

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE FÍSICA

# Segregação Celular Induzida por Diferença de Motilidade

Carine Priscila Beatrici

Dissertação realizada sob a orientação do professor Leonardo Gregory Brunnet, apresentada ao Instituto de Física da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Porto Alegre, 5 de junho de 2012

Trabalho financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).

# *Agradecimentos*

Eu quero agradecer às pessoas envolvidas diretamente neste trabalho, primeiramente ao meu orientador, agradeço por toda a ajuda necessária ao desenvolvimento desta pesquisa; a minha colega Ana, por todo o auxílio no cuidado com as hidras e as demais pessoas que de alguma forma se envolveram neste trabalho.

Agradeço aos professores, que durante este curso, me ensinaram coisas importantíssimas a minha formação.

Também gostaria de agradecer a minha família pelo apoio dado durante toda a minha formação acadêmica, pelo incentivo ao estudo e principalmente por estarem presentes sempre que eu precisei deles.

# *Resumo*

Partículas auto-propelentes são usadas para simular agregados celulares em um modelo onde as forças de adesão entre as células são homogêneas e apenas as diferenças de motilidade celular são usadas como indutores da segregação. Na formulação do modelo também é incluída a tendência das células orientarem sua velocidade na direção do movimento das células vizinhas. Duas variantes do modelo são exploradas e as condições sob as quais diferenças de motilidade celular podem produzir segregação são mapeadas em um diagrama de parâmetros. Nos casos onde há segregação, ajustam-se formas funcionais para os parâmetros que medem o crescimento dos agregados com intuito de estabelecer comparação com os modelos baseados em adesão diferencial.

# *Abstract*

Self-propelled particles are used to simulated cell aggregates in a model considering homogeneous adhesion forces between cells and using only motility differences as segregation drivers. The tendency of cells to follow their neighbors is also included in the formulation. Two model variants are explored and the conditions on which motility differences may produce segregation are mapped in a parameter diagram. In the cases where segregation happens, the functional form of the parameters measuring cluster growth are determined in order to establish comparison with models based on differential adhesion.

# *Sumário*

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	p. 7
<b>2</b>	<b>Histórico Experimental e Referencial Teórico</b>	p. 11
2.1	Primórdios do Problema Biológico . . . . .	p. 11
2.2	Hipóteses . . . . .	p. 12
2.3	Processos Bioquímicos Celulares . . . . .	p. 13
2.4	Velocidade Diferenciada . . . . .	p. 15
<b>3</b>	<b>Metodologia</b>	p. 18
3.1	O Modelo de Glazier Graner Hogeweg . . . . .	p. 18
3.2	O Modelo de Animóides . . . . .	p. 20
3.2.1	O modelo de Vicsek . . . . .	p. 21
3.2.2	A adaptação de Grégoire . . . . .	p. 23
3.2.3	Animóides e Segregação Celular - Hipótese de Adesão Diferencial . .	p. 25
3.2.4	Adaptação Utilizada neste Trabalho . . . . .	p. 28
3.3	Medidas . . . . .	p. 30
3.4	Simulação Numérica . . . . .	p. 31
3.4.1	Método das Caixas . . . . .	p. 32
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	p. 34
4.1	Resultados na Ausência de Movimento Coordenado . . . . .	p. 34
4.1.1	Arredondamento . . . . .	p. 35
4.1.2	Proporção entre Células de Tecidos Distintos . . . . .	p. 35

4.1.3	Influência do Número Total de Células . . . . .	p. 36
4.1.4	Visualização da Segregação . . . . .	p. 38
4.2	Resultados com Movimento Coordenado . . . . .	p. 39
4.2.1	Caso 1 . . . . .	p. 40
4.2.2	Caso 2 . . . . .	p. 44
4.2.3	Comparação Final ente Casos 1 e 2 . . . . .	p. 49
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	p. 52
	<b>Referências Bibliográficas</b>	p. 56

# 1 *Introdução*

Na evolução dos seres vivos existem algumas transições particularmente importantes, por exemplo, temos a transição entre seres vivos procariontes, seres unicelulares sem núcleo celular, e eucariontes, com núcleo celular. Outra transição notável surgiu mais tarde quando seres eucariontes passaram a se agrupar, estas células então começaram a viver em grupos formando os seres pluricelulares. Estes passos evolutivos ocorreram há milhões de anos, dessa forma para estudar como ocorreu a passagem entre as células vivendo separadas e vivendo unidas precisamos de seres que de alguma forma estejam, ainda hoje, próximos a esse estágio evolutivo. Temos dois seres nesse limiar que são encontrados frequentemente na literatura: *Hydra vulgaris* (hidra) e *Dictyostelium discoideum* [6], ambos se apresentam em lados diferentes desta transição. A *Dictyostelium discoideum* é um amebóide, unicelular que em condições extremas se transforma em um ser pluricelular. Na falta de alimento algumas amebas passam a emitir um sinal químico oscilante que induz um procedimento semelhante nas demais. Uma vez estabelecido um campo químico as amebas passam a se deslocar na direção positiva do gradiente desse campo, o que as leva a um agregado pluricelular, chamado de lesma. Essa união é temporária, quando esta lesma encontra um local adequado, parte das células se espalha e elas voltam a viver como seres unicelulares. As hidras, por sua vez, estão no lado oposto desta transição, são seres pluricelulares que, em condições específicas de laboratório, podem ter suas células separadas umas das outras. Embora não apresentem todas as funções necessárias para a sobrevivência, elas passam a se comportar como seres unicelulares. Novamente esta fase é temporária, pois as células da hidra podem se reorganizar formando novamente uma hidra pluricelular.

As células tem vantagens ao viver em grupos, como por exemplo, podem se locomover mais rápido e a distâncias maiores, podem se proteger de danos, fazer trocas de substâncias, entre outras. Estas vantagens são obtidas apenas por estarem unidas. As células podem ainda ter vantagens adicionais caso se especializem em algumas funções, e.g., algumas células podem interagir com o meio protegendo as demais, enquanto outras digerem alimentos, etc, com isso se tornam eficientes em alguns processos. A diferenciação celular é parte essencial na morfogênese, ocorre na maioria dos seres pluricelulares em fases embrionárias, também pode

ocorrer em alguns tipos de células, conhecidas como células tronco. Na morfogênese as células recebem sinais bioquímicos, que podem vir do ambiente ou das células vizinhas, partindo destes sinais e de sua relação com o material genético a célula pode modificar suas características: número de divisões celulares, o movimento celular, o tamanho, morte celular e propriedades da membrana celular. Modificações nas células produzem diferentes tipos de tecidos, algumas destas modificações alteram propriedades físicas como o tamanho, movimentação e adesão da membrana celular.

A espécie *Hydra vulgaris* ver fig.1.1 faz parte da classe hydrozoa, possui dois tipos de tecidos celulares e grande capacidade regenerativa. As células da hidra são de dois tipos: a endoderme, e a ectoderme. A endoderme, se localiza internamente e é responsável pela digestão, a ectoderme se localiza externamente e é responsável pelas trocas com o ambiente. Existem ainda algumas células neurais espalhadas pelo tronco da hidra e também células com substância urticante nos tentáculos para aprisionar alimento.

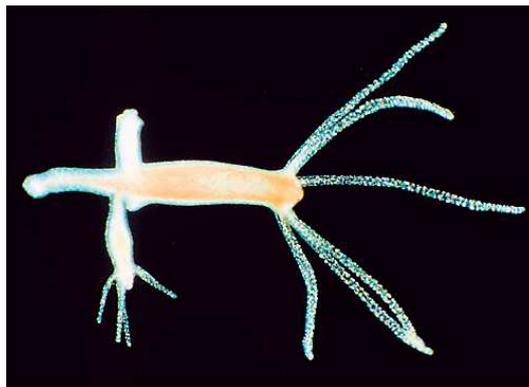


Figura 1.1: Foto de uma *Hydra vulgaris*.

Nosso interesse na hidra deve-se ao seu potencial de regeneração: suas células, quando separadas umas das outras e misturadas aleatoriamente, se reorganizam em um ser completo. A primeira parte desse processo é a da reorganização dos tecidos: as células migram dentro do agregado até as posições corretas e como são apenas dois tecidos a configuração final é um tecido localizado internamente e outro externamente no agregado. Esta etapa da regeneração é chamada de segregação celular (figura 1.2) e é nessa fase que muitos pesquisadores se perguntaram a respeito dos mecanismos existentes para explicar como as células encontram as posições corretas no agregado [1, 2, 3, 4, 5].

Quando separamos células de hidra e as misturamos aleatoriamente, elas já estão diferenciadas em ectoderme e endoderme, não ocorrendo rediferenciação. Elas migram para locais adequados dentro deste agregado por mecanismos predominantemente físicos[7] e, nesse caso,

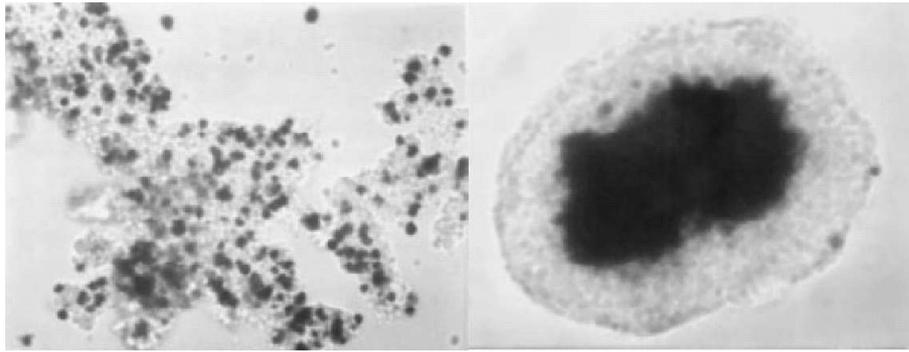


Figura 1.2: Segregação celular, temos a mistura aleatória à esquerda e o estado segregado à direita. Imagem retirada do artigo[5].

as características relevantes para a segregação celular serão descritas por variáveis físicas, como adesão, volume, velocidade de difusão e flutuação da membrana celular.

Com o intuito de explicar os mecanismos físicos responsáveis pela segregação celular, foram desenvolvidas algumas hipóteses, dentre elas destacamos duas: a hipótese da adesão diferenciada(HAD) e a hipótese da velocidade diferenciada(HVD). A adesão diferenciada propõe que a agregação ocorre como em líquidos imiscíveis. A partir dela, espera-se observar nos experimentos, por exemplo, a formação de centros de nucleação ao longo do processo de segregação e uma hierarquia entre tecidos relacionando adesão e envolvimento, o que foi efetivamente verificado [3]. Simulações computacionais usando essa hipótese [8, 9] mostram que a adesão diferenciada leva à separação de tecidos. Por outro lado, a hipótese de velocidade diferenciada é muito pouco explorada, existindo apenas um experimento intencionalmente projetado para testá-la[10]. Embora as hipóteses pareçam semelhantes, elas podem levar a resultados e previsões diferentes. Essencialmente o que está em discussão são dois limites distintos: um com motilidades idênticas para todas as células e adesão diferente para células de diferentes tecidos, e outro, com formulação inversa, adesão idêntica e motilidades diferentes. Deve-se também salientar que os resultados da experiência de Jones e Lee são bastante controversos e nunca foram refeitos experimentalmente ou testados por simulação.

Dentre os processos bioquímicos que ocorrem na célula temos particularmente interesse nos que estão envolvidos na reorganização de tecidos: a adesão celular e flutuações de membrana. A adesão celular é um processo intermediado por proteínas chamadas caderinas, que são moléculas dependentes do cálcio, do nome em inglês: Calcium-dependent adhesion molecules, e permitem a ligação entre células vizinhas. Se as células ligadas possuírem o mesmo tipo de caderina de outra as interações entre elas são ditas homofílicas. As flutuações de membrana resultam diretamente da atividade do citoesqueleto da célula, a actina é uma proteína que quando

polimerizada forma os microfilamentos que compõe o citoesqueleto. Esta proteína está presente em todos os seres eucariontes, a atividade do citoesqueleto depende da interação entre a actina com a cofilina, a cofilina ou ADF despolimeriza as moléculas de actina gerando grandes torções no citoesqueleto que por sua vez gera a flutuação na membrana.

Simplificamos esses processos bioquímicos de forma a poder descrever a célula como um todo composto de volume, forças de adesão e flutuação de membrana. Esta última responsável pela motilidade celular. O volume e a adesão são descritos por uma força adequada, com componentes atrativa e repulsiva, e os movimentos da membrana celular, que manifestam-se aproximadamente como flutuações aleatórias, são modelados por uma temperatura efetiva no sistema. De fato, estamos trabalhando com um sistema composto por células vivas, estas possuem energia interna e a utilizam para se locomover, logo, este é um sistema fora do equilíbrio e pode ter uma temperatura efetiva associada a ele diferente da temperatura ambiente.

Nesse trabalho abordamos o estudo da segregação usando modelos matemáticos que descrevem movimentos de bandos de animais para o estudo do movimento celular. Estes modelos foram adaptados para implementarem as idéias associadas à velocidade diferenciada. Procuramos com isso verificar se a velocidade diferenciada pode levar a separação de tecidos e, em caso positivo, descobrir que tipo de segregação pode ocorrer: células lentas envolvendo as rápidas ou o contrário. Finalmente, procuraremos identificar características que qualifiquem a hipótese de segregação por diferença de velocidades celulares frente a hipótese de adesão diferencial.

A dissertação está dividida em quatro partes. Na primeira parte temos o histórico do problema da segregação celular, a descrição das principais hipóteses formuladas para explicá-la e também detalhamos a hipótese da velocidade diferenciada. Finalmente apresentamos uma relação entre os processos bioquímicos celulares e as grandezas físicas utilizadas na simulação. Na segunda parte descrevemos dois modelos matemáticos utilizados para descrever movimento celular; os comparamos buscando vantagens e desvantagens para então adotar aquele mais diretamente ajustável à hipótese da velocidade diferenciada. Também descrevemos as adaptações feitas neste trabalho, juntamente com as medidas utilizadas.

Na terceira parte apresentamos os resultados das simulações do modelo numérico através de medidas de segregação celular e de um diagrama de parâmetros. Com esse diagrama queremos distinguir os valores onde há segregação celular dentro da hipótese da velocidades diferenciada. Na última parte temos as conclusões desse trabalho e algumas perspectivas para a continuidade.

## ***2 Histórico Experimental e Referencial Teórico***

### **2.1 Primórdios do Problema Biológico**

A regeneração é estudada há muito tempo, desde a antiguidade tentamos obter métodos eficientes para curar diversas avarias no corpo, porém o estudo de segregação celular tem seu início aceito em 1740, quando Trembley[11] cortou uma hidra ao meio e observou que algumas horas depois havia duas hidras regeneradas à partir dos pedaços da original, apesar de ser uma experiência de regeneração sem segregação celular, esta foi a precursora na obtenção da segregação propriamente dita. O próximo passo importante nesta área foi dado somente em 1886 quando Shiefferdecker[1] conseguiu separar dois tecidos celulares vivos, colocando-os em um extrato pancreático. E finalmente, em 1907, o pesquisador Wilson[12] fez uma das primeiras experiências de segregação, ele misturou células de diferentes tecidos de uma esponja e depois de algum tempo ela se regenerou. Contudo não era possível, no experimento de Wilson, diferenciar as células dos tecidos dentro do agregado celular pois ambos os tecidos tinham mesma coloração, então não foi determinado que mecanismo, físico, químico ou biológico, era responsável pela reorganização celular.

Do experimento de Wilson surgiram duas principais hipóteses para explicar a segregação celular:

- **Transformação Citológica:** a célula recebe informação do ambiente ou das células ao redor e se necessário se transformam no tipo de tecido que deveria estar no local considerado, como ocorre nas células tronco ao serem inseridas em um dado tecido.
- **Difusão:** as células, de algum modo, trocam de posição entre si dentro do agregado até atingir posições corretas, de forma a separar os dois tecidos.

Essa questão foi resolvida por Holtfreter[7], em 1944, que repetiu o experimento de Wilson, mas desta vez em células de anfíbios, estas células são pigmentadas de forma diferente por

tecido, ele pode observar o movimento dos diferentes tecidos e mostrou que a difusão é o mecanismo responsável pela segregação celular. Este experimento resolveu o problema em parte, mostra que o mecanismo não é transformação citológica mas não explica que mecanismo, físico ou químico, na difusão celular poderia separar dois ou mais tecidos distintos.

## 2.2 Hipóteses

O experimento de Holtfreter comprovou que a difusão é o agente separador de tecidos, mas não explicou qual ou quais mecanismos são responsáveis pela organização dos tecidos. Surgiram então hipóteses para explicar este problema, sendo as principais:

- Quimiotaxia[13] : Sugerida por Turing em 1952 essa hipótese defende que as células dos diferentes tecidos se reorganizam de acordo com sinais químicos emitidos do ambiente em torno das células ou por elas próprias;
- Adesão Diferenciada[3]: Proposta por Steinberg em 1962, segundo ela os diferentes tecidos possuem graus diferentes de adesão entre si devido a alguma substância em suas membranas, as células mais adesivas formam um agregado central com as células do tecido menos adesivo em torno[9];
- Adesão Temporal: proposta por Curtis em 1961, esta teoria defende que os padrões de reorganização se devem aos diferentes tempos que as células de tecidos diferentes levam para se aderirem. As células que se aderem mais rapidamente formam um agregado central enquanto as que levam mais tempo ficam na superfície desta.
- Contração Superficial: sugerida por Harris, essa teoria afirma que quanto menos contrativa é uma célula em relação à sua superfície exposta, mais internamente ela deve se posicionar dentro do agregado;
- Velocidade Diferenciada[10]: esta hipótese foi proposta para explicar o experimento de Jones, Evans e Lee, publicada em 1989, onde atribuiu à reorganização celular à diferença das velocidades de difusão das células dos diferentes tecidos.

É importante ressaltar que todas essas hipóteses não se excluem mutuamente, então mesmo comprovando que algum destes mecanismos tem participação no processo de separação de tecidos não podemos descartar os demais. Temos que considerar que todos os mecanismos propostos também podem estar presentes em diferentes seres vivos, pois em espécies de animais

diferentes as células podem ter características muito distintas levando à segregação celular por outros processos físicos. O mais provável é que as hipóteses, acima descritas, tenham cada uma sua participação na segregação celular, com proporções diferentes também dependendo dos tecidos envolvidos na segregação.

## 2.3 Processos Bioquímicos Celulares

Para modelar adequadamente a dinâmica de segregação, precisamos entender as características celulares relacionadas à adesão celular e à motilidade. Ou seja, estamos interessados nas propriedades das membranas celulares pois estas são responsáveis pelas interações das células com o ambiente e com as células vizinhas, e também precisamos conhecer o sistema de locomoção celular, em específico para as células de hidra. Nossa revisão nesse tema está fundamentada na referência [15].

A membrana celular, ver fig.2.1 é composta basicamente de duas camadas fosfolípídicas, cada camada possui uma extremidade apolar, que é hidrofóbica e a outra polar, que é hidrófila, esta extremidade limita ambos os lados da membrana. Todas as demais estruturas da membrana celular se encontram inseridas nestas camadas, estas possuem funções variadas, podendo controlar o transporte seletivo de substâncias, alimentação, excreção, controle osmótico, também fazem o controle eletrostático da célula, mas estamos interessados em apenas duas funções da membrana celular: a adesão entre células e as flutuações de membrana.

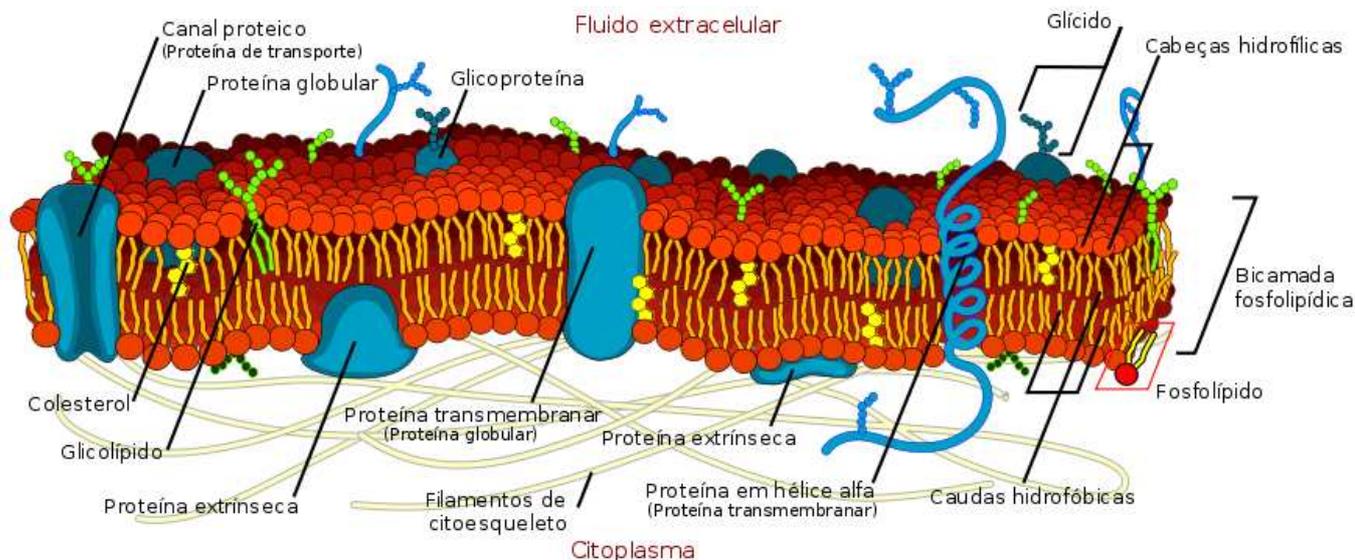


Figura 2.1: Esquema de uma membrana celular animal. Retirada do site [http://pt.wikipedia.org/wiki/Membrana\\_plasmática](http://pt.wikipedia.org/wiki/Membrana_plasmática), na data: 09/06/2010

Dentre as diversas substâncias que compõe a membrana celular temos interesse naquelas que geram a adesão celular, estas moléculas são, em geral, chamadas de CAMs, Moléculas de Adesão Celular. Para que duas células possam se aderir é necessário que suas moléculas de caderina tenham o mesmo tipo, estas são glicoproteínas que contém aproximadamente 700 aminoácidos e são as principais moléculas de adesão celular. As caderinas se ligam a algumas proteínas do citoesqueleto através de moléculas de catenina (parte intracelular) atravessam a membrana celular e podem se ligar a outras caderinas ou a membrana de outra célula (parte extracelular). Nesta região, elas são compostas por grupos de 100 aminoácidos, estes grupos são dependentes do cálcio ( $Ca^{++}$ ) pois o íon cálcio mantém as ligações entre eles. Sem o cálcio a caderina se degrada rapidamente.

Estamos interessados nas interações entre as caderinas que levam à adesão celular, para associar variáveis físicas às interações celulares. Vamos simular a adesão celular através de uma força atrativa entre as células, esta força atrativa deve ser de curto alcance pois as caderinas possuem extensão limitada, logo células mais afastadas não interagem. A interação entre as células também depende do volume da célula, pois estas aderem-se através das caderinas e se atraem, mas mantêm seu volume praticamente constante, devido ao citoplasma da célula que é gelatinoso. As células no entanto podem mudar de forma, pois a membrana é flexível e permite tais alterações. Para simular esse comportamento celular utilizamos uma força repulsiva que determina o volume mínimo da célula e desse volume definimos o alcance das caderinas, ou da força atrativa.

A movimentação celular também precisa ser entendida, para isto primeiro analisamos o interior celular, no citoplasma encontramos o citoesqueleto, este além de manter a forma celular é responsável pelo transporte intracelular de substâncias, e pelo movimento celular. Ele é composto de proteínas tubulares, responsáveis pela sustentação; por filamentos de actina, responsáveis pela movimentação celular; por proteínas motoras, estas transportam substâncias dentro da célula. A actina é a proteína do citoesqueleto responsável pelo movimento celular em células sem cílios ou flagelos, pois quando esta proteína reage com outra proteína, a cofilina, despolimeriza os microfilamentos do citoesqueleto que se torcem gerando flutuações na membrana celular e deslocam a célula. Na ausência de cofilina, o citoesqueleto se repolimeriza. O movimento celular depende então de dois fatores da posição dos microtúbulos dentro da célula e da concentração de cofilina na célula, esta distribui-se de forma não homogênea dentro da célula. Dada a complexidade dessa distribuição e a independência com relação às células vizinhas, descrevemos essas flutuações de membrana através de variáveis aleatórias.

## 2.4 Velocidade Diferenciada

O ponto central deste trabalho é compreender como podem dois tecidos diferentes, totalmente misturados se reorganizar, ou melhor como as células migram espontaneamente para as suas posições corretas e lá permanecem. Para responder a estas questões existem as hipóteses já citadas brevemente. Exploramos aqui a hipótese da velocidade diferenciada e por isso aprofundaremos sua descrição.

A velocidade diferenciada foi analisada experimentalmente em 1989 por Jones et al., estes trabalharam com células de frango, mediram as velocidades de difusão celular de três tipos de células (fígado, musculares e retina neural) e obtiveram velocidades diferentes para cada tipo de tecido. As motilidades tem a seguinte hierarquia: músculo > fígado > retina. O resultado obtido é a disposição final destes tecidos quando dispostos dois a dois (ver figs. 2.2, 2.3, 2.4) formando um agregado celular, onde em cada caso o tecido mais difusivo ocupou o centro do agregado com o tecido com menor motilidade ao redor. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho a velocidade gera um padrão final onde o tecido mais difusivo localiza-se no centro cercado pelos demais.

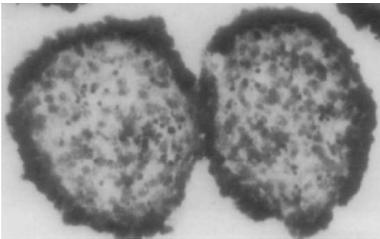


Figura 2.2: Agregado heterotípico de células de músculo e retina de frango obtido por Jones et al., as células de retina foram marcadas e aparecem escuras. Retirada do artigo.[10]

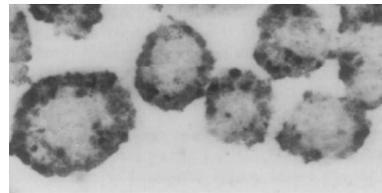


Figura 2.3: Agregado heterotípico de células de retina e fígado de frango obtido por Jones et al., as células de fígado foram marcadas e aparecem escuras. Retirada do artigo.[10]

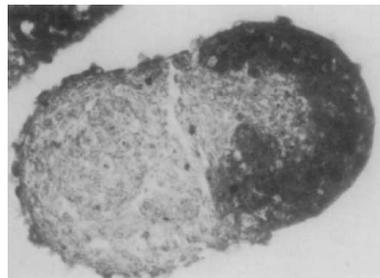


Figura 2.4: Agregado heterotípico de células de músculo e fígado de frango obtido por Jones et al., as células de fígado foram marcadas e aparecem escuras. Retirada do artigo.[10]

A discussão sobre qual das hipóteses explica a segregação celular continua em aberto e a velocidade diferenciada é citada como uma possibilidade. Em artigo de 1996, Steinberg[14] menciona a velocidade diferenciada como uma das explicações possíveis para a separação de tecidos. O surpreendente é que cita o experimento de Jones et al. de forma invertida: para Steinberg as células mais lentas ocupam o centro da mistura e as mais rápidas o contorno.

Temos então uma situação bastante interessante, pois a mesma hipótese foi usada para obter estados finais diferentes. Certamente a situação é contraditória e, provavelmente, elementos chave estão sendo ignorados em algum dos casos.

A hipótese da velocidade diferenciada atribui a reorganização celular, ou seja, o padrão final para os tecidos posicionados interna ou externamente no agregado, somente a diferenças nas velocidade de difusão celular. Dessa forma cada tecido é caracterizado por conter células com uma dada motilidade, estas ao se moverem dentro do agregado trocam diversas vezes de posição umas com as outras e, com o passar do tempo, um dos tecidos se posiciona dentro do agregado e o outro na sua superfície. Na sua versão original essa hipótese não indica qual destes tecidos será o interno. Nesse trabalho nos propomos fazer simulações para encontrar as condições necessárias e o padrão final para a segregação gerada pela velocidade diferenciada.

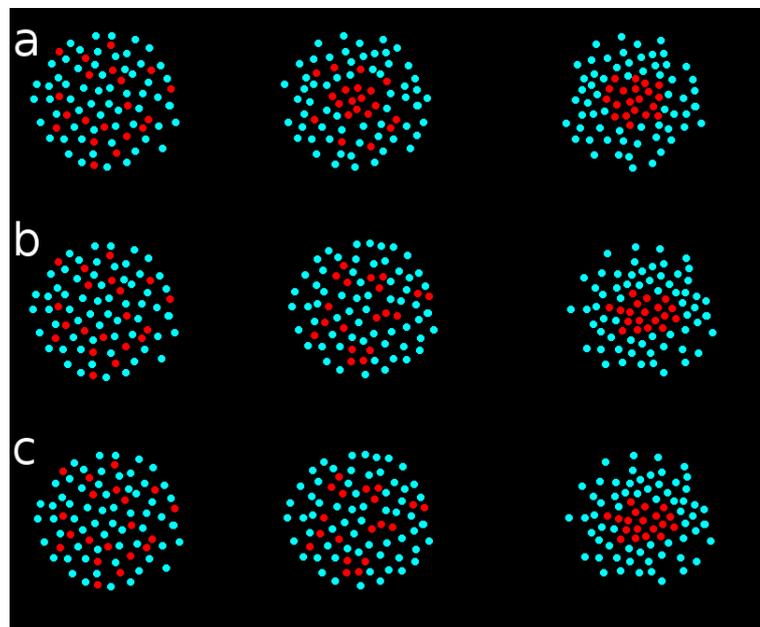


Figura 2.5: Representação ilustrativa da previsão dos estágios intermediários da segregação nas hipóteses: a) quimiotaxia; b) adesão diferenciada; e c) velocidade diferenciada.

Quando houver segregação, esperamos encontrar como estado intermediário uma estrutura espacial de grupos de células do mesmo tipo. Como não há um potencial central, não existe a tendência à formação de um grande núcleo central. O mesmo se espera e, de fato, se verifica na

adesão diferenciada, ver fig.2.5. Isto é diferente do encontrado na presença de quimiotaxia, pois nesse caso há formação de um núcleo central que cresce com o tempo. Também esperamos obter hierarquia de tecidos: se um primeiro tecido envolve um segundo, e este envolve um terceiro, então, o primeiro envolverá o terceiro (veja Fig. 2.6). Finalmente, mesmo que a distribuição espacial inicial de células seja não circular, esperamos que a forma final seja aproximadamente circular, minimizando a tensão superficial.

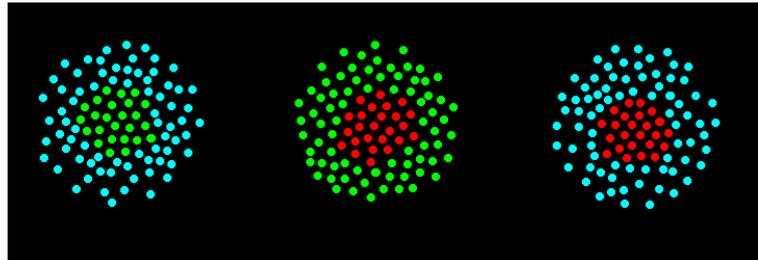


Figura 2.6: Representação da previsão da hierarquia de tecidos. Se um tecido a envolve o tecido b e este, por sua vez, envolve o tecido c, então, o tecido a deverá envolver o tecido c.

No próximo capítulo vamos descrever modelos matemáticos utilizados para a análise de dinâmica celular, suas características principais, algumas aplicações e suas vantagens e desvantagens na simulação da velocidade diferenciada. Além disso também vamos apresentar os modelos a serem usados nas simulações.

## 3 *Metodologia*

Estamos analisando um problema biológico do ponto da física teórica, portanto é necessário utilizarmos modelos matemáticos que contenham as principais características das células e como em todo modelo tratamos de aproximações, para isto precisamos de um modelo que contemple, ou pelo menos possa contemplar, todas as características necessárias para descrever as células adequadamente. Existem diversas abordagens para simular algumas das propriedades celulares, essas são derivadas de dois modelos: o de Glazier Graner Hogeweg (GGH)[8] e o de animóides. Vamos ver as principais características de ambos, comparando-os para decidir sua adequação ao estudo da velocidade diferenciada.

### 3.1 O Modelo de Glazier Graner Hogeweg

De maneira simples, pode-se entender o modelo de Glazier, Graner e Hogeweg como uma adaptação do modelo de Potts para dinâmica celular. A base do sistema é uma rede fixa, a cada ponto da rede associa-se um índice que define a que célula pertence esse ponto da rede. Dessa forma índices distintos estão associados a diferentes células (veja Fig. 3.1). A partir desses índices de estado atribui-se um valor de energia de interação entre sítios vizinhos: a índices iguais corresponde energia de interação nula, a índices diferentes associa-se energia positiva.

A dinâmica deste sistema é do tipo Monte Carlo, ou seja, sorteiam-se dois sítios vizinhos da rede e simula-se a troca de índices entre eles, se a energia for menor que a energia antes da troca anterior então ela ocorre, caso contrário ainda pode ocorrer a troca de índices, mas com certa probabilidade, definida a partir de uma temperatura efetiva atribuída ao sistema.

Explicitamente, para temperaturas não nulas, a probabilidade de haver troca de índices entre os sítios é dada por:

$$P = \begin{cases} e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} & ; \Delta E > 0 \\ 1 & ; \Delta E \leq 0 \end{cases}$$

1	1	1	1	2	2	2	3	3	3
1	1	1	2	2	2	2	3	3	3
1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
1	1	2	2	2	2	5	3	3	3
1	1	4	4	4	5	5	5	3	3
4	4	4	4	4	5	5	5	6	6
4	4	4	4	5	5	5	5	6	6
4	4	7	7	5	5	5	6	6	6
4	7	7	7	7	5	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	6	6	6	6

Figura 3.1: Rede do modelo GGH, contendo os índices que associam diversos sítios as células correspondentes.

Para  $T=0$ .

$$P = \begin{cases} 0 & ; \Delta E > 0 \\ 1 & ; \Delta E < 0 \\ \frac{1}{2} & ; \Delta E = 0 \end{cases}$$

Além do índice de sítios,  $\sigma$ , associado a diferentes células, também é atribuído a cada sítio um índice,  $\tau$ , para diferenciar os tecidos celulares. Células pertencentes ao mesmo tecido têm o mesmo valor de  $\tau$ . Por outro lado, também é necessário limitar o volume celular, pois as células possuem volume finito que varia muito pouco com o tempo ao longo do processo de segregação celular. Além disso, embora o volume se mantenha, a forma da célula pode variar bastante ao longo desse processo. Para levar em consideração esses aspectos Glazier e Graner propuseram uma função hamiltoniana com dois termos, o primeiro representando a energia entre sítios de células diferentes e o segundo desempenhando o papel de limitar o volume celular:

$$H_{sort} = \sum_{(ij)(i'j')viz} J[\tau(\sigma(i,j)), \tau(\sigma(i',j'))][1 - \delta_{\sigma(i,j), \sigma(i',j')}] + \lambda \sum_{\sigma} [a(\sigma) - A_{\tau}(\sigma)]^2 \theta A_{\tau}(\sigma)$$

onde

- $\tau(\sigma)$  tipo associado com a célula  $\sigma$ ;
- $J(\tau, \tau')$  energia superficial entre o spin do tipo  $\tau$  e  $\tau'$ ;
- $\lambda$  é o multiplicador de Lagrange associado à conservação de área;

- $a(\sigma)$  a área da célula  $\sigma$ ;
- $A_\tau$  a área ideal da célula do tipo  $\sigma$
- $\theta$  é a função de Heaviside;

A função hamiltoniana assim construída obtém corretamente as tensões superficiais entre células distintas e entre diferentes tecidos. Mas, apenas com esses termos, não contempla a velocidade diferenciada, para isso teríamos que considerar ainda um terceiro termo de energia interna [16]. Além disso, a inclusão de um termo de movimento coordenado, associado à fricção intercelular, seria de difícil implementação pois envolveria incluir termos de energia associada ao movimento relativo de células. Não temos relato de tal modelagem na literatura. Como veremos a seguir, a inclusão tanto da velocidade diferenciada como do movimento coordenado são bastante simples e intuitivos no modelo de animóides.

## 3.2 O Modelo de Animóides

Este modelo foi concebido em 1987 com intuito de representar no cinema o movimento de bandos de animais. No trabalho original de Reynolds[17], cada elemento (animóide) se movimenta seguindo três regras (ver figura 3.2):

1. manter uma certa separação dos vizinhos para evitar colisões;
2. alinhar-se de acordo com o movimento dos vizinhos;
3. aproximar-se dos demais caso se afaste muito do bando.

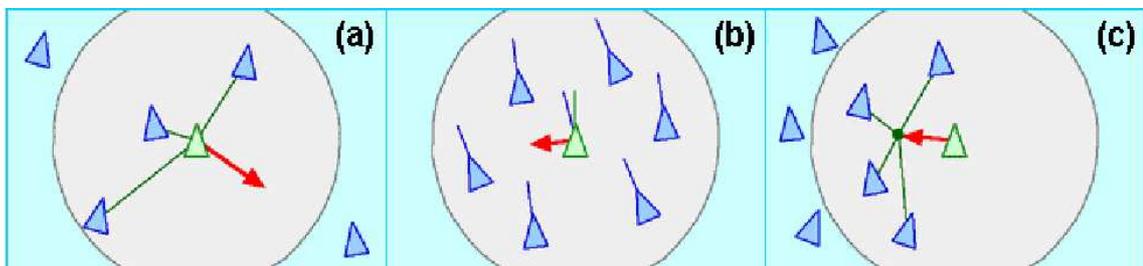


Figura 3.2: Regras de movimentação de animóides [18].

(a) Separação dos animóides; (b) alinhamento com vizinhos; (c) coesão com o bando;

Formalizando matematicamente essas regras de movimento, incluindo ruído e adaptando-as para dinâmica de células obteremos um modelo que permite introduzir facilmente a diferença de velocidades entre elas. Da mesma forma, como veremos, é simples implementar o movimento coordenado, pois ele é a base do modelo de Vicsek.

### 3.2.1 O modelo de Vicsek

Somente em 1995, ou seja, 8 anos após o trabalho de Reynolds, o grupo liderado por T. Vicsek[19] fez um estudo sistemático desse modelo. O objetivo era compreender com mais detalhes as condições necessárias para o surgimento do movimento coletivo sem líderes e na ausência de forças externas. Por exemplo, o movimento de bandos de animais como pássaros e peixes que se movem quase que sincronicamente em bandos sem líderes.

A essência da formulação de Vicsek é de que a direção da velocidade dos animóides depende das interações com seus vizinhos e o seu módulo permanece constante. Assim, em duas dimensões, a posição do  $i$ -ésimo animóide no tempo  $t + \Delta t$  é dada por:

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \vec{v}_i(t)\Delta t ,$$

com a direção,  $\theta_i$ , da velocidade  $\vec{v}_i(t + \Delta t)$ , definida por:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \alpha \sum_{j \sim \langle i \rangle} \vec{v}_j(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] , \quad (3.1)$$

onde  $\arg(\vec{v})$  indica que está sendo tomado o ângulo associado ao vetor  $\vec{v}$ ;  $\alpha$  determina a contribuição à direção de movimento devida aos animóides vizinhos;  $\eta$  determina o peso do ruído, representado por  $\vec{u}_i(t)$ , um vetor aleatório de módulo unitário e  $\Delta t = 1$ . São considerados vizinhos os animóides que estiverem dentro de um raio  $r_0$  finito, ver fig3.3.

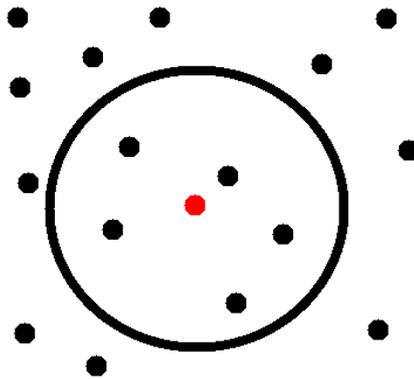


Figura 3.3: Representação da vizinhança de um animóide, onde o círculo limita a area de vizinhança do animóide marcado em vermelho.

Assim, a cada passo de tempo, o módulo da posição sempre varia de uma quantidade fixa e o animóide move-se em uma direção definida pela configuração dos vizinhos. Usualmente o sistema é simulado com dimensões fixas,  $L \times L$  e com condições de contorno periódicas.

Para analisar a transição entre as fases não movente e movente o grupo de Vicsek definiu o parâmetro de ordem:

$$\varphi = \left\langle \frac{1}{Nv_0} \sum_j \vec{v}_j \right\rangle, \quad (3.2)$$

sendo  $N$  o número de animóides e  $v_0$  o módulo da velocidade de cada um. Com essa definição  $\varphi$  pode assumir valores no intervalo  $[0, 1]$  e os casos limites possuem o seguinte significado:

- $\varphi = 1 \rightarrow$  todas os animóides estão se movendo na mesma direção, o movimento é totalmente ordenado;
- $\varphi = 0 \rightarrow$  todas os animóides se movem aleatoriamente, o movimento é totalmente desordenado;

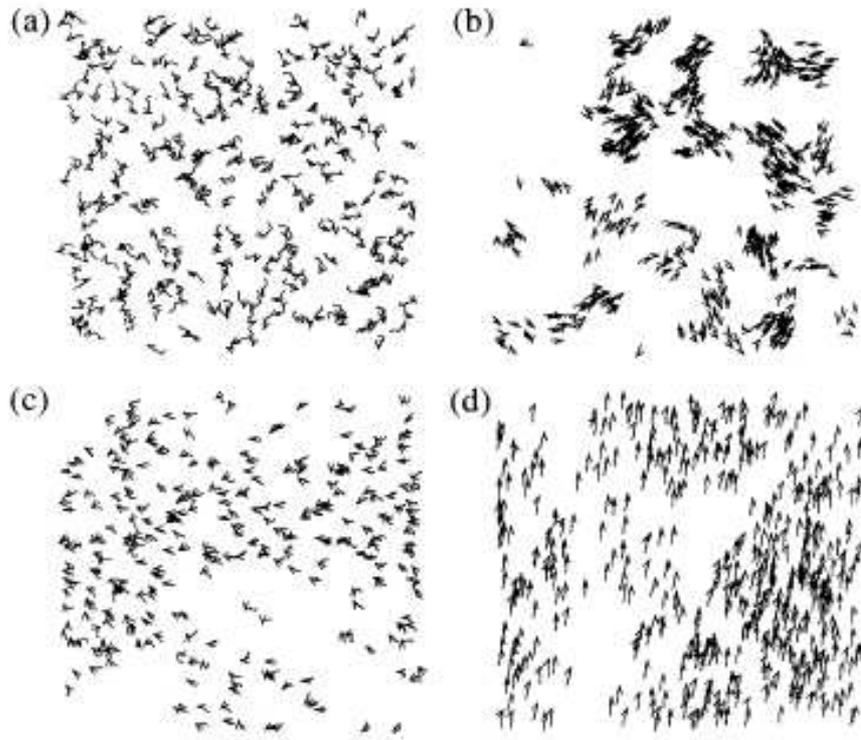


Figura 3.4: Considerando 20 passos da dinâmica do modelo de Vicsek, em todos os casos  $N = 300$ . a)  $t = 0$ ,  $L = 7$ ,  $\eta = 2.0$ ; b) para densidade e ruído pequenos temos a formação de grupos,  $L = 25$  e  $\eta = 0.1$ ; c) depois de algum tempo o sistema apresenta alguma correlação,  $L = 7$ ,  $\eta = 2.0$ ; d) para densidades maiores e ruído pequeno o movimento é ordenado,  $L = 5$  e  $\eta = 0.1$ . Imagem retirada do artigo[19].

O principal resultado encontrado é o de uma transição ordem-desordem no sistema, ver fig. 3.4. Essa transição pode ser induzida tanto pela variação da densidade de animóides, quanto pela variação relativa dos pesos  $\alpha$  e  $\eta$ . É importante salientar que esse é um sistema fora do

equilíbrio, pois as partículas interagem, mas se movem com energia cinética constante. Trata-se, portanto, de uma transição de fase fora do equilíbrio. Em seu trabalho original Vicsek sugere que a transição é de segunda ordem, mas a literatura a respeito permanece controversa [20, 21, 22, 23].

No que se refere aos objetivos de nosso trabalho, esse modelo permite que se especifique a velocidade de cada tipo de partícula. Porém, a modelagem de uma célula não está completa e, como discutido no modelo GGH, precisamos ainda limitar o volume celular e definir como as células interagem entre si. Na próxima subseção veremos como incluir o volume e as interações locais entre as células.

### 3.2.2 A adaptação de Grégoire

Com o intuito de modelar células, Grégoire[24] incluiu um termo de força entre as células, modelando as características celulares não contempladas pelo modelo original de Vicsek. (Deve-se mencionar, no entanto, que há uma publicação posterior de Vicsek abordando sistemas celulares [25].) A força proposta por Grégoire possui quatro partes distintas, dependendo da distância entre os centros dos animóides em interação, logo a seguir detalharemos. Por ser diretamente derivado do modelo de Vicsek, a velocidade de cada animóide continua possuindo módulo fixo, variando somente sua direção de movimento que será dada pela soma vetorial de três termos: os dois termos originais de Vicsek (tendência a seguir vizinhos e ruído) e um novo termo associado a força de interação entre animóides. Assim, a expressão para a direção da velocidade do  $i$ -ésimo animóide fica:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \alpha \sum_{j \sim \langle i \rangle} \vec{v}_j(t) + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + N\eta \vec{u}_i(t) \right]$$

onde,

- $\alpha$  é o parâmetro de movimento coordenado;
- $\vec{v}_j$  é a velocidade dos vizinhos da  $i$ -ésima célula;
- $\beta$  regula a intensidade da força de contato entre as células  $i$  e  $j$ ;
- $\vec{f}_{ij}$  é a força de contato entre as células  $i$  e  $j$ ;
- $\vec{u}$  é o vetor unitário aleatório, responsável pelo ruído;
- $\eta$  determina a contribuição relativa do ruído;

- $N$  é o número de vizinhos da  $i$ -ésima célula;

Células vizinhas são todas as células que estiverem dentro do raio de alcance da força (ver fig 3.5). A força ( $\vec{f}_{ij}$ ) é composta de quatro termos: para distâncias menores que um raio  $r_c$  é infinita (de repulsão), caracterizando o volume do animóide; para a distâncias em torno de  $r_{eq}$  é do tipo linear restauradora (o animóide tende a permanecer numa posição de equilíbrio); para distâncias entre o  $r_{har}$  e o  $r_{alc}$  é atrativa e constante (o animóide procura não se distanciar do bando); para distâncias maiores que  $r_{alc}$  é nula, o animóide se perdeu do bando. Explicitamente:

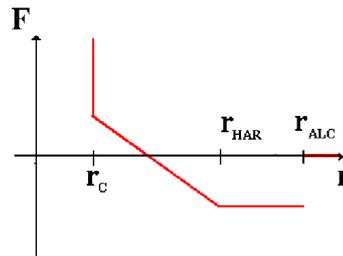


Figura 3.5: Dependência da força com a distância entre as partículas na adaptação de Grégoire.

$$\vec{f}_{ij} = \vec{e}_{ij} \begin{cases} +\infty & ; r_{ij} \leq r_c \\ 1 - \frac{r_{ij}}{r_{eq}} & ; r_c < r_{ij} < r_{har} \\ 1 - \frac{r_{har}}{r_{eq}} & ; r_{har} \leq r_{ij} < r_{alc} \\ 0 & ; r_{ij} \geq r_{alc} \end{cases}$$

onde,

- $\vec{e}_{ij}$  é o vetor unitário na direção da partícula  $i$  para  $j$ ;
- $r_{ij}$  é a distância entre as células  $i$  e  $j$ ;
- $r_{eq}$  é a distância de equilíbrio entre duas células;
- $r_{alc}$  é a distância de alcance da força;
- $r_c$  é o raio do volume mínimo da célula, o cerne;
- $r_{har}$  é a distância máxima onde a força ainda está no regime harmônico;

Esta força foi modelada para animais em bandos, no caso de células precisamos modificá-la sutilmente, como discutiremos a seguir. Com a inclusão do volume nesse modelo as partículas

deixam de ser pontuais e, como ocorre no gás de Van der Waals[26], esperam-se transições para fases condensadas líquida e sólida a baixas temperaturas, ou seja, a baixos níveis de ruído. Além disso, como mostrado no diagrama 3.6, a fase movente presente no modelo de Vicsek continua existindo, ou seja, agora temos uma versão movente correspondendo às fases gasosa, líquida e sólida.

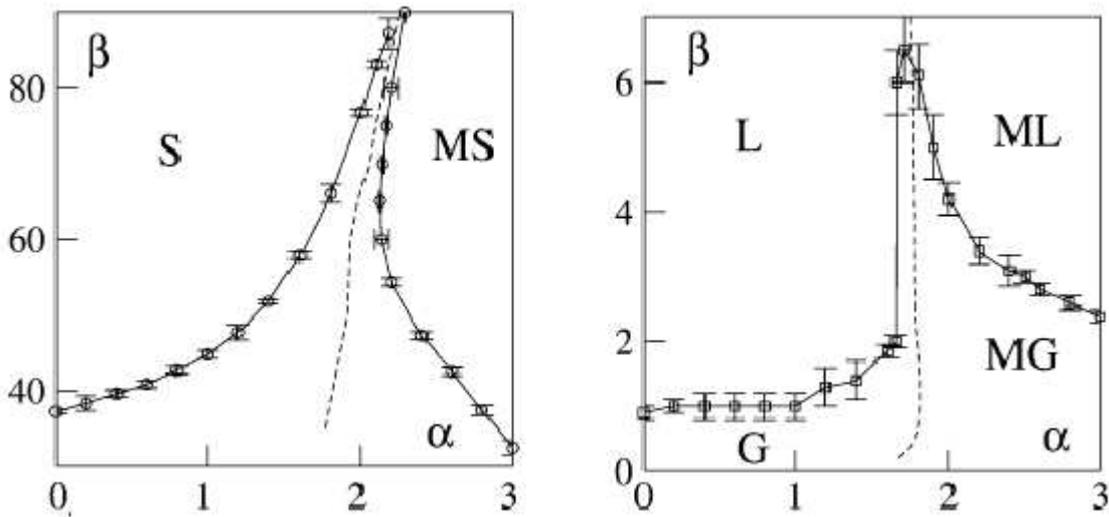


Figura 3.6: Diagrama de fases para densidade,  $\rho$ , não nula e tamanho finito,  $\eta = 1.0$ ,  $\rho = 1/16$ ,  $N = 2025$  e  $L = 180$ . Nas figuras vemos as três fases: sólida, líquida e gasosa, representadas respectivamente por: S, L e G, em qualquer das fases o sistema pode possuir movimento coletivo, nesse caso as fases moventes são representadas acrescentando M ao símbolo da fase original. Imagem retirada do artigo[24].

### 3.2.3 Animóides e Segregação Celular - Hipótese de Adesão Diferencial

O modelo de animóides, juntamente com estas adaptações descritas, foi utilizado para modelar a hipótese da adesão diferencial[9]. De acordo com esta hipótese, as células possuem adesão variada dependendo somente dos tecidos aos quais as células interagentes pertencem. Partindo disso, é necessário adequar dois aspectos do modelo anterior: o parâmetro  $\beta$ , para contemplar as diferenças entre tecidos; a dependência da força com a distância, para se levar em consideração características celulares, já que o modelo anterior tratava de animais macroscópicos, tais como pássaros e peixes.

O parâmetro  $\beta$  é alterado para estabelecer correspondência com as adesões distintas decorrentes da hipótese de adesão diferencial. Definem-se índices associados aos tecidos,  $n$  e  $m$  e o parâmetro de adesão dependente de tecido,  $\beta_{nm}$ . Com isso as células possuem três diferentes valores de adesão: i)  $\beta_{11}$  entre duas células da endoderme; ii)  $\beta_{22}$  entre duas células da ectoderme; iii)  $\beta_{12}$  entre duas células de tecidos diferentes, define-se  $\beta_{21} = \beta_{12}$ .

A dependência da força com a distância é alterada para representar forças de contato entre células e passa a ter três termos (ver fig.3.7): o primeiro representa um cerne impenetrável que tem alcance  $r_c$ , responsável pelo volume celular; o segundo é um termo harmônico, representando uma força linear em torno de um raio de equilíbrio  $r_{eq}$  e alcance  $r_{alc}$ ; o terceiro termo é de força nula, definida partir desse raio de alcance até o infinito. O regime de força constante não nula não mais existe, pois células perdem contato com as vizinhas mais facilmente do que animais se perdem do bando e as células mantêm contato através de ligações químicas, que são de curto alcance. Detalhamos a nova força abaixo:

$$f_{nm} = \begin{cases} 0 & ; r_{nm} \geq r_{alc} \\ 1 - \frac{r_{nm}}{r_{eq}} & ; r_c < r_{nm} < r_{alc} \\ +\infty & ; r_{nm} \leq r_c \end{cases}$$

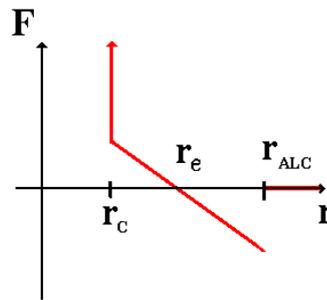


Figura 3.7: Dependência da força com a distância entre as partículas no modelo de Belmonte et al.

Para estudar a evolução temporal da segregação celular Belmonte et al. definiram um parâmetro relacionado à ordem espacial das células. Nesta definição escolhem-se as células de um tipo de tecido,  $j$ , e calcula-se a média aritmética da fração de vizinhos de tipo diferente em torno de cada célula de  $j$ . Define-se, então, a medida de segregação da seguinte forma:

$$\gamma_j = \left\langle \frac{n_{\neq}}{n_{=} + n_{\neq}} \right\rangle \quad (3.3)$$

onde,

- $\langle \rangle$  indica a média sobre as células tipo  $j$ ;
- $j$  assume dois valores: 1 para endoderme, 2 para ectoderme;
- $n_{\neq}$  é o número de vizinhos diferentes do animóide  $j$ ;
- $n_{=}$  é o número de vizinhos iguais ao animóide  $j$ ;

Com essa definição,  $\gamma_j$  assume valores no intervalo  $[0,1]$  e o significado dos casos limites é:

- $\gamma_j = 1$ : todas as células estão espalhadas sem contato com nenhuma igual;
- $\gamma_j = 0$ : cada célula está cercada por células do mesmo tecido;

A informação obtida ao se medir  $\gamma_1$  é semelhante à obtida ao se medir  $\gamma_2$ , de forma que, na prática apenas uma delas é utilizada. Por outro lado, para haver a possibilidade de envolvimento dos tecidos é necessário haver uma fração maior de células de ectoderme do que de endoderme. No caso de haver segregação, essa diferença produzirá uma maior variação em  $\gamma_1$  do que em  $\gamma_2$ , razão pela qual se adota a medida de  $\gamma_1$ .

As simulações são feitas distribuindo-se aleatoriamente  $N$  células em uma região circular de área  $N\pi r_c^2$  em uma proporção de 1 : 3 de células endo/ecto. Esta distribuição inicial fixa o valor inicial de  $\gamma_1$  em 0.75. Os gráficos ilustram o resultado obtido para a evolução temporal para alguns valores do parâmetro de movimento coordenado,  $\alpha$ , vemos que o aumento deste facilita a separação dos tecidos, ver fig.3.8. Podemos notar que a evolução temporal da segregação é uma lei de potência, cujo expoente, denominado  $\lambda$ , possui valores  $\lambda \sim -0.2$ .

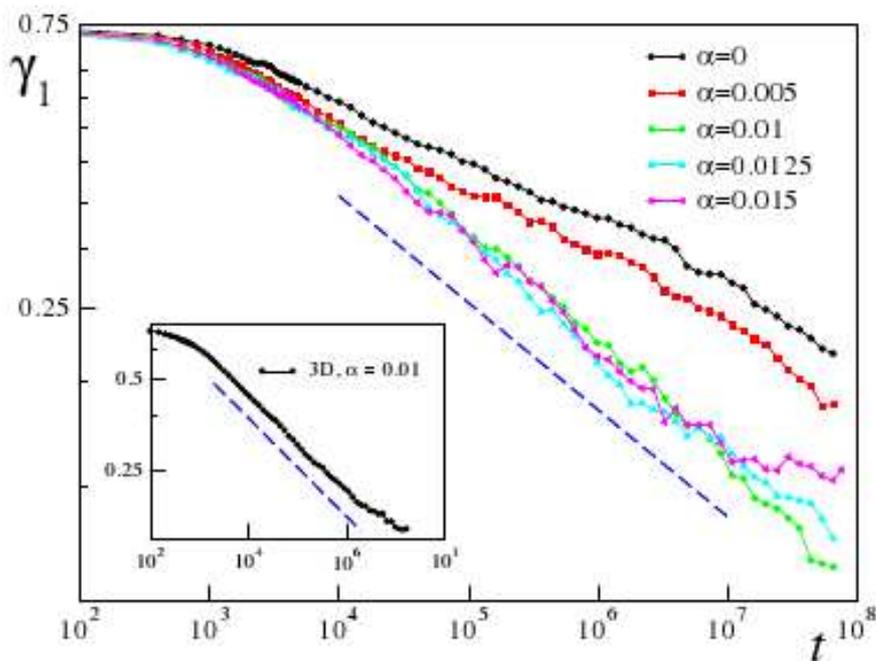


Figura 3.8: Evolução do parâmetro de ordem associado à segregação celular para um sistema bidimensional,  $N = 6400$ , com proporção 3:1 células de ecto/endo. A linha pontilhada é o ajuste, com  $\lambda = -0.18$ . Imagem retirada do artigo.[9]

A influência do número total de células sobre a segregação celular também foi analisada, ver fig. 3.9. Vemos que o tempo de reorganização total,  $t^*$ , dos tecidos depende do número de

células e é da forma de lei de potência, com expoente  $-\mu$ , então, tem-se  $t \sim N^\mu$ , ver fig. 3.9 b). Outra característica influenciada pelo número de partículas é o valor final da medida de segregação,  $\gamma^*$ , este também é uma lei de potência, com expoente definido por  $-v$ , dessa forma temos  $\gamma^* \sim N^{-v}$ , ver fig. 3.9 c). Podemos ver que escalando as curvas de segregação em relação a estes expoentes, fig. 3.9 a), estas se sobrepõem, mas ao fazer as curvas diretamente, fig. 3.9 a) gráfico interno, vemos os tempos e segregações de saturação dependentes de  $N$ .

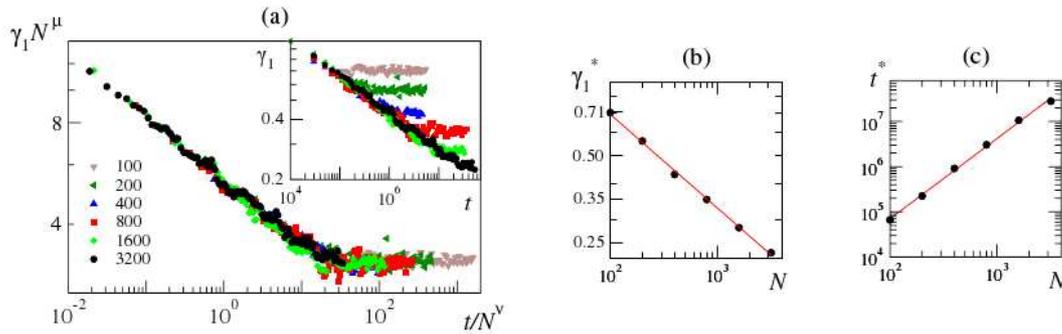


Figura 3.9: Segregação celular em duas dimensões para, com proporção 3:1 células de ecto/endo, onde: a) escala da segregação para diferentes valores de  $N$ ,  $\beta_{11} = 3.83$ ,  $\beta_{12} = 2.53$ ,  $\beta_{22} = 2.5$  e  $\alpha = 0.01$ ; b) valor da saturação de  $\gamma$  contra  $N$ ; c) tempo em que ocorre a saturação contra  $N$ . Imagem retirada do artigo.[9]

A última adaptação foi inserida na formulação de  $\theta$  com respeito dependência do termo de ruído com o número de vizinhos. Nos trabalhos com bandos de animais é fácil perceber os motivos da dependência do fator aleatório com o número de vizinhos, pois um indivíduo, ao estimar a posição dos demais, pode incorrer em erros que aumentam com o número de leituras a serem realizadas por passo de tempo. Mas para células, que estão em contato físico, não há sentido atribuir tal erro, pois termo estocástico está ligado às flutuações de membrana e não a erros de leitura. Dadas estas alterações, a direção de movimento assume a seguinte forma:

$$\theta_i^{t+1} = \arg \left[ \sum_{m \sim n} \left( \alpha_{nm} \frac{\vec{v}_m^t}{v_0} + \beta_{nm} f_{nm}^t \vec{e}_{nm}^t \right) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.4)$$

onde,  $\vec{e}_{nm}^t$  é o vetor unitário na direção da célula  $n$  à  $m$ .

### 3.2.4 Adaptação Utilizada neste Trabalho

A aplicação da versão do modelo de animóides ao caso de células deve levar em consideração as diferenças entre movimentos de animais em bandos e células dentro de um agregado, para isto fazemos algumas adaptações.

A hipótese da velocidade diferenciada (HVD) pressupõe diferentes velocidades para células

de diferentes tecidos. Atribui-se a velocidade  $v_0$  às células mais lentas e  $\delta v_0$  às demais células. Dessa forma,  $\delta$  é a razão entre as duas velocidades presentes no sistema. Mas é preciso ressaltar a diferença desta, para a hipótese de adesão diferenciada (HAD). Na HAD as diferenças entre as células são modeladas através do parâmetro  $\beta_{nm}$ , o que influencia somente a direção de movimento celular. Na HVD as diferenças estão presentes em ambas as equações de movimento, como vemos a seguir:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \sum_{j < viz >} \alpha_{ij} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.5)$$

$$\vec{x}_i(t + \Delta t) = \vec{x}_i(t) + \vec{v}_i(t) \Delta t \quad ,$$

note que trabalhamos com o mesmo parâmetro  $\beta$  para todas as células envolvidas na interação, e que tratamos com o módulo de  $\vec{v}_i(t)$  dependendo do tipo de tecido ao qual a  $i$ -ésima célula pertence. Adotamos como padrão  $\Delta t = 1$  para todas as simulações.

Nesse ponto é importante ressaltar que todos os modelos explorados até aqui foram desenvolvidos apenas para sistemas com uma só velocidade de partícula. Ao estendermos a modelagem para sistemas com mais de uma velocidade surgem várias possibilidades. Nesse trabalho tratamos com dois casos:

1. normalização pela velocidade mínima,

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \alpha \sum_{j < viz >} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.6)$$

com essa escolha haverá uma contribuição maior ao termo de movimento coletivo originada das vizinhas mais rápidas.

2. normalização dependente do tecido,

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \alpha \sum_{j < viz >} \frac{\vec{v}_j(t)}{|\vec{v}_i|} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (3.7)$$

nesse caso as partículas mais rápidas teriam uma contribuição menor ao termo de movimento coletivo do que as mais lentas.

Se interpretarmos o termo de movimento coletivo como associado à viscosidade do sistema, o primeiro caso atribuiria maior viscosidade às células mais rápidas e o segundo às células mais lentas.

Em suma, modelamos células com as seguintes características: a) têm simetria radial; b) são impenetráveis para distâncias entre centros menores que  $r_C$ ; c) interagem elasticamente para distâncias entre centros no intervalo  $r_C < r < r_{alc}$ ; d) movem-se com mesma velocidade escalar; e) modificam a direção de movimento de acordo com a distância das vizinhas através da força  $\vec{f}_{ij}$ , modulado pelo parâmetro  $\beta$ ; f) também modificam a direção de movimento de acordo com as direções das velocidade das vizinhas, termo modulado pelo parâmetro de movimento coordenado  $\alpha$ ; g) finalmente possuem um termo aleatório, o ruído  $\vec{u}_i$  modulado por  $\eta$ .

Os dois casos modelados somente são diferentes quando tratamos de sistemas com movimento coordenado, se este parâmetro for nulo,  $\alpha = 0$ , anula-se todo o termo de viscosidade. Dessa forma analisamos primeiramente o caso sem movimento coordenado,  $\alpha = 0$ , com o objetivo de encontrar valores dos demais parâmetros que gerem segregação celular. Ao encontrar tais valores, analisamos as diferenças entre os casos 1) e 2) discriminados acima e o modelo sem movimento coordenado. Outro fator que devemos também considerar é que, por construção, pode ocorrer movimento em conjunto em uma determinada direção, neste caso o tecido se encontraria na fase movente.

### 3.3 Medidas

Analisamos a segregação celular através das medidas definidas por Vicsek [19] (parâmetro de ordem  $\phi$ , equação 3.2 neste trabalho) e por Belmonte [9] (parâmetro  $\gamma$ , equação 3.3 neste trabalho). A seguir detalhamos como eles foram usados.

Calculamos o valor do parâmetro de ordem,  $\phi$ , para os diferentes tecidos separadamente. Têm-se, então, um valor desse parâmetro para as células mais rápidas e outro valor para as mais lentas. Isto é importante na HVD, pois as células possuem diferentes velocidades e podem possuir valores de  $\phi$  diferentes por tecido. Em alguns casos, os tecidos podem estar em fases diferentes, um na movente e outro na não movente.

O parâmetro de ordem,  $\phi$ , diferencia as fases movente e não movente, porém, na vizinhança da transição entre essas fases esperam-se grandes flutuações nesse parâmetro, pois encontramos uns poucos grupos numerosos de células movendo-se em direções arbitrárias. Neste caso, analisamos diretamente as imagens da segregação para aceitar ou não as segregações, escolhendo as biologicamente plausíveis. Por exemplo, se o sistema se dividir em muitos pedaços, a segregação seria inaceitável, pois a hidra não sobreviveria.

De acordo com a definição da medida de segregação celular,  $\gamma_j$ , deveríamos calcular esse parâmetro para os dois tecidos presentes no sistema, ou, como feito no trabalho de Belmonte,

poderíamos calculá-lo somente para as células menos aderentes. No nosso caso, todas as células possuem a mesma adesão e optamos por calcular  $\gamma_j$  somente para as células mais lentas. Com isso podemos retirar o índice  $j$  e usar somente  $\gamma$  para a representação da medida. Um valor de  $\gamma$  decrescente implica reorganização do sistema. Para que a HVD seja uma hipótese aceitável, espera-se que a medida de segregação possua características semelhantes, tanto na evolução temporal quanto na dependência com o tamanho do sistema, às obtidas para a hipótese da adesão diferenciada.

### 3.4 Simulação Numérica

A partir do modelo de Vicsek e de suas adaptações temos definidos o modelo matemático e os parâmetros de medidas da segregação celular, com isso podemos efetivamente realizar os cálculos, ou seja, desenvolver o programa que realize toda a dinâmica e calcule todas as variáveis de medida. Primeiramente definimos o estado inicial do sistema, isso inclui atribuir as posições e velocidades para todas as células no tempo  $t = 0$ . Definimos valores iniciais aleatórios para o ângulo da velocidade,  $\theta(0)$ , no intervalo  $[0, 2\pi)$  e, para as posições iniciais, temos um sorteio aleatório dentro de um círculo cuja a área é  $N\pi r_{eq}^2$ . Com isso, as células são distribuídas aproximadamente na área de equilíbrio do sistema.

A dinâmica obedece as equações, já definidas 3.6, 3.7 e 3.1. Diretamente dessas equações definimos vetores de dimensão  $N$  associados as variáveis posição, ângulo e velocidade. Também definimos as matrizes: distância e força que possuem dimensão  $N \times N$ . Além disso temos diversas variáveis simples, como os parâmetros,  $\gamma$ ,  $\varphi$  e etc.

O tempo é a variável discreta do problema, como mencionamos anteriormente, ele sempre é incrementado em uma unidade,  $\Delta t = 1$ , as demais variáveis são contínuas e precisam ser recalculadas a cada passo de tempo. Essas características são semelhantes a outra forma de cálculos numéricos: a dinâmica molecular (DM)[27]. Para realizar os cálculos da dinâmica diretamente (novas posições e velocidades), precisamos calcular as distâncias e forças entre cada par de células, assim o tempo de processamento cresce com  $N^2 - N$ , mas podemos utilizar técnicas conhecidas da DM para reduzir este tempo otimizando o cálculo das distâncias entre as células.

A dinâmica molecular, como o nome sugere, é muito utilizada para simular sistemas compostos por átomos ou moléculas, mas podemos aproveitar algumas idéias deste método. Em geral, se divide a DM em etapas: o calculo das forças; cálculo das novas posições; velocidades; cálculo das variáveis de interesse. Então, utilizamos esta organização na nossa simulação. Para

cálculo das distâncias vamos utilizar um método que reduz o tempo de processamento, após este cálculo, obteremos as componentes da força sobre cada célula e, então, atualizaremos as posições e velocidades para calcular os valores das medidas de segregação celular propriamente ditas, por último geramos as imagens instantâneas da configuração espacial para acompanhar a evolução do sistema.

### 3.4.1 Método das Caixas

O método das caixas consiste em dividir o espaço em regiões de igual tamanho, denominadas caixas. Dado que as forças presentes no problema tem curto alcance, não haverá qualquer erro de aproximação se calcularmos as distâncias (e as forças) apenas dentro da mesma caixa ou entre células de caixas vizinhas. No modelo adotado neste trabalho, as forças possuem um raio de alcance,  $r_{alc}$ , a partir do qual a força é nula. Atribuindo ao lado das caixas o valor da distância de alcance da força, podemos garantir que todas as células vizinhas estarão dentro da mesma caixa ou nas caixas vizinhas da célula. Podemos atribuir diretamente valor zero às forças entre células com distâncias superiores ao lado da caixa.

Para trabalharmos com caixas precisamos definir sua vizinhança, pois somente a caixa onde a célula se encontra e as caixas vizinhas são consideradas nos cálculos das variáveis dinâmicas. Em duas dimensões, cada caixa possui oito vizinhas. Dado que utilizamos condições de contorno periódicas, mesmo as caixas nos limites espaciais do sistemas possuem oito vizinhas. Mas, como mostrado na figura 3.10, somente é necessário considerar quatro, das oito caixas vizinhas, pois, se percorremos todas as caixas e calcularmos as interações de cada partícula com as partículas das caixas vizinhas, estaríamos calculando duas vezes a interação.

Denotamos as caixas com números inteiros e definimos as vizinhas através de quatro vetores:  $v_1$ ,  $v_2$ ,  $v_3$  e  $v_4$ . Cada um desses vetores contém as vizinhas da  $i$ -ésima caixa e todos estes possuem dimensão igual ao número de caixas do espaço[27],  $L_x \times L_y$ . A definição destes vetores é simples, mas devemos ter cuidado nas extremidades do espaço, nas laterais algumas das vizinhas estão do lado oposto do sistema, nas caixas inferiores algumas das vizinhas, ( $v_2, v_3, v_4$ ), são as caixas superiores, nos cantos são usadas duas das formas anteriores, tendo estes casos separados, as demais vizinhas são facilmente determinadas, podemos ver isso na fig. 3.10.

Os programas foram executados em aproximadamente 20 núcleos ao mesmo tempo, possibilitando o cálculo de diversos conjuntos de parâmetros. Os processadores utilizados são de dois tipos: AMD Athlon 2x de 2.2 GHz e Intel Core 2 Quad de 2.4 GHz. Onde utilizamos o compilador de FORTRAN90 da Intel para compilar os códigos fontes.

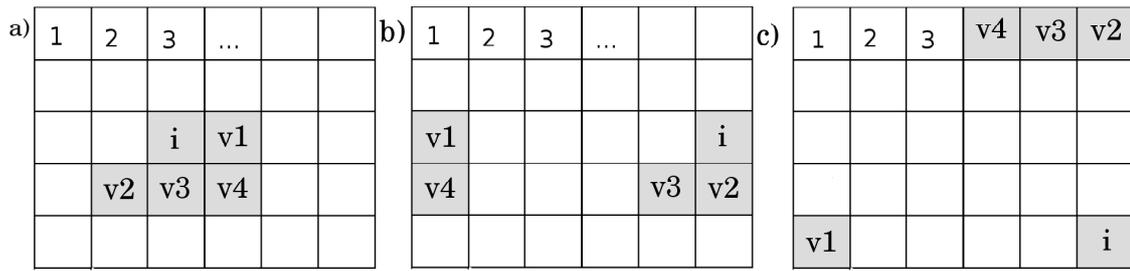


Figura 3.10: Divisão em caixas do espaço e vizinhas da  $i$ -ésima caixa, por exemplo, em três casos: a) caixa  $i$  central; b) caixa  $i$  lateral, devemos definir a vizinhança das caixas laterais e caixas inferiores; c) caixa  $i$  em um dos quatro cantos do sistema, novamente devemos defini-los em separado;

Usamos um primeiro programa com  $N = 2000$  para encontrar parâmetros de diferença de velocidades,  $\delta$ , e de movimento coordenado,  $\alpha$ , adequados à segregação celular, com isto determinamos um diagrama de fases. Cada ponto nesse diagrama demora aproximadamente um dia para ser obtido. Uma vez definido um conjunto de parâmetros, usamos um segundo programa onde aumentamos o número de partículas para  $N = 8000$  e passamos aos cálculos de segregação. Esses cálculos são realizados até tempos finais da ordem de  $t^* \sim 2 \times 10^8$ , onde normalmente encontramos saturação do parâmetro  $\gamma$ . No primeiro programa usado, o cálculo do parâmetro de ordem,  $\varphi$  é realizado a cada  $2.5 \times 10^5$  passos e usa-se um tempo final,  $t = 10^6$ . No segundo programa o cálculo do parâmetro de segregação,  $\gamma$  é realizado a cada 200 passos.

Dado que a evolução da segregação ocorre mais lentamente para tempos mais longos, escolhemos captar imagens em intervalos progressivamente mais longos, ou seja, usamos intervalos  $t^{0.8}$  para captá-las. Ou seja, iniciando com uma imagem em  $t = 1$ , teremos imagens em  $t = \{1, 2, 4, 8, 14, 23, 36, 54, 79, \dots\}$ . Como veremos nos resultados, com isto compensamos aproximadamente o expoente da segregação. Uma vez produzidas as posições das partículas a cada tempo pelo programa principal e armazenadas em arquivo, as imagens de evolução são geradas através do programa povray e unidas em videos pelo programa ffmpeg.

## 4 Resultados

Mostramos aqui os resultados das simulações efetuadas sobre os dois modelos, descritos na subseção 3.2.4. Vamos explorar esses resultados em duas situações distintas: com e sem o termo de movimento coletivo,  $\alpha$ . No caso  $\alpha = 0$  os dois modelos são idênticos. A seguir descrevemos os parâmetros comuns às simulações.

Utilizamos a velocidade das células mais lentas sempre como  $v_0 = 0.007$ , o parâmetro que controla o ruído é fixo e vale sempre  $\eta = 1$ , o número de partículas pode variar de  $N = 500$  até  $N = 8000$ , mas a proporção das células é sempre a mesma: utilizamos uma célula mais lenta a cada três células mais rápidas (1 : 3). Outro parâmetro fixo nas simulações é a adesão entre as células e vale,  $\beta = 0.55$ . Os raios característicos de interação também são fixos, o raio impenetrável ou raio de core,  $r_c = 0.2$ , o alcance da força é  $r_{ALC} = 0.55$ .

Finalmente o tamanho do sistema depende somente do número total de partículas, pois ajustamos as células no sorteio inicial de forma que, em média, as células estejam a distância de equilíbrio umas das outras, como o sorteio inicial é um círculo, calculamos este raio a partir do raio de equilíbrio da força e, então, somamos uma margem para o sistema poder relaxar. O valor dessa margem é de duas unidades, o espaço é bidimensional, com condições de contorno periódicas, como já foi discutido anteriormente. Ou seja, a dinâmica ocorre sobre um toróide.

### 4.1 Resultados na Ausência de Movimento Coordenado

No caso em que não há movimento coordenado,  $\alpha = 0$ , as equações de movimento assumem a forma:

$$\begin{aligned} \vec{x}_i(t + \Delta t) &= x_i(t) + \vec{v}_i \Delta t \\ \theta_i(t + \Delta t) &= \arg \left[ \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \end{aligned} \quad (4.1)$$

### 4.1.1 Arredondamento

Com intuito de testar os efeitos de tensão superficial[3], analisamos inicialmente se, após um transitório, uma distribuição inicial não circular geraria uma distribuição circular. Assim, sorteamos um estado inicial distribuindo as células sobre um quadrado e implementamos numericamente a dinâmica das equações de movimento 4.1. A razão entre as velocidades usada foi  $\delta = 3$ . Depois de algum tempo ( $t \sim 17500$ ), o sistema passou a apresentar uma distribuição aproximadamente arredondada das partículas, como mostrado nas figuras (4.1e4.2). A partir desse resultado, passamos a utilizar sorteios iniciais já circulares nas simulações posteriores.

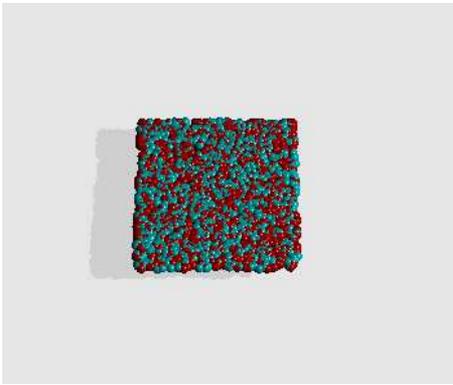


Figura 4.1: Estado inicial quadrado.

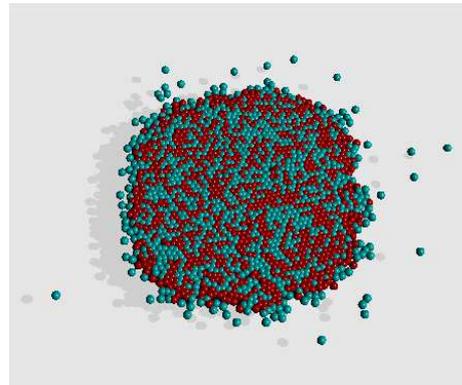


Figura 4.2: Sistema circular obtido através da dinâmica descrita após tempo de transiente,  $t=17531$ .

### 4.1.2 Proporção entre Células de Tecidos Distintos

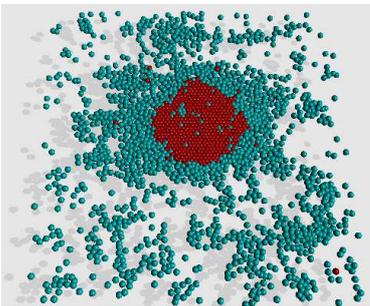


Figura 4.3: Sistema com três partículas mais rápidas para cada uma mais lenta.

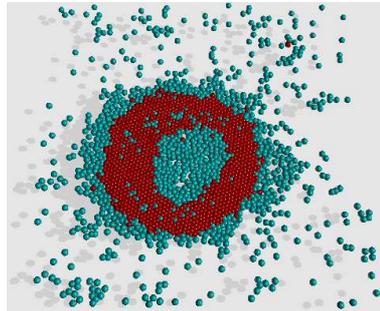


Figura 4.4: Sistema contendo metade das células de cada tipo.

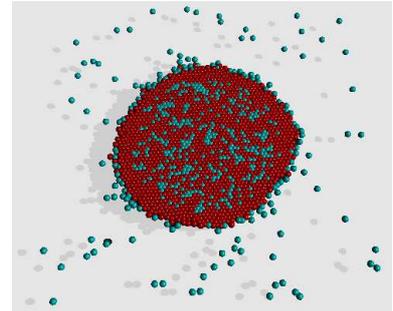


Figura 4.5: Sistema com três partículas mais lentas para cada uma mais rápida.

Não sabemos a priori qual será o tecido envolvido e qual o envolvente, além disso também não sabemos se o número de células de cada tecido é relevante. Analisamos, então, a influência da proporção de células mais lentas em relação às demais na segregação. As células velozes

podem se dispersar, porém se estas estiverem em maior número, podem sobrar células deste tipo no agregado e a segregação ocorrer sem problemas, fig.4.3. Caso o número de células em cada tecido seja o mesmo, nota-se uma certa dificuldade em obter a segregação, pois pode ocorrer formação de um anel, fig. 4.4, que impede as células de se reorganizarem. Com mais células lentas temos um problema ainda maior de aprisionamento, o que pode a princípio parecer uma segregação com as mais lentas por fora, na verdade é um estágio de retenção das células mais rápidas, se estas chegarem à superfície se dissipam, fig. 4.5. Então podemos observar que se acertarmos a proporção entre as células dos diferentes tecidos, as mais lentas irão se aglomerar formando um núcleo envolvido pelas mais rápidas, como citado na referência [14] e contrário ao resultado de Jones et al [10].

### 4.1.3 Influência do Número Total de Células

Já com sorteios iniciais circulares, proporções de células adequadas entre tecidos e  $\alpha = 0$ , analisamos o comportamento de  $\gamma$  para diferentes valores do número total de células do agregado,  $N$ , fixando a razão de velocidades, em  $\delta = 4$ , mostramos que para valores diferentes de  $N$  temos, qualitativamente, a mesma dependência temporal do parâmetro  $\gamma$ , ou seja, a segregação possui a mesma inclinação, mas com tempo de saturação dependente de  $N$ , ver figura 4.6. Dessa forma podemos utilizar um número de células conveniente para explorar o conjunto de parâmetros presente nas equações 3.6 e 3.7. Para escolher o número de partículas mais adequado precisamos levar em conta que quanto mais células o sistema contiver menor serão os efeitos de borda e de sistema finito, por outro lado, quanto maior o sistema maior será o tempo para realizar a simulação, por dois fatores: mais cálculos por passo e mais tempo para o sistema atingir o estado assintótico segregado.

Vemos no gráfico principal da figura 4.6 que, para diferentes valores de  $N$  e razão de velocidades fixa,  $\delta = 4$ , ocorre segregação. O parâmetro de ordem  $\gamma$  é uma função do tempo na forma de lei de potência com expoente,  $\lambda = -0.21$ . Note que este expoente é similar ao expoente obtido para simulações da adesão diferenciada[9]. De fato, como mostrado na figura 4.7 uma lei de potência ajusta-se bem apenas quando  $\delta > 3.5$ ; quando  $\delta = 3$  uma lei logarítmica ajusta-se melhor. É importante salientar aqui que as simulações por modelo Potts [8] também encontram essa última dependência.

Nos gráficos laterais da figura 4.6 temos uma análise dos valores de parâmetros associados aos estados assintóticos do sistema. Primeiramente, no gráfico superior, temos os valores do parâmetro de segregação,  $\gamma$ , na saturação, ou seja, quando o sistema atingiu seu estado final. Vemos que a função desse valor de saturação da medida de segregação,  $\gamma^*$ , é uma lei de

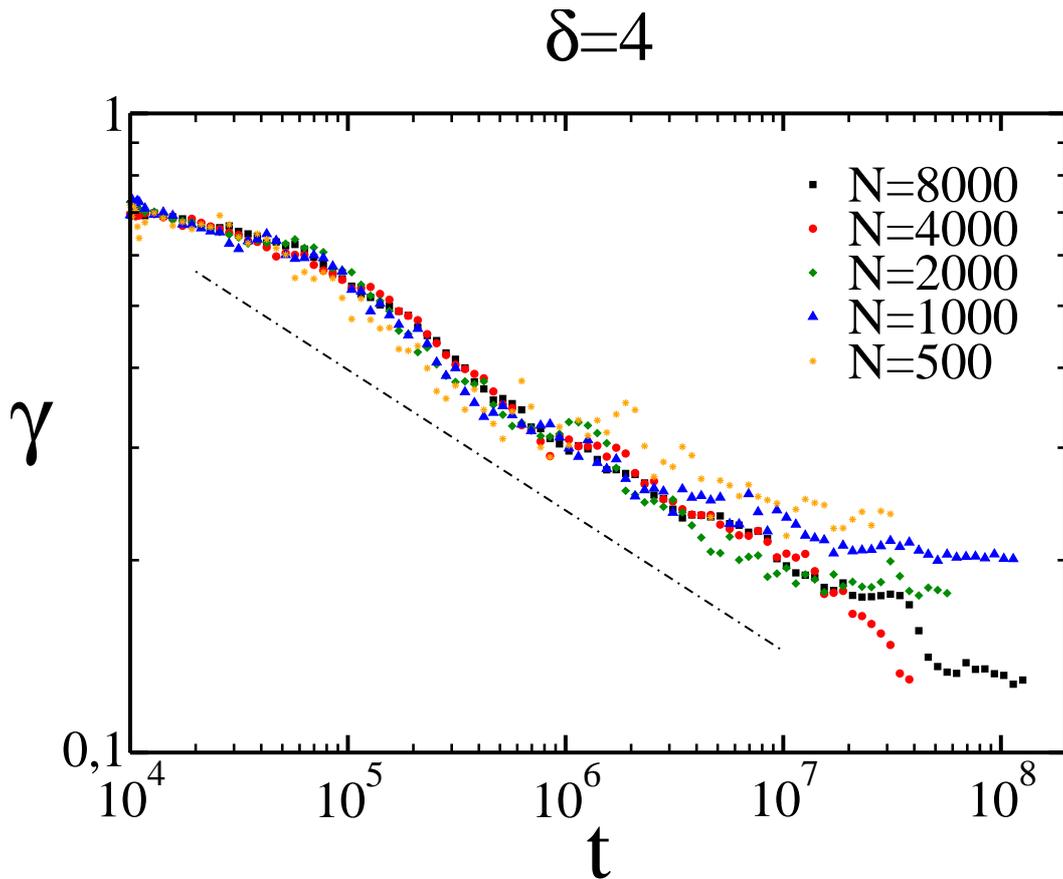


Figura 4.6: Neste gráfico temos  $\gamma \times t$  e  $\delta = 4$ , a reta tracejada indica uma lei de potência de expoente  $\lambda = -0.21$ .

potência com o número de células do sistema,  $N$ . O expoente associado a esta lei de potencia é denominado  $\mu$ , com isso temos  $\gamma^* \sim N^{-\mu}$ , e de acordo com o ajuste realizado no gráfico lateral superior da figura 4.6, seu valor é  $\mu = -0.33$ , que é o mesmo valor obtido na análise da hipótese da adesão diferenciada. No gráfico lateral inferior, da figura 4.6, temos os valores dos tempos de saturação,  $t^*$  para diferentes números de células no sistema,  $N$ . Novamente descrevemos a dependência do tempo de saturação com o número de células por uma lei de potência, denominamos o expoente associado por  $\nu$ , dessa forma temos  $t^* \sim N^\nu$ , o valor obtido para este expoente no ajuste dos pontos é  $\nu = 1.18$ , este valor difere do valor obtido na análise da hipótese da adesão diferenciada, podemos explicar isso pela dificuldade em ler tais valores, já que as curvas da nossa análise da velocidade diferenciada possuem mais variações que aquelas obtidas para adesão diferencial.

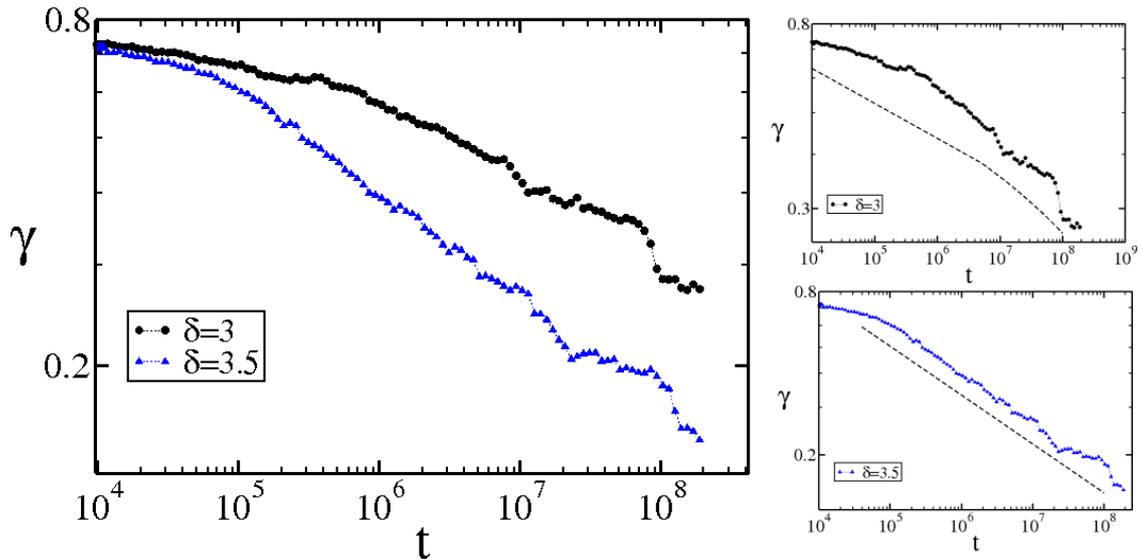


Figura 4.7: Neste gráfico temos  $\gamma \times t$  para diferentes valores de  $\delta$ . Nos gráficos menores mostramos os diferentes regimes de segregação: logarítmico  $\delta = 3$ , ver o ajuste superior, e lei de potência  $\delta = 3.5$  com  $\lambda = -0.18$ , ver o ajuste inferior. Os ajustes foram mostrados deslocados para melhor visualização.

#### 4.1.4 Visualização da Segregação

A figura 4.8 mostra o estado inicial para  $N=8000$  e após um sorteio de posições de células dentro de um círculo. A proporção de três partículas mais rápidas (ciano) para uma mais lenta (vermelha) leva ao valor inicial de  $\gamma = 0.75$ , como pode ser visto na figura 4.6. De fato esse valor se mantém até  $t = 10^4$  (veja figura 4.9) quando é ativada a diferença de velocidades,  $\delta = 4$ . Para  $t = 10^5$  (figura 4.10) nota-se a formação de centros de nucleação, o que corresponde ao início da segregação em forma de lei de potência (figura 4.6). As figuras 4.11 e 4.12 mostram a continuidade do processo de segregação com crescimento por fusão núcleos. E, finalmente, a figura 4.13 mostra o sistema completamente segregado, correspondendo à saturação do parâmetro  $\gamma$  na figura 4.6, neste estado o tecido correspondente a ectoderme não se apresenta em forma circular, pois a velocidade das células que o compõe é muito grande, devido a isto as células da ectoderme estão em uma fase próxima da transição líquida gasosa, gerando as diferenças na forma final do sistema.

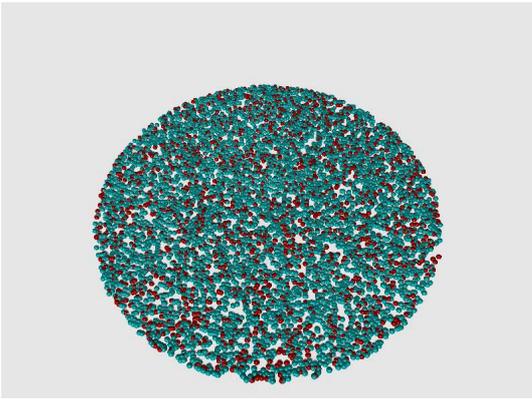


Figura 4.8: Estado inicial.

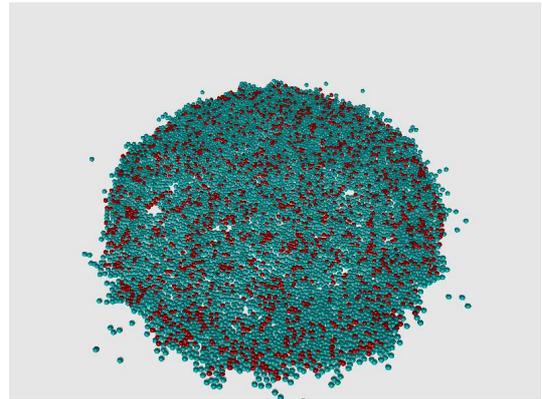


Figura 4.9: Tempo de relaxamento, as células ganham velocidade próprias,  $t=10^4$ .

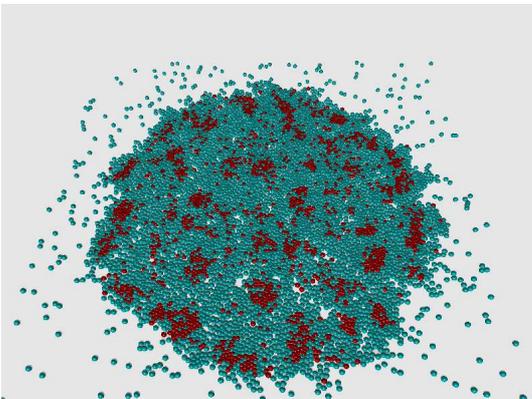


Figura 4.10: Início da segregação,  $t=10^5$

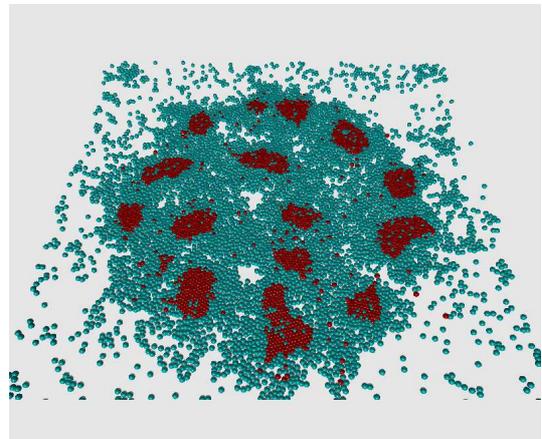


Figura 4.11: Formação de núcleos,  $t=10^6$ .

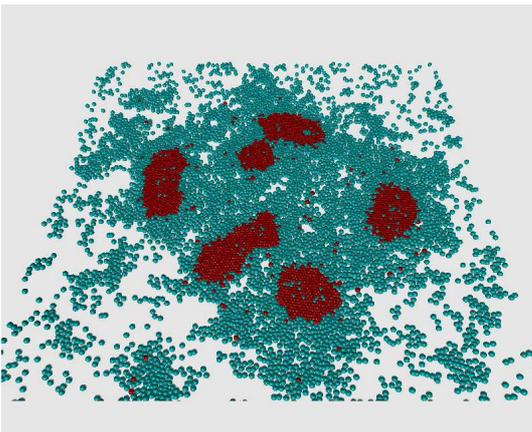


Figura 4.12: Formação dos núcleos maiores,  $t=10^7$ .

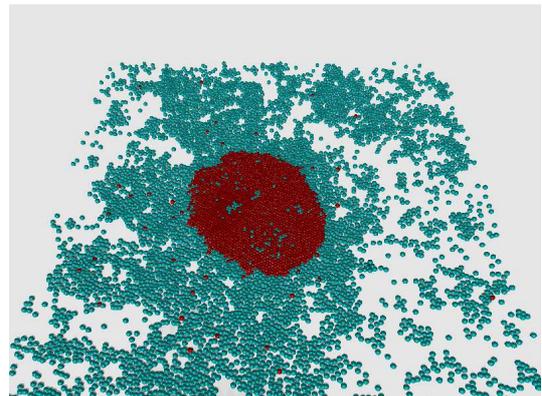


Figura 4.13: Estado final,  $t=10^8$ .

## 4.2 Resultados com Movimento Coordenado

Dentro de certos limites, o termo de movimento coletivo presente no modelo de animóides pode ser compreendido como viscosidade entre células vizinhas, ou seja, as células tendendo

a alinhar sua velocidade com a direção da média das velocidades das vizinhas. Revendo a equação:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \alpha \sum_{j \langle viz \rangle} \vec{v}_j(t) + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right],$$

o primeiro termo à direita da igualdade é o responsável por essa tendência, controlada pelo parâmetro  $\alpha$ . Na presença de movimento coordenado pode haver movimento do centro de massa, chamamos esta fase de movente, esse movimento depende de dois fatores: a intensidade do parâmetro de movimento coordenado ( $\alpha$ ) e a velocidade das células. Porém, nesse trabalho, temos um sistema composto de dois tipos de células que se deslocam com velocidades características distintas. Logo, a análise da transição para o estado movente deve considerar a razão entre essas velocidades. De fato, essa transição pode ocorrer para valores diferentes do parâmetro de movimento coordenado ( $\alpha$ ) nos diferentes tecidos e teremos, então, as seguintes possibilidades:

- i) Ambos tecidos estão na fase não movente, ou seja, o centro de massa das partículas mais lentas e o centro de massa das mais rápidas, em média, não se move.
- ii) O centro de massa das células dos diferentes tecidos têm velocidade média não nula e movem-se da mesma forma mantendo a coesão do sistema.
- iii) O centro de massa das células mais rápidas se move diferentemente do centro de massa das mais lentas, o sistema perde a coesão.

Estudamos somente o primeiro caso, onde não há movimento do centro de massa, pois nos demais casos a eventual segregação que possa ocorrer seria devida a quebra do agregado celular em pedaços. Não estamos interessados neste tipo de separação de tecidos, analisaremos somente casos onde o sistema se mantenha coeso, ver (figuras 4.18 e 4.23).

### 4.2.1 Caso 1

Nesta seção, analisamos os resultados obtidos a partir da primeira adaptação, definida anteriormente, cuja equação da direção da velocidade é:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \alpha \sum_{j \langle viz \rangle} \frac{\vec{v}_j(t)}{v_0} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right] \quad (4.2)$$

onde  $v_0$  é o módulo da velocidade das partículas mais lentas.

Como mencionado na seção 3.2.4, este modelo impõe uma viscosidade dependente do tipo das células vizinhas, pois o termo do somatório das velocidades (termo modulado por  $\alpha$ ) depende da velocidade das células vizinhas mais velozes, que contribuem mais. Dessa forma, todas as células tendem a seguir mais as vizinhas do tipo veloz em comparação com as células do tipo lento.

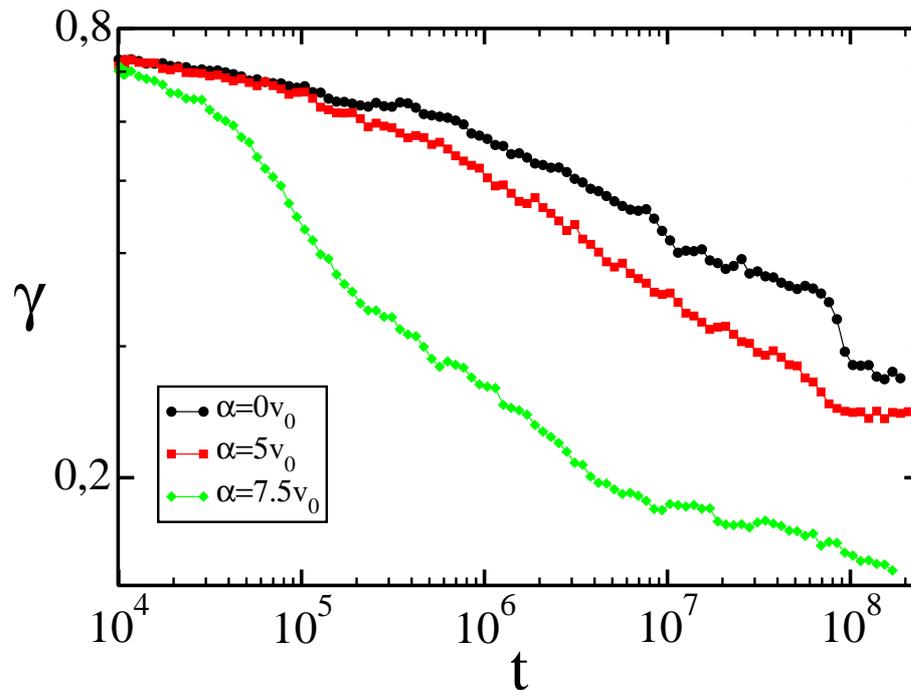


Figura 4.14: Gráfico  $\gamma \times t$ , onde a razão de velocidades é  $\delta = 3$  e o sistema é composto por  $N = 8000$  células. A segregação é logarítmica para  $\alpha \neq 7.5$ , mas neste valor, o tipo de segregação muda pois o sistema perde a coesão.

Concluimos que o movimento coordenado facilita a reorganização dos diferentes tecidos, tanto no caso de segregação logarítmica (ver figura 4.14), quanto nos casos de segregação com lei de potência (ver figura 4.15). No entanto, existe um limite superior para valores de  $\alpha$ , pois se ele for muito intenso (tipicamente  $\alpha > 10$ ) o sistema se parte em pedaços, ou ainda, pode ocorrer transição para a fase movente. Nestes mesmos gráficos (4.14 e 4.15) temos um caso em que o sistema se parte, para  $\alpha = 7.5$ , note como as curvas para este valor do parâmetro de movimento coordenado são qualitativamente diferentes das demais, evoluindo já desde o início da simulação para valores pequenos de  $\gamma$ .

Na figura 4.16 apresentamos as curvas anteriores em um único gráfico, acrescentando resultados para um valor intermediário de  $\delta = 3.5$  e excluindo os casos onde o sistema perde coesão. Assim podemos visualizar claramente as influências dos parâmetros  $\alpha$  e  $\delta$  na segregação, a principal é que ambos os parâmetros aceleram a reorganização dos tecidos, mas existe um valor

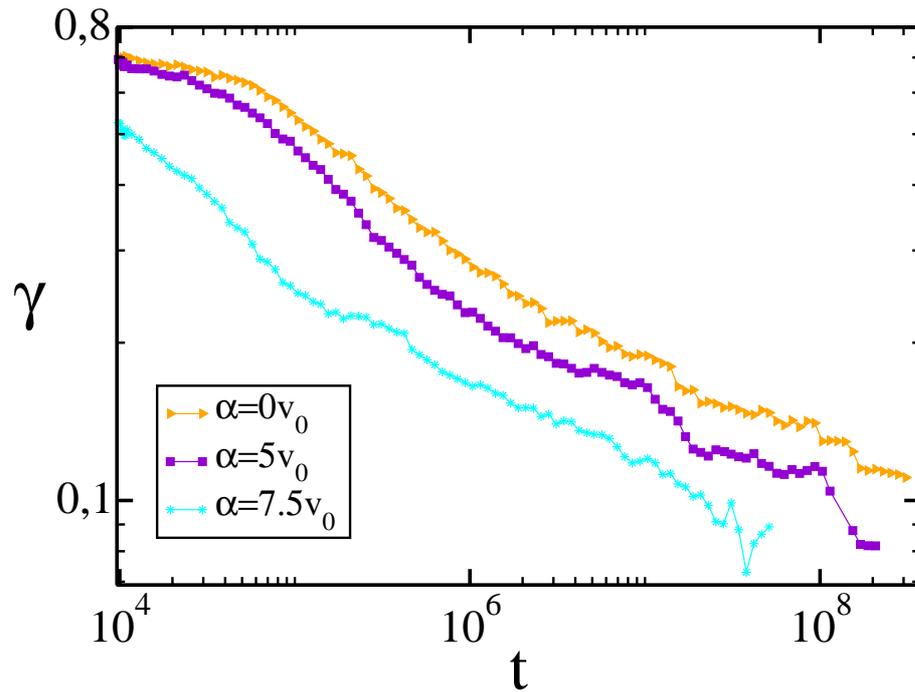


Figura 4.15: Comparação da evolução temporal da segregação para diferentes intensidades do movimento coordenado. A razão de velocidades é  $\delta = 4$ , temos segregação do tipo lei de potência para qualquer dos valores de  $\alpha$  utilizados.

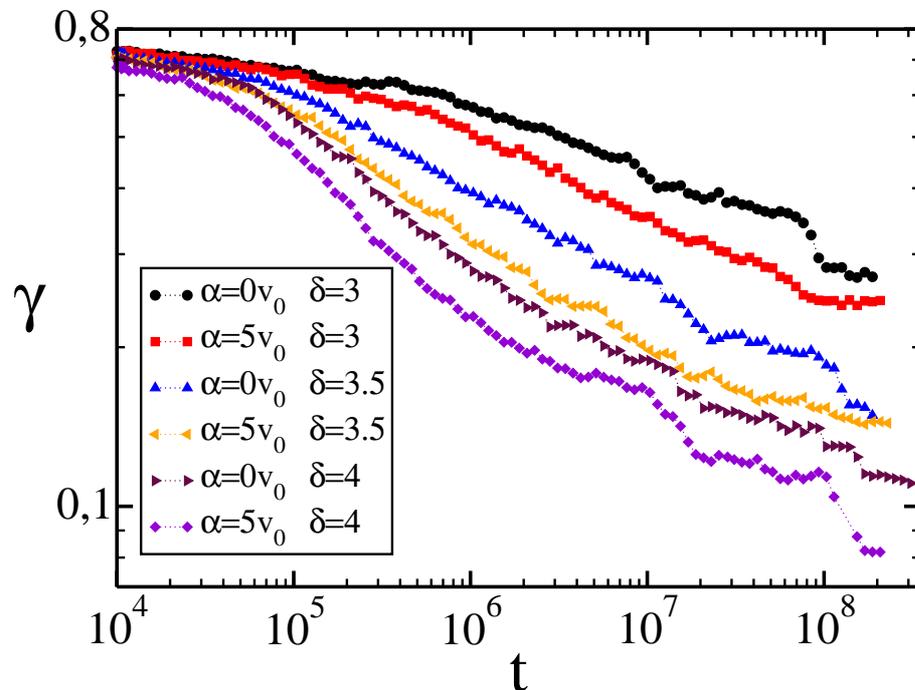


Figura 4.16: Evolução da segregação celular com o tempo variando ambos parâmetros,  $\gamma$  e  $\alpha$ , em combinações destes que tenham separação de tecidos até a saturação e sem perda de coesão.

máximo onde à partir dele o sistema perde a coesão.

A transição entre as fases movente e não movente é indicada pelo parâmetro  $\varphi$ , como definido na equação 3.2. Quando o sistema se encontra na fase não movente esse parâmetro deve ser nulo, o que indica que o movimento das células é browniano. No caso de um sistema finito, com  $N$  partículas, o somatório implícito na definição de  $\varphi$  deve resultar em  $\sqrt{N}$ , pois é equivalente a somar  $N$  vetores aleatórios, as velocidades das células, e de acordo com a definição de  $\varphi$ , este é normalizado.

O valor de  $\varphi$  usado para delimitar a primeira fase é obtido pela intersecção de duas retas, mostradas na figura 4.17, uma de inclinação nula, associada ao valor esperado para as flutuações, como mencionado acima, e outra, com inclinação não nula, ajustando os valores de  $\varphi$  na transição para a fase movente. Um caso típico, para  $\delta = 4$ , é mostrado na figura 4.17. Nessa figura temos duas curvas, a primeira para as partículas mais lentas, apresentando valores de  $\varphi$  mais baixos, e outra, associada as partículas mais rápidas. Repetindo esse procedimento para outros valores de  $\delta$ , construímos um diagrama de fases para o sistema.

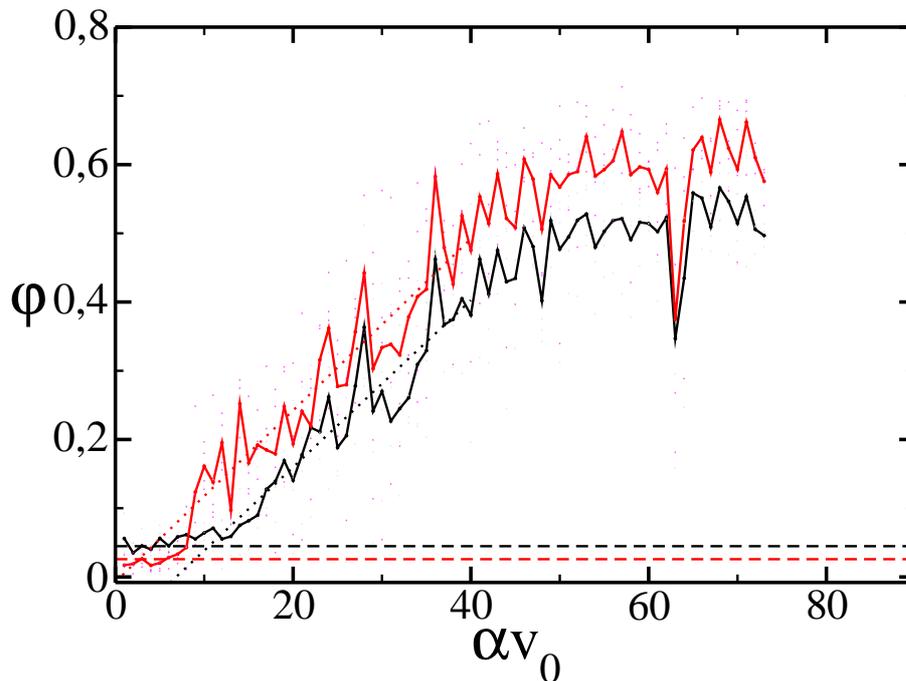


Figura 4.17: Parâmetro de ordem  $\varphi$  versus parâmetro de movimento coordenado  $\alpha$ , para  $\delta = 4$ . A linha preta é associada as células mais lentas; a linha vermelha às células mais rápidas. As linhas tracejadas são os respectivos valores de erro esperados para  $\varphi \sim 0$ . Os pontilhados são os ajustes lineares das respectivas curvas durante a transição.

Para separar a segunda fase da terceira utilizamos as diferenças entre as velocidades associadas ao centro de massa de cada tecido, dessa forma podemos diferenciar o movimento coeso

de todas as células, do movimento dos dois tecidos separados.

No diagrama das fases, (ver fig. 4.18) vemos a separação dos três diferentes regimes de fases moventes (i,ii,iii), lembrando que estamos interessados somente no primeiro regime. As regiões hachuradas do gráfico indicam os tipos de segregação que podemos encontrar: logarítmica e lei de potência. A região densamente hachurada no gráfico é onde a segregação ocorre na forma de lei de potência, a região menos densa é onde ocorre segregação logarítmica e finalmente a região não hachurada indica o conjunto de parâmetros onde não ocorre separação de tecidos.

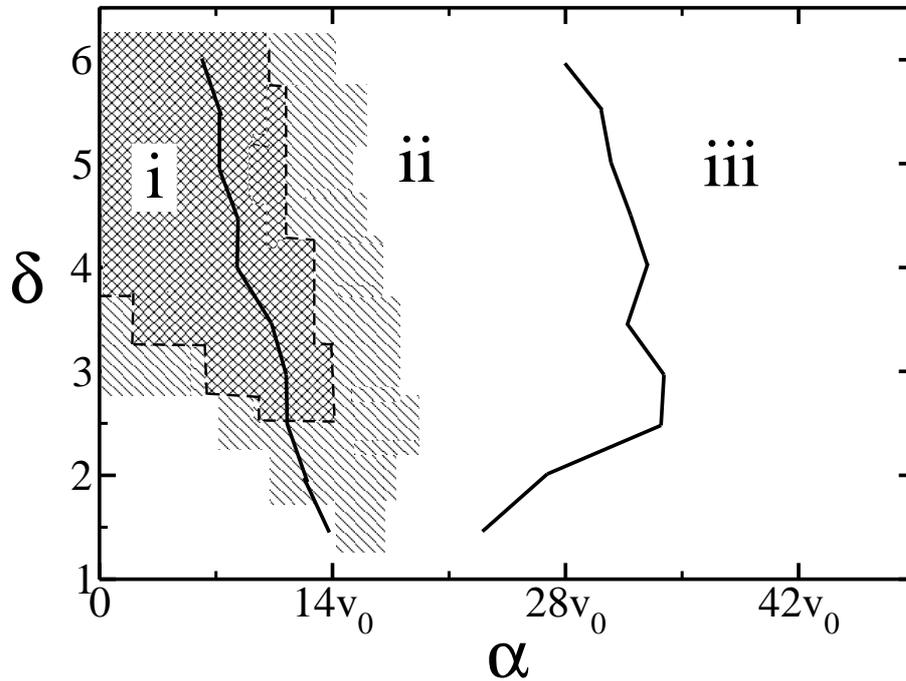


Figura 4.18: Razão de velocidade  $\delta$  versus parâmetro de movimento coordenado  $\alpha$ . As linhas contínuas limitam os diferentes regimes. A região densamente hachurada indica segregação melhor representada por uma lei de potência; a região menos densamente hachurada indica segregação logarítmica; a região não hachurada indica a ausência de reorganização para tais parâmetros.

## 4.2.2 Caso 2

Mostraremos agora os resultados de simulação obtidos a partir da equação 3.7, que denominamos caso 2. Por praticidade reescrevemos abaixo:

$$\theta_i(t + \Delta t) = \arg \left[ \alpha \sum_{j < viz} \frac{\vec{v}_j(t)}{|\vec{v}_i(t)|} + \beta \sum_j \vec{f}_{ij}(t) + \eta \vec{u}_i(t) \right]$$

A figura 4.19 mostra a evolução do parâmetro de segregação,  $\gamma$  para diferentes valores de  $\alpha$  e razão de velocidades fixa em  $\delta = 3$ . Observa-se que diferentemente do caso 1, as curvas estão próximas, umas das outras, até mesmo para os valores do parâmetro de movimento coordenado mais altos,  $\alpha = 7.5$  e  $\alpha = 10$ , isto indica que o sistema mantém a coesão para valores maiores do  $\alpha$  neste caso do que no caso 1.

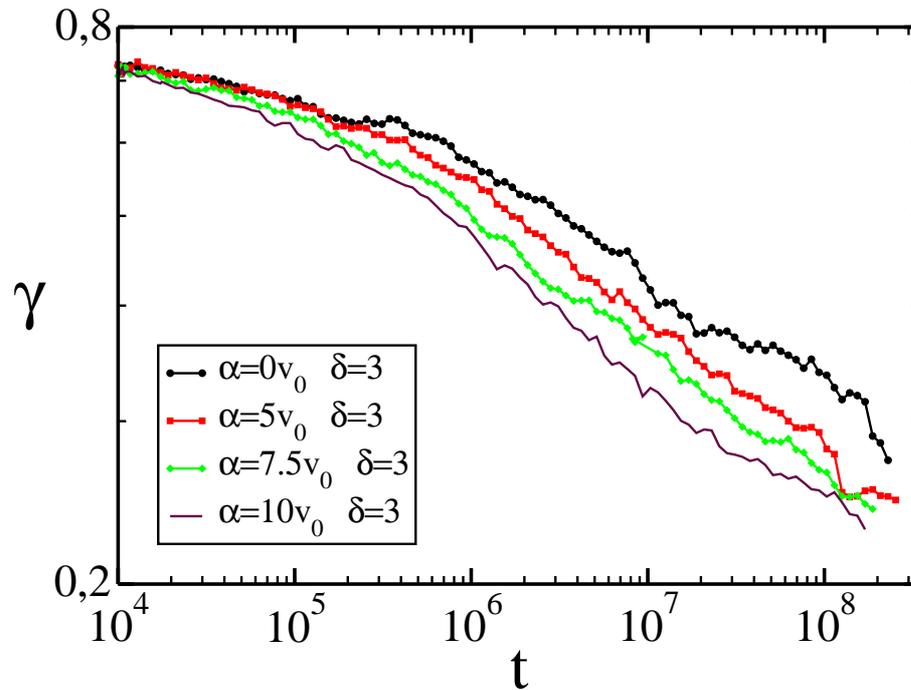


Figura 4.19: Gráfico  $\gamma \times t$ , para  $\delta = 3$  e  $N = 8000$ . Para os valores de  $\alpha = 7.5$  e  $\alpha = 10$ , as curvas são semelhantes as demais indicando que o sistema não perde a coesão.

Na figura 4.20 mostramos a evolução do parâmetro de segregação,  $\gamma$ , para  $\delta = 4$  e diferentes valores do parâmetro de movimento coordenado. A curva correspondente à  $\alpha = 7.5$ , assim como para  $\delta = 3$ , se mantém próxima às demais, ou seja, para  $\delta = 4$  encontramos o mesmo comportamento no caso 2, que é diferente do caso 1. Notamos também a influência do movimento coordenado na segregação celular, com o aumento de  $\alpha$  a reorganização de tecidos é acelerada, para diferentes valores de  $\delta$  (figuras 4.19 e 4.20), novamente só podemos considerar os parâmetros nos quais o sistema se mantenha coeso e na fase não movente.

Assim como fizemos para o caso 1, unimos as curvas de segregação, na figura 4.21, adicionamos as curvas do parâmetro de medida da segregação celular para razão de velocidades  $\delta = 3.5$ . Porém neste caso, temos mais curvas que no caso 1, pois o sistema se mantém coeso para valores maiores do parâmetro de movimento coordenado,  $\alpha$ , dessa forma temos mais valores possíveis para a segregação.

Da mesma forma que para o caso 1, a transição entre as fases movente e não movente é

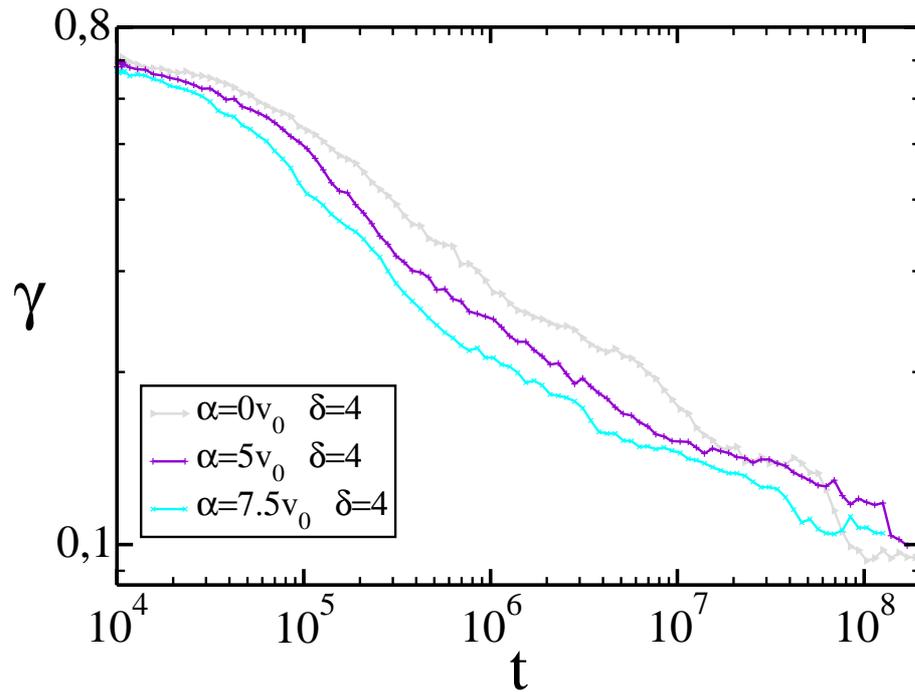


Figura 4.20: Gráfico  $\gamma \times t$ , para  $\delta = 4$  e  $N = 8000$ . Para o valor de  $\alpha = 7.5$ , a curva também é semelhante as demais, indicando a coesão do sistema.

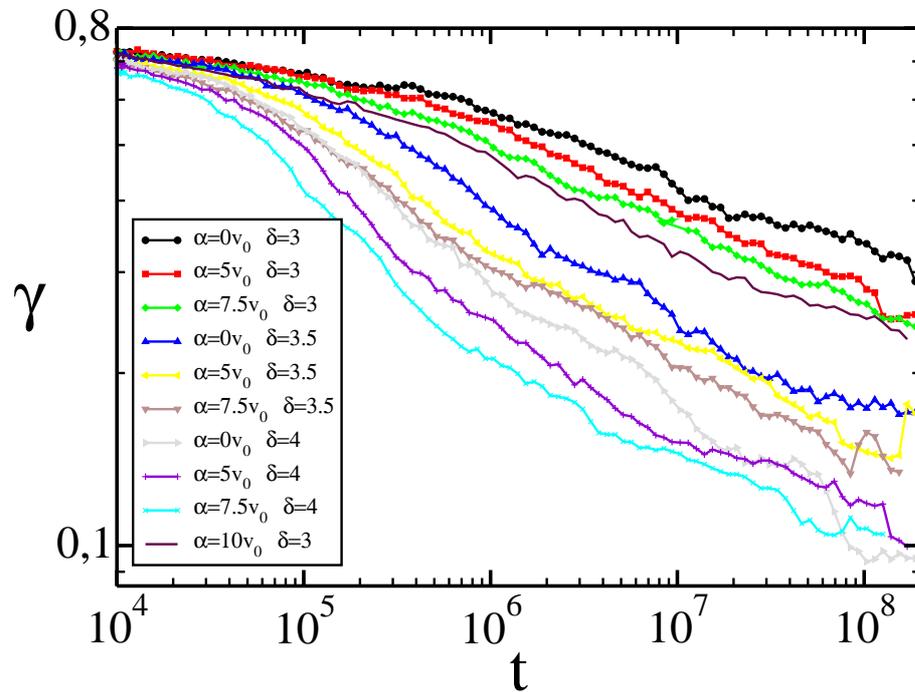


Figura 4.21: Gráfico  $\gamma \times t$ , para  $N = 8000$ . Temos mais curvas que no caso 1, pois o sistema se mantém mais coeso.

indicada pelo parâmetro  $\varphi$ , como já havíamos definido na equação 3.2. De acordo com esta definição, quando o sistema se encontra na fase não movente esse parâmetro deve ser nulo,

indicando que o movimento das células é browniano. Porém, no caso de um sistema finito, com  $N$  partículas, o somatório implícito na definição de  $\phi$  deve resultar em  $\sqrt{N}$ , pois é equivalente a somar  $N$  vetores aleatórios, as velocidades das células, e  $\phi$  este é normalizado em relação às velocidades e ao número de células.

Utilizamos o mesmo método que no caso 1, para determinar o valor de  $\phi$  usado para delimitar a primeira fase, ou seja, este valor é obtido pela intersecção de duas retas, mostradas na figura 4.22, uma de inclinação nula, associada ao valor esperado para as flutuações, como mencionado acima, e outra, com inclinação não nula, ajustando os valores de  $\phi$  na transição para a fase movente. Um caso típico, para  $\delta = 4$ , é mostrado na figura 4.22. Nessa figura temos duas curvas, uma para as células lentas e outra para as células rápidas. No caso 2 obtivemos valores diferentes do caso 1, os valores de  $\phi$  associados às partículas mais lentas é maior. Este fato é resultado direto da definição deste caso, pois o termo de movimento coordenado é maior para as células mais lentas, do que para as mais rápidas. Repetindo esse procedimento para outros valores de  $\delta$ , construímos um diagrama de fases para o sistema.

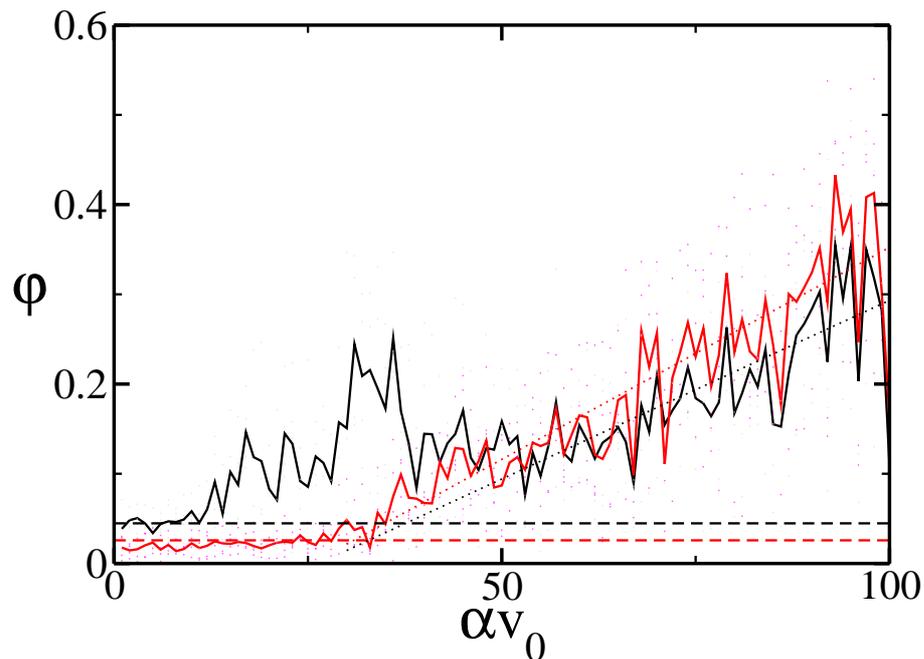


Figura 4.22: Parâmetro de ordem  $\phi$  versus parâmetro de movimento coordenado  $\alpha$ . As curvas vermelhas são referentes as células mais rápidas; as curvas pretas são referentes as células mais lentas. As linhas tracejadas são os valores esperados para o erro em  $\phi$  nulo. As linhas pontilhadas são os ajustes lineares dos valores de  $\phi$  na transição.

Como no Caso 1 utilizamos as diferenças de velocidade do centro de massa de cada tecido como elemento discriminador.

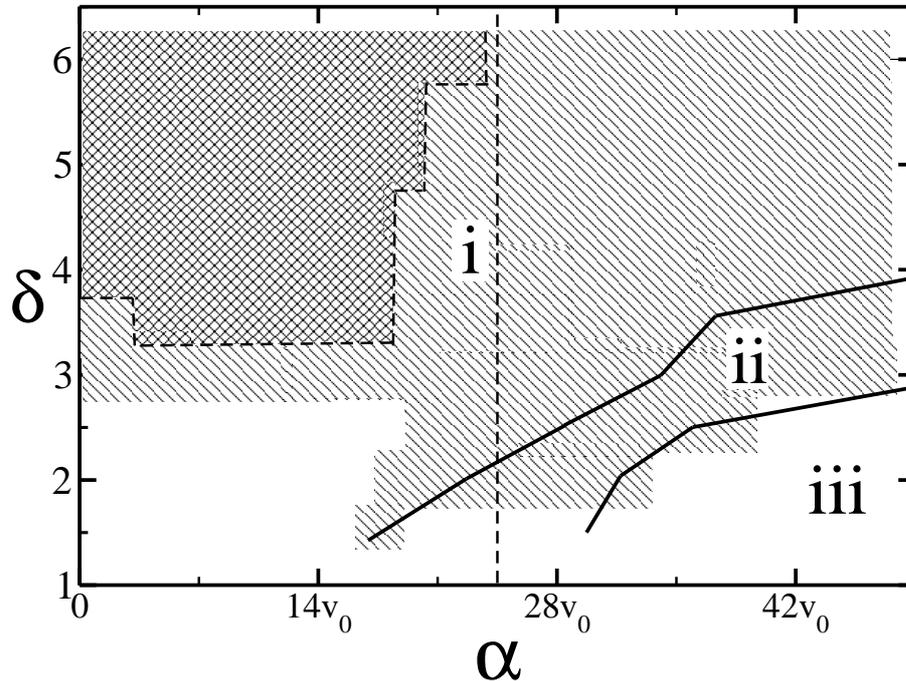


Figura 4.23: Razão de velocidade versus parâmetro de movimento coordenado. A região densamente hachurada representa a segregação compatível com lei de potência; a região menos densamente hachurada representa a segregação compatível com logarítmica; a região não hachurada representa a ausência de reorganização de tecidos para tais parâmetros. As linhas contínuas são as separações entre os regimes i, ii e iii. O pontilhado vertical é aproximadamente o valor de  $\alpha$  para o qual o sistema perde a coesão.

No diagrama das fases, (ver fig. 4.23) vemos a separação dos três diferentes regimes de fases moventes (i,ii,iii). As regiões hachuradas do gráfico indicam os tipos de segregação que podemos encontrar: logarítmica e lei de potência. A região mais densa do gráfico é onde a segregação tem forma de lei de potência; a região menos densa é onde ocorre segregação logarítmica; a região não hachurada é onde não ocorre reorganização de tecidos. Neste caso a limitação do parâmetro  $\varphi$  é mais clara que no caso 1. A transição (i  $\rightarrow$  ii) ocorre para valores de  $\alpha$  altos, mas o sistema já perdeu a coesão para valores de  $\alpha$  entre  $[20, 30]$ , podemos ver nas figuras 4.25 e 4.24 que para  $\alpha = 20$  o sistema manteve a coesão e para  $\alpha = 30$  o sistema se parte em pedaços, o parâmetro de ordem,  $\varphi$ , não diferencia estes dois casos. Este valor de  $\alpha$  é maior do que o valor de perda de coesão do caso 1, onde esta ocorria aproximadamente junto da transição (i  $\rightarrow$  ii).

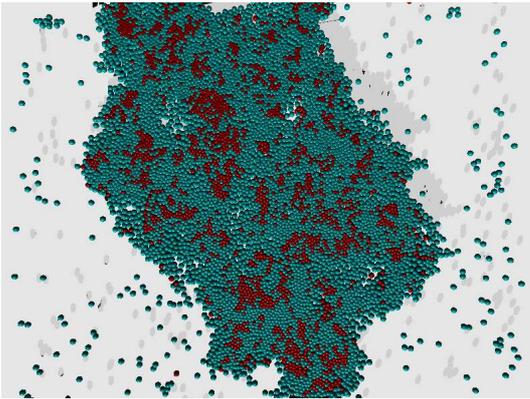


Figura 4.24: Imagem do sistema para  $\delta = 3$  e  $\alpha = 20$ , note que o sistema se mantém coeso, e esta na fase i.

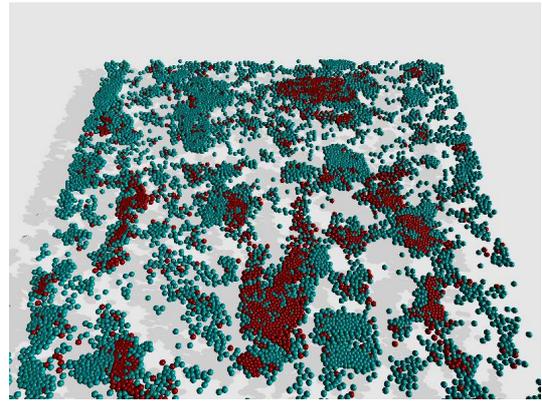


Figura 4.25: Imagem do sistema para  $\delta = 3$  e  $\alpha = 30$ , note que o sistema perdeu a coesão completamente, apesar de estar na fase i.

### 4.2.3 Comparação Final ente Casos 1 e 2

As diferenças na segregação celular comparando os casos 1 e 2 podem ser visualizadas nos gráficos a seguir (ver figuras 4.26, 4.27, 4.28). Vemos que no caso de segregação logarítmica,  $\delta = 3$ , mostrado na figura 4.26, as curvas de segregação do caso 2 se mantêm bastante próximas, quando comparadas às curvas do caso 1. Com isso concluímos que o aumento do movimento coordenado influencia mais a evolução temporal da separação de tecidos no caso 1 que no caso 2.

Neste mesmo gráfico (figura 4.26) temos uma curva um tanto deslocada das demais, ela descreve a evolução temporal do parâmetro de segregação para o caso onde a ectoderme perde completamente a coesão. Essa é outra grande diferença entre os modelos, no caso 2 este mesmo conjunto de parâmetros não leva o sistema se partir. Essas diferenças de comportamento na separação de tecidos podem ser confirmadas nos espaços de fases dos casos 1 e 2. Vemos também que nos demais gráficos (figuras 4.27 e 4.28) ocorrem também curvas deslocadas das demais (para  $\alpha = 7.5$ ) correspondendo à perda de coesão da ectoderme.

Finalmente comparamos os casos 1 e 2 no que se refere à transição para o regime movente, medida pelo parâmetro  $\varphi$ . Temos diferenças notórias para o valor do parâmetro de ordem quando se varia o parâmetro de movimento coordenado,  $\alpha$ , ver figuras 4.17 e 4.22. No caso 1 a transição para a fase movente se inicia para valores menores do parâmetro de movimento coordenado do que para o caso 2, o que mostra a maior contribuição de  $\alpha$  na dinâmica do caso 1, estas diferenças influenciam também a evolução da medida de segregação,  $\gamma$ . A diferença de valores de  $\alpha$  onde ocorre a transição de fases (não movente para movente), pode ser visualizada nos espaços de fases dos dois casos, ver figuras 4.18 e 4.23, onde mostramos as transições entre

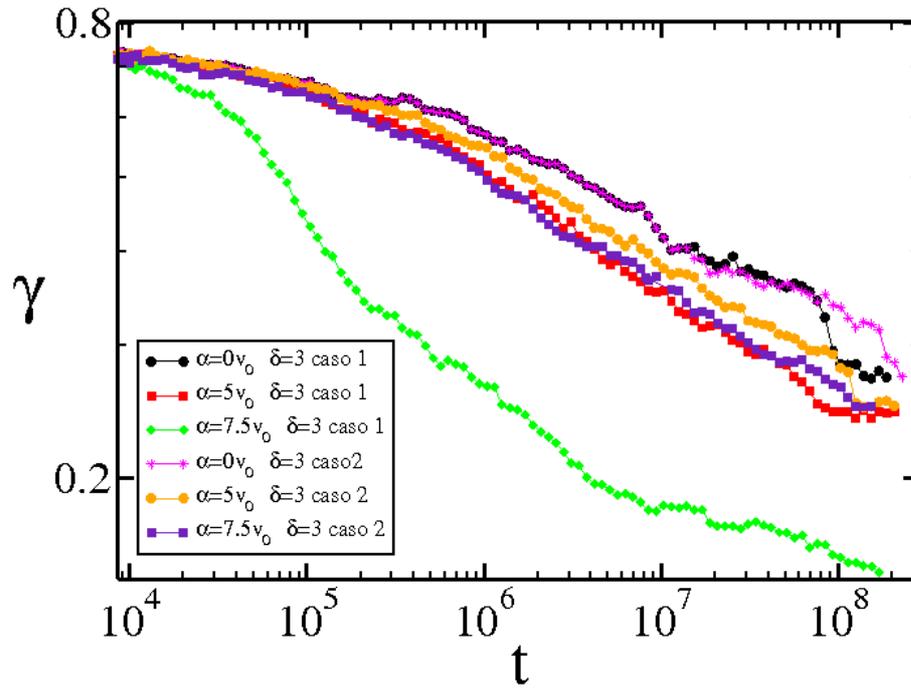


Figura 4.26: Evolução temporal da segregação para os casos 1 e 2. Para razão de velocidades,  $\delta = 3$ .

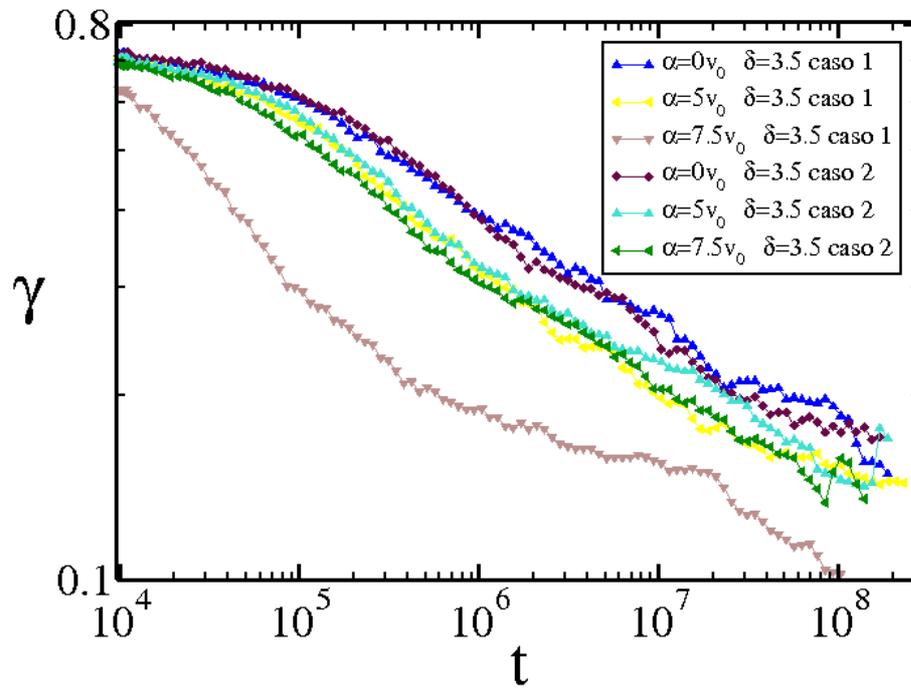


Figura 4.27: Evolução temporal da segregação para os casos 1 e 2. Para razão de velocidades,  $\delta = 3.5$ .

os regimes(i, ii e iii), vemos que estes espaços de fase são bastante distintos.

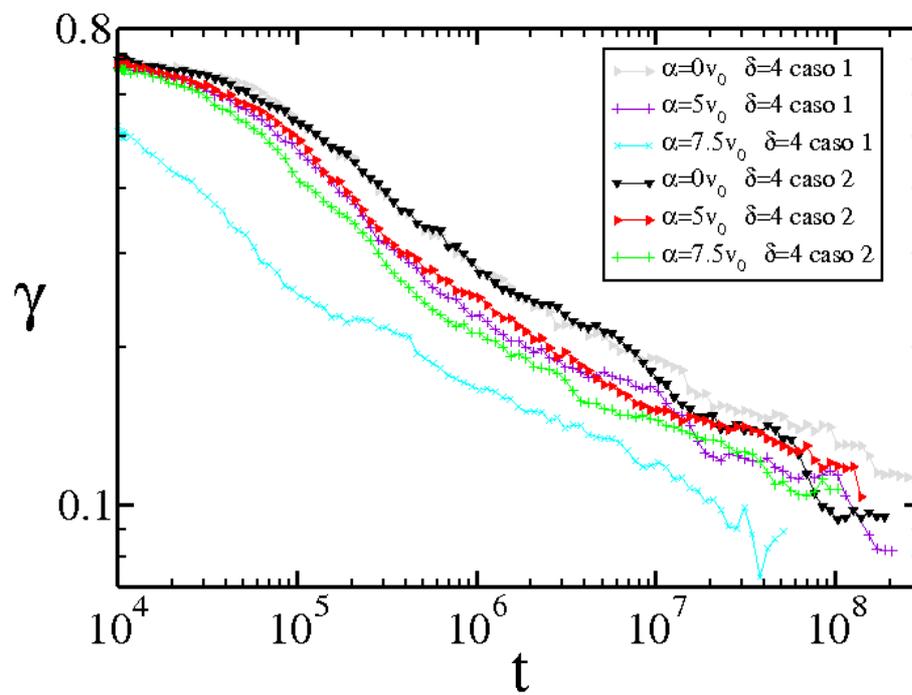


Figura 4.28: Evolução temporal da segregação para os casos 1 e 2. Para razão de velocidades,  $\delta = 4$ .

## 5 *Conclusões*

Analizamos o problema da reorganização celular na ausência de transformação citológica e quimiotaxia, chamada segregação celular. Este processo pode ocorrer em alguns seres vivos simples, como hidras e esponjas. Para explicar como as células deste tipo de animal podem migrar para posições adequadas dentro do agregado celular existem algumas hipóteses, dentre elas: a adesão diferenciada, a velocidade diferenciada e a quimiotaxia. Cada uma delas atribui a reorganização de tecidos a características celulares que podem ser modeladas por variáveis físicas (adesão diferenciada e velocidade diferenciada), ou químicas (quimiotaxia).

A hipótese de velocidade diferenciada atribui a reorganização de tecidos a diferenças na motilidade celular. Ela foi proposta por Jones et al. [10] que realizaram um experimento com três tipos de tecidos. De acordo esse experimento as células com maior motilidade terminam por ocupar o centro do agregado. Esses resultados foram explicados lançando-se mão de um segundo mecanismo: o reconhecimento celular. É provável que este argumento tenha sido usado porque o resultado encontrado era não intuitivo. De fato, referências posteriores a esse trabalho [14] citam-no sugerindo que teria sido encontrado o resultado oposto: as células mais lentas formariam o centro do agregado. Com intuito de explorar as possibilidades presentes nessa hipótese, simulamos neste trabalho o mecanismo de velocidade diferenciada sem qualquer hipótese adicional.

As simulações são feitas utilizando-se o modelo de animóides, com as adaptações de Vicsek e Grégoire. Ou seja, as partículas tem posições e velocidades descritas por variáveis contínuas e movem-se com passo fixo característico de cada tipo de célula. A nova posição para uma célula é obtida considerando-se as forças advindas das células vizinhas. Essas forças são compostas por termos de adesão e volume. Também leva-se em conta no cálculo da força a direção da velocidade das células vizinhas, representada pelo termo de movimento coordenado. Por último, temos o ruído, que é a parte aleatória associada às flutuações da membrana.

Como o movimento coordenado depende diretamente da velocidade e queremos incluir diferenças de velocidade entre as células, ficamos frente a duas possibilidades: i) Caso 1: nor-

malizar o termo de movimento coordenado pela velocidade das partículas mais lentas; ii) Caso 2: dividir o parâmetro de movimento coordenado pelo módulo da velocidade da partícula em questão. Com essas variantes estudamos os casos em que ocorre a segregação celular, mas limitamos os parâmetros de forma que o sistema não possuísse movimento do centro de massa e nem se partisse em pedaços.

Os primeiros resultados mostram que, para uma distribuição aleatória não circular de posições iniciais de células, o sistema se arredonda após um tempo transitório curto, isso possibilitou o uso de configurações iniciais já circulares. Também encontramos uma proporção adequada de partículas mais difusivas para as menos difusivas que facilita a segregação. É necessário termos mais partículas rápidas, pois estas podem se separar do agregado durante a segregação, restando em alguns casos poucas destas células.

A conclusão mais importante do trabalho é que somente com velocidade diferenciada obtivemos segregação celular e que esta tem como configuração final as células mais lentas no interior com as mais rápidas ao redor. Sabendo disso percorremos o espaço de parâmetros com o intuito de verificar em que regiões ocorrem reorganizações de tecidos. Inicialmente, simulamos a evolução do sistema sem movimento coordenado e encontramos os valores de  $\delta$  onde ocorre reorganização de tecidos. Esta segregação pode evoluir de duas maneiras: i) logarítmica: encontrada para razão de motilidades celulares em torno de três; ii) lei de potência: quando a razão de motilidades é maior que três e meio. É importante salientar que, no caso em que encontramos uma lei de potência, o expoente é  $\lambda \sim -0.2$ , o mesmo obtido na análise numérica da hipótese da adesão diferenciada quando simulada pelo modelo de animóides [9].

A segregação depende também do movimento coordenado pois ele facilita a separação dos tecidos. Por outro lado, valores excessivos deste parâmetro pode fazer a hidra se partir em pedaços. Nos dois casos estudados obtivemos resultados distintos:

1. **Caso 1:** a segregação obtida depende fortemente do parâmetro de movimento coordenado,  $\alpha$ . O aumento deste parâmetro faz com que a segregação ocorra mais rapidamente, porém para valores relativamente baixos,  $\alpha \sim 7$ , ocorre a perda de coesão do sistema.
2. **Caso 2:** a segregação depende fracamente do parâmetro de movimento coordenado. Para a mesma razão entre velocidades as curvas de segregação para diferentes valores de  $\alpha$  aparecem próximas umas das outras. Além disso, o sistema se mantém coeso para valores do parâmetro de movimento coordenado maiores que para o Caso 1.

Outra conclusão importante é obtida analisando-se os gráficos que varrem o espaço de parâmetros em cada caso. Verifica-se que em ambos modelos a segregação ocorre para uma

extensa faixa dos parâmetros  $\alpha$  e  $\delta$ , caracterizando um processo robusto. A diferença que aparece entre os dois modelos é que os valores de  $\alpha$  para os quais o sistema troca de fase (i→ii, ou, ii→iii) são bastantes distintos em cada caso. Além disso, como pode ser inspecionado visualmente, no Caso 1 o sistema perde a coesão logo após a passagem para a fase movente (ii), enquanto que no Caso 2, a perda de coesão ocorre ainda na fase i.

Estas conclusões já são suficientes para afirmarmos que a velocidade diferenciada é um mecanismo gerador de segregação celular, isto não implica que este seja o único mecanismo, de fato, pelas altas razões de velocidades que geram separação de tecidos, mesmo nos casos com movimento coletivo, podemos supor que este mecanismo não vai ser encontrado sozinho em seres vivos, o mais provável é ser encontrado com outros mecanismos tais como adesão diferenciada e fatores de reconhecimento celular.

No trabalho de Jones[10], onde o mecanismo da velocidade diferenciada é explorado experimentalmente, obtém-se que as células mais difusivas migram para o interior do agregado celular, o que contraria nossos resultados numéricos. Note que para explicar essa configuração final, os autores não utilizam somente a hipótese da velocidade diferenciada, mas afirmam que as células possuem algum meio de reconhecimento que as permitam, quando em contato, distinguir entre células do mesmo tipo e de outro tipo, para então separar os tecidos. É importante salientar que Jones et al. não mediram nesse trabalho as diferenças de adesão entre os três tipos de células.

Pode-se entender a necessidade de Jones et al. de adicionar o mecanismo de reconhecimento se levarmos em consideração a visão termodinâmica que norteou os trabalhos iniciais nessa área. Esse ponto de vista foi proposto por Steinberg[3] e associa aos diferentes tecidos tensões superficiais e minimização de energia como em líquidos imiscíveis. Dentro desse quadro espera-se que as células com maior motilidade apresentem menor tensão superficial, o que as levaria para o exterior em uma mistura com outras mais lentas. Cabe ainda citar como curiosidade que em seu trabalho de revisão, Steinberg[14] cita o trabalho de Jones invertendo o resultado.

Ainda dentro da visão termodinâmica do processo de segregação, deve-se mencionar que esperava-se também encontrar hierarquização entre os tecidos. No entanto, dentro da hipótese de velocidade diferenciada não encontramos, até o momento, configuração de parâmetros que gerasse a esperada hierarquia. A diferença de velocidades  $\delta$  a partir da qual encontramos segregação é muito grande e um terceiro tecido apresentar-se-ia praticamente como um gás.

Como perspectivas de trabalhos futuros, podemos considerar a possibilidade desta inversão do padrão final, em comparação com o que obtivemos, se assim como Jones, utilizarmos um

mecanismo de reconhecimento das células. Por exemplo, podemos impor que células iguais permanecem juntas após entrarem em contato. Com isso talvez consigamos os mesmos padrões finais obtidos por Jones. É claro que ao aplicarmos estes, ou qualquer outro tipo de mecanismo de reconhecimento, não estamos mais explorando a velocidade diferenciada propriamente dita e sim combinações de mecanismos.

Para se determinar efetivamente a validade da hipótese de velocidade diferenciada e a existência (ou não) de um fator de reconhecimento, teríamos que realizar um experimento de medida de motilidade celular em uma configuração onde a diferença de adesão entre as células fosse mínima.

Por último devemos citar que resta ainda desvendarmos as origens dos dois regimes de segregação celular (logarítmica e lei de potência). Para explorar melhor esse tema planejamos analisar o movimento de agregados de diferentes tamanhos, pois, como verificamos ao longo desse trabalho e dos trabalhos de Belmonte[9, 18], apesar de sabermos que a segregação ocorre por fusão de agregados, não temos claro que fatores presentes nesse processo determinam um regime ou outro.

## *Referências Bibliográficas*

- [1] P. Schiefferdecker Z. Wiss. Mikr., **3**, 483-484 (1886).
- [2] A. Moscona, Exp. Cell Res. **3**, 535–539, (1952).
- [3] M.S. Steinberg, Science **141** 401 (1963).
- [4] Verônica Grienisen, "Estudo do estabelecimento de configurações em estruturas celulares", dissertação apresentada em 09/11/2004 no IF-UFRGS. Orientação: Rita M. C. de Almeida.
- [5] J. C. Mombach, J. A. Glazier, R. C. Raphael, M. Zajac, Phys. Rev. Lett. **75** 11 (1995).
- [6] J.P. Rieu, C. Barentin, S. Sawai, Y. Maeda e Y. Sawada, J Biological Physics **30** (2004) 345.
- [7] J. Holtfreter, Rev. Can. Bio.,**3**, 220-250 (1944).
- [8] F. Graner and J. Glazier, Phys. Rev. Lett. **69** 2013 (1992).
- [9] J Belmonte, L G Brunnet, G L Thomas, Rita Almeida, H. Chaté, Phys. Rev. Lett., **100** (2008) 248702.
- [10] B. M. Jones, P. M. Evans, D. A. Lee Exp. Cel. Res.,**180**, 287-296 (1989).
- [11] M. J. Ratcliff, Isis **95** 255 (2004)
- [12] V. H. Wilson, J. Exp. Zool., **5**, 245-258 (1907).
- [13] A. M. Turing. Phil. Trans. Roy. Soc. London, **237**, 37-72 (1952).
- [14] M.S. Steinberg, Developmental Biology **180** 377 (1996).
- [15] S. F. Gilbert (editor), *Developmental Biology*, publicado por Sinauer Associates Inc., (1997).
- [16] W. F. Loomis, Phys. Rev. Lett., **83** 6 (1999).
- [17] C. W. Reynolds 21(4)(Seggraph'87 Conference Proceedings), 25-34, (1987).
- [18] Júlio Belmonte,"Aplicação do modelo de animódes à segregação celular", dissertação apresentada 25/06/2007 no IF-UFRGS. Orientação: Gilberto L Thomas.
- [19] T. Vicsek, A. Czirók, E. Ben-Jacob, I. Cohen and O. Shochet, Phys. Rev. Lett. **75**, 1226 (1995).
- [20] C. Huepe and M. Aldana, Phys. Rev. Lett. **92**, 168701 2004.

- [21] M. Nagy, I. Daruka and T. Vicsek, **373** 445 (2007)
- [22] G. Baglietto and E.V. Albano, Phys. Rev. E, **80**, 50103 (2009).
- [23] H. Chaté, F. Ginelli, F. Raynaud, Phys. Rev. E **77** 1 (2008).
- [24] G. Grégoire, H. Chaté and Y. Tu, Physica D **181**,157 (2003).
- [25] B. Szabó, G. L. Szöllöski, B. Gönei, Z. Jurányi, D. Selmeczi, T. Vicsek, Phys. Rev. E **74** 061908 (2006).
- [26] J. D. Van der Waals, D. "The Equation of State for Gases and Liquids", Nobel Lecture, December 12 (1910).
- [27] C. Scherer, Métodos Computacionais da Física (2005)