentro do raio de alcance, elas interagem apenas com os vizinhos mais próximos, sendo para o caso bidimensional os oito vizinhos mais próximos, e dezesseis para três dimensões. A esse terceiro modelo de interação entre as amebas damos o nome de *Modelo descontínuo de caroço-duro pequeno*, ou *MDCP*.

Cronologicamente, quando propomos tal modelo havíamos também adaptado o algoritmo para utilizar programação em paralelo como havíamos descrito no capítulo 3. Com tal adaptação, o ganho na eficiência numérica nos permitiu implementar a quimiotaxia calculando a concentração de AMPc em 4 pontos em torno de cada ameba para determinar o gradiente local e, daí, a contribuição de movimento devido a esse processo. Como havíamos mencionado, a resolução da difusão do AMPc escala com N^2 e ao introduzirmos tal modelo para quimiotaxia temos $4N^2$ termos adicionais a calcular, ficando assim claro o motivo do mesmo só ser implementado uma vez que a paralelização do algoritmo tivesse sido implementada.

Na Fig. 5.6 podemos ver os resultados para o *MCCG* de interações entre amebas, notando-se que a configuração final (Fig. 5.6b) de um único agregado não apresenta uma configuração hexagonal como apresentado pelos modelos anteriores (*MDCG* e *MCCG*). Se visualizarmos a evolução do agregado no material suplementar #4 da versão digital, veremos que a dinâmica de movimento das amebas e a capacidade de deslocamento dos agregados aumentou significativamente quando se compara com os resultados do modelo anterior. No entanto, a nova quimiotaxia e a rápida degradação do AMPc acabam diminuindo a eficiência de agregação das amebas.

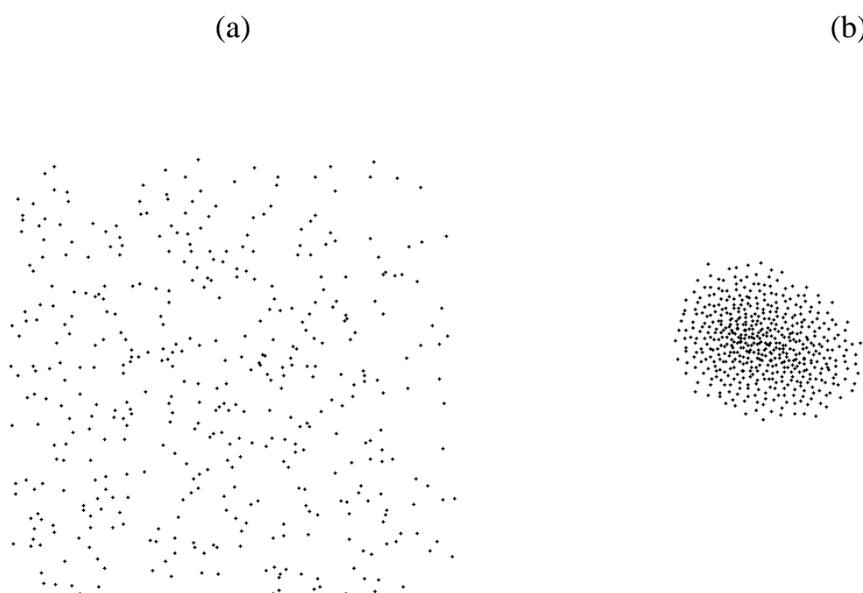


Figura 5.6: Simulação realizada utilizando o *MDCP*, como visto na Eq. (5.3) com o raio de caroço-duro agora descrito por $d_c = 0,1\sigma$. As amebas foram distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado medindo 0,32 mm e o estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. Temos duas figuras: a) configuração inicial para ambas as simulações; b) configuração final do agregado em $T = 75$ min. Na versão digital o vídeo da simulação pode ser encontrado no material suplementar #4

5.3 Simulações em três dimensões

Para estendermos as simulações para três dimensões, poucas alterações são necessárias. Como visto no capítulo 3 o sistema de equações que utilizamos é independente do número de dimensões espaciais e as diferenças são poucas: (i) devido à introdução de uma nova dimensão teremos uma maior difusão do AMPc; (ii) em um agregado tridimensional teremos em média mais vizinhos do que no caso bidimensional, e.g., vimos que para duas dimensões uma rede compacta apresenta 6 vizinhos, em três dimensões esse número passa para 12. Dessa maneira teremos maior quantidade de AMPc nos agregados tridimensionais, mas a difusão do mesmo será mais rápida. Como vimos na Fig. 3.3 a quantidade de AMPc na região extra-celular altera a frequência dos pulsos e, quando em quantidade demasiada, encolhe os ciclos de oscilações até que ele vire um ponto no espaço de fase. Assim sendo, alteramos o parâmetro livre para

adequar a dinâmica de AMPc à nova situação, encontrando-se $h = 0,05$ para essas simulações. A movimentação das amebas requer também mudanças no ruído. Redefinimos o ruído apresentado na Eq. 5.1, para um vetor unitário em coordenadas esféricas. Ou seja, além de sortear o ângulo θ no intervalo $[-\pi, \pi]$, sortearmos um segundo ângulo ϕ que, para manter a uniformidade da distribuição aleatória, será calculado por $\phi = \sin^{-1}(\xi)$, onde ξ tem o intervalo $[-1, 1]$.

A adaptação à força de interação das amebas requer menos ajustes. Modelaremos as amebas como esferas e, em um primeiro momento, utilizaremos o *MDCG* (seção 5.2.1), e deve-se notar que agora a distância r_{ij} entre amebas, refere-se a um raio em um espaço tridimensional. Temos também a questão da “gravidade” e de como restringir o movimento à região positiva do eixo Z . Apesar de experimentos mostrarem que a gravidade não tem real efeito sobre as amebas, incluímos uma tendência das amebas a se moverem para baixo, o que poderia ser entendido como gravidade, ou uma tendência de se fixar ao solo. Sem tal recurso, as amebas andariam livremente pelas três dimensões como se estivessem nadando em algum fluido. Tal tendência de se mover para baixo foi implementada como uma contribuição contínua na velocidade, com direção negativa no eixo Z . Para confinar as amebas na região superior do eixo Z iremos utilizar uma barreira com repulsão do tipo caroço-duro em torno de $Z = 0$. Sendo assim, qualquer ameba que chegue demasiadamente perto de tal limite, é repelida para cima.

Ao iniciar uma simulação as amebas são distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada bidimensional em $Z \sim 0$, atribuindo a cada uma um estado biológico sorteado ao acaso dentro do *ciclo padrão*. Para testarmos a tendência de adesão no solo, definimos o parâmetro G , que vai ser a contribuição de movimento na direção negativa do eixo Z a cada passo de tempo. Sendo assim, na Fig. 5.7 podemos ver o efeito desse parâmetro nas simulações. Essa simulação foi feita distribuindo-se 500 amebas aleatoriamente em uma região quadrada de lado medindo 0,45 mm), com condições iniciais biológicas aleatórias para cada ameba com dados do *ciclo padrão* e com parâmetros de movimento: $v = 8$, $\eta = 1$ e $\varepsilon = 4$. Apesar das condições iniciais espaciais e biológicas serem aleatórias, as três simulações tinham exatamente o mesmo estado inicial e alteramos simplesmente o parâmetro responsável pela tendência de adesão ao solo G .

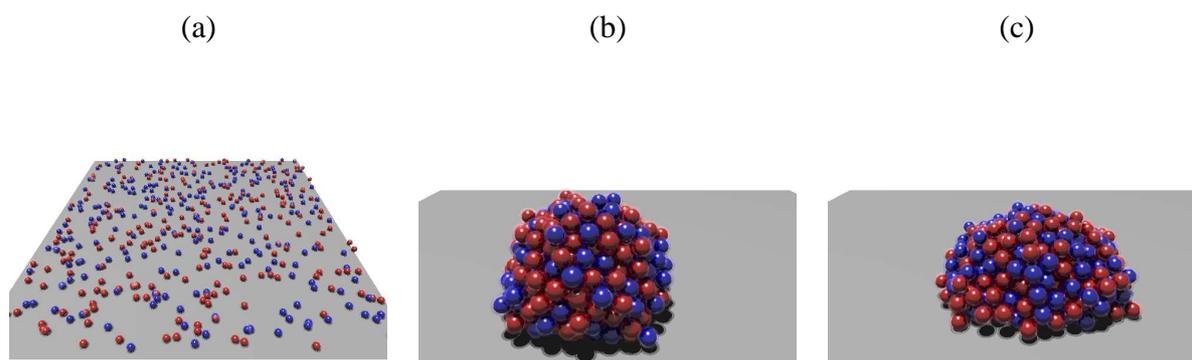


Figura 5.7: Simulações em três dimensões para casos com contribuições diferentes que simulam tendência de adesão com o solo. As amebas foram distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado medindo 0,45 mm e o estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. Temos três figuras: a) configuração inicial para ambas as simulações; b) configuração final para o caso com a contribuição de adesão ao solo em $G = 0,25$; c) configuração final para o caso com a tendência de adesão ao solo em $G = 0,5$. Simulações realizadas utilizando o *MDCG* de interações entre amebas.

Na Fig. 5.7a podemos ver a distribuição inicial das amebas e nas Figs. 5.7b e 5.7c temos respectivamente $G = 0,25$ e $G = 0,5$. Todas as figuras apresentadas foram confeccionadas com o auxílio do software Povray¹ e as diferentes cores para cada ameba são simplesmente para melhor visualização da dinâmica.

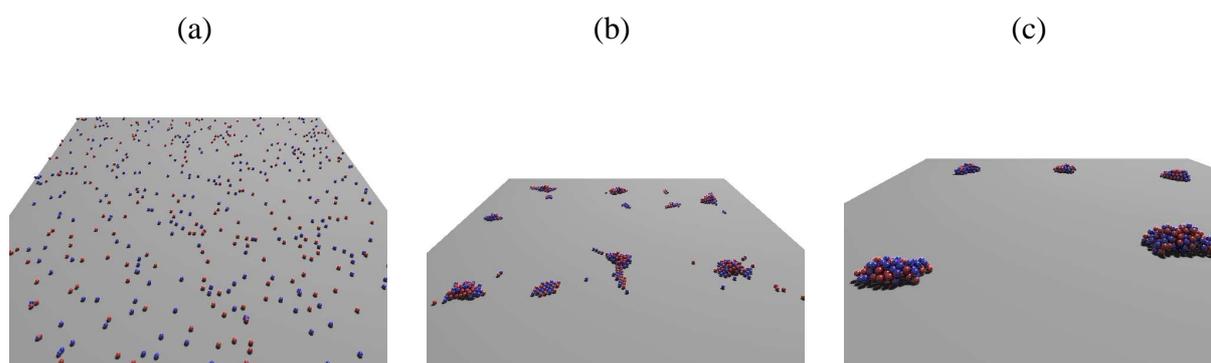


Figura 5.8: Simulação com 500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado 1 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) $T=0$; b) $T=25$ min; c) $T=170$ min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #5

Assim como no caso bidimensional, fizemos simulações em baixa densidade de amebas (500

¹www.povray.org

amebas distribuídas em 1 mm^2), podemos visualizar três diferentes estágios de tal simulação na Fig. 5.8. Após 25 min, podemos ver na Fig. 5.8b que, como no caso em duas dimensões, formaram-se vários agregados. Também podemos ver algumas amebas distribuídas em caminhos preferenciais de movimento a medida que se juntam em agregados maiores. A Fig. 5.8c nos mostra que após 170 min de simulação todas as amebas já fazem parte de algum agregado, com os mesmos se movimentando lentamente uns em direção aos outros. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #5.

Uma vez implementado a versão em paralelo do algoritmo, fomos capazes de simular grandes quantidades de amebas em períodos relativamente curtos de tempo. Na Fig. 5.9 mostramos imagens resultantes de uma simulação feita com 2500 partículas distribuídas em uma região quadrada de lado igual a 0,71 mm. Nota-se nessa figura a divisão em três diferentes centros de atração que se formam naturalmente pela dinâmica do AMPc e pela quimiotaxia. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #6.

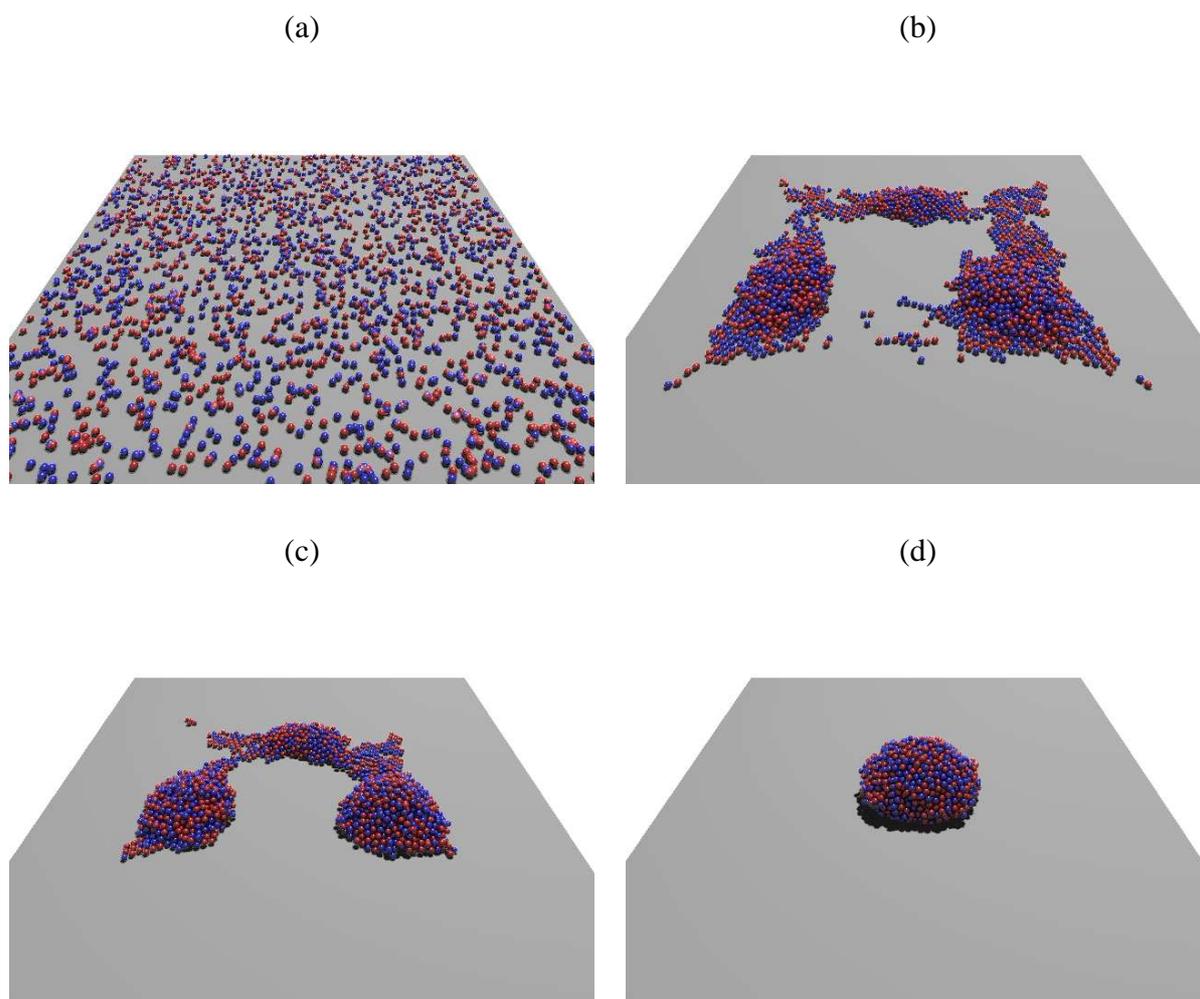


Figura 5.9: Simulação com 2500 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado medindo 0,71 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra quatro diferentes estágios da simulação: a) $T=0$; b) $T=19$ min; c) $T=33$ min; d) $T=75$ min. Simulação realizada utilizando o *MDCG* de interações entre amebas. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #6

Uma simulação em três dimensões referente ao *MCCG* (seção ??) pode ser visto na Fig. 5.10, onde surgem as mesmas redes hexagonais do caso bidimensional (Fig. 5.10b e 5.10c). No material suplementar temos a animação de tal simulação onde observamos novamente o movimento rotacional das amebas, mas agora em três dimensões. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #7.

Também realizamos simulações em três dimensões para o *MDCP* de volume (seção 5.2.3.

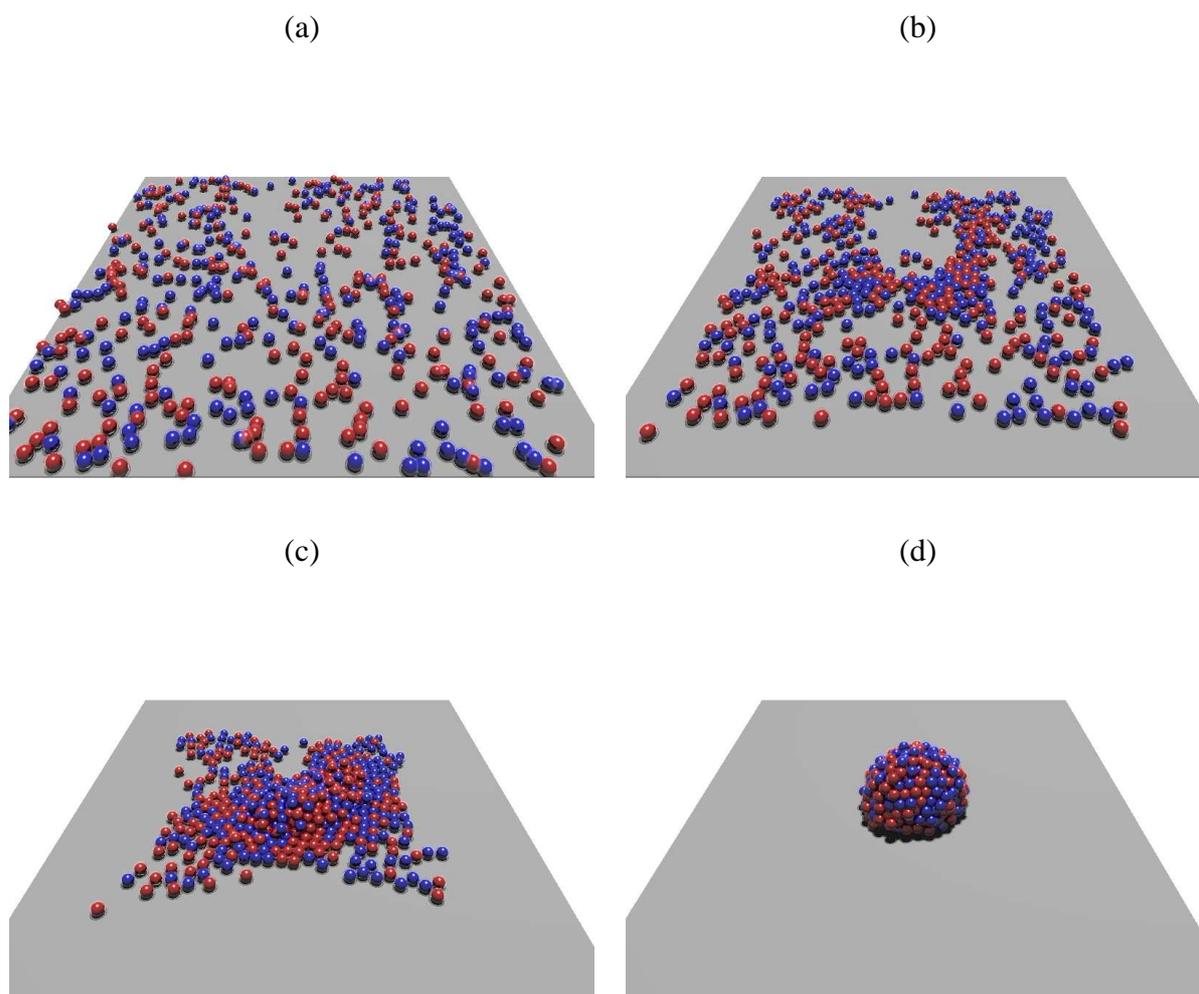


Figura 5.10: Simulação com 480 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado 0,33 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) $T=0$; b) $T=2$ min; c) $T=6$ min; d) $T=20$ min. Simulação realizada utilizando o *MCCG* de interações entre amebas. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #7

Na Fig. 5.11 mostra-se uma simulação onde 504 amebas foram distribuídas em uma região quadrada de lado 0,31 mm que utiliza esse novo modelo de força de interação. O estado inicial da simulação é mostrado na Fig. 5.11a, a formação de agregados e logo após as estruturas tridimensionais formadas pela reorganização dos mesmos são mostrados nas Figs. 5.11b 5.11c, com $T = 5$ e $T = 13,3$ minutos respectivamente. Após 100 minutos de simulação podemos ver que alguns dos agregados formados inicialmente se fundiram com os seus vizinhos na Fig. 5.11d. Como no caso bidimensional, a razão para termos um alto número de agregados em

relação as simulações anteriores, é o novo modelo utilizado para calcular a quimiotaxia. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #8.

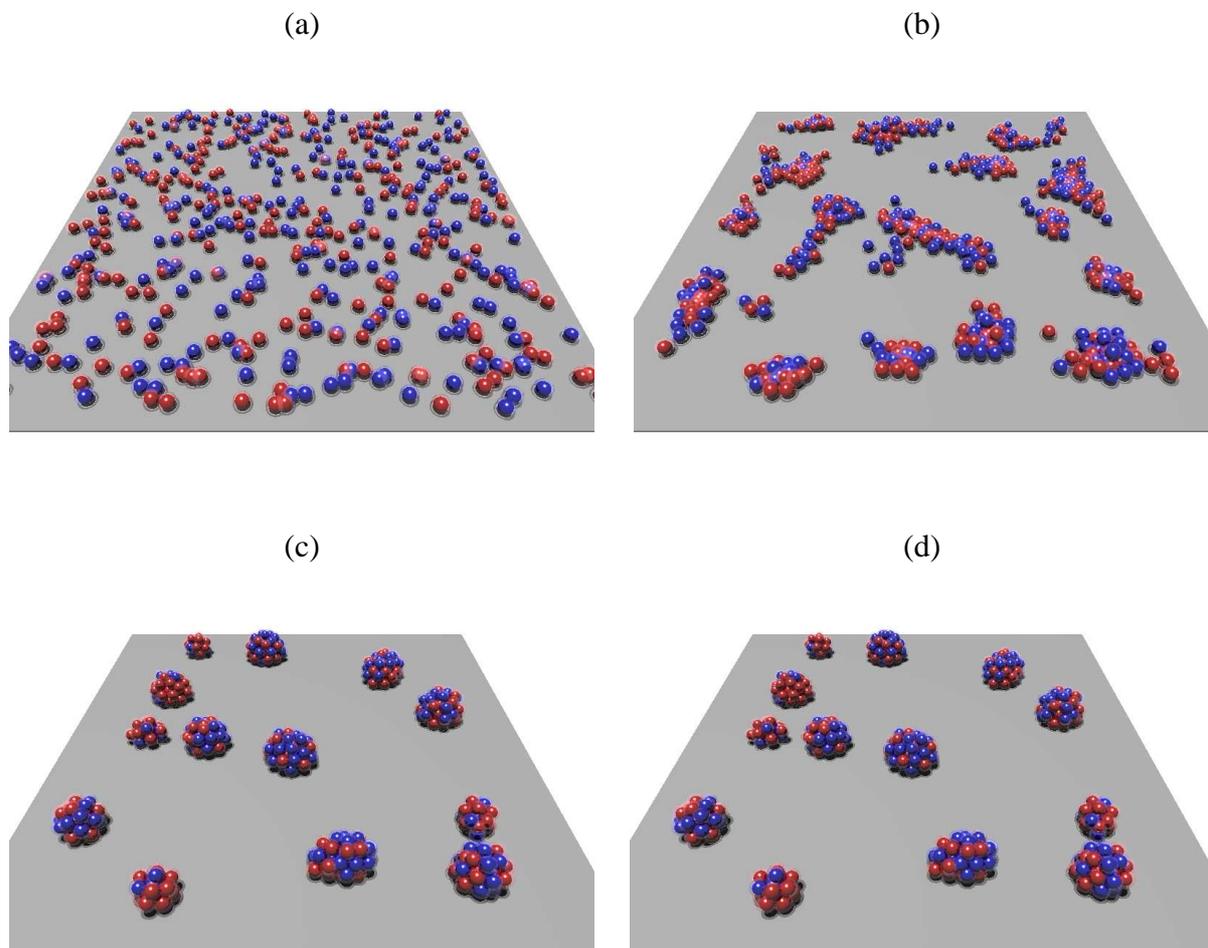


Figura 5.11: Simulação com 504 amebas distribuídas aleatoriamente em uma região quadrada de lado 0,31 mm. O estado biológico inicial para cada ameba foi escolhido aleatoriamente usando os dados do *ciclo padrão*. A figura mostra três diferentes estágios da simulação: a) T=0; b) T= 5 min; c) T=13,3 min; d) T=100 min. Simulação realizada utilizando o *MDCP* de interações entre amebas. Na versão digital podemos visualizar essa simulação no material suplementar #8

6 *Movimento Rotacional*

No capítulo anterior mostramos diversas simulações com os resultados para os diferentes modelos que desenvolvemos, e notamos que tanto no caso bidimensional como no tridimensional, obtivemos indícios de movimento rotacional. Veremos nesse capítulo a origem de tal movimento rotacional, assim como os parâmetros a ajustar para controlar sua magnitude e melhor representar as observações experimentais. Para entendermos esse comportamento primeiramente estudaremos um sistema de animóides puro em vez de estudarmos a ameiba, com objetivo de diminuir o número de variáveis e identificar um conjunto mínimo que produza esse comportamento.

6.1 **Origem do movimento rotacional**

Como vimos anteriormente no Cap. 5 há simulações em duas e três dimensões que apresentam comportamento rotacional. Comportamentos similares foram encontrados na literatura em outros sistemas de agentes auto-propelentes [59, 60, 61] que utilizavam potenciais de confinamento ou uma força gravitacional de atração entre os agentes móveis. O modelo aqui apresentado não apresenta tais potenciais de confinamento, mas a quimiotaxia acaba produzindo um efeito similar ao da força gravitacional vista na ref. [59]. O movimento rotacional em simulações com agentes móveis surge ao implementarmos algum tipo de confinamento ou pressão no sistema. Ao terem seu espaço limitado por um confinamento e devido à propriedade de sempre se moverem, aparece a possibilidade das partículas apresentarem uma quebra espontânea de simetria e iniciarem movimento rotacional.

No caso apresentado na Fig. 5.4 podemos notar que o movimento rotacional apresentado tem baixa eficiência, pois em 40 min. de simulação temos apenas alguns graus de movimento. Por outro lado, um conjunto de N amebas separadas em distâncias de equilíbrio local de forças, produz um agregado de raio $R = r_{\sigma}\sqrt{N}$, e, portanto, um perímetro dado por $2\pi r_{\sigma}\sqrt{N}$. Para o caso de um agregado de 500 amebas e uma velocidade de movimento de $20\sigma/\text{min} = 40r_{\sigma}/\text{min}$, uma ameba localizada na borda levaria somente 3,5 min. para completar uma volta completa. Portanto, o movimento obtido na Fig. 5.4 é melhor definido como uma deriva rotacional, i.e., um movimento rotacional a longo prazo, mas que ao ser observado em curtos períodos de tempo, parece aleatório. Vemos então ser necessário intensificar tal comportamento para fazermos a real comparação com os agregados de *Dictyostelium*.

Considerando que o movimento rotacional observado na *Dictyostelium discoideum* acontece nos estágios de diferenciação e migração, vamos nos focar nas simulações tridimensionais. Concomitantemente, para diminuirmos o número de variáveis e parâmetros a investigar, estudaremos o sistema do ponto de vista do modelo de animóides, i.e, sem sinalização química. Dessa maneira utilizaremos a Eq. 5.1, com o modelo forças descrito em na equação 5.3, mas com $d_c = 0,1\sigma$, ou seja o *MDCP*, apresentado na seção 5.2.3. Iremos nos referir às partículas nesse capítulo como animóides em vez de amebas, para diferenciar dos casos anteriores onde o sistema continha a dinâmica de AMPc.

Sabendo que o movimento circular se origina justamente da compressão dos animóides, ao removermos a sinalização química, e conseqüentemente a quimiotaxia, precisamos impor algum tipo de confinamento. Vamos implementar uma barreira com repulsão do tipo caroço-duro, na forma de um cilindro, cujo volume interior será a soma do volume V de N animóides considerados em seus raios de equilíbrio. Tal confinamento se assemelha a camada glico-proteica que envolve a lesma durante a migração. Com este arranjo poderemos testar diversas compressões no sistema com objetivo de determinar se esse é um fator relevante na quebra de simetria rotacional. Vale notar também que como agora temos um sistema fechado, não há mais necessidade de se impor uma tendência das partículas aderirem ao solo, sendo assim vamos desconsiderar a contribuição G definida na seção 5.3.

Para medir o movimento rotacional calcularemos o momento angular total do sistema, dado pela soma dos momentos angulares individuais a cada instante j de tempo,

$$\vec{L}^j = \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \times \vec{p}_i. \quad (6.1)$$

Devido ao ruído do sistema vamos também realizar uma média temporal dos momentos, agrupando 1 minuto de dados a cada ponto do gráfico, dessa maneira temos:

$$\langle \vec{L}^\tau \rangle = \frac{1}{T} \sum_{t'=t+1}^{t+T} \vec{L}^j, \quad (6.2)$$

onde $T = 1$ minuto e $\tau = t + \frac{T}{2} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}$ min, etc. Como mencionado iremos utilizar o volume V dos N animóides dentro do mesmo (calculado utilizando o raio de equilíbrio da ameba *Dictyostelium discoideum* $r_\sigma = 5 \mu\text{mm}$) e também as proporções experimentais da lesma [62] de maneira que teremos comprimento do cilindro onze vezes maior que o seu raio, dessa maneira podemos definir o raio do cilindro como:

$$r_c = \left[\frac{\delta \left(\frac{4}{3} N \pi r_\sigma^3 \right)}{11\pi} \right]^{\frac{1}{3}}, \quad (6.3)$$

onde δ é a proporção do volume V definido pelas N amebas na distância de equilíbrio que o cilindro terá, e o comprimento é dado por $l_c = 11r_c$. Para facilitar o cálculo do momento angular, posicionaremos o cilindro ao longo do eixo X centrado-o na origem (de maneira que o cálculo do vetor \vec{r}_i se torne trivial), resultando que os limites do seu comprimento sejam $[-\frac{l_c}{2}, \frac{l_c}{2}]$. Na Fig. 6.1 podemos ver as 2000 animóides e um cilindro representando a barreira implementada para conter os mesmos.

Devido a simetria do cilindro e a sua disposição ao longo do eixo X , espera-se que, caso os animóides atinjam um movimento circular, o momento angular referente a cada um deles forme uma estrutura similar a um cone de vetores centrados na origem com sentido de acordo com a rotação dos animóides. Uma vez que temos um vetor tridimensional e a mudança de comportamento deve surgir em apenas um dos eixos, vamos explicitar as componentes do vetor \vec{L}^τ em suas três componentes (X, Y, Z). A Fig. 6.2 representa o momento angular como descrito pela Eq. (6.1) em uma simulação de 2 mil animóides limitados por um cilindro para o

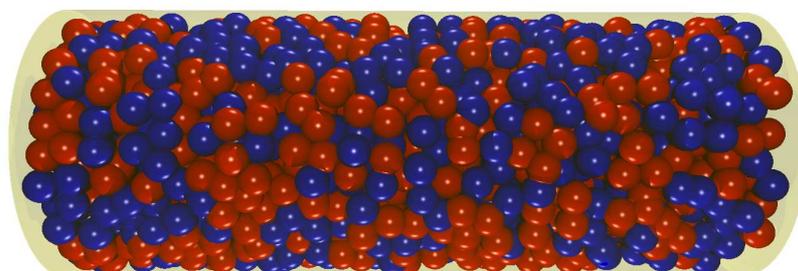


Figura 6.1: Simulação de 2000 animóides. O cilindro representa a barreira implementada para contê-los e as diferentes cores servem apenas para melhor visualizar o movimento de animóides específicos. Os parâmetros utilizados foram: $\alpha = 0$; $\delta = 1$; $\nu = 1$ e $\eta = 1$.

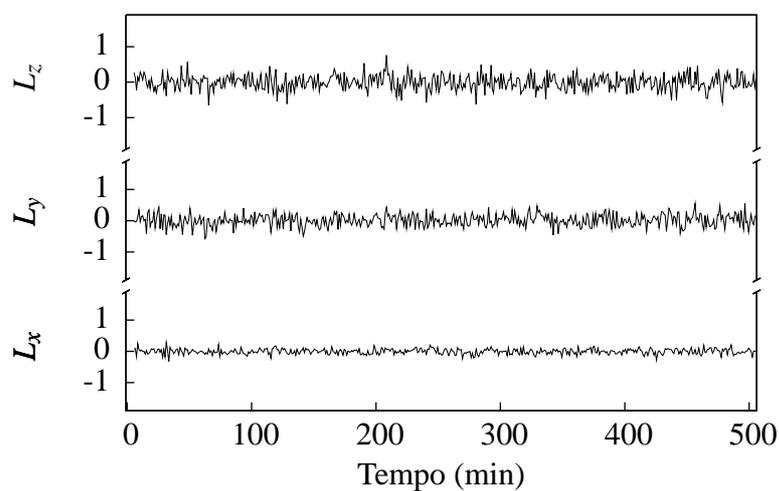


Figura 6.2: Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1$; $\alpha = 0$; $\nu = 1$; $\varepsilon = 0$. Podemos notar que as componentes y e z dominam sobre a componente x devido a disposição do cilindro ao longo do eixo X , sendo assim os animóides acabam se locomovendo mais na região de maior extensão em vez de sincronizarem num movimento rotacional

caso sem compressão ($\delta = 1$), sem alinhamento de velocidades ($\alpha = 0$), intensidade da força de adesão $v = 1$ e ruído unitário $\eta = 1$. Pode-se notar que nesse caso temos apenas ruído nas três componentes do momento angular. Pode-se notar também que o ruído nas componentes L_y e L_z tem maior amplitude que L_x , isso acontece pois os animóides tem maior liberdade de movimento ao longo do eixo X , fazendo com que a maior parte dos deslocamentos seja nessa direção, sendo assim a contribuição ao ruído será menor para L_x do que para as demais componentes.

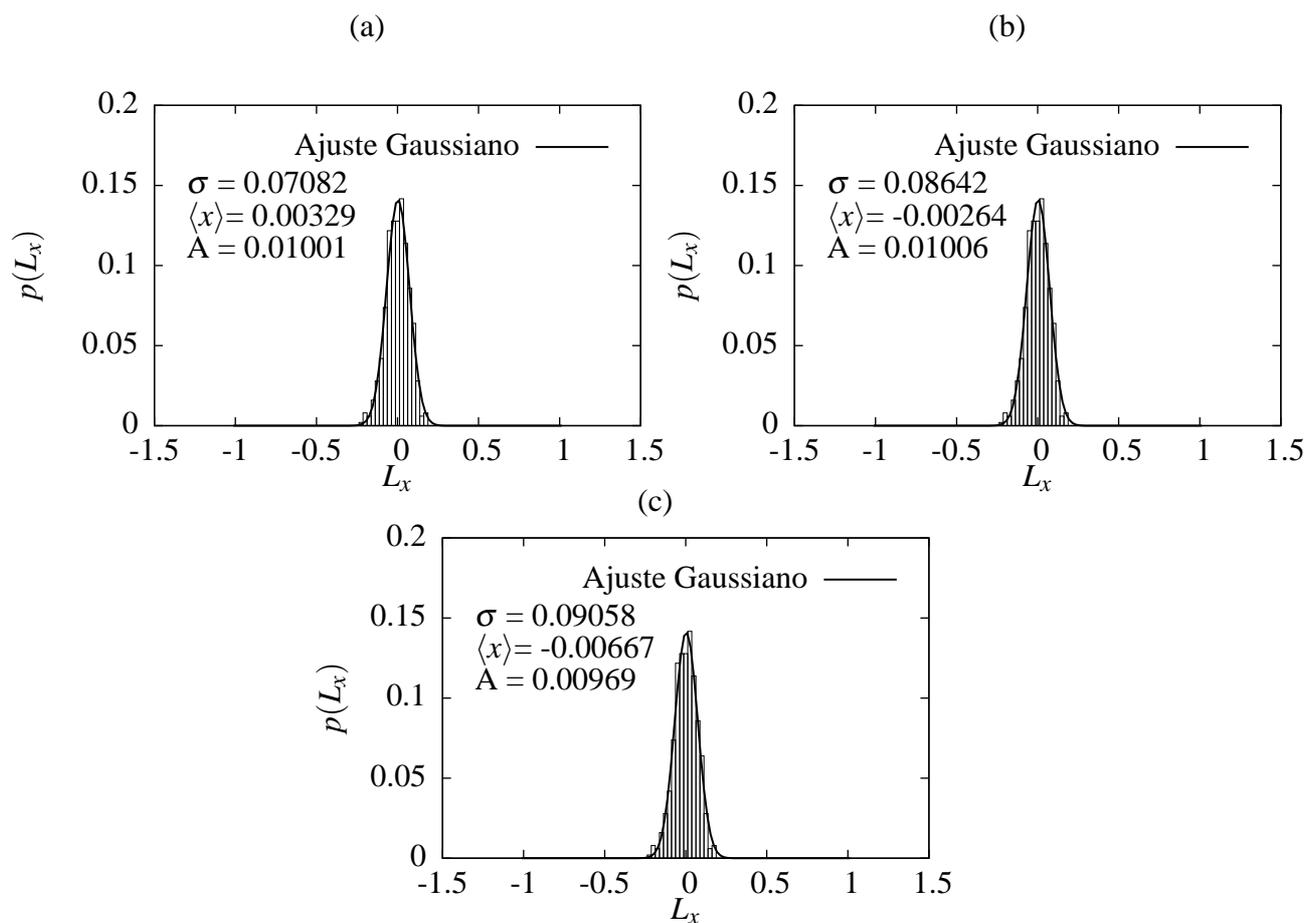


Figura 6.3: Histograma e um ajuste Gaussiano $(A/\sigma) \exp[-0.5 \frac{(\langle x \rangle - x)^2}{\sigma^2}]$ para a distribuição dos valores de L_x (para parâmetros $v = 1$ $\eta = 1$ e $\alpha = 0$) em tres casos distintos de compressão: a) $\delta = 0,5$; b) $\delta = 1,0$; c) $\delta = 1,5$.

Na Fig. 6.3 temos histogramas da componente X do momento angular calculado anteriormente para o caso de diferentes razões de volume δ (0,5; 1,0; e 1,5 respectivamente). Tais histogramas nos mostram uma distribuição gaussiana para os diferentes casos apresentados, onde podemos ver que, apesar de haver uma variação na largura da gaussiana, a proporção do volume original não gera uma quebra de simetria rotacional no sistema.

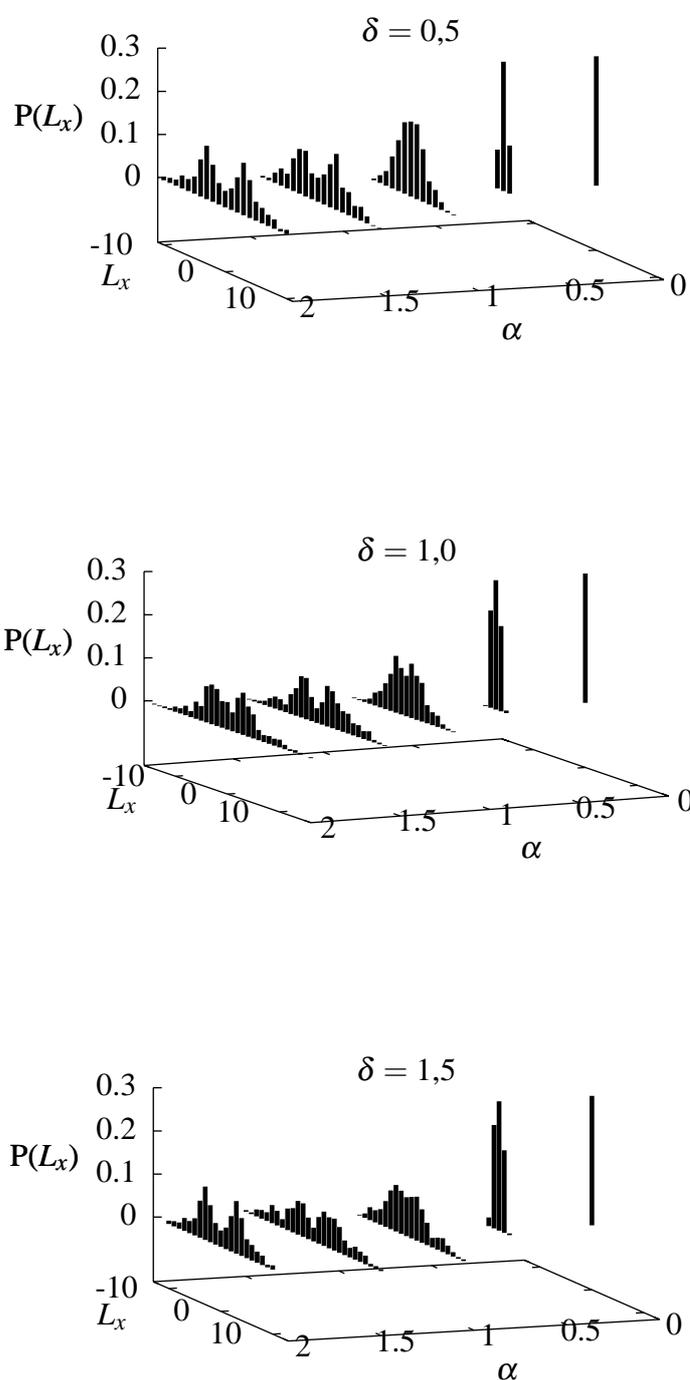


Figura 6.4: Histogramas da componente x do momento angular em função de α para simulações com: $\delta = 0,5$ superior; $\delta = 1,0$ central; $\delta = 1,5$ inferior. Simulações para 2000 amebas com parâmetros $\nu = 1$ e $\varepsilon = 0$. A componente L_x foi limitada em 0,3 para melhor visualização dos dados.

Num passo seguinte fizemos simulações onde o parâmetro α foi variado para as mesmas três diferentes compressões apresentadas anteriormente. Na Fig. 6.4 podemos ver os histogramas da componente x do momento angular para os diferentes casos ($\delta = 0,5; 1,0$ e $1,5$) e notamos que, a medida que o alinhamento das velocidades (controlada pelo parâmetro α) se intensifica, a distribuição gaussiana divide-se em duas. Ao longo dos histogramas referentes às Figs. 6.3 e 6.4 o número de contagens (501) - referente ao número de minutos da simulação após um transiente de 5 minutos - foi mantida constante. Assim, a quantidade e densidade de divisões no histograma pode variar entre as figuras.

Ao analisar a evolução dos histogramas podemos ver que temos um princípio de transição para o movimento rotacional. Entretanto, a Fig. 6.5 nos mostra que tal comportamento é muito sutil, e que ainda é dominado pela movimentação dos animóides ao longo do cilindro. Analisando o material suplementar #9 podemos ver que para valores baixos do parâmetro v , responsável pela adesão entre animóides, mesmo valores como $\alpha = 1$ iniciam o comportamento coletivo descrito por Grégoire e colaboradores [4, 28]. Tal comportamento coletivo combinado com o confinamento faz com que os animóides colidam contra a barreira na extremidade do cilindro e durante esse evento pode-se notar o movimento rotacional nos animóides das extremidades. A rotação tem a duração do choque com as extremidades, ou seja, acompanha a inversão sentido do movimento coletivo de translação nas bases do cilindro. (material suplementar #9).

Para explicar tal fenômeno, devemos lembrar que os relatos apresentados por [59, 60, 61] mostraram o comportamento rotacional em simulações bidimensionais com confinamento. Ao expandirmos o modelo para três dimensões o confinamento mais simples a ser implementado foi a barreira cilíndrica que utilizamos, mas, pelo exemplo visto acima, também necessitamos uma pressão aplicada ao longo do cilindro. Um comportamento similar foi visto na simulação apresentada na Fig. 5.10 onde podemos ver no material suplementar #7, que apesar de não termos a barreira cilíndrica, existe a tendência de adesão ao solo. Tal tendência de adesão acaba sendo análoga a compressão dos animóides ao colidir com a barreira na extremidade do cilindro, induzindo a quebra de simetria rotacional no sistema.

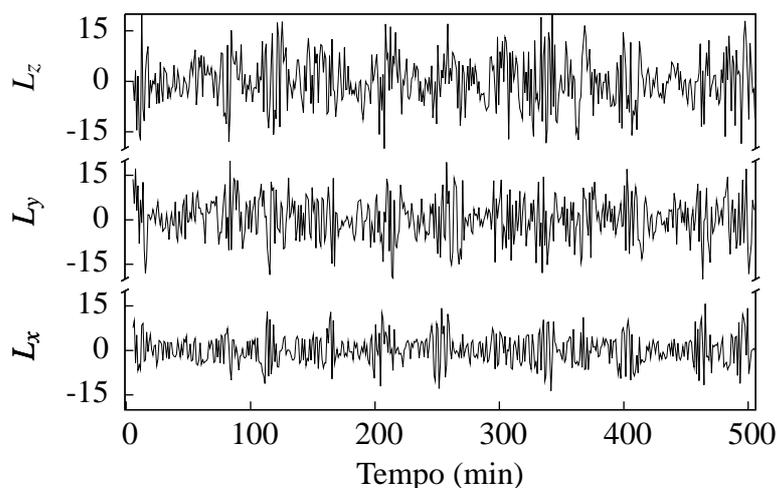


Figura 6.5: Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1$; $\alpha = 2$; $\nu = 1$; $\varepsilon = 0$. Apesar da indicação de movimento circular apresentados na Fig. 6.4 ao analisarmos as componentes y e z verificamos que estas tem uma amplitude maior que componente x , indicando que ainda não temos um movimento rotacional estabelecido. Na versão digital essa simulação pode ser vista no material suplementar #9.

Durante a fase de migração da lesma, podemos ver internamente movimentos helicoidais das amebas na direção de seu movimento [63]. Se considerarmos a migração da lesma, o fato das amebas internamente estarem se deslocando na mesma direção e sentido, junto com o fato de que a lesma é envolta por uma camada glico-proteica (produzida pela ponta do mesmo a medida que se locomove), podemos estabelecer uma correspondência entre esse comportamento e aquele mostrado acima. Dessa maneira, optamos por implementar uma tendência fixa de movimento Q na direção do eixo do cilindro, para simular a compressão adicional que as amebas anteriores sofrem devido à movimentação das restantes.

Após simular com diferentes parâmetros detectamos que um maior valor para o parâmetro ν , responsável pela adesão entre os animóides, inibe a transição para o estado de movimento coletivo. Na Fig. 6.6 mostramos o histograma para uma simulação com a tendência de movimento ao longo do eixo e um maior valor para a adesão entre os animóides, sendo os parâmetros: $\delta = 1,1$; $\alpha = 0,9$; $\nu = 5$; $\varepsilon = 0$; $Q = 0,2$. Tal histograma evidencia o mesmo comportamento visto anteriormente na Figs. 6.4b e 6.4c, mas ao analisarmos as três componentes, que pode ser

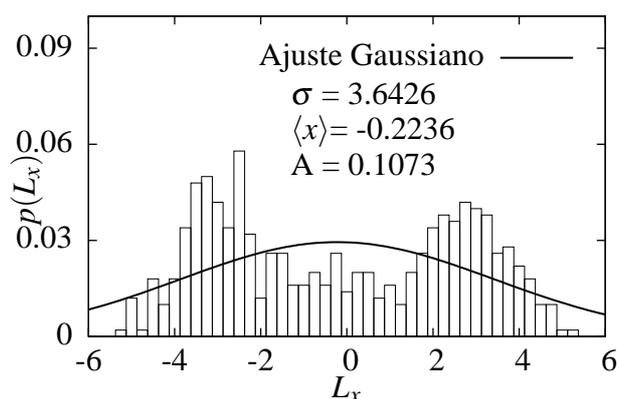


Figura 6.6: Histograma do componente L_x para uma simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1, 1$; $\alpha = 0,9$; $\nu = 5$; $\varepsilon = 0$; $Q = 0,2$.

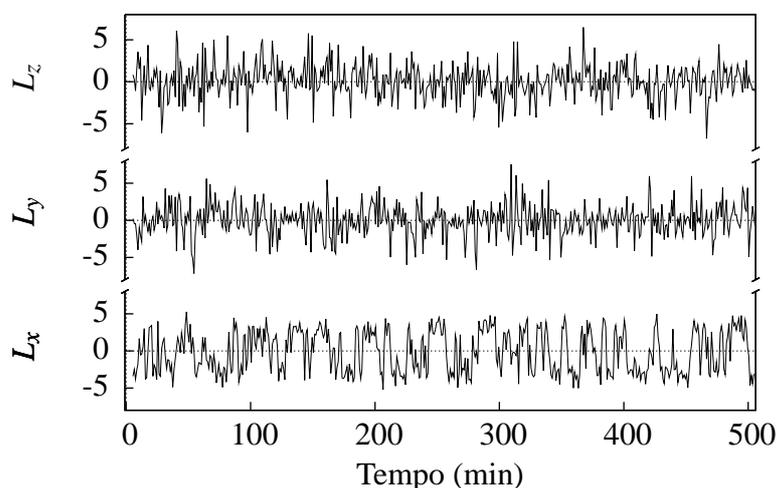


Figura 6.7: Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1, 1$; $\alpha = 0,9$; $\nu = 5$; $\varepsilon = 0$; $Q = 0,2$. Na versão digital podemos visualizar tal simulação no material suplementar #10

visto na Fig. 6.7, podemos notar que agora a componente x apresenta uma amplitude similar as demais, mostrando a eficácia do aumento na adesão entre as partículas para evitar o movimento coletivo. Na versão digital podemos visualizar tal simulação no material suplementar #10 onde verificamos que apesar dos animóides apresentarem um movimento circular, o mesmo ainda não domina o sistema. Ao incrementarmos o parâmetro α , podemos ver na Fig. 6.8 uma transição completa de comportamento, onde os animóides sincronizam o seu movimento circular que pode ser visualizado na versão digital no material suplementar #11

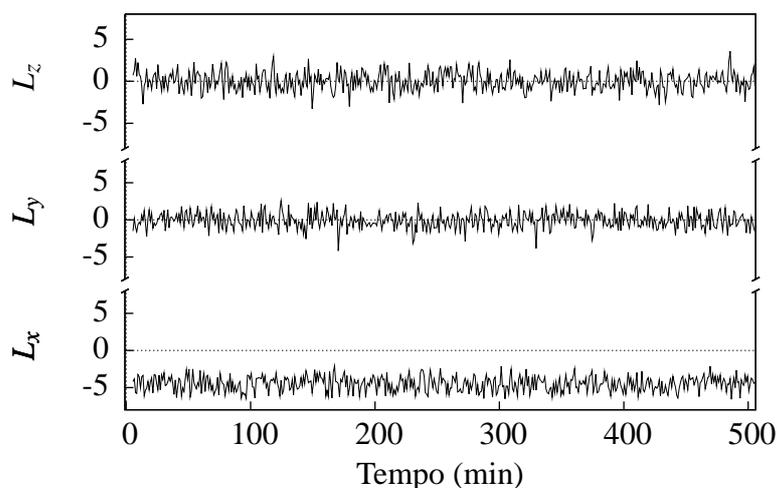


Figura 6.8: Evolução temporal das três componentes do momento angular como definido na Eq. (6.1). Simulação para 2000 amebas com parâmetros: $\delta = 1,1$; $\alpha = 1,0$; $\nu = 5$; $\varepsilon = 0$; $Q = 0,2$. Na versão digital podemos visualizar tal simulação no material suplementar #11

Se analisarmos o vídeo contido no material suplementar #11, podemos ver além do movimento circular, um comportamento de contração e expansão das amebas ao longo do eixo do cilindro. Tal comportamento acontece por causa de três fatores: a tendência de movimento ao longo do eixo; o parâmetro responsável pelo alinhamento das velocidades dos vizinhos α ; as barreiras do cilindro. O primeiro fator faz com que as amebas se concentrem em uma das extremidades do cilindro, mas a medida que algumas amebas são repelidas pela barreira do cilindro, elas influenciam as suas vizinhas a também inverter o seu movimento. Rapidamente tal comportamento se propaga pelo sistema, criando assim a oscilação descrita acima. Essa oscilação pode ser comparada ao estado de movimento coletivo descrito anteriormente, mas agora, causado pela repulsão da barreira, em vez de um fenômeno de sincronização natural do sistema causado pelo ruído e o alinhamento das velocidades.

Na Fig. 6.9 podemos ver os histogramas da componente x do momento angular para diversos valores da força de adesão, onde observa-se que para valores acima de $\nu = 7$, saímos da região de movimento circular. Para uma análise mais detalhada, na Fig. 6.10 podemos ver como o módulo do valor médio de L_x para diferentes valores de α , onde os demais parâmetros das simulações foram mantidos constantes nos seguintes valores: $\nu = 5$; $\eta = 1$; $Q = 0,2$; $\delta = 1,1$.

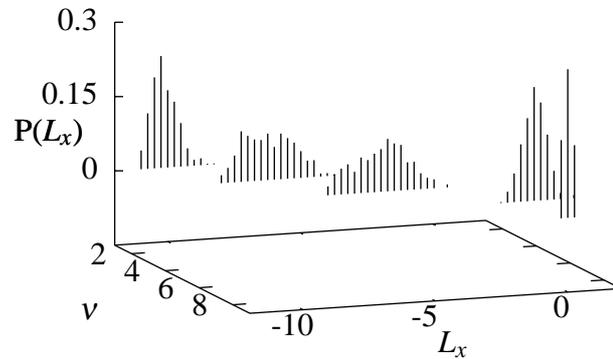


Figura 6.9: Histogramas da componente x do momento angular em função de v onde a componente L_x foi limitada em 0,5 para melhor visualização dos dados. Simulações para 2000 amebas com parâmetros $\alpha = 1,0$ $\varepsilon = 0$ $\delta = 1,1$.

A Fig. 6.10 contém também uma ampliação da região na qual o sistema apresenta movimento rotacional com as instabilidades descritas anteriormente, de maneira que, para valores de $\alpha \approx 1$ temos a sincronização do sistema inteiro no estado rotacional.

Outra medida interessante a estudar para o conjunto de simulações é o cumulante de Binder [64]. Esse cumulante pode indicar se a transição para o estado rotacional ocorre de forma contínua, com a distribuição de momento angular deslocando-se de zero continuamente para um valor finito, ou se há coexistência de duas distribuições, uma centrada em zero e outra em algum valor não nulo. O cumulante de Binder é definido por:

$$\frac{1}{2} (3 - \langle L_x^4 \rangle / \langle L_x^2 \rangle^2), \quad (6.4)$$

onde $\langle L_x^4 \rangle$ e $\langle L_x^2 \rangle$ são respectivamente o quarto e o segundo momento de L_x . Os resultados para o cumulante podem ser visualizados na Fig. 6.11, onde a ampliação revela que a região onde a transição de fase se inicia acontece para valores de α maiores que 0,85. Apesar do ruído constatado na medida, a inclinação negativa (aparente para $\alpha < 0,85$) indicaria a coexistência de fases, o que foi constatado nos histogramas e nas animações do material suplementar. Resultados para as simulações com $\alpha \geq 1$ confirmam a sincronização total do sistema no novo

estado.

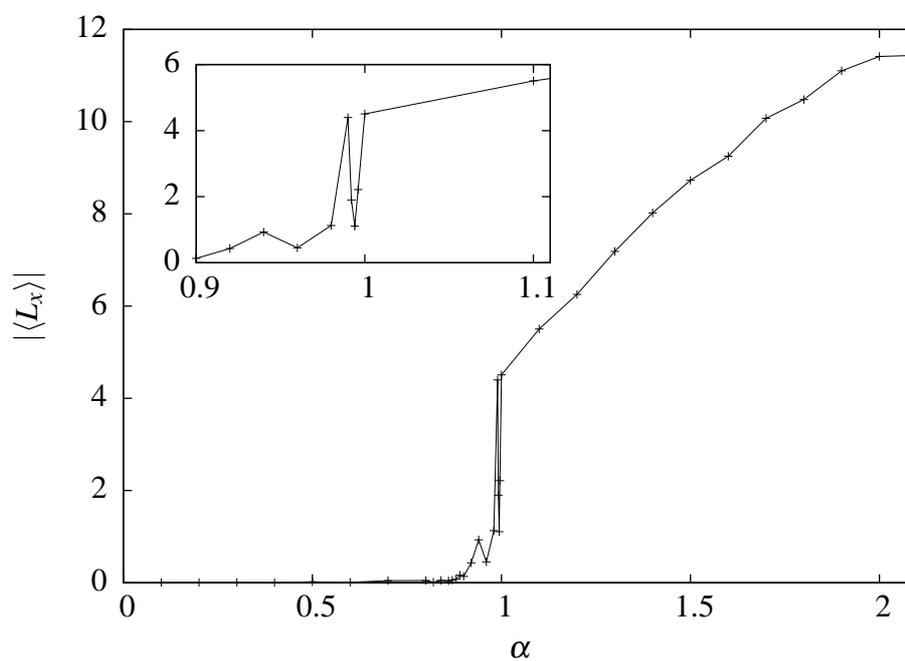


Figura 6.10: Módulo da média de L_x para diferentes valores de α em simulações com os seguintes parâmetros: $\nu = 5$; $\eta = 1$; $Q = 0, 2$; $\delta = 1, 1$. A ampliação da região na qual o sistema apresenta movimento rotacional com as instabilidades descritas anteriormente de maneira que para valores de $\alpha \approx 1$ temos a sincronização do sistema inteiro no estado rotacional.

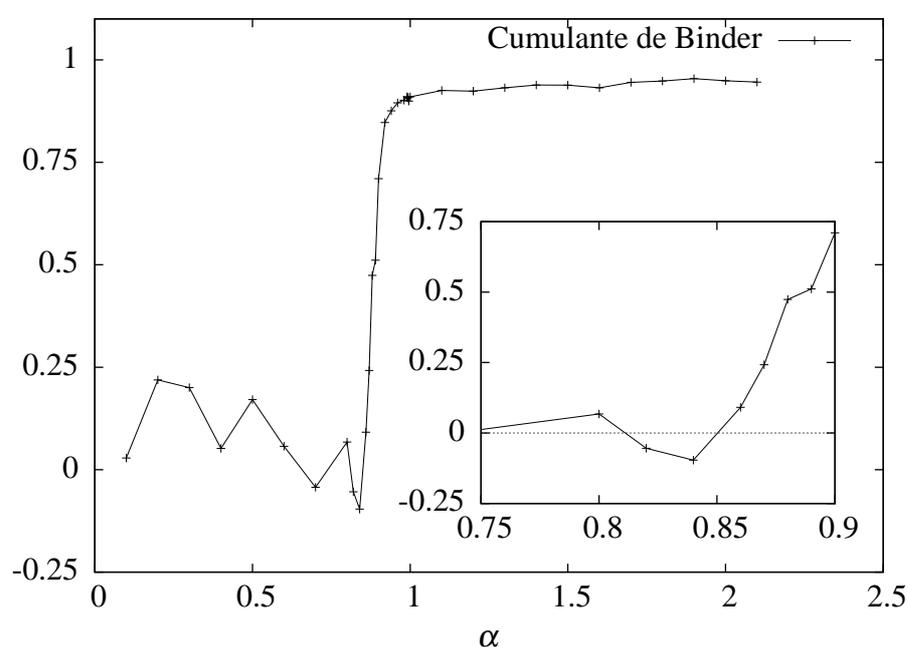


Figura 6.11: Cumulante de Binder, definido como $\frac{1}{2}(3 - \langle L_x^4 \rangle / \langle L_x^2 \rangle^2)$, em função do parâmetro α para simulações com os seguintes parâmetros: $\nu = 5$; $\eta = 1$; $Q = 0,2$; $\delta = 1,1$. Pode-se ver na ampliação que ocorre aumento abrupto do cumulante para $\alpha > 0,85$. A inclinação negativa aparente em valores menores ($\alpha < 0,85$) indicaria coexistência de fases. Resultados para as simulações com $\alpha \geq 1$ confirmam a sincronização total do sistema no novo estado.

7 *Conclusões e Perspectivas*

Mostraremos aqui um resumo de todos os resultados apresentados nos capítulos 3, 5 e 6, junto com uma análise sobre o significado de cada resultado, explicações sobre a origem de tais comportamentos e relevância de acordo com os experimentos e a literatura existente. Mais adiante, mostraremos também perspectivas para extensões do atual trabalho, cuja inclusão na tese não foi possível.

7.1 *Conclusões*

No atual trabalho estudamos diversos aspectos do ciclo de vida social da ameba *Dictyostelium discoideum*, considerando desde a fase de sinalização, agregação, formação do agregado (*mound*) e algumas propriedades da movimento durante a fase de migração da lesma. Para modelar a sinalização química entre as amebas, adaptamos o modelo proposto por Martiel e Goldbeter (MG) [13], onde incluímos difusão espacial do sinal química de Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC). A adaptação nas equações de MG foi baseada no trabalho de Nagano [1], de maneira que o único parâmetro alterado foi a constante h , responsável, originalmente, pela quantidade de AMPC produzido internamente que chega ao meio extra-celular, que aqui também foi utilizado como parâmetro livre para ajustar o sistema as necessidades das simulações. Num primeiro momento, mantivemos os parâmetros originais (compilados de experimentos por MG com a finalidade de montar um modelo mais próxima da realidade possível), e pela primeira vez na literatura mostramos [44] que um modelo com um único conjunto de parâmetros é capaz de simular diversos aspectos do ciclo de vida social da ameba *Dictyostelium discoideum*. Isto se deve essencialmente à técnica numérica usada para a descrição do campo, pois permitiu re-

presentar pela primeira vez os detalhes de sinalização, tanto em escalas muito pequenas, quanto macroscópicas.

Para resolvermos numericamente o sistema de equações referentes a dinâmica de AMPc, em vez de usar métodos usuais de integração para a equação da difusão, recorremos a uma solução analítica que utiliza Funções de Green. Tal método muda a dependência do tempo de resolução do problema. Este tempo que em métodos usuais depende do tamanho, da discretização ou número de dimensões do sistema, passa a depender somente o número de amebas no mesmo. Dessa forma, o campo químico é calculado apenas nos pontos em que se esteja interessado. A resolução através de tal método também possibilitou a adaptação dos algoritmos para a técnica de programação em paralelo que nos permitiu realizar simulações ainda maiores sem que isso impactasse de maneira expressiva no tempo de resolução numérica.

Num primeiro momento decidimos estudar a fundo a sinalização do AMPc da ameba em duas dimensões, e assim como Nagano, utilizamos os parâmetros originais de MG, com a exceção do parâmetro h , aqui tomado como livre. Escolhemos sistemas bidimensionais para essas simulações pois, pois elas se referem justamente ao estágio anterior à agregação e que representa o estágio para o qual o modelo foi proposto, i.e., quando as amebas ainda estão distribuídas no solo em uma configuração bidimensional e estabelecendo a comunicação via AMPc pelo ambiente. Diversos conjuntos de simulações foram realizados, onde as amebas eram distribuídas espacientemente em grades igualmente espaçadas e permaneciam em posições fixas. Através de tais simulações verificamos no nosso modelo a sincronização dos pulsos químicos para amebas suficientemente próximas (Fig. 3.3) e também que a medida que aumentamos a densidade das amebas, aumentamos também a frequência dos pulsos.

Medimos a velocidade de propagação do sinal químico detectamos uma lei de potência descrevendo a relação da velocidade com a distância entre as amebas, onde o expoente de tal relação é aproximadamente $-0,541$ (Fig. 3.5), valor consistente com processos difusivos. Os valores medidos para a velocidade do sinal químico ficaram no intervalo $[0,2 ; 1,63]$ mm/min, que estão na mesma ordem de grandeza com experimentos [8]. Ao realizarmos essas medidas três regimes distintos de propagação de onda foram encontrados, dependendo do espaçamento

entre as amebas: para espaçamentos menores que $27\sigma = 0,27$ mm temos pulsos espontâneos e sincronização do sistemas em ondas circulares iniciadas no centro do sistema (*target waves*); espaçamentos no intervalo entre 28 e 32σ significam que o sistema apenas propaga pulsos impostos como condições iniciais ou perturbações; nos casos em que as amebas estão espaçadas mais que 33σ entre si o sistema se torna tão esparsa que não consegue propagar nem os pulsos impostos a ele, o que o leva a um estado quiescente permanente.

Para estudar a relação entre a amplitude de pulsos e o número de onda dos mesmos, realizamos simulações onde podemos verificar um decaimento da amplitude à medida que o número de onda cresce (Fig. 3.7). Tal comportamento é similar ao encontrado no exemplo prototípico da equação complexa de Ginzburg-Landau [51] e apesar de uma comparação mais quantitativa não ser possível, sabemos qualitativamente tratar-se de um problema de bifurcações de Andronov-Hopf em meios difusivos [52].

O nosso modelo também reproduziu naturalmente os padrões de reação-difusão (Figs. 3.8 e 3.9) vistos em experimentos [53]. As simulações mostraram que o padrão final a ser atingido pelas amebas depende diretamente da densidade das amebas no sistema. Para simulações onde o espaçamento entre as amebas era de igual ou menor que 12σ , invariavelmente o sistema evoluía para uma onda circular e sendo assim, qualquer outra configuração será apenas transitória. Para espaçamentos de 13σ ou maiores, o sistema pode manter indefinidamente configurações como espiriais ou padrões mais complexos de reação-difusão, mas ainda assim existe a possibilidade do mesmo evoluir para a onda circular. As dimensões do sistema (quantidade de amebas) influem diferentemente nesses dois regimes. No caso da sincronização em onda circular, quanto maior o sistema, mais tempo será necessário até que o mesmo se estabilize. No caso de comportamentos mais complexos, as dimensões do sistema vão influenciar a probabilidade de termos comportamentos mais complexos, i.e., quanto maior o sistema, mais provável de obtermos os padrões do tipo reação-difusão.

A densidade de amebas utilizadas nessas simulações é muito baixa quando comparadas a dados experimentais como os de Alcantar[53], esse estudo também relata uma distância intercelular máxima de 5σ em um agregado e que a sinalização entre as amebas ocorre geralmente

dentro de uma distância de 6σ . Como o modelo de MG foi desenvolvido a mais de 20 anos, os dados experimentais utilizados para os parâmetros são ainda mais velhos. Dessa maneira adotamos um procedimento similar a outros estudos [17, 18, 19] onde o parâmetro K_e , responsável pela degradação do AMPc tem variações que vão desde $k_e = 9 \text{ min}^{-1}$ até $k_e = 120 \text{ min}^{-1}$, e o alteramos.

Ao decidir alterar esse parâmetro devemos salientar que uma vez tendo definido um parâmetro livre h , deveríamos atualizá-lo juntamente com a nova taxa de degradação. Como o tempo de resolução numérica do nosso sistema depende em grande parte histórico a ser mantido pelo método de resolução adotado, e esse depende diretamente da degradação de AMPc, demos preferência a valores maiores de K_e quando fizemos uma varredura do espaço de parâmetros $K_e \times h$. Dessa maneira procuramos pelo conjunto de parâmetros tal que conseguíssemos reproduzir com espaçamentos de 5σ o que antes só acontecia com espaçamentos maiores que 12σ . Uma vez feita tal varredura chegamos a novos valores para a dupla de parâmetros tal que as simulações agora apresentam as mesmas dimensões das visualizadas nos experimentos, como pode ser visualizado na Fig. 3.10.

Após estudar a sinalização química implementamos o movimento nas amebas utilizando um modelo de animóides [3, 5, 28] adaptando-o para as necessidades atuais: removemos o alinhamento do ângulo de movimento entre os vizinhos; incluímos quimiotaxia na direção das fontes de AMPc, cuja eficiência depende da concentração local de AMPc e é modelada através dos dados experimentais obtidos em [6]; num primeiro momento apenas adaptamos o modelo de interação entre as amebas visto em [5] para as dimensões características da ameba. Tal modelo inicial (modelo descontínuo de caroço-duro grande (*MDCG*)) reproduziu com sucesso o processo de agregação, mostrando sinais de caminhos preferenciais de deslocamento (*streaming*) nas simulações de baixa densidade (Fig. 5.2b). Podemos ver na Fig. 5.2c que a mesma simulação gerou múltiplos agregados com um número relativamente pequeno de amebas em cada. Tal fato se deve à natureza das equações de MG e à densidade dez vezes menor do que a encontrada em experimentos [58]. Como visto nos experimentos de sincronização, uma vez que as amebas se aproximam, a amplitude da órbita do espaço de fase diminui, suprimindo as

oscilações por quase todo o sistema, o que gera uma produção ínfima, mas contínua de AMPc. Sem os pulsos, as amebas se movimentam na direção das regiões de maior concentração local de AMPc. Isso acontece pois as amebas de agregados distantes também estão em um estado não pulsante e, portanto, tornam-se apenas perturbações no cálculo do gradiente na direção das fontes de emissão. Para simulações com densidades experimentais, a distância média entre as amebas é pequena o suficiente para que apenas um agregado se forme, como visto na Fig. 5.3.

Nas simulações em baixa densidade, apesar de termos diversos agregados, alguns continuam se movimentando em direção aos vizinhos. Como não implementamos uma camada glicoproteica nos agregados, a difusão do AMPc é inevitável e com isso o AMPc oriundo desses vizinhos, mesmo atuando apenas como uma perturbação, eventualmente faz com que tais agregados se fundam em um único. Ao analisar o movimento das amebas por longos períodos de tempos verificamos a existência de um comportamento circular o qual definimos como uma deriva rotacional pois, ao analisar em curtos períodos vemos que o movimento das amebas ainda é preferencialmente aleatório, mas com uma tendência circular em grandes intervalos de tempo.

Após a publicação de tais resultados [44] resolvemos aprimorar o *MDCG* para melhor descrever o comportamento das amebas e eliminar algumas peculiaridades do mesmo. Por exemplo, as amebas manterem-se comprimidas devido à quimiotaxia, ou ainda, mesmo para parâmetros nos regimes adequados, a partir de um determinado número de amebas no agregado, as centrais acabavam por entrar no regime de discos sob compressão. Isso acontece porque a força de interação não foi elaborada considerando-se sistemas sob pressão. Portanto adaptamos a força de interação alterando a região de repulsão linear para uma inversamente proporcional a distância do tipo $1/(r - r_c)$ de maneira que ela fosse suavemente até infinito, evitando assim, que as interações entre as amebas se tornassem uma soma de infinitos, nomeamos tal modelo de *modelo contínuo de caroço-duro grande (MCCG)*. Tal resultado foi capaz de simular agregados com grandes quantidades de partículas como visto na Fig. 5.5, sem perder os comportamentos prévios de formação de caminhos, de deslocamento preferenciais e de movimento rotacional. Entretanto a nova força de interação é tão estável que acaba cristalizando as amebas em uma rede hexagonal enquanto que, em agregados ou lesmas reais, o movimento das amebas se asse-

melha mais a um fluido.

Como proposta final para a interação entre as amebas, adaptamos o *MDCG* de maneira que as amebas fossem elásticas a ponto de não ficarem presas na região de caroço-duro. Para tal, diminuimos a região de repulsão linear de $0,75$ para $0,1\sigma$ para que o aumento da região de repulsão linear desse mais elasticidade as amebas e diminuísse a probabilidade das mesmas ficarem presas na situação de discos em compressão, dessa maneira nomeamos tal modelo como *modelo descontínuo de caroço-duro pequeno (MDCP)*. Concomitantemente com tal alteração no modelo de interação entre as amebas, atualizamos os parâmetros K_e responsável pela degradação do AMPc e do parâmetro h , aqui tomado como livre, e também atualizados os algoritmos do nosso programa para implementar programação em paralelo com o auxílio do Centro Nacional de Super Computação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CESUP-UFRGS). A paralelização do algoritmo nos permitiu atualizar o cálculo da quimiotaxia, que em vez do antigo modelo considerando a direção das fontes de AMPc, agora calcula a concentração em quatro pontos distintos em torno da ameba para então determinar a região de maior concentração de sinal químico. O resultado desse modelo pode ser visto na Fig. 5.6 e no material suplementar #4 onde podemos confirmar que o movimento das amebas se assemelha mais aos relatos experimentais. Nas simulações utilizando o *MDCP* não temos mais evidências de caminhos preferenciais de deslocamento, isso se deve ao fato dos novos fatores de degradação e transporte de AMPc em conjunto com a nova quimiotaxia implementada.

Nesse trabalho também fizemos simulações em três dimensões para os três diferentes modelos de interação entre as amebas. O método utilizado para resolução da difusão do AMPc se mostrou novamente eficiente, pois virtualmente não há impacto no tempo de resolução ao adicionarmos uma dimensão às simulações. Em três dimensões as amebas foram tratadas como esferas em vez de círculos ao considerarmos as interações químicas e físicas entre as mesmas. O ruído em tais simulações também foi alterado para representar uma distribuição uniforme em três dimensões. Para evitar que as amebas se deslocassem livremente pelas três dimensões como se estivessem nadando em algum fluido, impusemos uma quantidade fixa de movimento na direção a região negativa do eixo Z , simulando assim uma tendência de adesão ao solo. Da

mesma maneira implementamos uma barreira do tipo caroço-duro no plano $Z = 0$ para conter as amebas na região positiva do eixo em questão. Tal proposta apesar de simples foi capaz de reproduzir com sucesso o formato dos agregados formados no final da agregação (Fig. 5.7). Tivemos um sucesso similar ao caso bidimensional na formação de caminhos preferenciais de movimento, sendo que para o *MCCG* obtivemos o mesmo movimento rotacional de deriva, mas agora em três dimensões. O *MDCP* apresentado também mostrou um movimento mais líquido das amebas como aquele visto nos experimentos. Mas, como foi mencionado para o caso bidimensional, as alterações no cálculo da quimiotaxia em conjunto com os novos parâmetros de degradação e o parâmetro livre dificultaram a sinalização entre agregados, de maneira que não detectamos a formação dos caminhos preferenciais de deslocamento e um maior número de agregados foi gerado.

Analisando o movimento rotacional obtido tanto em duas como três dimensões e relatos na literatura sobre agentes móveis [59, 60, 61], decidimos voltar a um modelo de animóides para tentar reproduzir tal comportamento mas com uma maior intensidade. Sendo um modelo de animóides puro, num primeiro momento não implementamos nenhum tipo de quimiotaxia mas voltamos a usar o alinhamento das velocidades com os vizinhos. Como a origem do movimento rotacional está justamente no confinamento dos animóides, decidimos tentar reproduzir os movimentos helicoidais apresentados pelas amebas na região anterior da lesma durante a fase de migração [63]. Portanto implementamos uma barreira com repulsão tipo caroço-duro na forma de um cilindro disposto ao longo do eixo X , e uma vez que temos o cilindro para conter os animóides, não necessitamos mais a tendência de adesão ao solo. Simulamos casos para diferentes valores dos parâmetros relacionados ao alinhamento de velocidades, força de interação e compressão do cilindro. Ao verificarmos o momento angular do sistema vimos que, para a região de parâmetros anterior ao movimento coletivo, a maior contribuição ao momento angular se deu pelas componentes y e z do mesmo, significando que os animóides tem uma tendência maior a andar ao longo do eixo do cilindro do que apresentar o movimento rotacional. Quando variamos o parâmetro de alinhamento de velocidades, de maneira que o sistema entrasse no regime de movimento coletivo, obtivemos em parte o resultado desejado.

O movimento coletivo dos animóides, quando confinados, somado à tendência de se deslocarem pelo eixo do cilindro, resulta em colisões do conjunto com as extremidades do cilindro. Visualizando o material suplementar #9 podemos observar que, ao colidir com as extremidades, os animóides apresentam um movimento rotacional enquanto são comprimidos pelos demais. Após a colisão, a tendência a rotar diminui. Ao compararmos com a simulação referente a Fig. 5.10, que também apresentou movimento rotacional em três dimensões, podemos comparar a pressão sofrida pelas amebas ao colidirem nas extremidades do sistema com a tendência de adesão ao solo. Se considerarmos que durante a migração as amebas dentro da lesma estão envoltas por uma camada glico-proteica, camada essa que é criada a medida que a lesma se desloca, é intuitivo depreender que as amebas na região anterior da lesma estarão sujeitas a uma compressão adicional. Assim sendo, introduzimos uma contribuição constante ao movimento, com direção e sentido definidos ao longo do eixo do cilindro, com intuito forçar o movimento circular contínuo.

Com essa última adaptação reproduzimos com sucesso o movimento rotacional, como pode ser visto nas Figs. 6.8 6.9 e 6.10 e nos materiais suplementares #10 e #11. Ambos materiais suplementares mostram que, apesar de termos movimento rotacional (intermitente e total respectivamente), as simulações também apresentam um movimento oscilatório das amebas ao longo do eixo. Tal oscilação se deve ao fato delas estarem sendo repelidas pela barreira e estarem influenciando o sentido de movimento dos vizinhos, de forma que, ocasionalmente, temos uma inversão momentânea da direção de movimento. Medimos também o módulo do valor médio da componente x do momento angular das simulações assim como o cumulante Binder para diferentes valores do parâmetro responsável pelo alinhamento das velocidades.

O cumulante de Binder evidencia justamente a transição da distribuição de valores na componente L_x de uma gaussiana centrada na origem, passando por uma mistura de gaussianas e finalizando quando os animóides se estabilizam no movimento rotacional. Quando isto ocorre, teremos novamente uma gaussiana, mas agora deslocada da origem, como visto na Fig. 6.10. A análise também mostra que temos coexistência de estados, o que é indicado por mínimos na curva.

Na literatura especializada [17, 65, 63], a versão mais popular como origem do movimento circular das amebas dentro da lesma é de que as amebas estão seguindo ondas helicoidais de concentração de AMPc, mas com o atual modelo mostramos uma proposta alternativa, que é, além de viável, muito mais simples: o movimento circular é devido as propriedades de um sistema de agentes móveis sob compressão. Uma vez que tal movimento pode ser originado pelas características de contenção da lesma em agentes auto propelentes, pode-se supor também, que mesmo que exista um sinal químico helicoidal, o mesmo possa se originar por causa do movimento das amebas, e não ao contrário, ou até mesmo um comportamento de cooperação entre ambos.

7.2 Perspectivas

Como vimos no Cap. 5 a interação entre amebas utilizando o *MDCP* representa com mais fidelidade o comportamento das amebas, entretanto o novo cálculo da quimiotaxia não é tão eficaz para reproduzir os caminhos preferenciais de deslocamento. Um estudo mais detalhado sobre o impacto do espaço de parâmetros $K_e \times h$ (degradação química do AMPc e taxa de transporte do sinal intracelular para o meio respectivamente), se faz necessário para determinar se um novo conjunto de valores poderia amenizar o comportamento e ao mesmo tempo manter as atuais escalas de interação, ou então, um novo método para a quimiotaxia que não seja artificial como o primeiro, mas que apresente melhores resultados que o atual.

Uma vez tendo descoberto um catalisador do movimento rotacional no atual modelo de animóides, o próximo passo lógico seria implementar as mesmas restrições apresentadas no capítulo 6 no modelo contendo sinalização química. Entretanto, a complexidade adicional da dinâmica de AMPc e quimiotaxia dificultou comparações simples entre ambos os casos. Ao reintroduzirmos a sinalização, as amebas tem a tendência de se agregar, e devido a alta elasticidade no *MDCP* atual de interação entre as partículas, mesmo inseridas em uma barreira cilíndrica ficamos com um agregado pseudo-esférico. Para evitar tal comportamento poderíamos alongar o comprimento do cilindro de maneira dificultar o arredondamento do agre-

gado. Tal solução gera um outro problema, pois como vimos a tendência dos animóides é de justamente se locomover na região de maior extensão, dessa maneira o alongamento do cilindro piora ainda mais esse comportamento. Razões menores de volume do cilindro não resolvem completamente o problema, uma vez que ao diminuir demais, o raio do cilindro se torna tão pequeno que o alinhamento de velocidades dificulta o movimento coletivo

Outro fator importante também é de como justificar a tendência das amebas se locomovendo em um sentido do eixo do cilindro. Dados experimentais mostram que temos uma maior concentração de AMPc na parte anterior da lesma, e poderíamos ser levados a pensar que ao introduzir uma quebra na simetria de produção de AMPc poderia nos levar ao mesmo comportamento. Entretanto, simulações preliminares mostraram que as opções mais simples de tal quebra de simetria não eram suficientes para estabelecer a compressão na extremidade do cilindro como no caso de animóides. Vale notar também que existem relatos de que uma vez finalizada a agregação, temos a ativação de diferentes mecanismos para a produção de AMPc [66], e apesar de sabermos que ainda temos gradientes de AMPc e que as amebas reagem a quimiotaxia, os detalhes de tais comportamentos dentro da lesmas ainda são em sua grande parte desconhecidos. Deixamos então como uma possível futura extensão do modelo tal comparação entre o modelo de animóides puro e aquele com sinalização química.

Apesar de termos encontrado uma transição para movimento rotacional no modelo de animóides, ainda temos uma oscilação indesejada na direção do eixo do cilindro. Um futuro modelo deve contemplar alterações na barreira cilíndrica para evitar tal comportamento. Uma possível solução seria transferir momento dos animóides para a barreira, de maneira que seja possível para o cilindro ser deslocado pela pressão contínua dos mesmos. Sem uma real repulsão dos animóides ao colidirem na extremidade do cilindro, podemos evitar a mudança no sentido de movimento e sua eventual propagação pelo agregado. Tal alteração além de ter a possibilidade de remover um comportamento indesejado das simulações, representa de maneira ainda mais realista os experimentos. Ainda em relação ao movimento circular, diferentes formatos de barreiras podem ser testadas para analisar a dependência do movimento circular com a simetria do confinamento.

Bibliografia

- [1] NAGANO, S. Diffusion-assisted aggregation and synchronization in dictyostelium discoideum. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 80, n. 21, p. 4826–4829, May 1998.
- [2] REYNOLDS, C. W. *Regras de interação para animóides*.
- [3] VICSEK et al. Novel type of phase transition in a system of self-driven particles. *Phys Rev Lett*, v. 75, n. 6, p. 1226–1229, Aug 1995.
- [4] GRÉGOIRE, G.; CHATÉ, H.; TU, Y. Moving and staying together without a leader. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, v. 181, n. 3-4, p. 157–170, jul. 2003. ISSN 0167-2789.
- [5] BELMONTE, J. M. et al. Self-propelled particle model for cell-sorting phenomena. *Physical Review Letters*, v. 100, n. 24, 2008.
- [6] FISHER, P. R.; MERKL, R.; GERISCH, G. Quantitative analysis of cell motility and chemotaxis in dictyostelium discoideum by using an image processing system and a novel chemotaxis chamber providing stationary chemical gradients. *J Cell Biol*, v. 108, n. 3, p. 973–984, Mar 1989.
- [7] RAPER, K. Pseudoplasmodium formation and organization in dictyostelium discoideum. *J Elisha Mitchell Sci Soc*, v. 56, p. 241–282, 1940.
- [8] SIEGERT, F.; WEIJER, C. Digital image processing of optical density wave propagation in dictyostelium discoideum and analysis of the effects of caffeine and ammonia. *J Cell Sci*, v. 93, n. 2, p. 325–335, 1989.
- [9] FOERSTER, P.; MULLER, S.; HESS, B. Curvature and spiral geometry in aggregation patterns of dictyostelium discoideum. *Development*, v. 109, n. 1, p. 11–16, 1990.
- [10] BELOUSOV, B. P. *A periodic reaction and its mechanism, in Collection of short papers on radiation medicine for 1958*. Moscow, 1959.
- [11] ZAIKIN, A. N.; ZHABOTINSKY, A. M. Concentration wave propagation in 2-dimensional liquid-phase self-oscillating system. *Nature*, Macmillan Magazines Ltd, v. 225, n. 5232, p. 535–&, 1970.
- [12] JANG, W.; GOMER, R. H. Combining experiments and modelling to understand size regulation in dictyostelium discoideum. *J R Soc Interface*, v. 5 Suppl 1, p. S49–S58, Aug 2008.
- [13] MARTIEL, J.-L.; GOLDBETER, A. A model based on receptor desensitization for cyclic amp signaling in dictyostelium cells. *Biophysical Journal*, v. 52, p. 807–828, November 1987.

- [14] TYSON, J. J.; MURRAY, J. D. Cyclic amp waves during aggregation of dictyostelium amoebae. *Development*, v. 106, n. 3, p. 421–426, Jul 1989.
- [15] TYSON, J. J. et al. Spiral waves of cyclic amp in a model of slime mold aggregation. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, v. 34, n. 1-2, p. 193–207, 1989.
- [16] HÖFER, T.; SHERRATT, J. A.; MAINI, P. K. Dictyostelium discoideum: cellular self-organization in an excitable biological medium. *Proc Biol Sci*, v. 259, n. 1356, p. 249–257, Mar 1995.
- [17] BRETSCHEIDER, T.; SIEGERT, F.; WEIJER, C. J. Three-dimensional scroll waves of camp could direct cell movement and gene expression in dictyostelium slugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 10, p. 4387–4391, May 1995.
- [18] BRETSCHEIDER; VASIEV; WEIJER. A model for cell movement during dictyostelium mound formation. *J Theor Biol*, v. 189, n. 1, p. 41–51, Nov 1997.
- [19] BRETSCHEIDER; VASIEV; WEIJER. A model for dictyostelium slug movement. *J Theor Biol*, v. 199, n. 2, p. 125–136, Jul 1999.
- [20] LEVINE; REYNOLDS. Streaming instability of aggregating slime mold amoebae. *Phys Rev Lett*, v. 66, n. 18, p. 2400–2403, May 1991.
- [21] KESSLER; LEVINE. Pattern formation in dictyostelium via the dynamics of cooperative biological entities. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, v. 48, n. 6, p. 4801–4804, Dec 1993.
- [22] VASIEVA, O. O. et al. A model of dictyostelium-discoideum aggregation. *Journal Of Theoretical Biology*, v. 171, n. 4, p. 361–367, dec 1994.
- [23] VASIEV; HOGEWEG; PANFILOV. Simulation of dictyostelium discoideum aggregation via reaction-diffusion model. *Phys Rev Lett*, v. 73, n. 23, p. 3173–3176, Dec 1994.
- [24] SAVILL, N. J.; HOGEWEG, P. Modelling morphogenesis: From single cells to crawling slugs. *Journal of Theoretical Biology*, v. 184, n. 3, p. 229–235, feb 1997.
- [25] MARÉE, A. F. M.; PANFILOV; HOGEWEG. Migration and thermotaxis of dictyostelium discoideum slugs, a model study. *J Theor Biol*, v. 199, n. 3, p. 297–309, Aug 1999.
- [26] MARÉE, A. F.; HOGEWEG, P. How amoeboids self-organize into a fruiting body: multicellular coordination in dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 7, p. 3879–3883, Mar 2001.
- [27] MARÉE, A. F. M.; HOGEWEGMIGRATION, P.; SLUGS, a. M. S. Thermotaxis of Dictyostelium discoideum. Modelling dictyostelium discoideum morphogenesis: the culmination. *Bull Math Biol*, v. 64, n. 2, p. 327–353, Mar 2002.
- [28] GRÉGOIRE, G.; CHATÉ, H. Onset of collective and cohesive motion. *Phys Rev Lett*, v. 92, n. 2, Jan 2004.
- [29] SHAFFER, B. M. The acrasina. *Advances in Morphogenesis*, v. 2, p. 109–182, 1962.

- [30] GOLDBETER, A. Oscillations and waves of cyclic amp in dictyostelium : A prototype for spatio-temporal organization and pulsatile intercellular communication. *Bulletin of Mathematical Biology*, v. 68, n. 5, p. 1095–1109, jul. 2006.
- [31] GOLDBETER, A. Mechanism for oscillatory synthesis of cyclic amp in dictyostelium discoideum. *Nature*, v. 253, n. 5492, p. 540–542, Feb 1975.
- [32] GOLDBETER, A.; SEGEL, L. A. Unified mechanism for relay and oscillation of cyclic amp in dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 74, n. 4, p. 1543–1547, Apr 1977.
- [33] GOLDBETER, A.; SEGEL, L. A. Control of developmental transitions in the cyclic amp signalling system of dictyostelium discoideum. *Differentiation*, v. 17, n. 3, p. 127–135, 1980.
- [34] KELLER, E. F.; SEGEL, L. A. Initiation of slime mold aggregation viewed as an instability. *Journal of Theoretical Biology*, v. 26, n. 3, p. 399 – 415, 1970.
- [35] ROSSOMANDO, E. F.; SUSSMAN, M. A 5'-adenosine monophosphate-dependent adenylate cyclase and an adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent adenosine triphosphate pyrophosphohydrolase in dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 70, n. 4, p. 1254–1257, Apr 1973.
- [36] GERISCH, G.; HESS, B. Cyclic-amp-controlled oscillations in suspended dictyostelium cells: their relation to morphogenetic cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 71, n. 5, p. 2118–2122, May 1974.
- [37] GERISCH, G.; WICK, U. Intracellular oscillations and release of cyclic amp from dictyostelium cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 65, n. 1, p. 364–370, Jul 1975.
- [38] ROOS, W. et al. Amplification of cyclic-amp signals in aggregating cells of dictyostelium discoideum. *FEBS Lett*, v. 53, n. 2, p. 139–142, May 1975.
- [39] GERISCH, G. et al. Oscillations of cyclic nucleotide concentrations in relation to the excitability of dictyostelium cells. *J Exp Biol*, v. 81, p. 33–47, Aug 1979.
- [40] LOOMIS, W. F. Biochemistry of aggregation in dictyostelium. a review. *Dev Biol*, v. 70, n. 1, p. 1–12, May 1979.
- [41] LAUZERAL, J.; HALLOY, J.; GOLDBETER, A. Desynchronization of cells on the developmental path triggers the formation of spiral waves of camp during dictyostelium aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 17, p. 9153–9158, Aug 1997.
- [42] ROOS, W.; SCHEIDEGGER, C.; GERISH, G. Adenylate cyclase activity oscillations as signals for cell aggregation in dictyostelium discoideum. *Nature*, v. 266, n. 5599, p. 259–261, Mar 1977.
- [43] DEVREOTES, P. N.; SHERRING, J. A. Kinetics and concentration dependence of reversible camp-induced modification of the surface camp receptor in dictyostelium. *J Biol Chem*, v. 260, n. 10, p. 6378–6384, May 1985.

- [44] CALOVI, D. S.; BRUNET, L. G.; ALMEIDA, R. M. C. de. camp diffusion in dictyostelium discoideum: A green's function method. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 82, n. 1, p. 011909, Jul 2010.
- [45] GEBERTH, D.; HUETT, M.-T. Predicting the Distribution of Spiral Waves from Cell Properties in a Developmental-Path Model of Dictyostelium Pattern Formation. *PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY*, 5, n. 7, JUL 2009.
- [46] PÁLSSON, E.; OTHMER, H. G. A model for individual and collective cell movement in dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 19, p. 10448–10453, Sep 2000.
- [47] PÁLSSON, E. A three-dimensional model of cell movement in multicellular systems. *Future Generation Computer Systems*, v. 17, n. 7, p. 835 – 852, 2001. Particle Based Modelling Methods Applied in Biology.
- [48] PÁLSSON, E. A 3-d model used to explore how cell adhesion and stiffness affect cell sorting and movement in multicellular systems. *Journal of Theoretical Biology*, v. 254, n. 1, p. 1 – 13, 2008.
- [49] BUTKOV, E. *Mathematical Physics*. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Company, 1968.
- [50] BRUNET, L.; CHATÉ, H.; MANNEVILLE, P. Long-range order with local chaos in lattices of diffusively coupled ODEs. *Physica D Nonlinear Phenomena*, v. 78, p. 141–154, nov. 1994.
- [51] CROSS, M. C.; HOHENBERG, P. C. Pattern formation outside of equilibrium. *Rev. Mod. Phys.*, American Physical Society, v. 65, n. 3, p. 851, Jul 1993.
- [52] WIKIPEDIA. *Reaction–diffusion system*. 2011. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Reaction-diffusion>>.
- [53] ALCANTRA, F.; MONK, M. Signal propagation during aggregation in the slime mould dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, v. 85, p. 321–334, 1974.
- [54] REYNOLDS, C. W. Flocks, herds and schools: A distributed behavioral model. In: *Proceedings of the 14th annual conference on Computer graphics and interactive techniques*. New York, NY, USA: ACM, 1987. (SIGGRAPH '87), p. 25–34. ISBN 0-89791-227-6. Disponível em: <<http://doi.acm.org/10.1145/37401.37406>>.
- [55] CHATÉ, H. et al. Collective motion of self-propelled particles interacting without cohesion. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 77, n. 4, p. 046113, Apr 2008.
- [56] BAGLIETTO, G.; ALBANO, E. V. Nature of the order-disorder transition in the vicsek model for the collective motion of self-propelled particles. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 80, n. 5, p. 050103, Nov 2009.
- [57] IHLE, T. Kinetic theory of flocking: Derivation of hydrodynamic equations. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 83, n. 3, p. 030901, Mar 2011.

- [58] RIETDORF, J.; SIEGERT, F.; WEIJER, C. J. Analysis of optical density wave propagation and cell movement during mound formation in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, v. 177, n. 2, p. 427–438, ago. 1996.
- [59] SHIMOYAMA, N. et al. Collective motion in a system of motile elements. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 76, n. 20, p. 3870–3873, May 1996.
- [60] SCHWEITZER, F.; EBELING, W.; TILCH, B. Statistical mechanics of canonical-dissipative systems and applications to swarm dynamics. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 64, n. 2, p. 021110, Jul 2001.
- [61] SZABÓ, B. et al. Phase transition in the collective migration of tissue cells: Experiment and model. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 74, n. 6, p. 061908, Dec 2006.
- [62] INOUE, K.; TAKEUCHI, I. Motive force of the migrating pseudoplasmodium of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci*, v. 41, p. 53–64, Feb 1980.
- [63] SIEGERT, F.; WEIJER, C. J. Three-dimensional scroll waves organize *Dictyostelium* slugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, n. 14, p. 6433–6437, Jul 1992.
- [64] BINDER, K. Finite size scaling analysis of Ising model block distribution functions. *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*, v. 43, p. 119–140, 1981.
- [65] STEINBOCK, O. et al. Three-dimensional waves of excitation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 15, p. 7332–7335, Aug 1993.
- [66] FIRTEL, R. A. Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes Dev*, v. 9, n. 12, p. 1427–1444, Jun 1995.