

HERMAN FIALHO FUMIÃ

UM MODELO MULTIESCALA PARA A
CARCINOGENESE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F976u Fumiã, Herman Fialho, 1986-
2015 Um modelo multiescala para a carcinogênese / Herman
Fialho Fumiã. - Viçosa, MG, 2015.
x, 164f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador : Marcelo Lobato Martins.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.154-164.

1. Biofísica. 2. Câncer. 3. Expressão gênica. 4. Modelos
computacionais. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Física. Programa de Pós-graduação em
Física. II. Título.

CDD 22. ed. 570.4

HERMAN FIALHO FUMIÃ

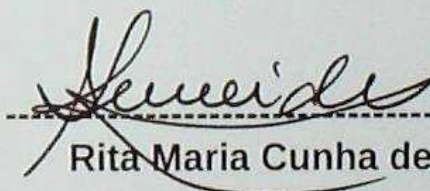
UM MODELO MULTIESCALA PARA A CARCINOGENESE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

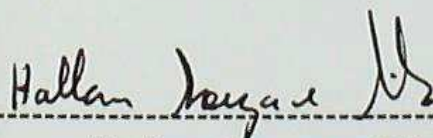
APROVADA: 02 de junho de 2015.




Carmen Pimentel Cintra do Prado



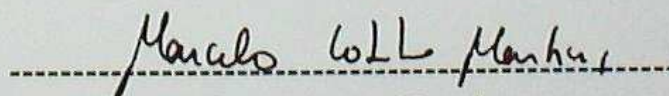
Rita Maria Cunha de Almeida



Hallan Souza e Silva



Letícia Ribeiro de Paiva



Marcelo Lobato Martins
(Orientador)

“Alea iacta est”

Júlio Cesar, às margens do Rubicão.

Agradecimentos

À minha família. Aos meus pais, Ronei e Joana, e à minha irmã, Agatha, pelo amor e apoio incondicionais durante todos esses anos de estudo. Finalmente, volto para casa.

Ao orientador. Ao Prof. Marcelo, cuja visão privilegiada da Física da Vida tornaram esse trabalho possível.

Aos amigos. Aos meus amigos Davidson, Fábio (vulgo Baiano), Gabriel, Glaubert, Renan, Saulo, e Thiago.

À CAPES. Pelos quatro anos de bolsa.

Sumário

Resumo	vii
Abstract	ix
1 Introdução	1
2 A Biologia do Câncer	3
2.1 O que é o câncer?	3
2.2 Câncer: uma doença de origem genética	4
2.3 A carcinogênese	6
2.3.1 As capacidades adquiridas pelo câncer	8
2.3.1.1 Autossuficiência em fatores de crescimento	9
2.3.1.2 Insensibilidade a fatores inibidores de crescimento	10
2.3.1.3 Evasão da apoptose	10
2.3.1.4 Potencial replicativo ilimitado	13
2.3.1.5 Angiogênese sustentada	15
2.3.1.6 Invasão dos tecidos e metástase	16
3 Redes Booleanas: Modelando a Regulação Gênica	17
3.1 A regulação gênica	17
3.2 Modelando redes genéticas	18
3.3 Redes booleanas	19
3.3.1 Regras canalizadoras	21
3.3.2 Regras do tipo limiar	23
3.4 A dinâmica dos modelos booleanos	24
3.4.1 Os atratores	24
3.4.2 As células “funcionam” nos atratores	25
3.5 Considerações finais	27

4	Um Modelo de Rede Booleana para as Rotas do Câncer	28
4.1	A construção da rede	28
4.1.1	A caracterização da rede	30
4.2	Propondo uma dinâmica para a regulação	32
4.2.1	Os atratores	33
4.2.2	Os fenótipos celulares	34
4.2.3	As escolhas dos pesos e limiares da regra de atualização	36
4.3	Os resultados	38
4.3.1	A célula normal	38
4.3.2	As mutações	41
4.3.2.1	Condição ambiental (00100)	41
4.3.2.2	Condição ambiental (00101)	42
4.3.2.3	Quando os sensores de integridade não estão funcionais	43
4.4	Mutações <i>driver</i> e a topologia	45
4.5	A carcinogênese colorretal	47
4.6	A terapia molecularmente direcionada	50
4.7	Discussão e conclusão	53
5	O Modelo Multiescala para a Carcinogênese	57
5.1	Introdução	57
5.2	O modelo	60
5.2.1	O tecido	60
5.2.2	As populações celulares: células vivas são redes	61
5.2.3	As populações celulares divididas por fenótipos	62
5.2.4	As substâncias químicas e as condições ambientais	63
5.2.4.1	Equações de difusão	63
5.2.4.2	Equações locais	65
5.2.5	As condições ambientais	68
5.2.6	A dinâmica das populações	70
5.2.7	Algoritmo da simulação	74
5.2.8	Estimativa dos valores dos parâmetros	75
5.2.8.1	Nutrientes, oxigênio, H^+	75
5.2.8.2	Fatores parácrinos	78
5.2.8.3	Outras considerações sobre os parâmetros	80
5.3	Resultados	80
5.3.1	A dinâmica de crescimento	83
5.3.1.1	Esquema I	88
5.3.1.2	Os Esquemas II e III	95
5.3.2	A frequência das mutações	97
5.3.2.1	Características metabólicas <i>versus</i> mutações	98
5.3.3	Oxigênio, nutrientes, e H^+	101
5.3.4	Os fatores parácrinos	105
5.3.5	Células glicolíticas permanentes	112

5.4	Discussão e conclusão	114
6	Conclusão e Perspectivas Futuras	120
A	Complemento ao Capítulo 4	122
A.1	Rotas de Sinalização	122
A.2	Propriedades Topológicas	125
A.2.1	Conectividade	126
A.2.2	Distribuição de conectividade	126
A.2.3	Coefficiente de aglomeração	127
A.2.4	Menor caminho médio	128
A.3	Valores dos parâmetros utilizados	129
B	Complemento ao Capítulo 5	131
B.1	Propriedades topológicas da rede	131
B.2	As rotas de sinalização	131
B.3	Novos fenótipos	140
B.4	Limiares e pesos para a nova rede	140
B.5	Mutações <i>drivers</i> na nova rede	144
B.5.1	Normoxia: condição (00100)	144
B.5.1.1	Sensores funcionais	144
B.5.1.2	Sensores avariados	144
B.5.2	Hipóxia: condição (00101)	147
B.5.2.1	Sensores funcionais	147
B.5.2.2	Sensores avariados	149
B.6	Espaço dos fenótipos	152
	Referências Bibliográficas	154

Resumo

FUMIÃ, Herman Fialho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2015. **Um modelo multiescala para a carcinogênese.** Orientador: Marcelo Lobato Martins. Coorientadores: Sílvio da Costa Ferreira Júnior e Márcio Santos Rocha.

Nesta tese de doutoramento, desenvolvemos um modelo multiescala para o processo de carcinogênese. Permitido pela existência de mutações, o câncer emerge das interações entre diversas células em várias escalas de tempo e espaço. Inicialmente, desenvolvemos um modelo para a escala microscópica do câncer, ou seja, para o que ocorre “dentro das células”. Um sistema dinâmico booleano integrando as principais rotas de sinalização envolvidas no câncer foi construído. O sistema produz padrões estacionários de expressão gênica – atratores – dependendo do microambiente celular. Agrupamos os atratores da rede em distintos fenótipos celulares e determinamos mutações *drivers* que promovem transições fenotípicas. As mutações apontadas estão em acordo com aquelas catalogadas nos diversos censos de genes associados ao câncer. Empregamos o modelo para avaliar o efeito de terapias molecularmente direcionadas. Descobrimos que as monoterapias são aditivas em seus efeitos e que a associação de diversas drogas é necessária para a erradicação do câncer.

No modelo multiescala, as células, representadas pelo sistema dinâmico booleano, interagem entre si e com um microambiente permeado por substâncias químicas (nutrientes, oxigênio, íons H^+ , e vários fatores parácrinos). A dinâmica do modelo revela que, pressionadas pela competição por recursos e por um microambiente em permanente mudança, as células selecionam mutações que as tornam progressivamente mais agressivas. No estágio final, elas são autossuficientes em fatores de crescimento, insensíveis a fatores inibidores de crescimento, evadiram da apoptose, e possuem um potencial replicativo ilimitado; características de células cancerosas. Nossos resultados suportam a hipótese da aquisição de um fenótipo

mutador pelo câncer. Também sugerem que as células glicolíticas permanentes surgem como consequência de mutações selecionadas por outros processos, não havendo mecanismo de seleção específico para esse fenótipo.

Abstract

FUMIÃ, Herman Fialho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **A multiscale model of carcinogenesis.** Adviser: Marcelo Lobato Martins. Co-advisers: Sílvio da Costa Ferreira Júnior and Márcio Santos Rocha.

In this doctoral thesis, we developed a multiscale model for the process of carcinogenesis. Allowed by the existence of mutations, cancer emerges from interactions between different cells in different scales of time and space. Initially, we developed a model for the microscopic scale of cancer, i.e., about what occurs “inside the cells”. A Boolean dynamical system integrating the main signaling pathways involved in cancer was constructed. This system exhibits stationary gene expression patterns – attractors – dependent on the cell’s microenvironment. We grouped the network attractors into distinct cell phenotypes and determined driver mutations that promote phenotypic transitions. The predicted drivers are in agreement with those pointed out by diverse census of cancer genes recently performed for several human cancers. Finally, the Boolean network model was employed to evaluate the outcome of molecularly targeted cancer therapies. The major find is that monotherapies are additive in their effects and that the association of targeted drugs is necessary for cancer eradication.

In the multiscale model, cells, represented by their Boolean dynamical systems, interact among them and with a microenvironment permeated by chemicals (nutrients, oxygen, H^+ ion, and several paracrine factors). The model’s dynamics shows that, pressured by competition for resources and by an ever-changing microenvironment, the cells select mutations that make them progressively more aggressive. In the final stages, the cells have acquired the following capabilities: self-sufficiency in growth signal, insensitivity to anti-growth signals, evading apoptosis, and limitless replicative potential; characteristics shared by cancer cells. Our results support the hypothesis of a mutator phenotype in cancer. Also

they suggest that permanent glycolytic cells appear as a consequence of mutations selected by other processes. Therefore, there is no selection for this phenotype.

Introdução

CÂNCER é um nome genérico para mais de 100 doenças que possuem como característica comum a proliferação celular desordenada. O câncer invade tecidos próximos de onde surge e coloniza regiões distintas do organismo por meio da corrente sanguínea e dos vasos linfáticos. Com uma alta taxa de mortalidade, as chances de cura dependem do tipo de câncer e do estágio em que se encontra.

O objetivo principal dessa tese é estudar o desenvolvimento do câncer, processo denominado **carcinogênese**. Para isso, precisamos levar em conta fenômenos que ocorrem tanto dentro quanto fora das células. No Capítulo 2, explicamos os princípios básicos da Biologia do Câncer. Como se verá, as células precisam adquirir várias características na sua jornada em direção à malignidade. Estas características são obtidas por meio de mutações em determinados genes. No Capítulo 3, apresentamos a teoria por trás dos modelos de redes booleanas. Essa explicação é uma introdução para o Capítulo 4, no qual apresentamos um modelo booleano para as rotas do câncer. Pesquisando na literatura especializada, propomos uma rede mínima de interação regulatória. Essa rede engloba os genes pertencentes às rotas de sinalização que são frequentemente alteradas no câncer. Com esse modelo, pretendemos compreender qual o efeito das mutações no genoma celular e como isso está relacionado a aquisição das diversas características pelas células tumorais. No que diz respeito ao desenvolvimento do câncer, esse modelo pretende descrever o que ocorre “dentro das células”. No Capítulo 5, apresentamos um modelo multiescala para o processo de desenvolvimento do câncer. Da mesma forma que não é possível compreender totalmente um material apenas através da análise individual de seus átomos formadores, não se pode entender

o câncer analisando uma única célula; o mistério está escondido na interação. Por isso, no modelo multiescala, inúmeras células estão presentes, influenciando e sendo influenciadas pelo microambiente. As células competem entre si e, como resultado dessa luta Darwiniana, células mais adaptadas podem surgir. As frequentes adaptações necessárias, eventualmente culminam em células com várias das características das células cancerígenas.

O Apêndice A é um complemento ao Capítulo 4. Nele, apresentamos a rede utilizada dividida por rotas e os valores dos parâmetros do modelo. Também definimos algumas grandezas importantes na caracterização de redes complexas.

O Apêndice B é um complemento ao Capítulo 5. Nele, apresentamos as melhorias e modificações feitas na rede do Capítulo 4, que foi a versão utilizada no modelo multiescala. As rotas da rede melhorada e alguns resultados também são apresentados.

Capítulo 2

A Biologia do Câncer

Neste capítulo, apresentamos os aspectos básicos da biologia do câncer que julgamos indispensáveis para a compreensão dos modelos que desenvolvemos. Nossa breve apresentação se baseia na teoria da origem clonal do câncer, de longe a que goza de maior credibilidade. Excelentes informações sobre a biologia do câncer podem ser encontradas em [1–3].

2.1 O que é o câncer?

Um organismo multicelular pode ser pensado como uma grande comunidade de células cujos comportamentos são estritamente controlados. Todos os dias milhares de células morrem e outras milhares são produzidas para ocupar o lugar das que se foram. Em situações normais esse equilíbrio de morte e proliferação é meticulosamente mantido. Contudo, por mais eficiente que seja, esse controle não é perfeito. Uma vez ou outra uma célula escapa e inicia um processo desenfreado de divisões que pode culminar na formação de uma massa celular. Essa aglomeração de inúmeras células “rebeldes” é denominada de **tumor**.

Longe de ser um observador passivo do caos em expansão, o organismo impõem várias barreiras para a progressão tumoral: o reconhecimento pelo sistema imunológico, os fatores inibidores de crescimento e a sinalização apoptótica são apenas alguns exemplos. A maior parte dos tumores acaba sendo vencida por uma barreira ou outra. A grande preocupação recai naquela pequena parte que se adapta e continua a sua marcha evolutiva. Ao tumor que atinge o apogeu de

sua evolução, contornando todos os obstáculos que lhe foram impostos, reservamos o nome de **câncer** ou **tumor maligno**. O que difere o câncer dos outros tumores, ditos tumores benignos, é a capacidade de invadir os tecidos próximos (invasão local) e também de colonizar regiões distintas do organismo através da corrente sanguínea e vasos linfáticos, processo denominado metástase. Devido a essas características, os tumores malignos são extremamente mais mortais do que os benignos. Em 2010, nos EUA, por exemplo, os tumores malignos responderam por quase 98% das mortes devido a tumores (574.743 mortes por tumores malignos e 14.917 por tumores benignos) [4].

Em princípio, existem tantos tipos de câncer quanto são os tipos de células do organismo (cerca de 200 [5]). Na prática, alguns tipos são muito mais frequentes que outros. Diferentes tipos podem destoar muito em suas características histológicas, na sua evolução ou na chance de morte do paciente. Infelizmente, isso torna improvável a possibilidade de se encontrar um único tipo de cura para todos cânceres. É mais provável que sejam necessárias várias curas.

Os diferentes tipos de câncer podem ser agrupados em quatro grandes grupos dependendo dos tecidos nos quais surgem. Os **carcinomas** são originários das células epiteliais da pele ou que revestem os órgãos internos. É o tipo mais frequente de câncer, representando 80% dos casos diagnosticados a cada ano. Os **sarcomas** são originários dos ossos, cartilagem, gordura, músculos, vasos sanguíneos ou outros tecidos conectivos ou de suporte. As **leucemias** originam-se em tecidos responsáveis pela formação das células sanguíneas como a medula óssea, levando a formação de um número anormal de células sanguíneas. Por último, os **linfomas** são originários das células do sistema imune [3].

2.2 Câncer: uma doença de origem genética

Os genes são partes do DNA nas quais estão codificadas as informações necessárias para a produção de uma ou mais proteínas. Quando a informação de um gene está sendo lida e executada, dizemos que o gene está sendo **expresso**. As proteínas são as responsáveis por executar todos os processos que uma célula realiza. Dessa forma, o conjunto de todos os genes, denominado genoma, funciona como uma central que comanda a célula. Se uma célula se encontra em uma condição em que necessita, por exemplo, de captar mais glicose do meio, os

genes relacionados a esse processo passarão a ser expressos (ou serão expressos com maior intensidade).

Ao falarmos sobre o câncer, dissemos que ele adquire novas características com o intuito de contornar as várias barreiras impostas pelo organismo. Hoje sabemos que essas características são obtidas por meio de alterações na forma como os genes da célula são expressos. Essas alterações são chamadas de mutações e podem corresponder a modificações diretas na informação codificada no gene, por exemplo, através da deleção ou inserção de novas bases, ou podem ser modificações epigenéticas, que alteram a forma como o gene é expresso modificando a estrutura da cromatina (sem alterar o gene em si).

Nem todos os genes estão associados ao câncer. Ao contrário, a estimativa é que um pouco mais de 1% dos genes humanos entrem nesse grupo [6]. Não é estranho que seja dessa forma. Os genes controlam uma miríade de processos no organismo, vários dos quais não têm nenhuma relação com o controle de processos associados ao câncer, tais como proliferação, morte celular e migração.

As alterações genéticas associadas ao câncer podem ser adquiridas de três formas: (1) herdadas dos pais, (2) espontaneamente via mutações somáticas ou (3) via infecções virais. Cânceres associados com mutações herdadas dos pais representam entre 0,1% e 10% dos casos dependendo do tipo de câncer. As mutações devido a infecções virais ¹ são bem mais raras e parecem estar limitadas a um número relativamente pequeno de tipos de câncer [2]. Portanto, as mutações somáticas obtidas espontaneamente são responsáveis pela grande maioria dos cânceres ².

Os genes do câncer podem ser divididos em três grupos: **oncogenes**, **genes supressores de tumor** e **genes de estabilidade**. Os oncogenes são a forma mutada de genes normais chamados de proto-oncogenes, que estão associados a regulação de processos fundamentais como a proliferação e a diferenciação celular. Em geral, as mutações fazem que os oncogenes sejam sempre expressos ou que sejam expressos em condições que normalmente não o seriam. O gene Ras, por exemplo, é um proto-oncogene que normalmente é expresso quando existem

¹Alguns vírus que tem um papel bem definido na sua associação com o câncer são os vírus Epstein-Barr, do papiloma humano, da hepatite C e B, HHV-8 (associado ao sarcoma de Kaposi), HTLV-II (associado a leucemia de células T) [7]

²O termo mutações somáticas significa que essas mutações afetam os genes das células somáticas. As células somáticas são todas as células do corpo com exceção das células germinativas (espermatozoides no homem e óvulos na mulher). Como consequência, mutações somáticas não podem passar para os descendentes do organismo.

fatores que estimulam a proliferação, os chamados fatores de crescimento. Contudo, mutações em Ras podem fazer com que ele seja expresso mesmo na ausência desses fatores, o que pode induzir a célula a se dividir.

Diferentemente dos oncogenes, os genes supressores de tumor são inativados pelas mutações. Esses genes estão envolvidos no controle de processos como a manutenção da integridade genética, a progressão do ciclo celular, a diferenciação, as interações célula-célula, e a apoptose [2]. O papel desses genes como reguladores desses importantes processos faz com que a inativação dos mesmos represente uma vantagem para o câncer. O gene supressor de tumor p53, por exemplo, é responsável por interromper a proliferação celular ou induzir a célula a morrer por apoptose em condições anômalas como hipóxia, danos no genoma, proliferação celular excessiva, entre outras. A sua inativação permite que a célula continue a se proliferar ou permanecer viva mesmo nessas condições adversas.

Mutações nos genes de estabilidade auxiliam o câncer de uma forma distinta. Os genes de estabilidade são responsáveis pela correção de danos ocorridos no DNA, tanto os que ocorrem naturalmente no processo de replicação celular como aqueles induzidos por mutagênicos. Dessa forma, mutações nos genes de estabilidade auxiliam o câncer através do aumento da taxa de ocorrência de mutações em outros genes, que doutra forma é mantida no mínimo.

2.3 A carcinogênese

O processo de desenvolvimento do câncer é chamado de carcinogênese. As evidências sugerem que a maior parte dos tumores são originários de uma única célula que em um passado remoto, devido a uma mutação, adquiriu uma certa vantagem proliferativa em relação às células normais. A célula mutada produz clones que também carregam a mutação e que, portanto, também possuem uma vantagem proliferativa. Como já foi citado, existem várias restrições impostas pelo organismo ao desenvolvimento tumoral. Quanto maior o número de clones maior será a probabilidade de que haja uma outra mutação em alguma célula da massa clonal que confira à mesma a capacidade de ultrapassar mais uma barreira. Essa célula e os clones que ela vier a gerar estarão em vantagem em relação às outras células do tumor com apenas uma mutação e, obviamente, com relação às células normais. O processo de desenvolvimento tumoral continua nessa mesma

linha, com novas mutações produzindo populações celulares com maior vantagem adaptativa em relação as anteriores. Eventualmente, a evolução culminará em uma população celular que ultrapassou todas as restrições que lhe foram impostas e se encontra apta a invadir e colonizar outros tecidos, ou seja, câncer (Figura 2.1).

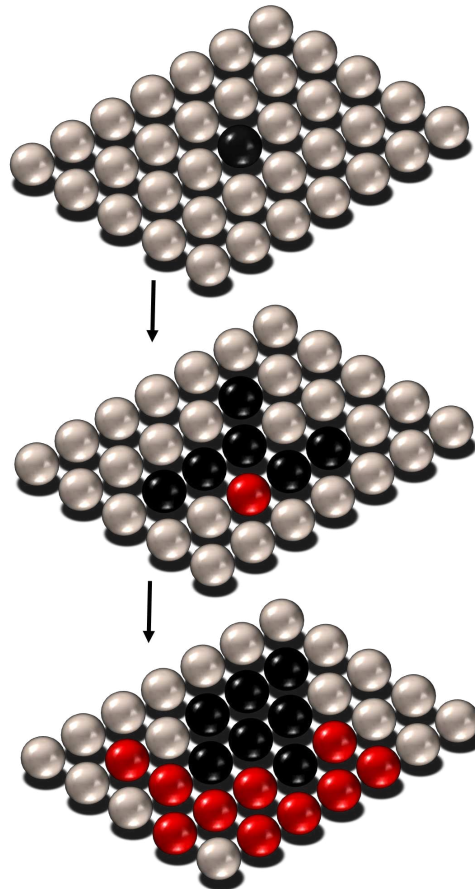


FIGURA 2.1: **Evolução clonal.** Uma única célula em um tecido normal adquire uma alteração que confere uma vantagem proliferativa (preta). Essa célula se divide dando origem a vários clones. Uma célula entre os clones adquire uma segunda mutação que confere uma vantagem proliferativa adicional (vermelho). O tumor é o resultado de vários estágios de mutações e expansão clonal.

Devido à necessidade da aquisição de um conjunto de mutações, o processo de carcinogênese é demorado. Um câncer descoberto hoje pode ter tido sua origem em uma célula mutada a décadas atrás. Essa evolução do câncer em múltiplos estágios explica porque a chance de um indivíduo ter câncer aumenta quase exponencialmente com a idade (Figura 2.2).

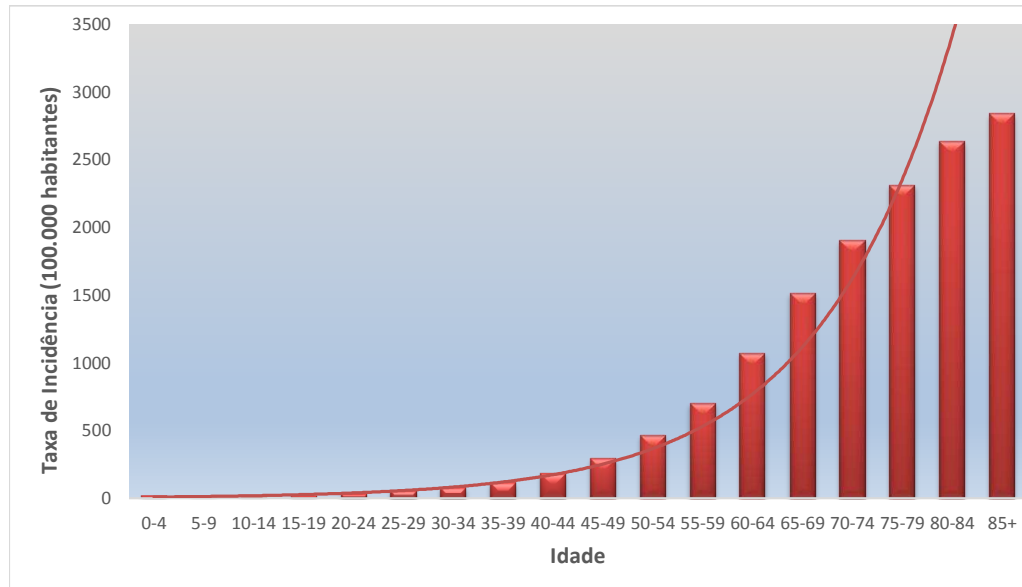


FIGURA 2.2: **Taxa de incidência.** Número médio de novos casos por ano para todos os cânceres (Reino Unido, 2009-2011). Dados obtidos em [8].

2.3.1 As capacidades adquiridas pelo câncer

Em doenças genéticas como a doença de Huntington, a fenilcetonúria ou a doença de Tay-Sachs podemos encontrar um determinado gene ou conjunto de genes a quem atribuir a causa da patologia. O câncer é diferente nesse aspecto. Observe a Tabela 2.1, que apresenta as cinco mutações mais frequentes nos cânceres de mama, pâncreas e de pele. Como podemos observar as mutações não são as mesmas e, como a própria expressão “mutações mais frequentes” sugere, mesmo em cânceres do mesmo tecido o conjunto de mutações não precisa ser necessariamente igual. Como compreender o processo de evolução do câncer com todo esse panteão de mutações possíveis?

Em seu artigo seminal [9], Hanahan e Weinberg propõem uma explicação interessante: as diferentes mutações são caminhos distintos para se alcançar o mesmo objetivo. Segundo Hanahan e Weiberg “o vasto catálogo de genótipos das células cancerosas é a manifestação de **seis** alterações essenciais na fisiologia da célula que coletivamente ditam o crescimento maligno: autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade à sinalização de inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, e invasão dos tecidos e metástase”. Cada uma dessas características

obtidas significa que uma das barreiras impostas pelo organismo foi superada. A seguir, explicaremos essas características em mais detalhes.

Câncer de mama	Câncer de pâncreas	Câncer de pele
Pi3k (25%)	Ras (57%)	Raf (42%)
p53 (25%)	p53 (35%)	p53 (26%)
E-caderina (12%)	CDKN2A (18%)	PTCH1(24%)
Gata3 (7%)	Smad4 (17%)	hTert (23%)
MLL3 (7%)	β -catenina (16%)	CDKN2A (20%)

TABELA 2.1: **Mutações frequentes.** As cinco mutações mais frequentes em três tipos de câncer. Dados disponíveis no banco de dados [COSMIC](#) [10].

2.3.1.1 Autossuficiência em fatores de crescimento

As células normais só proliferam quando moléculas presentes no meio extracelular, denominadas **fatores de crescimento**, se ligam a receptores específicos presentes na superfície celular. Esse receptores são internalizados levando consigo os fatores de crescimento, os quais, já dentro da célula, geram uma cascata de eventos intracelulares que ativam vários genes envolvidos no processo de proliferação celular. A necessidade desses fatores para que a divisão ocorra permite que o organismo controle quando as células devem se dividir.

As células cancerosas conseguem burlar essa necessidade de fatores de crescimento através de pelo menos três mecanismos [9]:

1. **Aumentando o número de receptores na superfície da célula:** Em condições normais nas quais não exista a necessidade de proliferação celular, a concentração basal de fatores de crescimento não é suficiente para que haja a ligação dos mesmos com a quantidade de receptores requerida para que se desencadeie uma resposta proliferativa. Entretanto, se a quantidade de receptores na superfície celular for aumentada, a concentração mínima de fatores de crescimento requerida é diminuída. Isso pode ser obtido através de mutações em genes envolvidos na síntese desses receptores e é um evento comum em muitos cânceres. Em média, 50% a 70% dos carcinomas de pulmão, cólon e mama sintetizam os receptores EGFR e ErbB-3 [11].
2. **Alterando algum gene envolvido na transmissão do sinal proliferativo:** Genes como Ras, NF1 e Raf, por exemplo, pertencem a rota

envolvida na transmissão do sinal proliferativo. Mutações em genes desse rota podem fazer com que a sinalização através dela seja iniciada sem a presença de fatores de crescimento no meio extracelular. Estima-se que a ativação constitutiva de Ras por mutações, por exemplo, esteja presente em cerca de 20% de todos os tumores humanos [12].

- 3. Produzindo seus próprios fatores de crescimento:** As células cancerosas podem gerar seus próprios fatores de crescimento de uma forma direta ou indireta. Na forma direta, a célula cancerosa produz fatores de crescimento que são liberados no meio intercelular e ativam os receptores da própria célula, esse é um exemplo do que chamamos de sinalização autócrina. Na forma indireta a célula produz fatores que estimulam outras células, como as células normais da matriz extracelular, a produzirem os fatores de crescimento de que ela necessita [13].

2.3.1.2 Insensibilidade a fatores inibidores de crescimento

Os fatores inibidores de crescimento atuam no sentido de interromper a proliferação celular. Similarmente aos fatores de crescimento, na superfície celular existem receptores específicos para esses fatores.

Um dos fatores inibidores de crescimento mais conhecidos é o TGF- β . Quando TGF- β encontra-se presente no meio intercelular, a sua ligação com os receptores específicos na superfície da célula leva a expressão de genes que codificam proteínas do grupo Smad que, por sua vez, ativam a expressão de genes que interrompem o ciclo celular como p15 e p21 [14].

Existem distintas formas através das quais o câncer pode se tornar insensível a sinalização inibidora. A diminuição da quantidade de receptores específicos na superfície celular [15] ou a produção de receptores disfuncionais é um exemplo [9]. Mutações em genes pertencentes as rotas que transmitem a sinalização dos fatores inibidores também é uma possibilidade [16].

2.3.1.3 Evasão da apoptose

A **apoptose** é uma forma de morte celular programada que envolve a eliminação da célula de uma forma “limpa”, por assim dizer. Durante o processo

de apoptose a célula sofre uma contração; o citoplasma se torna mais denso e as organelas celulares aproximam-se uma das outras. Apesar disso, a integridade das organelas é mantida e a célula ainda possui uma membrana plasmática intacta e, dessa forma, nenhum dos constituintes celulares extravasa para o meio. Depois que a apoptose é concluída os “restos mortais” da célula são rapidamente fagocitados sem desencadear nenhuma resposta inflamatória.

A apoptose é um processo fundamental ao organismo. Vários processos incluindo a renovação tecidual, o desenvolvimento e funcionamento correto do sistema imune, a atrofia normal de tecidos hormônio-dependentes tais como a próstata e o útero pós-gravídico, o desenvolvimento embrionário e a morte celular induzida por substâncias químicas são processos dependentes da apoptose. Um funcionamento incorreto, seja por um aumento ou diminuição na taxa de apoptose leva a inúmeras doenças, entre elas o câncer [17].

A apoptose atua como um empecilho para a carcinogênese de várias formas. Em uma delas ela ataca o câncer na sua essência, tentando impedir o estabelecimento de mutações. *Grosso modo*, podemos dizer que quando uma mutação ocorre a célula a detecta e tenta consertá-la. Dependendo da extensão da mutação a célula pode não ser capaz de arrumar o dano e, como alternativa, ela inicia o programa de apoptose para que a célula mutada seja eliminada³. Dessa forma, a apoptose atua impedindo que alterações no material genético sejam passadas adiante.

A apoptose também atua eliminando as células que se encontram em condições longe da normalidade como, por exemplo, sujeitas a um estímulo proliferativo excessivo, situação que pode ocorrer em células com mutações em oncogenes; ou em um meio com baixa concentração de oxigênio, condição enfrentada pelas células quando o tumor se expande; ou ainda quando existem no meio determinadas substâncias como fatores de morte e inibidores de crescimento, que podem surgir devido a uma resposta inflamatória desencadeada pelo tumor.

Existem inúmeras formas das quais o tumor se vale para evadir da apoptose. Como já dito, a apoptose é uma morte programada, o que significa que existe um conjunto de genes que determinam essa ação. A forma como esses genes interagem para executar esse processo é altamente complexa e sofisticada e muito

³É claro que todo esse processo não é perfeito, doutra forma as células mutadas sempre seriam eliminadas ou “consertadas” e o câncer não existiria. O fato é que o processo de reparo do DNA não funciona corretamente sempre. Às vezes ele mais estraga do que conserta, levando a deleções de pequenas partes do DNA ou mesmo a translocações [18].

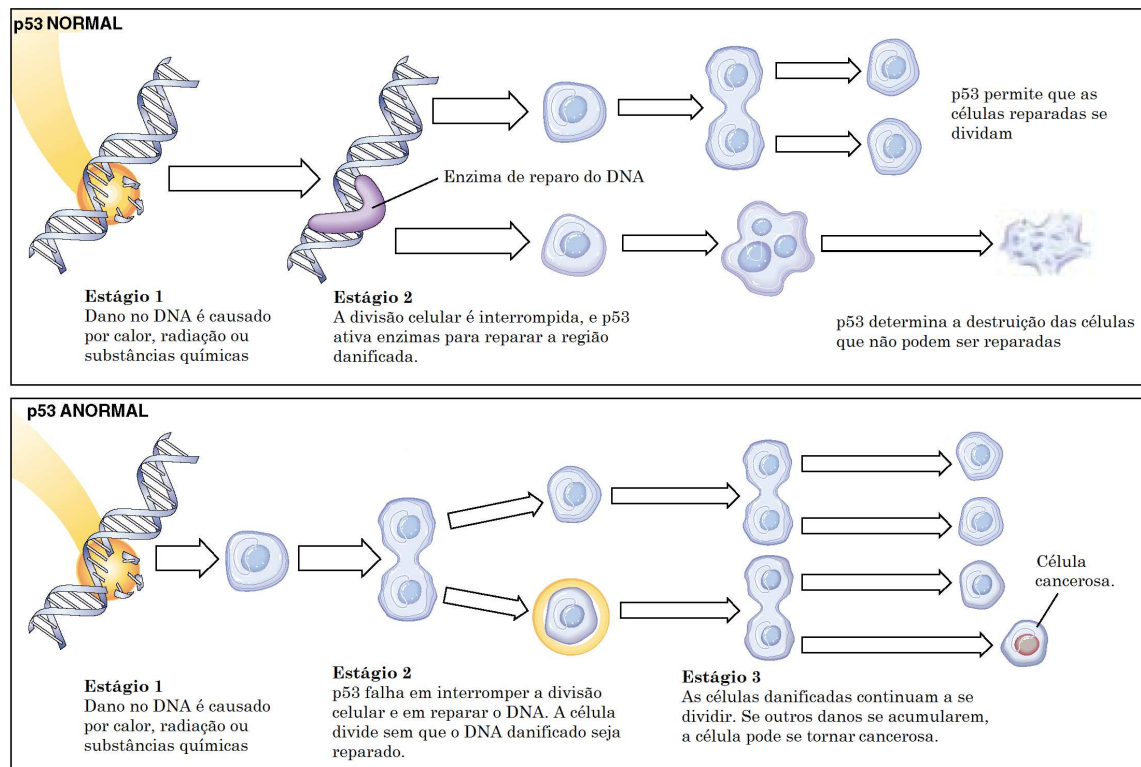


FIGURA 2.3: O gene p53 e a divisão celular. O gene p53 normal monitora o DNA destruindo células com danos no DNA que não podem ser reparado. Quando p53 está anormal ele não consegue parar a divisão celular ou reparar o DNA. Conforme as células danificadas se proliferam, o câncer pode vir a se desenvolver (figura adaptada de [19]).

ainda permanece desconhecido. Entretanto, parece bem estabelecido a existência de duas rotas principais de sinalização através das quais a apoptose pode ser desencadeada: a rota **extrínseca** e a **intrínseca**. A rota extrínseca, como o nome sugere, é iniciada através da ligação de fatores de morte presentes no meio extracelular, como $\text{TNF-}\alpha$, FasL, Apo2L, Apo3L, a receptores específicos presentes na superfície da célula. A cascata de sinalização decorrente dessa ligação culmina na ativação da **caspase-8**, que inicia a fase de execução da apoptose. A rota intrínseca ou rota mitocondrial da apoptose está intimamente associada com genes da família Bcl-2, que engloba genes com papel pró-apoptótico (e.g. Bax, Bak) ou anti-apoptótico (e.g. Bcl-2, Bcl- X_L , Bcl-w). Quando o “balanço” entre os estímulos pró e anti-apoptóticos tende para o primeiro, a integridade da membrana da mitocôndria é comprometida, o que resulta na liberação de proteínas solúveis, incluindo citocromo c, que agem iniciando a ativação de caspases no citosol que induzem a apoptose [20].

Vários genes tem um papel ativo no controle da apoptose, mas nenhum deles é tão proeminente quanto o p53, cognominado de o “guardião do genoma”. Quando um dano no DNA é percebido pela célula os níveis de expressão de p53 aumentam, o que leva inicialmente a uma parada do ciclo celular para que haja uma tentativa de reparo do dano. Se o dano não puder ser reparado, o gene p53 ativa as rotas de apoptose para que a célula seja eliminada (ver Figura 2.3). A deleção de p53 faz com que a célula não entre em apoptose, o que permite que as mutações se estabeleçam.

Além de p53, mutações em outros genes permitem que a célula evada da apoptose. Alterações em genes como Ras, Pten ou Akt, por exemplo, aumentam a intensidade dos sinais anti-apoptóticos [9].

2.3.1.4 Potencial replicativo ilimitado

A maior parte das células humanas em cultura é capaz de se dividir apenas um determinado número de vezes após o qual elas entram em um estado não-proliferativo chamado **senescência** (Figura 2.4). Essa limitação replicativa não é observada na maior parte das células cancerosas que, por se dividirem indefinidamente, são ditas **imortalizadas**.

Por que as células normais apresentam essa limitação no potencial replicativo? Acredita-se que a resposta esteja no encurtamento progressivo dos telômeros. Os telômeros correspondem as extremidades dos cromossomos e servem, entre outras funções, para evitar que haja a fusão entre cromossomos vizinhos. Descobriu-se que a enzima DNA polimerase, responsável pela replicação do DNA, não é capaz de sintetizar completamente a extremidade final do mesmo. O cromossomo é basicamente uma longa fita de DNA enrolada e as extremidades dessa fita correspondem a região dos telômeros no cromossomo. Dessa forma, a cada vez que a célula se divide os telômeros vão se encurtando. Após um número crítico de divisões celulares, os telômeros se tornam tão curtos que a célula identifica esse encurtamento como um dano no DNA [21]. A resposta celular a esse dano é a ativação de genes que impedem a célula de se proliferar, levando-a ao estado senescente. Fibroblastos humanos entram nesse estado tipicamente depois de 50 a 70 divisões [22].

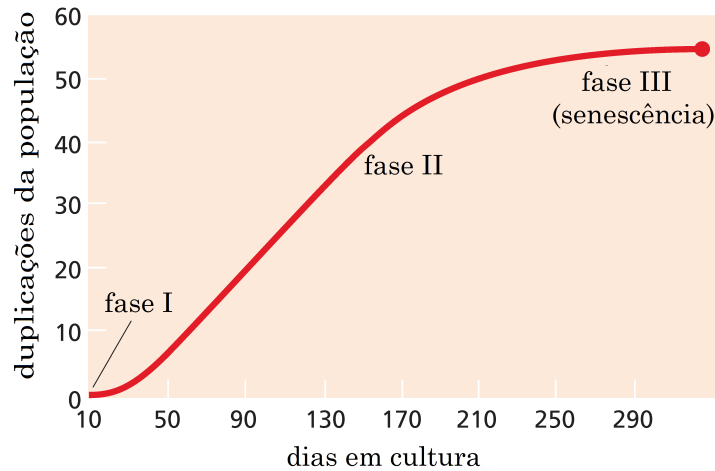


FIGURA 2.4: **Limite de Hayflick.** Número de vezes que uma população de fibroblastos em cultura dobra em função do tempo. Quando a população dobra por volta de 60 vezes as células param de se dividir, mas ainda podem permanecer viáveis por muito tempo. Figura adaptada de [1].

Ultrapassar a senescência é a primeira das duas etapas que as células tumorais precisam vencer para adquirir um potencial replicativo ilimitado. A senescência parece estar associada a ativação das rotas p53 e Rb, ambas responsáveis pelo controle da proliferação celular. Inativações em genes pertencentes a essas rotas, tais como Rb, p53 e p16, permitem que a célula escape da senescência e continue se dividindo. Contudo, isso significa que os telômeros continuam se encurtando, o que não pode continuar indefinidamente. Após algumas divisões um estágio denominado **crise** é alcançado, caracterizado por massiva instabilidade cromossomal e morte celular. As células tumorais precisam evitar a fase de crise e, para isso, devem impedir que os telômeros continuem se encurtando. Isso pode ser alcançado obtendo uma capacidade característica de células germinativas e algumas células-tronco: a produção da enzima **telomerase**, que consegue estabilizar o tamanho dos telômeros compensando o que é perdido durante cada divisão [23].

Entre 85% e 90% dos tumores humanos expressam a telomerase. O percentual restante encontra uma forma alternativa ainda não muito bem compreendida para interromper o encurtamento dos telômeros, o mecanismo ALT (*alternative lengthening of telomeres*), que é telomerase-independente. Esses fatos somente corroboraram a hipótese de que a obtenção do potencial replicativo ilimitado é fundamental para o câncer [1].

2.3.1.5 Angiogênese sustentada

Os tecidos normais possuem uma rede de vasos sanguíneos distribuída de tal forma que cada célula receba por difusão uma quantidade adequada de nutrientes e oxigênio. Ao surgir em um tecido, o tumor utiliza os recursos provenientes dessa rede. Entretanto, essa fonte limita o crescimento do tumor, já que a partir de um certo volume (por volta de $1\text{-}2\text{ mm}^3$) a quantidade de oxigênio que chega por difusão até as células tumorais é insuficiente ⁴. Nesse estágio, o tumor é dito **avascular**.

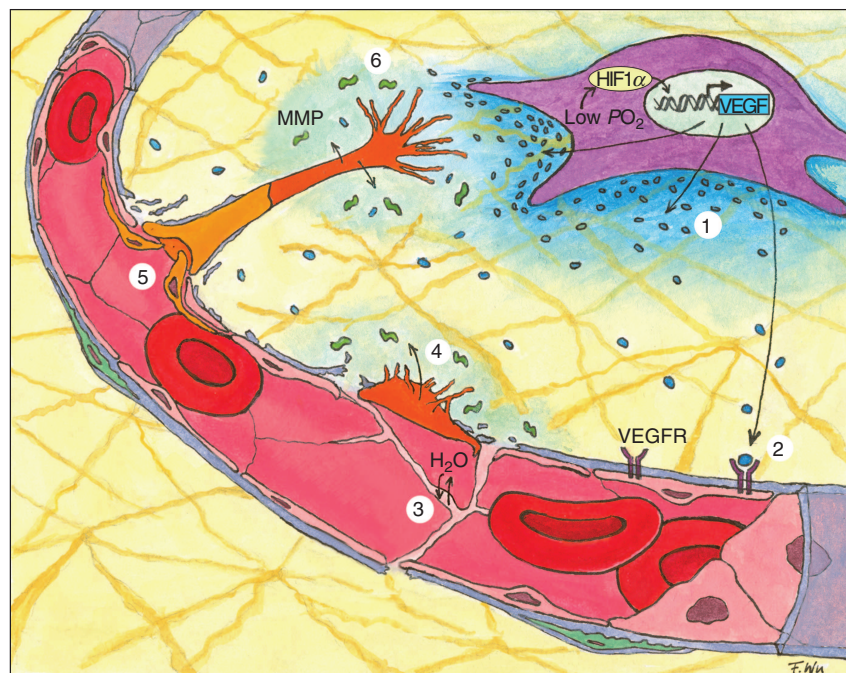


FIGURA 2.5: **Processos envolvidos na angiogênese.** (1) HIF-1 é ativado em células nas regiões de hipóxia. Como consequência HIF-1 ativa a transcrição de VEGF que passa a ser secretado pelas células. (2) VEGF liga-se ao receptor VEGFR na superfície dos capilares. (3) A permeabilidade dos vasos muda. (4) Uma célula endotelial que serve como guia (*tip cell*) é ativada e quebra a membrana basal. (5) Novas células proliferam atrás da célula-guia formando a haste do vaso. (6) Células vizinhas à célula-guia liberam MMPs no meio, o que leva a proteólise da matriz celular e permite que as células migrem. Figura retirada da referência [24].

Para o tumor continuar evoluindo é necessário que ele induza o organismo a expandir a rede de vasos sanguíneos com intuito de suprir suas demandas. Esse processo é denominado **angiogênese** e representa uma fase de transição na evolução

⁴O primeiro limitante é oxigênio, já que nutrientes como a glicose, por exemplo, possuem um maior comprimento de difusão

tumoral: de uma lesão localizada e relativamente inofensiva para uma doença sistêmica e potencialmente fatal [25].

A angiogênese é um processo complexo que envolve várias etapas como a degradação da matriz extracelular, a migração e proliferação das células endoteliais, a formação de *loops* pelos capilares (anastomose), a maturação dos vasos e o estabelecimento do fluxo sanguíneo [26]. Embora vários fatores de crescimento distintos sejam necessários para que a angiogênese ocorra, a família de fatores de crescimento VEGF (*vascular endothelial growth factors*) está associada ao início do processo. Em resposta à baixa oxigenação presente em determinadas regiões do tumor, o gene HIF-1 das células tumorais dessas regiões torna-se ativo e induz a liberação de VEGF no meio intercelular. O VEGF difunde através do tecido até alcançar a vasculatura pré-existente, na qual age estimulando as células endoteliais dos vasos sanguíneos a se proliferar formando novos vasos sanguíneos em direção ao tumor [27]. Veja a Figura 2.5.

2.3.1.6 Invasão dos tecidos e metástase

Os tumores benignos estão confinados aos tecidos em que se originam. Por isso motivo, normalmente não causam a morte do organismo e são frequentemente operáveis. Os tumores malignos são invasivos, eles se espalham para os tecidos próximos e, eventualmente, para tecidos muito distantes do local onde se originam. Esse processo é denominado de metástase.

A capacidade de sofrer metástase requer a aquisição de inúmeras habilidades por parte das células tumorais. Alguns exemplos são a capacidade de migrar, de degradar a membrana basal e de sobreviver sem estar em contato com a mesma, e de sobreviver em um tecido distinto daquele de origem. Embora algumas habilidades possam ser adquiridas diretamente por mutações, o processo de invasão e metástase envolve a colaboração de vários tipos de células, muitas das quais são perfeitamente normais. As células do estroma, por exemplo, podem ser induzidas pelas células tumorais a produzirem uma série de fatores de crescimento que garantem a sobrevivência e induzem a migração das células tumorais. Os macrófagos na periferia do tumor, por exemplo, podem acelerar a invasão local liberando enzimas que degradam a matriz extracelular, tais como metaloproteínas e catepsinas, em resposta a fatores produzidos pelas células tumorais [28, 29].

Redes Booleanas: Modelando a Regulação Gênica

Neste capítulo, apresentamos os conceitos de regulação gênica e de redes de regulação gênica. Introduzimos os modelos de rede booleanas, que se apresentam como uma alternativa simples e eficaz na modelagem de redes de regulação.

3.1 A regulação gênica

Os genes são partes do DNA em que estão codificadas informações que podem ser utilizadas para a produção de uma ou mais proteínas. Quando essas informações estão sendo “lidas” e “executadas” dizemos que o gene está sendo **expresso**. O conjunto de todos os genes que estão sendo expressos em uma dada célula é denominado **padrão de expressão gênica**. Diferentes tipos de células, como por exemplo, uma célula do coração e outra do pâncreas, possuem os mesmos genes, mas diferentes padrões de expressão. Alterações no ambiente em que uma célula se encontra também podem ocasionar uma mudança no padrão de expressão dos genes. A diminuição dos níveis normais de oxigênio, por exemplo, leva à inibição e à ativação da expressão de vários genes relacionados a adaptação a esse novo ambiente.

Essa flexibilidade no padrão de expressão é possível devido a existência de mecanismos de regulação. Entre a leitura da informação em um gene até a síntese

da(s) proteína(s) associada(s) ao mesmo, existem vários pontos nos quais a expressão pode ser regulada (para mais informações ver [30]). No entanto, como a síntese proteica é energeticamente dispendiosa, o principal ponto de regulação ocorre no início do processo, ou seja, na leitura da informação. Essa etapa de leitura denomina-se **transcrição gênica**.

A transcrição inicia quando uma enzima denominada **RNA polimerase** se liga a uma região do DNA que fica próxima ao gene que vai ser transcrito, denominada **promotor**. Contudo, a RNA polimerase possui pouca afinidade com o promotor, o que significa que essa ligação ocorre a uma taxa muito baixa. É aqui que um conjunto de proteínas denominadas **fatores de transcrição** entram em cena; elas são capazes de alterar a taxa com que a RNA polimerase se liga ao promotor. Essa alteração pode ser tanto um aumento quanto uma diminuição. No primeiro caso, dizemos que o fator ativa (ou induz) e, no segundo, que ele inibe a transcrição. Cada gene é regulado por um conjunto variável tanto em tipos quanto em números de fatores de transcrição. Genes responsáveis por processos celulares essenciais, por exemplo, podem estar sujeitos a uma regulação complexa que requer a ação de inúmeros fatores de transcrição.

A complexidade da regulação gênica aumenta consideravelmente quando consideramos vários genes. Tomemos um determinado fator de transcrição a , por exemplo, que regule n genes. Como os fatores de transcrição são proteínas, a está presente na célula quando o gene A que o codifica está expresso. Ora, mas o gene A também é regulado por fatores de transcrição que, por sua vez, são produzidos por outros genes também regulados por fatores de transcrição. Dessa forma, podemos pensar no genoma como uma grande rede de genes que se conectam através de interações regulatórias mediadas pelos fatores de transcrição. Esse entendimento está na base da modelagem das redes genéticas.

3.2 Modelando redes genéticas

Suponha que tenhamos uma pequena rede de regulação formada pelos genes A , B e C que codificam os fatores de transcrição a , b e c , respectivamente. Digamos que o fator a ative os genes B e C e que o gene A seja ativado pelo fator b e inibido pelo fator c . Uma forma de representar essa rede é através de um **grafo direcionado**, ferramenta muito utilizada na Ciência da Computação.

Um grafo direcionado consiste de um conjunto N de nós (ou vértices) e um conjunto A'' de arestas ou ligações. Em nosso caso, o conjunto de nós é o conjunto dos genes $N = \{A, B, C\}$. As arestas correspondem às interações regulatórias entre os genes. Por exemplo, para o gene B que sintetiza o fator de transcrição b que ativa o gene A , temos a aresta $(B, A, +)$. A primeira coordenada indica qual gene é o regulador, a segunda, qual gene é o regulado e, a terceira, se a interação é ativadora ou inibidora. Portanto, o conjunto das arestas no presente caso é $A'' = \{(B, A, +), (C, A, -), (A, B, +), (A, C, +)\}$. O grafo pode ser representado como na Figura 3.1, na qual os nós são representados por círculos e as arestas por linhas com setas ou linhas perpendiculares na extremidade próxima aos nós que estão sendo regulados. As setas representam ativação e as linhas perpendiculares inibição.

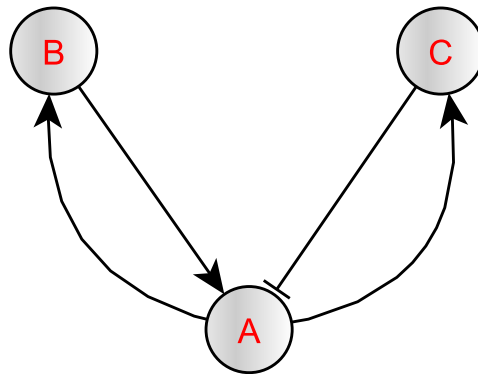


FIGURA 3.1: **Rede de regulação.** Os círculos representam os nós (genes), as arestas (interações regulatórias) são linhas com setas (+) ou linhas perpendiculares (−) na extremidade próxima aos nós que estão sendo regulados

3.3 Redes booleanas

A concentração celular de uma dada proteína $[P]$ é uma medida da intensidade da expressão do gene que a codifica ¹. Essa concentração está diretamente associada à concentração dos fatores de transcrição que regulam o gene em questão. Como estas duas grandezas estão relacionadas?

Existe uma extensa documentação experimental apontando que a intensidade da expressão gênica pode se relacionar de forma sigmoideal com a concentração dos

¹Desde que o principal ponto de regulação seja a transcrição.

fatores de transcrição [31]. Os modelos matemáticos sugerem que em situações em que há cooperatividade entre diferentes fatores de transcrição [32], em que os fatores de transcrição do mesmo tipo formam dímeros, trímeros ou multímeros, ou em que os fatores de transcrição são rapidamente degradados [33], essa resposta sigmoïdal é observada. Acredita-se que essas situações sejam comuns em organismos eucariotos.

Através da Figura 3.2, vemos que uma função sigmoïdal pode ser aproximada por uma função do tipo degrau, o que é denominado de **aproximação booleana**. Aceitando-a, um gene i pode ser representado por um elemento binário σ_i que está no estado 1 quando o gene está expresso e no estado 0 quando não está. Conseqüentemente, uma rede de regulação gênica com N genes torna-se um conjunto $\{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N\}$ de N elementos binários interconectados.

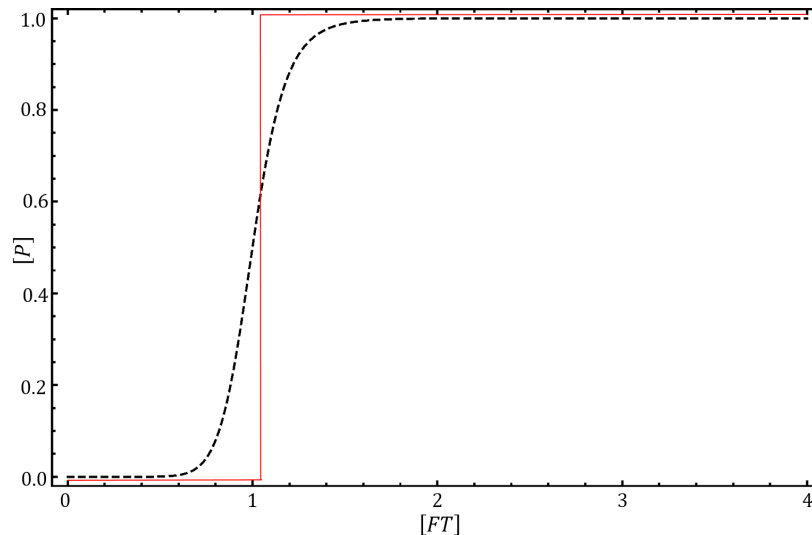


FIGURA 3.2: **Aproximação booleana.** A concentração de uma determinada proteína (intensidade de expressão do gene) é uma função sigmoïdal da concentração de fatores de transcrição. Essa função pode ser aproximada por uma função do tipo degrau.

Em uma rede de regulação, cada gene i possui um número k_i de outros genes que o regulam, número que depende da topologia da rede em questão. A dinâmica da rede é obtida pela atualização simultânea de todos os genes da rede em um tempo $t + 1$ de acordo com

$$\sigma_i(t + 1) = F_i \left(\sigma_{i_1}(t), \sigma_{i_2}(t), \dots, \sigma_{i_{k_i}}(t) \right), \quad (3.1)$$

em que F_i é uma regra específica para o gene i que combina todos os seus reguladores.

Para um gene i com k_i reguladores existem $2^{2^{k_i}}$ regras lógicas. Portanto, o espaço de regras possíveis é enorme mesmo para pequenos valores de k_i . Salvo alguns poucos casos, não se pode determinar uma única regra adequada para um gene, mas sim um conjunto delas. Isso ocorre porque as rede biológicas ainda não são muito bem compreendidas e os dados disponíveis são limitados [34].

Várias hipóteses adicionais são propostas para limitar o conjunto de regras possíveis. Exemplos de conjuntos de regras bastante utilizados, que derivam da adoção de determinadas hipóteses, são as **regras canalizadoras** e as **regras do tipo limitar**.

3.3.1 Regras canalizadoras

Na Biologia, o termo **canalização** refere-se à estabilidade fenotípica dos organismos em relação às mutações e às alterações ambientais ². Em outras palavras, as células dos organismos conseguem se comportar da mesma forma apesar das perturbações externas e internas. As regras ditas canalizadoras produzem uma dinâmica estável em relação às alterações nos genes da rede, o que justifica sua denominação.

Seja i um gene regulado por k outros genes. Seja j um gene pertencente ao conjunto de reguladores de i . Se o gene j no estado a determina que o gene i está no estado b independentemente do estado dos demais reguladores de i , temos uma regra canalizadora. Denominamos o gene j de gene canalizador e dizemos que a regra possui valor canalizador a e saída canalizada b .

Seja A um gene regulado por dois outros genes B e C . Existem $2^2 = 16$ regras lógicas possíveis (Figura 3.3), mas quais destas são canalizadoras? As regras podem ser canalizadoras com valor canalizador 0 ou 1 e em relação aos genes B ou C . Para exemplificar, tomemos C como gene canalizador e o valor canalizador como 1. Note que se $\sigma_C = 1$, as Regras 13, 15 e 16 determinam que $\sigma_A = 1$, e as Regras 1, 2, 3 e 4 determinam que $\sigma_A = 0$, independentemente do estado do

²Essa estabilidade se deve a mecanismos como redundância genética, regulação por *feedback*, e interações bioquímicas cooperativas.

gene B . Logo, todas são regras canalizadoras, sendo que as Regras 13, 15 e 16 possuem saída canalizada 1, e as Regras 1, 2, 3 e 4 possuem saída canalizada 0.

B	C	Regra 1	Regra 2	Regra 3	Regra 4	Regra 5	Regra 6	Regra 7
0	0	0	1	0	1	0	1	0
1	0	0	0	1	1	0	0	1
0	1	0	0	0	0	1	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0

Regra 8	Regra 9	Regra 10	Regra 11	Regra 12	Regra 13	Regra 14	Regra 15	Regra 16
1	0	1	0	1	0	1	0	1
1	0	0	1	1	0	0	1	1
1	0	0	0	0	1	0	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1

FIGURA 3.3: **Regras Lógicas.** Todas as 16 regras possíveis para um gene A que é regulado por dois outros genes B e C .

Pode-se mostrar que 14 das 16 regras lógicas são canalizadoras. Embora nesse caso a maior parte das regras sejam canalizadoras, a razão entre o número de regras canalizadoras C e o número de regras possíveis R diminui rapidamente com o número de reguladores k do gene (Figura 3.4).

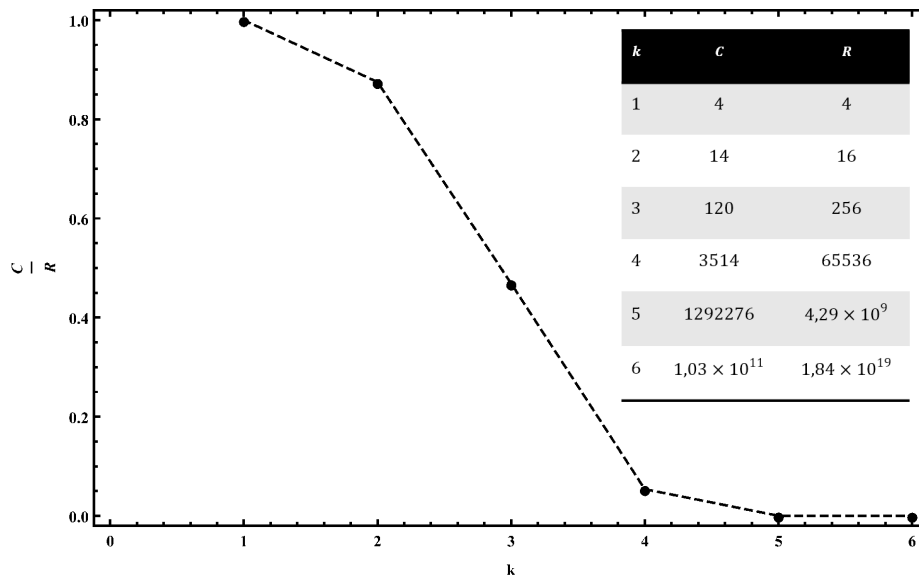


FIGURA 3.4: **Número de Regras Canalizadoras.** O número de regras canalizadoras C aumenta com o número k de reguladores do gene. Contudo, a razão entre o número de regras canalizadoras C e o número total de regras R diminui bruscamente. A informação sobre o número de regras canalizadoras até $k = 10$ pode ser obtida em [35].

Em uma rede real os genes frequentemente possuem vários reguladores. Se um gene com k reguladores tem a dinâmica controlada por uma regra canalizadora, alterações em qualquer um dos $k - 1$ genes, com exceção do gene canalizador, produzem a mesma saída canalizada. Portanto, quanto maior o número de genes na rede associados a regras canalizadoras, maior a estabilidade da mesma.

3.3.2 Regras do tipo limiar

A hipótese central das regras do tipo limiar é que a interação entre os distintos fatores de transcrição na regulação de um dado gene é do tipo aditiva. Um gene j que regula um gene i , o faz com um determinado peso J_{ji} . Se o gene j ativa a expressão do gene i temos que $J_{ji} > 0$. Se ele a inibe, temos que $J_{ji} < 0$. O estado final do gene i é determinado somando as contribuições de todos os seus reguladores (Regra ??).

$$\sigma_i(t+1) = \begin{cases} 1, & \text{se } \sum_{j=1}^{k_i} J_{ji}\sigma_j(t) > \theta_i \\ 0, & \text{se } \sum_{j=1}^{k_i} J_{ji}\sigma_j(t) < \theta_i \\ \sigma_i(t), & \text{se } \sum_{j=1}^{k_i} J_{ji}\sigma_j(t) = \theta_i \end{cases} \quad (3.2)$$

Certamente, um dos pontos fortes das regras do tipo limiar é a descrição das interações regulatórias como ativadoras ou inibidoras, o que a aproxima da nomenclatura biológica. Apesar da sua hipótese central restritiva, as regras do tipo limiar foram utilizadas com sucesso para descrever a sequência biológica correta dos eventos no ciclo celular das leveduras *S. cerevisiae*³ e *S. pombe*⁴ [36, 37]. Esses resultados sugerem que, pelos menos em determinados casos, as interações regulatórias podem ser consideradas como puramente aditivas [38].

³*Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular. É utilizado na produção de pão, cerveja e etanol.

⁴*Schizosaccharomyces pombe* também é um fungo unicelular. É utilizado como organismo modelo em biologia molecular e celular.

3.4 A dinâmica dos modelos booleanos

3.4.1 Os atratores

Seja uma rede com N nós que está sujeita a uma determinada regra de atualização. Sendo σ_i o estado de ativação (0 ou 1) do nó i , dizemos que uma **configuração** é um conjunto $\{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N\}$ com N elementos que indica o estado de todos os nós da rede. Ao conjunto de todas as configurações possíveis (2^N configurações), denominamos de **espaço das configurações**.

Se escolhermos uma configuração A aleatória e aplicarmos a regra de atualização, uma nova configuração B é produzida⁵. Se tornarmos a aplicar a regra na configuração B , produziremos uma outra configuração C . Ao executarmos esse procedimento inúmeras vezes estaremos gerando “caminhos” ou “fluxos” no espaço das configurações. Entretanto, como o espaço de configurações é finito, o fluxo das configurações também será. Em algum momento, a aplicação da regra de atualização produzirá uma configuração que já foi produzida. Denominemos a configuração antecedente à configuração já produzida de I . Existem apenas duas possibilidades para a configuração sucessora de I ; ou ela é uma configuração anterior pertencente a algum ponto do fluxo (por exemplo, a configuração D na Figura 3.5) ou ela é a própria configuração I .

Observe que no caso da Figura 3.5(a), se a regra de atualização continuar a ser aplicada, as configurações D , E , I vão se repetir indefinidamente na sequência $\{D, E, I, D, E, I, \dots\}$. No caso da Figura 3.5(b), a configuração produzida é sempre a I .

Ao conjunto de configurações para o qual a dinâmica do sistema converge denominamos de **atrator**. O período de um atrator corresponde ao número de configurações que ele possui. Atratores que possuem período maior que 1, como o da Figura 3.5(a), que possui período igual a 3, são denominados de **ciclos limites**. Atratores de período 1 são denominados **pontos fixos** (como o da Figura 3.5(b)).

Distintamente do caso ilustrativo anterior, o espaço de configurações pode ser muito complexo. Em geral, existem vários fluxos de configurações que convergem para um ou mais atratores. A Figura 3.6 ilustra um caso em que o espaço de

⁵A não ser no caso de escolhermos justamente um ponto fixo.

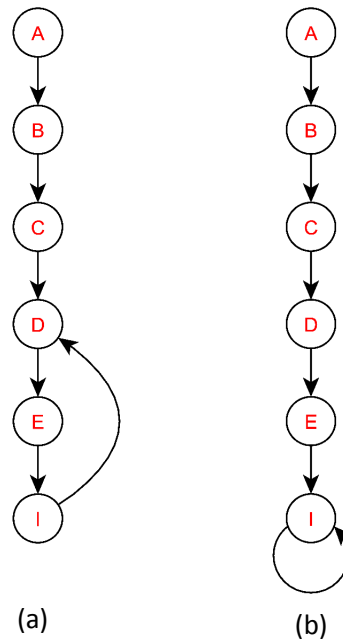


FIGURA 3.5: **Fluxos de Configurações.** Em (a), o fluxo de configurações culmina em um ciclo limite de período 3. Em (b), o fluxo de configurações atinge o ponto fixo I .

configurações possui dois atratores. Um deles é um ciclo limite de período 7 (configurações em azul) e, o outro, um ponto fixo (configuração em vermelho). Observe que cada atrator possui um determinado número de configurações as quais ele atrai. Denominamos esses conjuntos de configurações atraídas de **bacias de atração**. O tamanho da bacia de atração de um atrator está diretamente relacionado à sua importância na dinâmica do sistema. Quanto maior for, maior a probabilidade de que a dinâmica culmine no dito atrator.

3.4.2 As células “funcionam” nos atratores

Uma **configuração** é um conjunto $\{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N\}$ com N elementos que indica o estado de todos os nós da rede. Em outras palavras, uma configuração representa um determinado padrão de expressão gênica. Portanto, um atrator com p configurações (período p) representa um conjunto limitado de padrões de expressão gênica que se repetem ciclicamente.

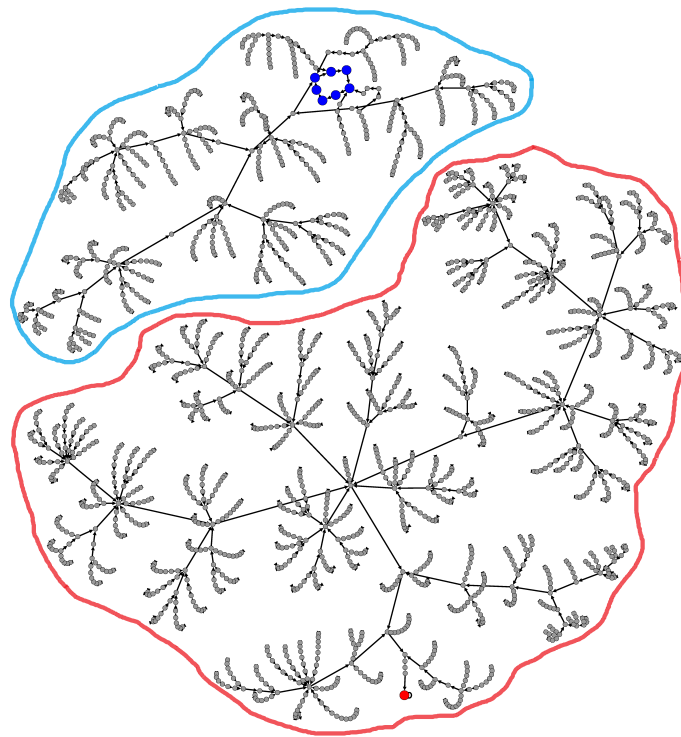


FIGURA 3.6: **Bacias de atração.** No espaço de configurações, conjuntos de configurações são atraídos pelos atratores. Denominamos esses conjuntos de bacias de atração.

Os atratores assemelham-se ao que se observa nas células. As células são sistemas estáveis, caso não haja modificações nas condições ambientais ou mutações genéticas, o seu comportamento não se altera ⁶, ou seja, o seu padrão de expressão.

Essas considerações levaram Stuart Kauffman a admitir como hipótese que *as células operam nos atratores do sistema* [39]. Portanto, um atrator representa um determinado comportamento celular. Dessa forma, espera-se que uma célula em ciclo esteja em um atrator distinto de uma célula que não está se dividindo, por exemplo.

Independentemente da rede de regulação ou da regra adotada, todos os modelos booleanos produzem atratores no espaço das configurações. Contudo, o número, o tamanho da bacia de atração, e o período dos atratores produzidos dependem tanto da rede quanto da regra. Essas quantidades são importantes na análise da adequabilidade do modelo para descrever um problema em questão. É razoável esperar, por exemplo, que o atrator com a maior bacia de atração descreva um

⁶Salvo as flutuações inerentes ao mecanismo de regulação

comportamento bem conhecido do sistema, já que, segundo a hipótese de Kauffman, é o comportamento celular mais provável.

3.5 Considerações finais

O modelo de redes booleanas é uma abordagem simples para o estudo das redes de regulação. Ele exige poucas informações (informações experimentais qualitativas costumam ser suficientes), é de fácil implementação computacional e fácil de ser analisado mesmo para grandes sistemas. Além disso, os resultados obtidos geralmente permitem a obtenção de várias informações úteis sobre a dinâmica do sistema [40].

Naturalmente, a adequabilidade do modelo de redes booleanas depende do nível em que se quer estudar o problema. Informações mais “finas” sobre a dinâmica da regulação, tais como a concentração das proteínas e dos fatores de transcrição, demandam uma outra abordagem como, por exemplo, modelos de equações diferenciais. Esses modelos são baseado em hipóteses mais realistas e produzem resultados mais precisos. Como esperado, o preço por querer mais é oferecer mais; a quantidade de dados experimentais necessários para se determinar as variáveis do modelo aumenta muito, assim como a dificuldade de análise do modelo. Para redes que incluem vários elementos, essa abordagem mais “fina” torna-se impraticável [41].

Um Modelo de Rede Booleana para as Rotas do Câncer

EMBORA o câncer seja um fenômeno complexo cujo desenvolvimento ocorre em várias escalas e envolve milhares de células em uma batalha Darwiniana, fundamentalmente ele é uma desordem de fundo genético. Se é um fato que uma análise apenas nessa escala não é capaz de explicar o câncer, também é verdade que ela não pode ser desprezada.

Neste capítulo, apresentamos o modelo desenvolvido para a escala genética ou microscópica do câncer. Nesse modelo, propomos uma rede de regulação gênica que engloba partes do genoma humano que são frequentemente alteradas no câncer, conjuntamente com uma regra de evolução que determina a forma como os membros da rede interagem entre si.

4.1 A construção da rede

Redes biológicas como as de regulação gênica e de interação de proteínas exibem uma estrutura modular, na qual cada módulo é formado por elementos (genes, proteínas) que interagem preferencialmente entre si e estão associados conjuntamente ao controle de um ou mais processos celulares [42]. A rede que propomos para o câncer é um exemplo de uma rede com estrutura modular. Optaremos por utilizar o termo **rota de sinalização** ao invés de módulo.

A metodologia utilizada na construção da rede pode ser dividida em três etapas. Inicialmente, identificamos as rotas de sinalização que são frequentemente alteradas em diversos tipos de câncer. Na sequência, identificamos os principais elementos de cada uma das rotas isoladamente e, por último, a forma como as rotas interagem entre si. Para obter essas informações, realizamos uma extensa busca na literatura especializada e utilizamos o banco de dados [KEGG](http://www.genome.jp/kegg/) (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>).

Identificamos um total de 8 rotas de sinalização, a saber:

- **Rota RTK:** associada à regulação da proliferação, diferenciação, promoção da sobrevivência, e modulação do metabolismo celular;
- **Rota PI3K-Akt:** associada com sinalização dependente da concentração de fatores de crescimento. Fortemente associada com a sinalização para a sobrevivência celular e captação de glicose [43];
- **Rota Wnt:** envolvida na regulação do processo de desenvolvimento embrionário. No organismo adulto está associada a homeostase e a renovação tecidual [44];
- **Rota TGF- β -Smad:** associada à percepção e sinalização de fatores de inibição proliferativa;
- **Rota Rb/E2F:** associada à regulação da iniciação da replicação do DNA [45];
- **Rota HIF-1:** associada à percepção da concentração de oxigênio no meio e às mudanças metabólicas adequadas [46];
- **Rota de apoptose:** associada à decisão celular de entrar ou não em apoptose;
- **Rota ATM/ATR:** associada à percepção e reparo de danos no DNA.

Os elementos da rede ou nós, podem ser classificados em **internos** e **externos**. Os nós externos são entradas que informam as condições presentes no meio extracelular. Existem cinco nós externos que agem como sensores das concentrações de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, fatores de morte e de mutagênicos.

Os nós internos são os nós restantes da rede, sendo que a maior parte deles representam genes. Alguns nós internos representam complexos de proteínas e outros são saídas abstratas como os nós “Apoptose” ou “Reparo do DNA”, que indicam processos que estão ocorrendo.

A rede resultante é apresentada na Figura 4.1. Para uma melhor visualização dos nós constituintes da rede, todas as 8 rotas de sinalização são apresentadas em detalhe no Apêndice A.

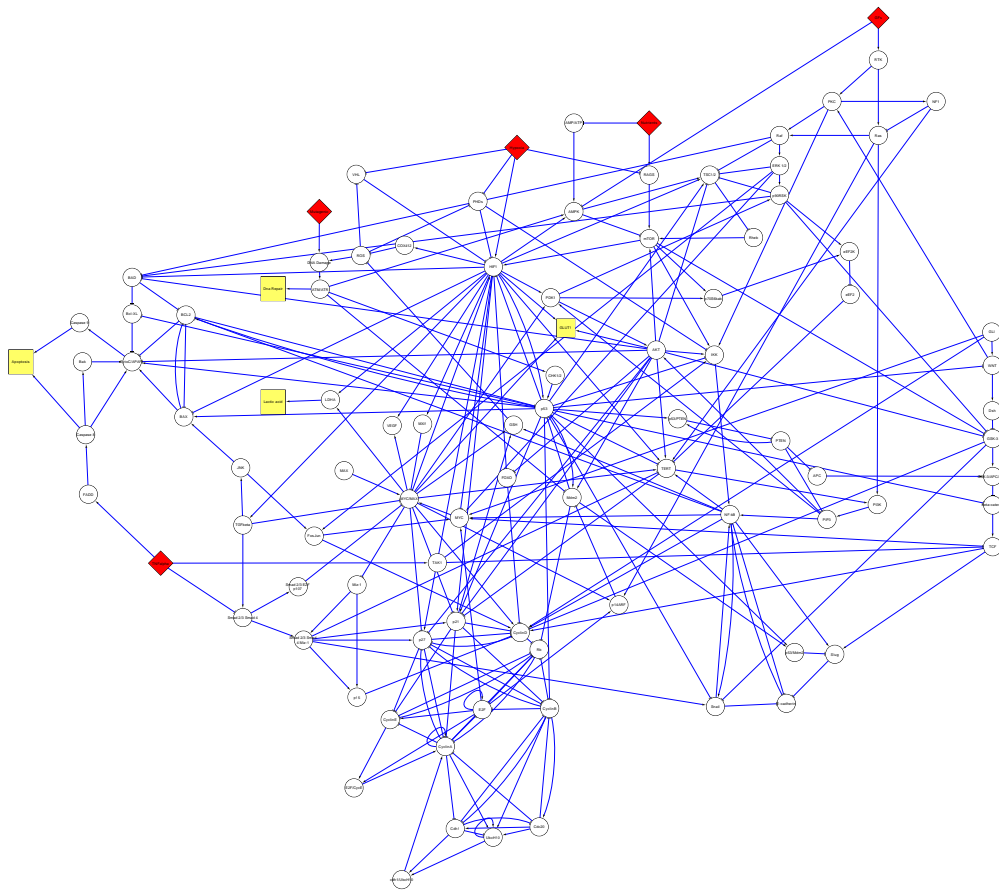


FIGURA 4.1: **Rede para o câncer.** Os nós correspondentes às condições ambientais (nós externos) estão em vermelho, os nós internos estão em amarelo e branco. Ligações regulatórias ativadoras são representadas por uma seta e as inibidoras por uma linha com uma barra perpendicular a ela.

4.1.1 A caracterização da rede

Caracterizamos a rede proposta de acordo com algumas propriedades topológicas usualmente utilizadas. Comparamos os valores dessas propriedades

com aqueles obtidos de um *ensemble* de redes aleatórias com o mesmo número de nós e o mesmo número médio de arestas. Como pode ser visto através da Tabela B.1, a rede para o câncer possui um caminho médio pequeno (efeito *small-world*) assim como o *ensemble* de redes aleatórias. Contudo, diferentemente das redes aleatórias, a rede para o câncer exibe um alto valor para o coeficiente de aglomeração. As distribuições de conectividades de entrada ($P(k_{in})$) e saída ($P(k_{out})$) podem ser vistas na Figura 4.2 e, como pode ser notado, se aproxima de uma distribuição livre de escala para $P(k_{in})$. De fato, estas três características: caminho médio pequeno, alto coeficiente de aglomeração e distribuição livre de escala parecem ser onipresentes em redes biológicas [47].

Propriedades da Rede	Câncer	Aleatória
Nós	96	96
Arestas	249	249 ± 12
Conectividade média	2,59	$2,59 \pm 0,12$
Menor caminho médio	3,14	$2,91 \pm 0,08$
Coeficiente de aglomeração	0,178	$0,026 \pm 0,005$

TABELA 4.1: **Propriedades topológicas da rede:** para o câncer e para um *ensemble* de redes aleatórias.

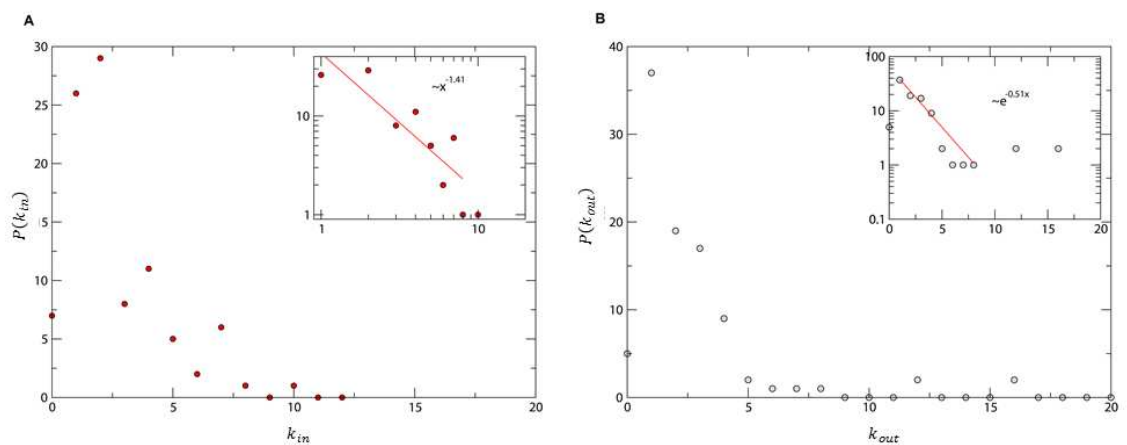


FIGURA 4.2: **Distribuição de conectividades da rede.** (a) Distribuições de conectividades de entrada $P(k_{in})$ e (b) de saída $P(k_{out})$.

Uma rápida definição dessas propriedades é apresentada no Apêndice A.

4.2 Propondo uma dinâmica para a regulação

Admitimos que os nós da rede só podem assumir dois valores (abordagem booleana), 0 ou 1, que representam os estados inativo e ativo, respectivamente. No caso dos nós que representam genes, o estado ativo significa que o gene está sendo expresso e, o estado inativo, que ele não está ¹. No caso dos complexos proteicos, o estado ativo significa que o complexo é formado e o inativo que não há formação do mesmo. Os nós externos ou ambientais seguem a mesma linha, se o nó associado aos nutrientes estiver ativo, por exemplo, isto significa que a concentração de nutrientes no meio extracelular é maior ou igual à concentração adequada para a célula.

Nós propomos uma regra ou função de atualização determinística do tipo limiar que nos permite obter o estado de todos os nós em um instante $t + 1$ desde que saibamos o estado de todos os nós no tempo t . A regra utilizada é a seguinte:

$$\sigma_i(t + 1) = Sgn \left(J_{ii}\sigma_i(t) + \sum_{j=1}^{k_i} J_{ji}\sigma_j(t) - \theta_i \right) \quad (4.1)$$

$$Sgn(x) = \begin{cases} 1 & \text{se } x > 0 \\ 0 & \text{se } x \leq 0 \end{cases} \quad (4.2)$$

A constante de acoplamento J_{ji} assume valores inteiros negativos ou positivos. O seu valor informa como o nó j regula o nó i , inibindo (sinal negativo) ou ativando (sinal positivo), e o peso dessa regulação, dado pelo módulo de J_{ji} . Sendo assim, o que a regra nos diz é que para decidir o seu estado em um tempo $t + 1$ um nó soma todos os estímulos devido aos nós que o regulam e a si mesmo ($J_{ii}\sigma_i(t) + \sum_{j=1}^k J_{ji}\sigma_{j(i)}(t)$) em um tempo t . Se essa soma for maior que um determinado limiar de ativação característico de cada nó θ_i , esse nó estará ativo em $t + 1$, caso contrário estará inativo. Observe que mesmo se um nó j fizer parte dos reguladores de um gene i ele somente estará exercendo efetivamente a regulação se estiver ativo. A regra de atualização somente se aplica aos nós internos, os nós externos não são modificados por ela, uma vez que representam as condições do ambiente celular.

¹Admitimos que se o gene está sendo expresso, a proteína associada ao mesmo se encontra presente na célula. Ou seja, desprezamos qualquer tipo de regulação pós-transcricional.

4.2.1 Os atratores

O conceito de atratores e a sua associação com os fenótipos celulares é de fundamental importância em nosso modelo. Para compreendermos o que são atratores, imaginemos o seguinte procedimento:

1. Defina um conjunto de valores para os nós da rede que representam as condições ambientais, por exemplo: Hipóxia=0, Fator de Crescimento=0, Nutrientes=1, Mutagênicos=0, Fator de Morte=0.
2. Escolha aleatoriamente um conjunto de valores 0 ou 1 para todos os outros nós da rede, ou seja, os nós chamados internos. Essa será a configuração da rede no tempo $t = 0$.
3. Aplique a regra de evolução 4.1 sobre a rede com a configuração escolhida na etapa anterior. Salve a nova configuração obtida através da aplicação da regra.
4. Repita as etapas 2 e 3 inúmeras vezes.

Para representar graficamente a nossa experiência, associemos a cada configuração da rede, tanto a escolhida aleatoriamente quanto a obtida depois da aplicação da regra, uma bolinha (ou um nó). Se uma configuração leva para outra depois da aplicação da regra de evolução, nós desenharemos uma seta partindo desta configuração e apontando para a configuração a qual ela leva. A Figura 4.3 exemplifica os resultados obtidos quando executamos o procedimento proposto 10.000 vezes.

Observe que existe um fluxo de configurações em direção a dois conjuntos destacados no gráfico (configurações azuis e vermelha). Cada um desses conjuntos de configurações é chamado de atrator. Um atrator que possui p configurações é dito de período p , no caso em que $p = 1$ dizemos que o atrator é um **ponto fixo**. A Figura 4.3 apresenta dois atratores, observe que cada atrator atrai um determinado conjunto de configurações que lhe é próprio, ou seja, uma dada configuração flui para apenas um atrator. O conjunto de todas as configurações atraídas por um atrator é chamado de **bacia de atração**.

Como uma configuração do sistema se constitui no estado de ativação dos nós da rede, dizemos que cada configuração representa um **padrão de expressão**

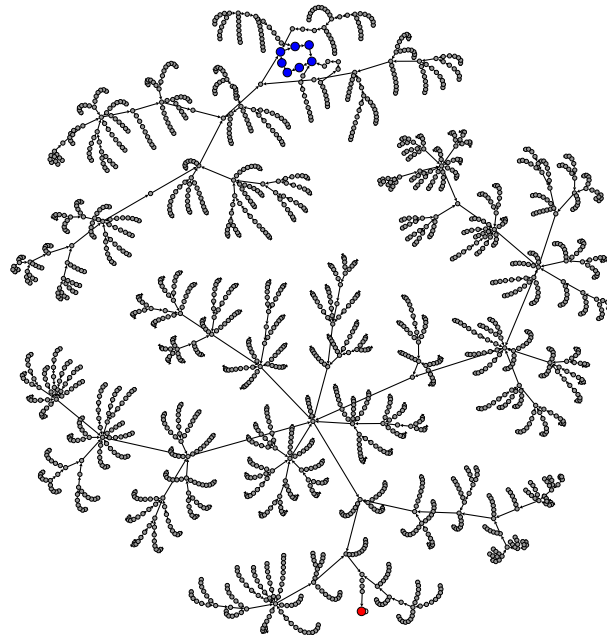


FIGURA 4.3: Atratores.

gênica. Embora essa identificação associe o modelo boleano com a biologia da regulação, ainda precisaremos assumir as seguintes hipóteses:

1. As células operam nos atratores do sistema;
2. A quantidade de configurações atraídas por um dado atrator é uma medida da probabilidade de ocorrência do mesmo no contexto celular.

4.2.2 Os fenótipos celulares

O **genótipo** é o conjunto de todos os genes de um organismo. Em nosso caso, o genótipo corresponde aos nós da rede proposta ². O **fenótipo** corresponde às características físicas e bioquímicas observadas na célula, sendo um resultado

²Com exceção daqueles nós que não representam genes e dos nós associados às condições ambientais

da interação entre o ambiente celular e o genótipo da mesma. Essa interação leva à expressão de determinados genes e de outros não. Através da análise do conjunto de genes expresso podemos identificar o tipo de comportamento celular exibido.

Utilizamos o conceito de fenótipo para interpretar o comportamento celular associado aos atratores produzidos pela dinâmica do problema. *Definimos os fenótipos como o estado de ativação de um determinado grupo de genes ao longo do período de um dado atrator.* Definimos os sete fenótipos a seguir:

- **Apoptótico:** o fenótipo apoptótico é aquele das células em apoptose. Para verificá-lo, analisamos o estado de ativação de dois nós, a saber: *Caspase 8* e *Caspase 9*. A ativação de algum deles ($\sigma_{\text{Casp8}} = 1 \vee \sigma_{\text{Casp9}} = 1$) em alguma configuração pertencente ao atrator é suficiente para que o fenótipo seja dito apoptótico. O fenótipo apoptótico exclui todos os outros. Portanto, todos os fenótipos definidos a seguir só terão significado se o fenótipo apoptótico não for observado.
- **Proliferativo:** o fenótipo proliferativo é aquele das células em processo de divisão. Analisamos o estado de ativação de 3 nós da rede, a saber, *Ciclina A*, *B*, e *E*. Como as ciclinas são expressas de forma diferente ao longo do ciclo celular, a ordem de ativação dos nós é importante. As ciclinas precisam ser expressas na ordem *Ciclina E*, *Ciclina A*, e *Ciclina B*.
- **Quiescente:** o fenótipo quiescente é aquele das células que não estão em divisão. Todos os atratores nos quais as ciclinas estão inativas ou ativadas em uma ordem incorreta possuem esse fenótipo.
- **Migratório:** o fenótipo migratório é aquele das células que podem se mover no tecido. Esse fenótipo é observado se o nó *E-caderina* estiver inativo ($\sigma_{\text{E-cad}} = 0$) ao longo de alguma configuração do atrator.
- **Imortalizado:** a maior parte das células só pode se dividir um determinado número de vezes, o que é chamado de limite de Hayflick. Quando esse limite é alcançado elas entram em um estado dormente chamado senescência e posteriormente morrem. As células que conseguem vencer o limite de Hayflick e podem se dividir um número indeterminado de vezes possuem o fenótipo imortalizado. Esse fenótipo é observado se o nó correspondente a *hTert* ($\sigma_{\text{hTert}} = 1$) estiver ativo em alguma configuração do atrator.

- **Glicolítico:** células que utilizam a rota anaeróbica para a produção de ATP mesmo na presença de oxigênio possuem o fenótipo glicolítico. Se o nó *HIF-1* estiver ativo e o nó associado a condição ambiental de *hipóxia* estiver inativo ($\sigma_{\text{hif1}} = 1 \wedge \sigma_{\text{hip}} = 0$), dizemos que o atrator possui esse fenótipo.
- **Mutatório:** células com defeitos nos mecanismos de reparo do DNA apresentam um aumento na taxa de mutações, o que caracteriza o fenótipo mutatório. Se o nó associado à condição ambiental de *mutagênicos* estiver ativo e o nó associado ao processo de *reparo do DNA* estiver inativo ($\sigma_{\text{mut}} = 1 \wedge \sigma_{\text{rep}} = 0$), dizemos que o atrator possui o fenótipo mutatório.

Como já dito, o fenótipo apoptótico exclui todos os outros. Naturalmente, o fenótipo quiescente e o proliferativo são mutuamente excludentes. Os demais fenótipos podem ser observados conjuntamente.

4.2.3 As escolhas dos pesos e limiares da regra de atualização

Como já vimos, a regra de evolução 4.1 contém dois conjuntos de parâmetros: o conjunto dos pesos $J = \{J_{ij}\}$ e o conjunto dos limiares de ativação $\Theta = \{\theta_i\}$. Obviamente, diferentes conjuntos de parâmetros implicam diferentes regras de evolução. Como escolher uma regra adequada entre as inúmeras possibilidades? Antes de apresentar a metodologia utilizada, é necessário definir o que entendemos como adequado.

Definição 1. *Uma regra será dita adequada se os resultados produzidos pela dinâmica do modelo reproduzirem qualitativamente os resultados conhecidos em determinadas condições ambientais para as células normais.*

Utilizamos a seguinte metodologia para encontrar uma regra que satisfaça essa definição: Inicialmente, adotamos como conjuntos-base os valores de todos os pesos J_{ij} como +1 ou -1, conforme a interação seja ativadora ou inibidora, e os valores de todos os limiares como 0. Procuramos alterar esses conjuntos-base de parâmetros aos poucos, comparando os resultados produzidos com aqueles esperados para uma célula normal. Utilizamos duas fontes para fazer modificações

nos conjuntos-base, o que podemos chamar de (I) imposições decorrentes da estrutura da rede e, (II) informações experimentais qualitativas sobre o estado de ativação dos nós.

As imposições decorrentes da estrutura da rede observam-se nos casos em que temos um nó i que é regulado por apenas um outro nó j . Se j ativa i , então i só deve estar ativo se j estiver. Ao contrário, se j inibe i , então i só deve estar inativo quando j estiver ativo. Qualquer outro resultado significa que o nó j não tem efeito sobre o nó i , o que contraria a premissa de que j é regulador de i .

Alguns exemplos de informações qualitativas utilizadas são as seguintes: o nó HIF-1 é expresso quando a concentração de oxigênio diminui no meio extracelular [48]; é necessário que NF1 esteja inativo para que Ras se ative [49]. Informações similares a estas nos permitem modificar pesos e limiares dos nós envolvidos até que a dinâmica produza os resultados esperados.

Através da metodologia explicada escolhemos os seguintes valores para os parâmetros:

- Todos os pesos J_{ij} são iguais a $+1$ ou -1 , com exceção daqueles apresentados na Tabela A.1 do Apêndice A;
- Todos os limiares θ_i são iguais a 0 , com exceção daqueles apresentados na Tabela A.2 do Apêndice A.

É necessário ressaltar que existem outros conjuntos de parâmetros que também produzem uma resposta aceitável. Alguns desses conjuntos são equivalentes ao conjunto adotado. Esse é o caso quando a modificação do módulo de um peso é irrelevante ou então pode ser contrabalançada pela modificação de um limiar. Entretanto, existem conjuntos de parâmetros que são essencialmente distintos. Estes conjuntos de parâmetros também geram respostas aceitáveis porque modificam apenas aspectos quantitativos da resposta do modelo ³

³Por exemplo, sabemos que a hipóxia pode induzir a apoptose em células normais. Contudo, o quanto a apoptose é induzida depende, entre outros fatores, do tipo celular e do tempo de permanência nessa condição. Não temos motivos plausíveis para dizer que um conjunto de parâmetros que leva a 100% de apoptose é menos ou mais adequado do que um que leva 50%. Entretanto, podemos dizer que os dois conjuntos são mais adequados do que um que leva a 0% de apoptose, já que essa resposta é observada.

4.3 Os resultados

4.3.1 A célula normal

A rede proposta e a regra de atualização 4.1 com os valores dos parâmetros definidos na seção anterior representam uma célula normal no modelo. Por esse motivo, apresentamos nessa seção justificativas dessa identificação através da comparação dos resultados produzidos pela dinâmica do modelo com aqueles observados em células normais. Determinamos também a estrutura do espaço de estados da célula normal, o que inclui a análise do número e do fenótipo dos atratores contidos nesse espaço.

Como já dito, existem 5 nós associados às condições ambientais, logo nós temos um total de 32 (2^5) condições ambientais distintas. Para cada condição ambiental existem 2^{91} estados ou configurações possíveis. Devido as condições ambientais serem fixas, o espaço de estados é subdividido em 32 subconjuntos de condições iniciais. Por sua vez, cada subconjunto é subdividido nas bacias de atração de seus atratores.

Para estudarmos o espaço de estados, sorteamos para cada uma das condições ambientais um milhão de estados iniciais e determinamos os atratores, os fenótipos associados e o tamanho da bacia de atração de cada atrator. Determinamos que o espaço de estados é formado por 62 atratores. Quais são esses atratores, o tamanho das suas bacias de atração, o seu fenótipo, e a condição ambiental a qual pertencem são apresentados no Apêndice A.

A comparação dos atratores de todas as condições ambientais entre si, excluindo dessa comparação os nós associados às condições ambientais, revela que todos eles são distintos. Dessa forma, o repertório de atratores é determinado univocamente pelo microambiente celular. Apesar de distintos, vários desses atratores compartilham o mesmo fenótipo, ou seja, fundamentalmente estão associados ao mesmo comportamento celular ⁴. Entre os 62 atratores, 47 são apoptóticos, 3 são proliferativos e 12 são quiescentes, os quais atraem 87,4%, 3,1% e 9,5% de todas as condições iniciais testadas (32 milhões). A Figura 4.4 ilustra o que convençionalmente chamamos de **espaço de fenótipos**, nela observamos a quais tipos de fenótipo cada condição ambiental conduz.

⁴Dentro dos fenótipos estabelecidos. Como existe diferença na expressão de alguns genes, outras características fenotípicas não analisadas podem diferir nos dois atratores.

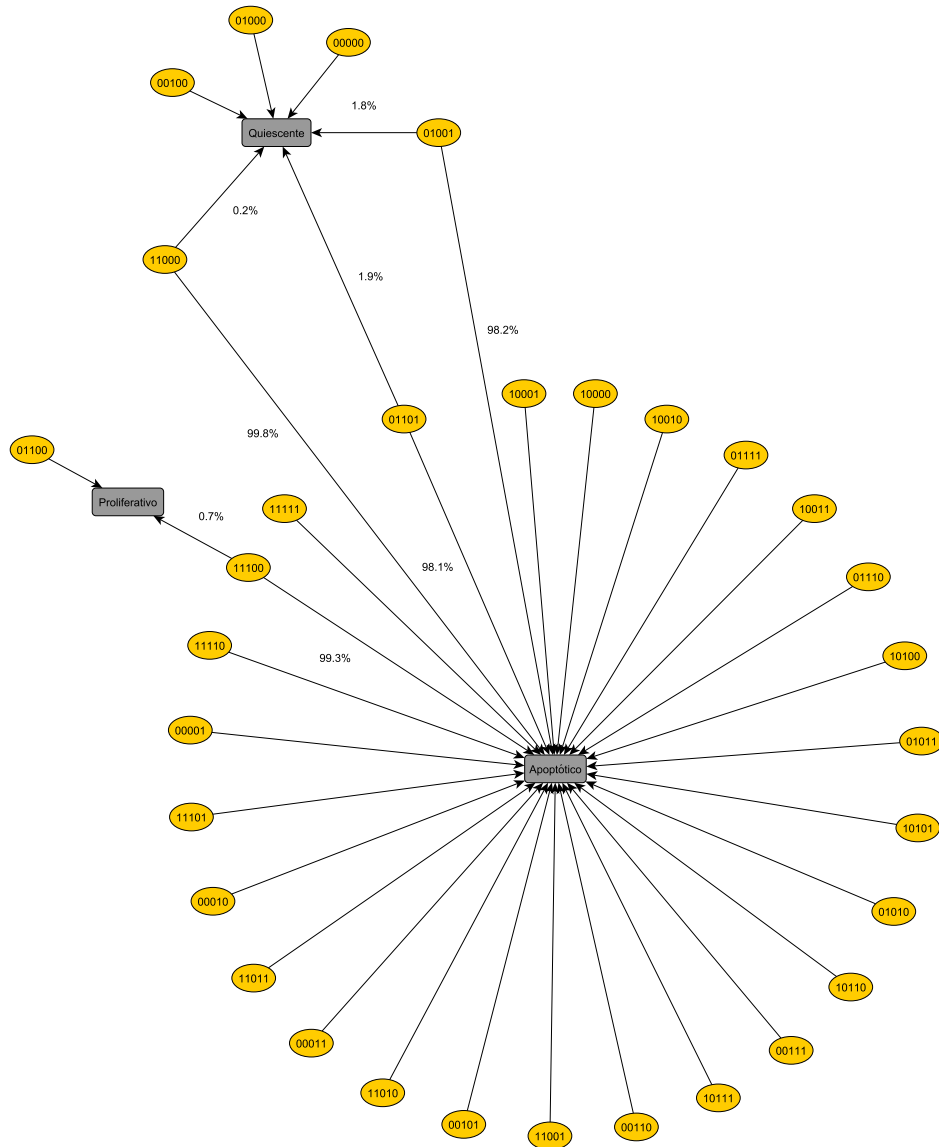


FIGURA 4.4: **Espaço de fenótipos.** Três fenótipos (apoptótico, proliferativo e quiescente) são gerados em resposta a todas as 32 condições ambientais distintas. Na Figura, um microambiente é especificado por uma sequência binária de valores associados aos seus nós de entrada (mutagênicos, fatores de crescimento, suprimento de nutrientes, fatores de morte, hipóxia). Por exemplo, o microambiente (11000), correspondente à presença de mutagênicos e fatores de crescimento, pode levar a célula a um fenótipo apoptótico (em 99,8% dos estados iniciais) ou a um fenótipo quiescente (raramente, 0,2%). Em nossa rede, mutagênicos geram danos no DNA e $TNF-\alpha$ é o fator de morte.

A seguir, comentamos em detalhes os resultados produzidos para algumas dessas condições ambientais. A condição ambiental (00100) corresponde a presença de oxigênio e nutrientes em concentrações adequadas e a baixas concentrações de fatores de crescimento, morte ou mutagênicos. Para todos os estados iniciais

testados, a dinâmica do modelo leva para um ponto fixo associado a um fenótipo quiescente. Se, em adição a normoxia e a abundância de nutrientes, existem fatores de crescimento (01100), a rede sempre evolui para um ciclo limite associado a um fenótipo proliferativo. Dessa forma, como esperado, células normais são totalmente dependentes de sinais mitogênicos para a sua proliferação [50]. Além disso, sob hipóxia, suprimento adequado de nutrientes e ausência de fatores de crescimento (00101), para todos os estados iniciais testados a rede é atraída para um ponto fixo correspondente a um fenótipo apoptótico. De forma consistente, a morte celular programada é uma resposta típica das células somáticas a muitas formas de estresse, tais como hipóxia e privação de nutrientes [50].

Em um ambiente de hipóxia com concentração adequada de nutrientes e presença de fatores de crescimento (01101), a rede exibe biestabilidade. Isto é, ela pode ser atraída para um fenótipo quiescente (em 2% dos estados iniciais) ou para um fenótipo apoptótico (98% dos estados iniciais). De fato, é conhecido que a ativação por hipóxia de HIF-1 inibe Myc, levando à parada do ciclo celular (quiescência)[51]. Sabe-se também que HIF-1 pode se ligar a p53 e estabilizá-lo, o que pode levar a apoptose ou à interrupção do ciclo celular [52]. A biestabilidade também é observada se um dano no DNA (mutagênicos) é introduzido em um cenário de normoxia, nutrientes e sinalização mitogênica (10100): cerca de 99,35% dos estados iniciais compatíveis são atraídos para um fenótipo apoptótico, enquanto uma fração muito pequena (0,65%) alcança um fenótipo proliferativo. Novamente, é bem conhecido o fato de que o ciclo celular pode ser facilmente interrompido e a apoptose deflagrada em resposta a danos no DNA de células normais. Contudo, uma resposta proliferativa, embora rara, confere às células somáticas alteradas uma capacidade de se proliferar. Em nosso modelo, essa resposta proliferativa é associada a dois ciclos limites distintos. Em um deles os sinais antiapoptóticos — Bcl-2, Bcl-X_L e Mdm2 — estão sempre ativos enquanto os sinais pró-apoptóticos — Bad, Bax, p53 — estão inativos. No outro ciclo limite, Bad e Bax estão inativos, mas p53 e os sinais antiapoptóticos oscilam de tal forma que quando p53 está ativo o mesmo ocorre com Bcl-2, Bcl-X_L e Mdm2. Dessa forma, as caspases, que são quem de fato deflagram a apoptose, permanecem inativas ao longo desses ciclos limites.

Em resumo, a rede como um todo gera respostas coerentes com aquelas observadas em células normais sob diferentes condições ambientais, o que sugere que o modelo está qualitativamente correto.

4.3.2 As mutações

Agora que já definimos o que é uma célula normal no modelo, podemos estudar o efeito das mutações nessa célula. Com esse intuito, definimos as seguintes formas de mutações que podem ser aplicadas a um nó i da rede:

- **Deleção:** o nó i é mantido sempre inativo ($\sigma_i(t) = 0, \forall t$);
- **Ativação constitutiva:** o nó i é mantido sempre ativo ($\sigma_i(t) = 1, \forall t$);
- **Superexpressão:** o nó i é mantido sempre ativo e o peso com o qual ele regula os seus nós-alvo é multiplicado por um fator α ($\sigma_i(t) = 1, J_{ij} = \alpha J_{ij}, \forall t$).

Como estamos interessados em estudar o processo de desenvolvimento do câncer, procuramos mutações cujo efeito seja conferir algum tipo de vantagem seletiva a célula mutada em relação às células normais, como por exemplo, proliferação na ausência de fatores de crescimento ou a evasão da apoptose. Essas mutações são denominadas “*drivers*”. O estudo está centrado em duas condições ambientais, (00100) e (00101). Como explicaremos posteriormente, essas são duas condições inicialmente enfrentadas por grande parte dos tumores.

Inicialmente, supomos que os mecanismos de detecção de mutações no DNA estão funcionais. Para modelar isto, mantemos sempre ativo um nó presente na rede denominado “Dano no DNA”⁵. O caso em que as mutações no DNA não são detectadas também é estudado.

4.3.2.1 Condição ambiental (00100)

Ao surgir em um tecido normal é provável que uma célula mutada se encontre em um meio com concentração adequada de nutrientes e oxigênio. Excetuando-se os casos nos quais o tecido em que a célula surja esteja enfrentando um processo inflamatório ou esteja se recuperando de uma lesão, é provável que a concentração de fatores de morte e de crescimento também seja mínima. Portanto, a condição ambiental (00100) é enfrentada frequentemente por uma célula mutada

⁵Isso é equivalente a alterar a condição ambiental mutagênicos para 1, uma vez que o nó externo “Mutagênicos” ativa única e diretamente o nó “Dano no DNA”.

que inicia o processo de carcinogênese. Como já exposto, nessa condição ambiental a célula normal do modelo possui o **fenótipo quiescente**. Dessa forma, qualquer mutação que leve essa célula a exibir um **fenótipo proliferativo** é uma candidata em potencial a estar associada ao processo de carcinogênese.

Para todos os nós da rede que representam genes, estudamos o fenótipo produzido pelos três tipos de mutação. A Tabela 4.2, apresenta os genes que quando mutados conferem a célula uma vantagem proliferativa. O tipo de mutação é apresentado, assim como o que denominamos de eficácia da mutação. *A eficácia corresponde ao percentual de estados iniciais que são atraídos para algum atrator que possui o fenótipo almejado, no caso presente, o fenótipo proliferativo.*

Gene	mutação	eficácia
Egfr	ativação	0,91%
	superexpressão	0,91%
Gli	ativação	0,08%
	superexpressão	0,35%
hTert	ativação	0,07%
	superexpressão	0,07%
Nf1	deleção	0,03%
Nf- κ B	superexpressão	0,13%
PI3K	ativação	0,14%
	superexpressão	0,73%
Pkc	ativação	0,48%
	superexpressão	1,34%
Pten	deleção	0,51%
Ras	ativação	0,16%
Wnt	ativação	0,6%
	superexpressão	0,6%

TABELA 4.2: **Mutações *driver* na condição de normoxia.** Genes afetados e mutações correspondentes que levam a rede a um fenótipo proliferativo na condição de normoxia e abundância de nutrientes. Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

4.3.2.2 Condição ambiental (00101)

Um suprimento inadequado de oxigênio é uma condição enfrentada pelo tumor ao longo de todo o seu desenvolvimento. Na fase inicial, denominada avascular, o oxigênio que o tumor recebe difunde a partir da vasculatura pré-existente

no tecido. Como a partir de uma certa distância dos vasos sanguíneos a quantidade de oxigênio que chega até as células neoplásicas é inadequada, o crescimento do tumor se encontra limitado. Para seguir adiante, o tumor precisa estimular a produção de novos vasos sanguíneos para suprir a sua demanda, fenômeno conhecido como angiogênese. Entretanto, mesmo em tumores que já desenvolveram uma vasculatura própria existem regiões de hipóxia. Isso ocorre porque a vasculatura produzida pelo processo de angiogênese é irregular, e ineficiente para suprir as necessidades das células tumorais.

Devido à importância da condição ambiental de hipóxia, estudamos o efeito das mutações na condição (00101), que corresponde à presença de nutrientes em condições adequadas e a escassez de oxigênio ⁶. Segundo o modelo, a resposta de uma célula normal nessa condição é a apoptose. Portanto, qualquer mutação que confira à célula alguma capacidade de evadir da apoptose pode ser considerada como potencialmente associada ao câncer. Os genes com essa característica apontados pelo modelo são aqueles da Tabela 4.3.

Gene	mutação	eficácia
Akt	superexpressão	100%
Bcl-2	ativação	100%
	superexpressão	100%
Bcl- X_L	superexpressão	100%
Ikk	superexpressão	88,7%
Nf- κ B	ativação	91,7%
	superexpressão	100%
p53	deleção	100%
Snail	superexpressão	83,6%

TABELA 4.3: **Mutações *driver* na condição de hipóxia.** Genes afetados e mutações correspondentes que capacitam a rede a evadir da apoptose induzida por hipóxia. Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

4.3.2.3 Quando os sensores de integridade não estão funcionais

Nos casos anteriores, supomos que os genes que agem como sensores de integridade do DNA estão funcionais. Contudo, isso nem sempre é verdade. Indivíduos que herdaram mutações nesses genes, tal como o gene ATM, possuem uma

⁶Embora os nutrientes também difundam a partir dos vasos sanguíneos o seu comprimento de difusão é bem superior, de sorte que o primeiro limitante é a escassez de oxigênio.

chance até 100 vezes maior de desenvolver câncer [53]. Sugere-se que as mutações nesses genes possam estar intrinsecamente associadas à própria ocorrência do câncer. Existem sugestões de que a taxa normal de mutação celular não pode responder pela frequência de cânceres observada. Uma solução proposta é que o câncer precisa adquirir um fenótipo mutador [54], caracterizado por um aumento considerável da probabilidade de mutação, obtido justamente através da alteração de genes que fazem o papel de sensores de integridade do DNA.

Haveria alguma alteração nos genes preditos como potencialmente associados ao câncer nas seções anteriores se a rota de reparo do DNA estiver avariada? Para responder essa questão infligimos uma deleção ao principal gene de reparo da rede proposta, o gene ATM, e refizemos a busca por mutações nas condições ambientais (00100) e (00101). Os resultados são apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5.

Gene	mutação	eficácia
Akt	superexpressão	54,3%
Egfr	ativação	100%
	superexpressão	100%
Gli	ativação	100%
	superexpressão	100%
hTert	ativação	100%
	superexpressão	100%
Nf1	deleção	100%
Nf- κ B	superexpressão	2,1%
Pdk1	superexpressão	36%
PI3K	ativação	100%
	superexpressão	100%
Pkc	ativação	100%
	superexpressão	100%
Pten	deleção	100%
Ras	ativação	100%
	superexpressão	100%
Wnt	ativação	100%
	superexpressão	100%

TABELA 4.4: **Mutações *driver* quando existem avarias nos sensores (normoxia).** Novas mutações *driver* sob normoxia e suprimento adequado de nutrientes no contexto em que os sensores de integridade do DNA estão avariados. Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

Na condição ambiental em que há oxigênio e nutrientes em concentrações adequadas (00100), a deleção do gene ATM resulta em um aumento de 10 para 12 no

número de mutações *drivers* associadas à obtenção de um fenótipo proliferativo (Tabela 4.4). Mais expressivo é o aumento observado na eficácia dessas mutações, muitas delas são 100% eficazes em induzir a célula à proliferação.

Na condição de hipóxia e concentração adequada de nutrientes (00101), a deleção de ATM tem como efeito principal o aumento do número de mutações *driver* associadas a evasão da apoptose, de 7 para 22 (Tabela 4.5).

Dessa forma, os resultados indicam que alterações nos sensores de integridade tornam a célula mais propensa a sofrer mutações, ou em outros termos, a exibirem um aumento na instabilidade gênica.

4.4 Mutações *driver* e a topologia

Nesta seção, investigamos se os nós cujas mutações podem conferir vantagens seletivas à célula transformada possuem características proeminentes na topologia da rede. Para todos esses nós a **centralidade de intermediação** B e a conectividade total k ($k = k_{in} + k_{out}$) foi determinada. A centralidade de intermediação B de um nó i é definida como o número de menores caminhos entre todos os pares de nós da rede que passam através de i dividido pelo número de menores caminhos da rede. Sendo assim, se um nó i tem um grau de intermediação de $B = 0,25$, por exemplo, 25% dos menores caminhos da rede passam através dele.

Dividimos os nós em três grupos de acordo com a sua centralidade de intermediação (Tabela 4.6). O primeiro grupo é o de **alta centralidade**, formado por nós que possuem mais do que duas vezes a centralidade média da rede $\langle B \rangle$. O grupo contém oito nós, a saber, Akt, HIF-1, hTert, Ikk, mTor, Myc, Nf- κ B e p53. Esse grupo também é altamente conectado, possuindo uma conectividade média $\langle k \rangle_g$ quase duas vezes maior que a conectividade média da rede $\langle k \rangle$. Esses resultados indicam o papel central desses nós na rede, já que muitas rotas convergem para estes nós (alta conectividade) e muitas rotas encontram nesses nós o caminho mais curto para atingir outros nós da rede (alta centralidade de intermediação). O segundo grupo é formado por nós com **centralidade intermediária** ($\langle B \rangle \leq B < 2\langle B \rangle$) e contém apenas dois nós, Mdm2 e Pdk1. A conectividade média do grupo é ligeiramente menor do que a conectividade média da rede. Por último, o terceiro grupo é formado por nós com **pequena centralidade** ($B < \langle B \rangle$), os quais também possuem pouca conectividade. Esse grupo é o

Gene	mutação	eficácia
Akt	superexpressão	100%
Bcl-2	ativação	100%
	superexpressão	100%
Bcl- X_L	superexpressão	100%
Egfr	ativação	2,6%
	superexpressão	2,6%
Gli	ativação	0,7%
	superexpressão	3,05%
HIF-1	deleção	100%
hTert	ativação	0,09%
	superexpressão	0,09%
Ikk	superexpressão	99%
Mdm2	superexpressão	100%
mTor	superexpressão	19%
Myc	ativação	0,03%
	superexpressão	0,02%
Nf1	deleção	0,08%
Nf- κ B	ativação	99%
	superexpressão	100%
p53	deleção	100%
Phd	superexpressão	100%
Pkc	ativação	2,6%
	superexpressão	9,1%
PI3K	ativação	0,18%
	superexpressão	17,3%
Pten	deleção	14,8%
Ras	ativação	0,17%
	superexpressão	0,17%
Snail	superexpressão	98%
Vhl	ativação	100%
	superexpressão	100%
Wnt	ativação	3,5%
	superexpressão	3,5%

TABELA 4.5: **Mutações *driver* quando existem avarias nos sensores (hipóxia).** Novas mutações *driver* sob hipóxia e suprimento adequado de nutrientes no contexto em que os sensores de integridade do DNA estão avariados.

Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

maior de todos, contendo treze nós: Bcl-2, Bcl- X_L , Egfr, Gli, Nf1, Phd, PI3K, Pkc, Pten, Ras, Snail, Vhl e Wnt.

Os resultados sugerem que as características topológicas de um nó influenciam diretamente na probabilidade do mesmo estar relacionado a uma mutação *driver*.

Um nó com centralidade maior que duas vezes a centralidade média da rede, por exemplo, possui 57% de chance de ser um *driver*, contra 26% para um nó com centralidade menor que a centralidade média da rede. Mesmo as mutações *drivers* topologicamente menos importantes (segundo e terceiro grupo) parecem se valer da importância dos nós mais centrais pois tendem a ser reguladores diretos dos nós do primeiro grupo (todos os 2 do segundo grupo e 7 dos 13 do terceiro grupo).

Grupo	genes do grupo	$\langle B \rangle_g / \langle B \rangle$	$\langle k \rangle_g / \langle k \rangle$	P_{driver}
$B \geq 2\langle B \rangle$	Akt, HIF-1, hTert, Ikk, mTor, Myc, Nf- κ B e p53	4,84	1,80	57%
$\langle B \rangle \leq B < 2\langle B \rangle$	Mdm2 e Pdk1	1,48	0,84	33%
$B < \langle B \rangle$	Bcl-2, Bcl- X_L , Egfr, Gli, Nf1, Phd, PI3K, Pkc, Pten, Ras, Snail, Vhl e Wnt	0,38	0,53	26%

TABELA 4.6: **Centralidade e conectividade média das mutações *driver***. Observe que quanto mais central e mais conectado é um dado nó, maior a probabilidade que o mesmo esteja associado a uma mutação *driver*.

4.5 A carcinogênese colorretal

Uma rápida consulta a bancos de dados como o [COSMIC](#) ou [ICGC](#) nos permite obter informações sobre a frequência com a qual diversos tipos de mutações ocorrem em diferentes tipos de cânceres. Obtemos informações, por exemplo, de que o gene p53 é inativado em 22% dos tumores do sistema nervoso central, ou de que o gene Ras é ativado em 17% dos tumores do pulmão. O próximo passo é compreender como um determinado conjunto de mutações predominante em um dado tipo de tumor está associado à evolução do mesmo, ou seja, precisamos responder questões como: existe uma ordem na qual as mutações devem ocorrer? Se sim, esse ordenamento é único? Infelizmente, as informações dessa natureza são mais escassas.

Escassas mas não inexistentes. De todos os tipos de câncer, o colorretal é aquele sobre o qual possuímos mais informações acerca da sua evolução, o que se deve a sua alta frequência e acessibilidade. A Figura 4.5 é conhecida informalmente como Vogelgram, ela combina os estágios do câncer colorretal juntamente com as

mutações que se acredita estarem envolvidas na passagem de um estágio a outro [2].

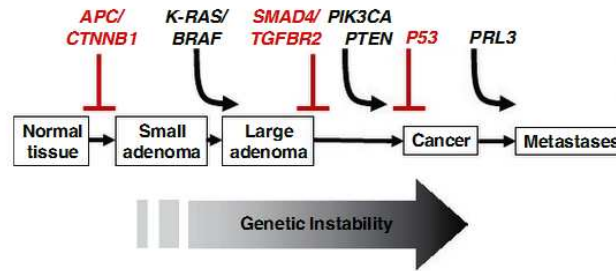


FIGURA 4.5: **Vogelgram.** Alterações genéticas associadas a evolução do câncer colorretal. Retirado de [2].

Estudamos a consequência no nosso modelo de se fazer mutações na sequência do Vogelgram, com exceção da última mutação em PRL3 que não se encontra presente na rede proposta. *Espera-se que a sequência de mutações torne o tumor cada vez mais apto a contornar as diversas barreiras que lhe são impostas pelo organismo.* A nossa análise consiste em determinar as características adquiridas pelo espaço de fase (todas as condições ambientais) a cada nova mutação, o que inclui o número de atratores, os fenótipos dos mesmos e o tamanho das bacias de atração. Em alguns casos essa análise global não é suficiente para determinar as novas características obtidas pela rede, podendo estas serem inferidas através da análise específica do efeito provocado em determinadas condições ambientais.

A deleção de Apc provoca uma modificação no espaço de fases global, agora existem 58 atratores, 47 apoptóticos, 7 proliferativos e 4 quiescentes, os quais atraem 87,36%, 12,52% e 0,12% dos estados iniciais testados, respectivamente. O número de atratores proliferativos e o tamanho de suas bacias de atração aumenta às custas dos atratores quiescentes. Dessa forma, o principal papel da deleção de Apc é aumentar as situações na qual a célula entra em ciclo. Isso se torna mais claro se analisarmos a condição ambiental (00100) de um tecido em condições normais, correspondente a um ambiente com concentração adequada de nutrientes e oxigênio mas sem fatores que estimulam a proliferação (fatores de crescimento). A rede normal apresenta o fenótipo quiescente nesse estado, mas a rede com deleção em Apc apresenta um fenótipo proliferativo, o que pode dar início a uma expansão clonal. A deleção em Apc não resulta em nenhuma vantagem antiapoptótica para a rede, em condições em que reina a hipóxia, por exemplo, a morte celular ainda é a regra.

A **ativação de Ras** altera o espaço de fases aumentando o número de atratores para 72, dos quais 58 são apoptóticos, 8 são proliferativos e 6 quiescentes. Contudo, a fração de estados iniciais atraídos por cada tipo de fenótipo é essencialmente a mesma (87,36% apoptóticos, 12,53% proliferativos e 0,11% quiescentes). As verdadeiras vantagens dessa mutação tornam-se claras quando se analisa o efeito provocado na condição de hipóxia e nutrientes em quantidades ideais (00101). Essa condição ambiental é frequentemente enfrentada tanto por tumores incipientes, que carecem de oxigênio em regiões distantes do capilar que os alimenta, quanto por tumores com vascularização própria, que mesmo assim possuem regiões de hipóxia. Devido a essa mutação, a rede agora apresenta um fenótipo quiescente para 0,10% das condições iniciais testadas enquanto outrora a única resposta possível era a apoptose. Outra vantagem é observada em um ambiente com nutrientes em condições ideais, normoxia e mutagênicos (10100). Enquanto antes só havia apoptose, a ativação de Ras garante a presença do fenótipo proliferativo para 0,07% das condições iniciais testadas.

A **deleção de Smad4** aumenta para 75 o número de atratores; 60 apoptóticos, 6 proliferativos, e 9 quiescentes. Essa mutação torna-se de suma importância quando existe TGF- β no ambiente. Em nosso modelo, se considerarmos que TGF- β está sempre ativo⁷, independentemente das condições ambientais escolhidas as respostas possíveis são sempre atratores com fenótipos apoptóticos ou quiescentes. A deleção de Smad4 torna o sistema insensível a essa sinalização inibidora, permitindo que a célula prolifere nessa condição adversa.

A **deleção de Pten** tem como consequência o aumento no número de atratores para 80; 40 apoptóticos, 16 proliferativos e 24 quiescentes, que atraem 50%, 27,9% e 22,1% dos estados iniciais testados, respectivamente. Embora a resposta seja dependente da condição ambiental, podemos dizer que a mutação em Pten torna o tumor bem mais agressivo. Na condição de normoxia e nutrientes em quantidades ideais, por exemplo, a rede sempre exhibe o fenótipo proliferativo, glicolítico e imortalizado. Se a hipóxia substitui a normoxia, em adição aos fenótipos proliferativos, glicolíticos e imortalizados, que passam a atrair 70,8% dos estados iniciais, aparecem atratores quiescentes, que atraem 29,2% dos estados iniciais. Na condição em que temos normoxia, nutrientes e um microambiente mutagênico,

⁷O nó TGF- β não é tratado em nossa rede como uma condição ambiental explicitamente por ele ser ativado por HIF-1. Contudo, ele de fato pode estar presente no ambiente, entrando portanto como uma condição ambiental. Para todos os efeitos, manter o nó TGF- β sempre ativo é uma simulação desse seu papel como condição ambiental

51,2% dos estados iniciais são levados a atratores com fenótipos proliferativos, glicolíticos e imortalizados; o percentual restante de 48,8% leva a atratores com fenótipos quiescentes. Observe que embora agressivo o tumor ainda encontra barreiras a sua proliferação (os atratores quiescentes) nas condições em que há falta de nutrientes ou ambiente mutagênico.

A deleção de p53 resulta em um decréscimo no número de atratores para 48, sendo 24 apoptóticos e 24 proliferativos. Ambos os fenótipos atraem um total de 50% dos estados iniciais testados. De fato, a apoptose para 50% dos estados iniciais é o valor mínimo que pode ser obtido sem mutações na rota de TNF- α , uma vez que está rota culmina na ativação direta da Caspase 8. Não obstante, o principal resultado é que a rede sempre exhibe o fenótipo proliferativo, glicolítico e imortalizado em ambientes com suprimento adequado de nutrientes, normoxia ou hipóxia; o mesmo vale se o ambiente for genotóxico ou contiver inibidores de crescimento. Quase todas as barreiras impostas ao tumor foram sobrepujadas através dessa sequência de poucas mutações.

Em resumo, como mostrado na Figura 4.6, nossas simulações revelam que cada mutação *driver* na rota canônica para o câncer colorretal [2] contribui para um aumento na capacidade proliferativa ou de resistência à apoptose da célula transformada. Além disso, o modelo indica que outras mutações fora desta rota clássica para a carcinogênese colorretal também podem levar a fenótipos proliferativos e resistentes a apoptose. Esse é o caso, por exemplo, de deleções de Pten, ou p53, ou ATM, ou Fadd, ou Chk depois das mutações em Apc e Ras. Alternativamente, a ativação de PI3K, ou Akt, ou Bcl-2, ou Mdm2 novamente depois das mutações em Apc e Ras decrescem a apoptose e aumentam a proliferação.

4.6 A terapia molecularmente direcionada

A terapia molecularmente direcionada consiste na inibição ou ativação de genes que produzam a interrupção do estado tumorigênico induzindo a célula, por exemplo, à apoptose, necrose, senescência ou diferenciação. Não existe uma forma simples de prever *a priori* quais genes serão alvos indicados para a terapia, ponto no qual modelos similares ao nosso talvez sejam de alguma valia. Outra grande dificuldade envolve a produção das drogas. A descoberta de inibidores de

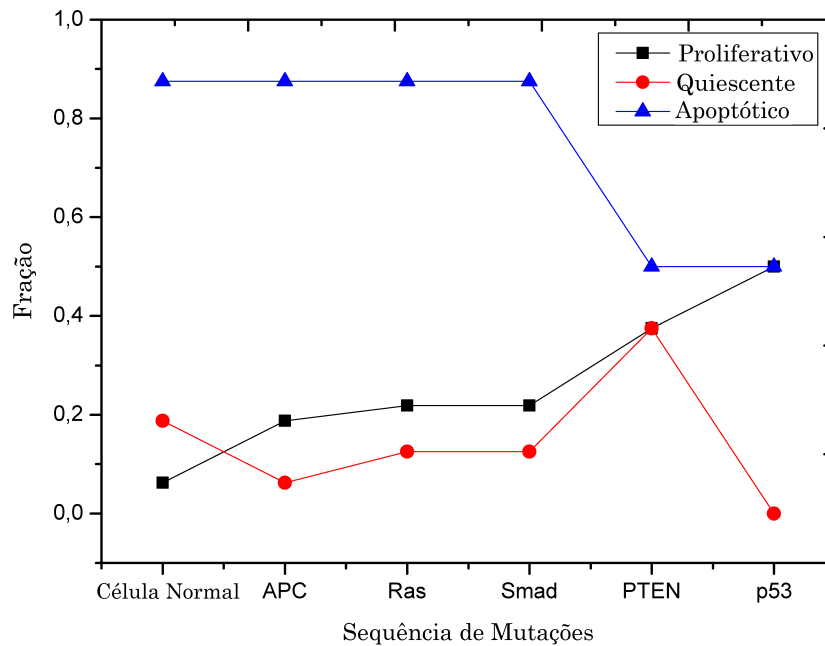


FIGURA 4.6: **Resposta da rede a mutações *driver* da carcinogênese colorretal.** Fração de estados iniciais que culminam em atratores com fenótipos apoptóticos, proliferativos ou quiescentes (para todas as condições ambientais) depois da acumulação sequencial de mutações do câncer colorretal.

EGFR, BCR-ABL, e HER2, por exemplo, foi um sucesso, mas a de inibidores de Ras e Myc ainda não [55].

Nesta seção, utilizamos o modelo para o câncer colorretal para estudar a terapia molecularmente direcionada. Adotamos três abordagens: (1) uma busca sobre todos os nós para encontrar alvos em potencial para a terapia direcionada; (2) o estudo do efeito de inibidores comuns ao longo dos vários estágios da carcinogênese; (3) e o uso de terapias combinadas (apenas para o estágio mais agressivo).

Na primeira abordagem empreendemos uma busca por nós no modelo cuja inibição ou ativação (reintrodução do tipo selvagem) provoca um aumento da bacia de atração dos fenótipos quiescentes e/ou apoptóticos com um decréscimo do fenótipo proliferativo, ou seja, estamos a procura de nós que funcionem como alvos em potencial para a terapia direcionada. Todos os nós foram atacados (entenda-se inativados ou ativados) individualmente. Nossas simulações revelam que a **inibição** de Pdk1, Akt, E2f, ciclinas D e E, e Mdm2 aumentam o fenótipo quiescente (37,5% para Pdk1 e Akt, e 50% para E2f, ciclinas e Mdm2) e diminuem o

fenótipo proliferativo (12,5% para Pdk1 e Akt, e 0% para E2f, ciclinas e Mdm2). O mesmo é observado com a ativação de p53, Rb, Cdh1, p21, p27 e Smad4 (a quiescência aumenta para 50% e a proliferação cessa para p53, Rb, Cdh1, p21 e p27, enquanto para Smad4 ambas as frações mudam para 25%). Por sua vez, a ativação de FADD e caspases aumentam a apoptose para 100% de chance. Paradoxalmente, o modelo prediz que tanto a ativação ou a inibição de ciclinas A e B bem como Cdc20 aumentam a quiescência e diminuem a proliferação (50% e 0%, respectivamente) (ver Figura 4.7).

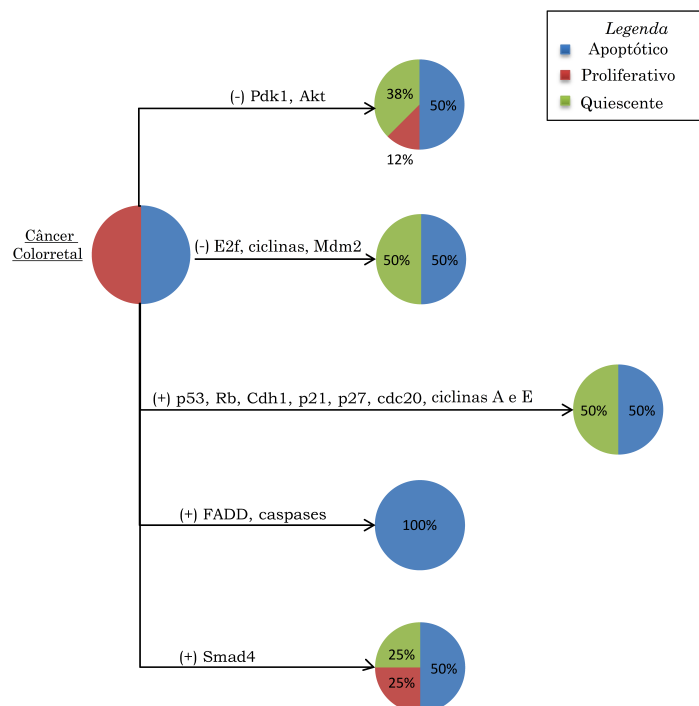


FIGURA 4.7: **Genes-alvo.** Efeito do ataque a genes-alvo no câncer colorretal.

No que diz respeito à aplicação combinada de drogas atualmente em testes clínicos [55], o efeito de vários inibidores direcionados sobre nosso modelo de câncer colorretal foi investigado em três condições ambientais, a saber, normoxia e suprimento adequado de nutrientes (00100); hipóxia e suprimento adequado de nutrientes (00101); suprimento adequado de nutrientes e estresse carcinogênico (10100). Nessas condições, o modelo de câncer colorretal é sempre atraído para um fenótipo proliferativo, imortalizado e glicolítico. De acordo com as simulações, o uso combinado de inibidores de mTor e Cdks previne a glicólise e entrada no ciclo celular; e a combinação de Cdks e inibidores de hTert previne a proliferação e a imortalização. Sendo assim, uma vez que em nosso modelo as monoterapias

com inibidores de mTor, Cdks, e hTert previnem a glicólise, proliferação celular e imortalização, respectivamente, a terapêutica parece ser linear. Por sua vez, a associação de reativadores de p53 e de inibidores de Bcl-2/Bcl-X_L provoca a interrupção do ciclo celular nas condições de hipóxia e abundância de nutrientes; normoxia, abundância de nutrientes e estresse carcinogênico. Contudo, não tem efeito na condição de normoxia e abundância de nutrientes. Outra associação envolvendo reativadores de p53 e inibidores de VEGF bloqueia o ciclo celular em 29% dos estados iniciais testados. Em nosso modelo, a ação dos inibidores de VEGF é simulada forçando a hipóxia e a falta de nutrientes sobre os nós de entrada.

Finalmente, nós testamos terapias com uma e duas drogas combinadas usando inibidores de mTor, VEGF, Ras e Pkc em células que estão em diferentes estágios de malignidade. Novamente, o nosso modelo para o câncer colorretal foi considerado. O melhor resultado obtido para uma célula completamente maligna (rede carregando mutações em Apc, Ras, Smad4, Pten e p53) foi a inibição do fenótipo glicolítico através da utilização de inibidores de mTor. Nenhuma diminuição na proliferação celular pode ser alcançada. Em contraste, uma célula no estágio anterior da carcinogênese (rede carregando mutações em Apc, Ras, Smad4, Pten) pode ter a sua chance de proliferação diminuída por meio da utilização de terapias com uma e duas drogas combinadas. De fato, a fração do fenótipo proliferativo decresce de 100% para 70%, 63%, e 67% usando inibidores de VEGF, mTor + VEGF, e Pkc + VEGF, respectivamente. Também observamos que o resultado da terapia depende das condições ambientais. Por exemplo, a combinação de inibidores de mTor e Pkc reduz a chance de proliferação de cerca de 51% para 8% na condição de normoxia, abundância de nutrientes e estresse carcinogênico. Contudo, essa mudança é significativamente menor na condição de hipóxia e abundância de nutrientes, indo de 71% para 63%. Dessa forma, os resultados demonstram que cada tratamento afeta distintamente células que estão em diferentes estágios da malignidade.

4.7 Discussão e conclusão

Nós construímos um sistema dinâmico booleano integrando as principais rotas de sinalização associadas ao câncer em uma rede simplificada. A dinâmica

desta rede é controlada por atratores associados aos fenótipos apoptóticos, proliferativos e quiescentes que qualitativamente reproduzem o comportamento de células normais sobre diversas condições ambientais. É válido ressaltar que a resposta da rede é altamente restrita com 87,4%, 3,1%, e 9,5% dos estados iniciais sendo atraídos para atratores com fenótipos apoptóticos, proliferativos e quiescentes, respectivamente. Dessa forma, sob estresse persistente a apoptose ou a parada do ciclo celular é o comportamento padrão. Além disso, a proliferação celular é rigidamente regulada, ocorrendo quase somente em um ambiente com oxigenação adequada (normoxia) e que possua fatores de crescimento. Como observado em nosso modelo, a sinalização através das rotas associadas aos fatores de crescimento, seja devido à presença de fatores de crescimento no meio ou mutação genética, aumenta a estabilidade dos fenótipos associados à sobrevivência celular (proliferativo e quiescente), levando a uma diminuição do fenotipo apoptótico. Esse resultado é consistente com os achados de Mai e Lieu [56] que, usando redes booleanas integrando as rotas extrínseca e intrínseca para apoptose com a rota associada a sinalização por fatores de crescimento, demonstraram que a indução da apoptose é dependente do balanço entre a sinalização pró-apoptótica e pró-sobrevivência.

Os resultados de nossas simulações demonstraram que perturbações em alguns nós da rede levam a uma transição fenotípica. Nós interpretamos esses nós como mutações *driver*. As mutações associadas podem ser ativações constitutivas ou inativações dos nós ou, ainda, um aumento na força de interação com o qual os nós interagem com os outros nós, o que chamamos de superexpressão. Na condição de normoxia e suprimento adequado de nutrientes, observamos que mutações em Egfr, Gli, Nf1, Nf- κ B, PI3K, Pkc, Pten, Ras e Wnt transformam uma célula normal, anteriormente quiescente, em uma célula proliferativa. A expansão clonal resultante muitas vezes leva a hipóxia. Mutações adicionais em Akt, Bcl-2, Bcl- X_L , Ikk, Nf- κ B, p53 e Snail permitem que a célula transformada evada da apoptose induzida pela situação de hipóxia. Estas 17 mutações *drivers* preditas pelo nosso modelo estão incluídas nos aproximadamente 2% dos genes do genoma humano implicados na progressão tumoral segundo diversos censos recentes [57–59]. Alguns dos genes sugeridos pelo modelo são mutados de forma significativa em vários tumores: PI3K, Pten, e Akt em câncer de mama [59, 60]; Ras e p53 em câncer de mama e câncer colorretal [59, 61]; p53 e Nf1 em carcinoma do ovário [62]; p53 e Pten em câncer de pulmão de pequenas células [63]; e Egfr, p53, Nf1, e PI3K em glioblastoma humano[64]. Por sua vez, Gli é alvo de translocações

e ampliações em cânceres de mama e colorretal [61], Bcl-2 é amplificado em câncer de células escamosas do pulmão [65] e a rota de sinalização Wnt é alterada em 93% de todos os cânceres de cólon e retais [66]. Outra predição em relação a esses genes *driver* em nosso modelo é a de que eles não precisam ser topologicamente centrais na rede, mas precisam pelo menos ser reguladores diretos de nós que são centrais.

Nosso modelo booleano para as rotas do câncer nos permite explorar a carcinogênese em nível molecular. Células de tumores nascentes estão enfrentando continuamente estresses ambientais frequentemente em resposta à inflamação. A inflamação promove hiperplasia induzida por citocinas, genotoxicidade, e morte celular induzida por ROS. No epitélio hiperplásico, a proliferação anormal das células leva inicialmente a hipóxia e a seleção do fenótipo glicolítico, resultando em um aumento da acidificação do meio e na falta de nutrientes e fatores de crescimento. A hipóxia severa seleciona células resistentes a apoptose e promove a acumulação de mutações. O baixo pH pode gerar danos no DNA e a falta de glicose reforça fortemente a seleção de células com oncogenes ativados. Assim, como foi demonstrado pela nossa simulação da carcinogênese colorretal, como regra para evoluir, as células cancerosas empreendem uma busca aleatória por soluções fenotípicas que as permitam ultrapassar as barreiras impostas pelo seu microambiente frequentemente em alteração. Finalmente, cada mutação *driver* na jornada rumo à carcinogênese contribui para um aumento na capacidade proliferativa e/ou de resistência a apoptose. Enquanto isso várias mutações que não contribuem diretamente para o câncer, ditas *passenger*, podem se acumular. Nosso modelo booleano suporta distintas rotas para a carcinogênese, caracterizadas por um conjunto específico de mutações críticas misturadas com um espectro variado de mutações irrelevantes (*passenger*). Assim, como observado na análise genômica de diversos cânceres, diferentes combinações de genes mutados existem e a maior parte das amostras de um dado tumor difere de todas as outras [59].

O desenvolvimento de terapias direcionadas que sejam eficazes lida com um grande desafio. De um ponto de vista experimental é muito difícil determinar quais são os genes que tem um papel crítico na progressão tumoral. É nesse aspecto que modelos matemáticos integrando diversas rotas associadas ao câncer podem ser úteis. Usando o nosso modelo, nós encontramos que a inibição de alguns nós (Pdk1, Akt, E2F, ciclinas D e E, e Mdm2) ou a ativação de outros (p53, Rb, Cdh1, p21, p27 e Smad4) aumenta o fenótipo quiescente e diminui o

fenótipo proliferativo. Contudo, todas as terapias testadas foram inefetivas para simultaneamente reverter todas as características malignas e parecem ser aditivas ou “lineares” em seus efeitos. Dessa forma, nossas simulações indicam que a associação de mais de uma droga é necessária para a erradicação ou controle do câncer. Além disso, nós achamos que cada tratamento afeta distintamente as células se elas estão em diferentes estágios de desenvolvimento rumo à malignidade ou em diferentes condições ambientais. As implicações disso são que, embora uma terapia combinada possa erradicar um conjunto determinado de células tumorais com um dado fenótipo, eventualmente clones de outras células que não puderam ser eliminadas pela terapia irão surgir, tornando o tratamento ineficaz. Sendo assim, estes resultados fornecem um suporte adicional ao ponto de vista de que se deve utilizar uma série de drogas combinadas, que devem ser aplicadas concomitantemente para bloquear várias rotas do câncer aliadas a uma modificação do ambiente tumoral [55].

Por último, comentaremos brevemente acerca das limitações do modelo e nossas perspectivas futuras. Na forma atual, a rede para o câncer e a dinâmica booleana é capaz de reproduzir algumas características biologicamente relevantes da carcinogênese. É certamente verdadeiro que melhorias na topologia da rede podem levar a melhores resultados e previsões. Contudo, existem limitações que recaem na própria natureza do modelo, que está limitado ao nível molecular de uma única célula. Ora, as interações célula-célula em um ambiente permanentemente em mudança é que determinam os possíveis clones que serão gerados e selecionados ao longo da progressão tumoral e, em consequência, a eficácia de terapias direcionadas molecularmente. Dessa forma, o modelo baseado em rede booleanas pode ser adequado para se descrever a escala microscópica em modelos multiescala para o desenvolvimento do câncer e de terapias [67], o que fazemos na capítulo a seguir.

O Modelo Multiescala para a Carcinogênese

No capítulo anterior, desenvolvemos um modelo para o que podemos denominar **N** de **escala microscópica** do câncer, ou seja, para os eventos mutacionais que ocorrem no genoma das células. Embora fundamental, a análise apenas nessa escala não pode explicar a carcinogênese. O câncer é um fenômeno que emerge como resultado da interação entre diversas células em várias escalas de tempo e espaço. Portanto, necessitamos de um modelo multiescala.

5.1 Introdução

É possível dividir os fenômenos relacionados ao câncer em três escalas: microscópica, mesoscópica e macroscópica.

A **escala microscópica** ou subcelular é aquela dos fenômenos que ocorrem dentro da célula ou em sua membrana. Mutações genéticas, absorção de nutrientes, mudanças no padrão de expressão gênica, reorganização do citoesqueleto são todos fenômenos pertencentes a essa escala.

A **escala mesoscópica** ou escala celular é aquela da interação local entre as células. Mediante a liberação de moléculas sinalizadoras, tais como fatores de crescimento, citocinas, e fatores de morte, as células tumorais afetam e são afetadas por células vizinhas (sinalização parácrina). Nessa escala também ocorre

a interação da célula com a matriz extracelular. A degradação dessa matriz é necessária para a migração celular, fenômeno fundamental para o processo de metástase e invasão.

A **escala macroscópica** compreende fenômenos que ocorrem no nível do tecido. O processo de angiogênese, a metástase, o crescimento de uma massa tumoral multicelular, a difusão de substâncias como oxigênio e glicose, são exemplos de fenômenos que ocorrem nessa escala.

As escalas encontram-se interconectadas. Isso torna impossível descrever completamente o fenômeno do câncer analisando apenas uma escala. Como exemplo, suponha que uma célula sofra uma mutação genética que lhe confira uma vantagem proliferativa. Isto é, um fenômeno que ocorre na escala microscópica. Como consequência dessa mutação, vários clones da célula mutada são produzidos. Com o aumento no número desses clones, as concentrações de oxigênio e nutrientes disponíveis no tecido diminuem (alteração na escala macroscópica). Em um ambiente com falta de oxigênio, tanto as células normais quanto as células com a mutação começam a morrer. A morte dessas células libera no meio várias substâncias que agem nas células vizinhas (escala mesoscópica). A falta de oxigênio também altera a expressão gênica das células (escala microscópica), induzindo-as a produzir fatores angiogênicos que atuam na formação de novos vasos sanguíneos (escala macroscópica).

As considerações acima nos motivam à busca de um modelo multiescala para o câncer. Utilizamos como inspiração o modelo desenvolvido por Ferreira *et al.* [68]. Nesse trabalho, os autores propuseram um modelo que combina equações de reação-difusão para descrever os campos de concentração de nutrientes com regras estocásticas que descrevem as ações executadas pelas células. O tecido onde ocorre a simulação é representado por uma rede quadrada de tamanho $(L + 1) \times (L + 1)$. Funcionando como fonte de nutrientes, existe um capilar em $x = 0$. O modelo engloba três tipos de células; normais, cancerosas e necróticas. As células normais e cancerosas competem pelos nutrientes disponíveis. As células necróticas são o resultado da morte das células cancerosas e não influenciam na dinâmica do modelo. De acordo com probabilidades que dependem da concentração local dos nutrientes, as células cancerosas podem executar três tipos de ações celulares: morte, divisão, ou migração.

O modelo reproduz com sucesso as morfologias mais comuns observadas em tumores, como as papilares, compactas e desconexas (Figura 5.1). O modelo também explica as características dos tumores que geram essas morfologias. Os padrões desconexos surgem de células cancerosas com baixa mobilidade mas alta taxa de proliferação. Os padrões papilares são característicos de células com baixa mobilidade e alto consumo de nutrientes. Os padrões compactos surgem quando a taxa de consumo de nutrientes pelas células é baixa.

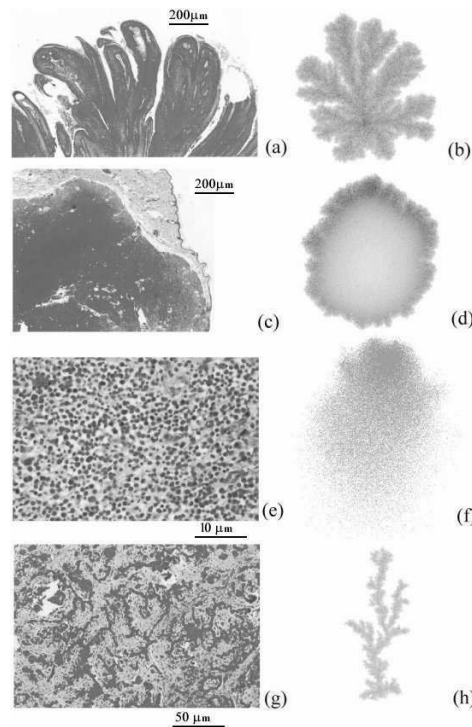


FIGURA 5.1: **Morfologias comuns observadas no crescimento de tumores.** (a) Padrões papilares de um papiloma escamoso, (c) um carcinoma basocelular sólido e compacto, (e) um padrão disseminado de um plasmocitoma e (g) filamentos característicos de um tricoblastoma. Todos estes padrões histológicos foram retirados de cães. Os padrões simulados correspondentes são mostrados em (b), (d), (f) e (h), respectivamente. Figura retirada de [69].

Embora o modelo de Ferreira *et al.* não englobe explicitamente a escala microscópica, os efeitos tangíveis das alterações nessa escala estão presentes nas ações celulares. Com maior ou menor eficiência, todas as células cancerosas são capazes de proliferar e de migrar. Como as células só morrem por necrose, podemos supor que elas já evadiram a apoptose. Dessa forma, as células cancerosas descritas no modelo já devem possuir diversas alterações genéticas que lhes conferem essas capacidades.

Um modelo que inclua explicitamente a escala microscópica talvez permita a compreensão de como as diversas capacidades são gradualmente adquiridas pelas células cancerosas. Sabemos que as mutações genéticas são os motores dessas capacidades, mas quais mutações, quantas e em qual sequência? Como o ambiente influencia nas mutações adquiridas? Essas são perguntas que procuramos responder.

O modelo que desenvolvemos está limitado ao estudo de tumores nos estágios iniciais, nos quais o tumor encontra-se preso ao tecido de origem e ainda não induziu a formação de uma vasculatura própria. A arquitetura utilizada é particularmente adequada para tumores epiteliais, de onde originam-se 90% dos cânceres. Contudo, como acredita-se que todos os cânceres precisam adquirir capacidades similares ao longo do seu desenvolvimento, esperamos captar a essência dos mesmos.

5.2 O modelo

5.2.1 O tecido

O tecido onde a simulação ocorre consiste de uma rede quadrada $(L+1) \times (L+1)$ com parâmetro de rede igual a Δ . Localizado em $x = 0$ encontra-se um capilar que funciona como fonte de nutrientes $N(\vec{x})$, oxigênio $O(\vec{x})$ e, eventualmente, como meio de retirada do acúmulo de ácido no tecido $H(\vec{x})$ (íons H^+) (Figura 5.2). Consideramos quatro tipos de populações celulares: células normais σ_n , células mutadas σ_m , células necróticas σ_{nec} e células apoptóticas σ_{ap} . Em cada sítio \vec{x} da rede pode haver no máximo uma célula normal ($\sigma_n(\vec{x}) = 0, 1$), o que modela o controle preciso do organismo na manutenção da arquitetura do tecido normal. Admitindo que as células mutadas escapam a esse controle, supomos que elas possam empilhar-se em um mesmo sítio ($\sigma_m(\vec{x}) = 0, 1, 2, \dots$). As células necróticas σ_{nec} e apoptóticas σ_{ap} originam-se da morte das outras populações celulares e permanecem no tecido por um tempo t_e antes de desaparecerem.

Inicialmente, o tecido é formado predominantemente por células normais e algumas poucas células apoptóticas e necróticas que resultam da morte dessas. Essas células apoptóticas e necróticas são substituídas por meio da divisão de células normais e, nesse processo, eventuais mutações sofridas pelas células normais dão

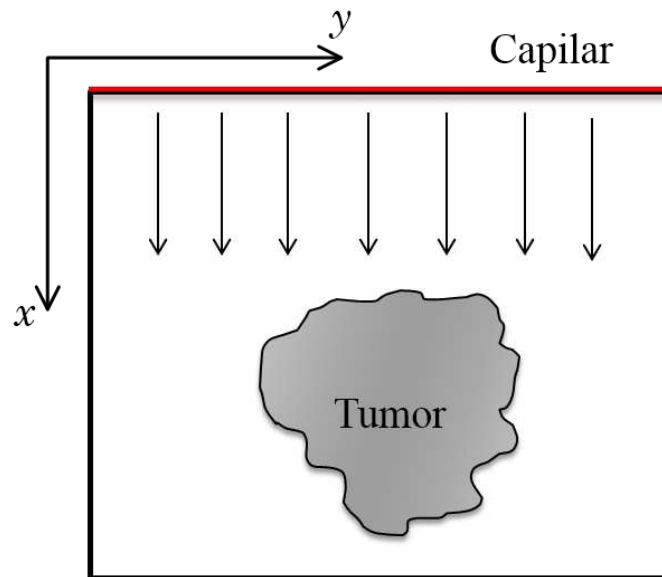


FIGURA 5.2: **Tecido.** Oxigênio e nutrientes difundem do capilar localizado em $x = 0$. Se houver acúmulo de ácido no tecido, ele será retirado através do capilar.

origem às populações de células mutadas. Quais células são mutadas e os tipos de mutações que ocorrem são eventos aleatórios.

5.2.2 As populações celulares: células vivas são redes

No capítulo anterior, propusemos um modelo de redes booleanas para a regulação gênica. Agora, utilizaremos esse modelo para representar as células normais e mutadas. Portanto, células são redes de regulação sujeitas a regras de atualização. É importante ressaltar que a rede de regulação foi melhorada, incluímos novos nós e interações regulatórias. Também definimos quatro novos fenótipos: necrótico, senescente, produtores de $Tgf-\beta$ e produtores de $Tnf-\alpha$. Explicamos as modificações feitas no Apêndice B.

Cada uma das **células normais** σ_n está associada a uma rede de regulação idêntica que funciona como o seu genoma. As **células mutadas** σ_m correspondem a rede das células normais com no mínimo um dos seus nós alterados.

As populações das **células apoptóticas** σ_{ap} e **necróticas** σ_{nec} não estão associadas a nenhuma rede pois representam os restos *post-mortem* das células que morreram por apoptose ou necrose, respectivamente. São importantes na

dinâmica do sistema porque liberam substâncias químicas no meio que influenciam as células vivas (normais e mutadas).

5.2.3 As populações celulares divididas por fenótipos

O fenótipo celular refere-se ao comportamento exibido pela célula. Por exemplo, em um dado tempo uma célula mutada σ_m pode estar se dividindo ou não; pode estar gerando grandes quantidades de ácido lático ou sintetizando Tnf- α . Por esse motivo, definiremos alguns subconjuntos das populações normais e mutadas caracterizados pelos fenótipos exibidos.

O subconjunto de **células com fenótipo quiescente** σ_q^f é constituído por células que não estão em processo de divisão celular. Células normais ou mutadas podem pertencer a esse grupo.

O subconjunto das **células com fenótipo proliferativo** σ_p^f é constituído por células que estão se dividindo. Apenas células mutadas podem pertencer a esse grupo. Embora surjam novas células normais no tecido, estamos supondo que essas células são originárias das células-tronco¹.

O subconjunto das **células com fenótipo glicolítico e proliferativo** σ_g^f é formado por células que, além de estarem se dividindo, também possuem um fenótipo glicolítico. Essas células possuem características metabólicas distintas das demais células mutadas, como o aumento na captação de nutrientes (glicose) e na eliminação de ácido lático.

O subconjunto das **células com fenótipo senescente** σ_s^f é formado por células pertencentes à população das células mutadas. As células senescentes não estão em divisão, mas liberam no meio substâncias químicas que podem influenciar as demais células (IL-1 e ROS).

O subconjunto das **células que liberam Tgf- β** σ_{tgf}^f é formado por células pertencentes à população das células mutadas que ativam a síntese de Tgf- β .

O subconjunto das **células que liberam Tnf- α** σ_{tnf}^f é formado por células pertencentes à população das células mutadas que ativam a síntese de Tnf- α .

¹Ou seja, elas vêm de “fora” do tecido.

Alguns dos subconjuntos ou fenótipos podem se sobrepor. Células que liberam Tgf- β e/ou Tnf- α , por exemplo, também podem ser quiescentes, glicolíticas, proliferativas ou senescentes.

5.2.4 As substâncias químicas e as condições ambientais

Existem nove tipos de substâncias químicas no modelo. Três delas, nutrientes $N(\vec{x})$, oxigênio $O(\vec{x})$ e íons H^+ $H(\vec{x})$, são descritas por equações de difusão. As seis restantes, Tgf- β ($\text{tgf-}\beta(\vec{x})$), Tnf- α ($\text{tnf-}\alpha(\vec{x})$), Wnt ($\text{wnt}(\vec{x})$), IL-1 ($\text{il-1}(\vec{x})$), HMGB1 ($\text{hmgbl}(\vec{x})$) e ROS ($\text{ros}(\vec{x})$) são governadas por equações de dispersão locais.

5.2.4.1 Equações de difusão

O capilar, em $x = 0$, atua como fonte de nutrientes e de oxigênio e como sumidouro dos íons H^+ . Admitimos que os coeficientes de difusão dessas substâncias são constantes e que as taxas de produção e consumo são lineares. Contudo, essas taxas modificam-se em função do fenótipo exibido pelas células.

Seja $\sigma_q^f(\vec{x}, t)$ o número de células com **fenótipo quiescente** no tempo t e na posição \vec{x} . Essas células consomem nutrientes a uma taxa $\gamma_q N(\vec{x}, t)$, oxigênio a uma taxa $\mu_q O(\vec{x}, t)$ e não produzem íons H^+ .

Seja $\sigma_s^f(\vec{x}, t)$ o número de células com **fenótipo senescente** no tempo t e na posição \vec{x} . Essas células consomem nutrientes e oxigênio à mesma taxa das células quiescentes e, também, não produzem íons H^+ . Portanto, com relação as dinâmicas de N , O e H , essas células são equivalentes às quiescentes.

Seja $\sigma_p^f(\vec{x}, t)$ o número de células com **fenótipo proliferativo** no tempo t na posição \vec{x} . Essas células consomem nutrientes a uma taxa λ_p vezes maior que a das células quiescentes, oxigênio a uma taxa κ_p vezes maior que a das células quiescentes, e não produzem íons H^+ ($\lambda_p > 1, \kappa_p > 1$).

Seja $\sigma_g^f(\vec{x}, t)$ o número de células com fenótipo **proliferativo e glicolítico** no tempo t na posição \vec{x} . Essas células consomem glicose a uma taxa λ_g vezes maior que a das células quiescentes, oxigênio a uma taxa κ_g vezes maior que a das células

quiescentes, e produzem íons H^+ a uma taxa β^2 . Temos que $\lambda_g > \lambda_p$ devido ao maior consumo de nutrientes, especialmente glicose, observado em células glicolíticas.

Propomos as seguintes equações para a concentração das substâncias citadas:

$$\frac{\partial N(\vec{x}, t)}{\partial t} = D_N \nabla^2 N(\vec{x}, t) - [\sigma_q^f(\vec{x}, t) + \sigma_s^f(\vec{x}, t) + \lambda_p \sigma_p^f(\vec{x}, t) + \lambda_g \sigma_g^f(\vec{x}, t)] \gamma_q N(\vec{x}, t) \quad (5.1)$$

$$\frac{\partial O(\vec{x}, t)}{\partial t} = D_O \nabla^2 O(\vec{x}, t) - [\sigma_q^f(\vec{x}, t) + \sigma_s^f(\vec{x}, t) + \kappa_p \sigma_p^f(\vec{x}, t) + \kappa_g \sigma_g^f(\vec{x}, t)] \mu_q O(\vec{x}, t) \quad (5.2)$$

$$\frac{\partial H(\vec{x}, t)}{\partial t} = D_H \nabla^2 H(\vec{x}, t) + \beta \sigma_g^f(\vec{x}, t) \quad (5.3)$$

Utilizamos condições de contorno de Dirichlet em $x = 0$ para todas as substâncias, i.e, $N(x = 0) = N_0$, $O(x = 0) = O_0$ e $H(x = 0) = H_0$. Em $y = 0$ e $y = \Delta L$ utilizamos condições de contorno periódicas para todas as equações, ou seja, $N(y = 0) = N(y = \Delta L)$, $O(y = 0) = O(y = \Delta L)$ e $H(y = 0) = H(y = \Delta L)$. Na borda externa do tecido, ou seja, em $x = \Delta L$, utilizamos condições de contorno de Neumann ($\partial f(x = \Delta L) / \partial x = 0$) para todas as substâncias, o que significa que não há fluxo de nenhuma delas nessa direção.

Para reduzir o número de parâmetros nas Equações 5.1, 5.2, 5.3, utilizamos as seguintes variáveis adimensionais:

$$t' = \frac{D_O t}{\Delta^2}, \quad \vec{x}' = \frac{\vec{x}}{\Delta}, \quad N' = \frac{N}{N_0}, \quad O' = \frac{O}{O_0}, \quad H' = \frac{H}{H_0}, \quad (5.4)$$

e

$$d_N = \frac{D_N}{D_O}, \quad d_H = \frac{D_H}{D_O}, \quad \alpha_N = \Delta \sqrt{\frac{\gamma_q}{D_O}}, \quad \alpha_O = \Delta \sqrt{\frac{\mu_q}{D_O}}, \quad \alpha_H = \Delta \sqrt{\frac{\beta}{H_0 D_O}} \quad (5.5)$$

²A taxa de produção de íons H^+ pelas células glicolíticas é entre 20 e 200 vezes maior do que as que não o são [70]. Isso justifica a simplificação de colocá-las como as únicas produtoras de íons H^+ no modelo

Com as substituições e omitindo os apóstrofes, temos as seguintes equações:

$$\frac{\partial N(\vec{x}, t)}{\partial t} = d_N \nabla^2 N(\vec{x}, t) - [\sigma_q^f(\vec{x}, t) + \sigma_s^f(\vec{x}, t) + \lambda_p \sigma_p^f(\vec{x}, t) + \lambda_g \sigma_g^f(\vec{x}, t)] \alpha_N^2 N(\vec{x}, t) \quad (5.6)$$

$$\frac{\partial O(\vec{x}, t)}{\partial t} = \nabla^2 O(\vec{x}, t) - [\sigma_q^f(\vec{x}, t) + \sigma_s^f(\vec{x}, t) + \kappa_p \sigma_p^f(\vec{x}, t) + \kappa_g \sigma_g^f(\vec{x}, t)] \alpha_O^2 O(\vec{x}, t) \quad (5.7)$$

$$\frac{\partial H(\vec{x}, t)}{\partial t} = d_H \nabla^2 H(\vec{x}, t) + \alpha_H^2 \sigma_g^f(\vec{x}, t) \quad (5.8)$$

As condições de contorno no capilar tornam-se $N(x=0) = O(x=0) = H(x=0) = 1$.

5.2.4.2 Equações locais

Quando proteínas sintetizadas por uma célula difundem por pequenas distâncias para induzir mudanças nas células vizinhas, o evento é chamado de interação parácrina, e as proteínas que difundem de **fatores parácrinos**. As proteínas Wnt, Tgf- β , Tnf- α , IL-1, e HMGB1 são fatores parácrinos atuantes em diversos processos como, por exemplo, o controle da divisão celular, o desencadeamento da resposta imune, e a formação de matriz extracelular [71].

As espécies reativas de oxigênio (ROS) constituem-se de um grupo de moléculas reativas e radicais livres produzidas como decorrência do metabolismo celular. No meio extracelular, ROS pode agir como um fator parácrino, influenciando processos como a apoptose e a expressão genética [72, 73].

Consideramos esses seis fatores parácrinos no modelo. As fontes desses fatores são as seguintes (ver Figura 5.3):

Wnt: liberado pelas células apoptóticas a uma taxa r_1 [74];

Tgf- β : liberado pelas células apoptóticas a uma taxa r_2 [75]. Também pode ser liberado, a uma taxa r_{2m} , por células que adquiram um fenótipo produtor de Tgf- β ;

Tnf- α : liberado a uma taxa r_{3m} por células que adquiram um fenótipo produtor de Tnf- α ;

IL-1: liberado por células com um fenótipo senescente a uma taxa r_{4m} [76];

HMGB1: liberado pelas células necróticas a uma taxa r_5 [77];

ROS: liberado pelas células necróticas a uma taxa r_6 . Também pode ser liberado por células com fenótipo senescente a uma taxa r_{6m} [78].

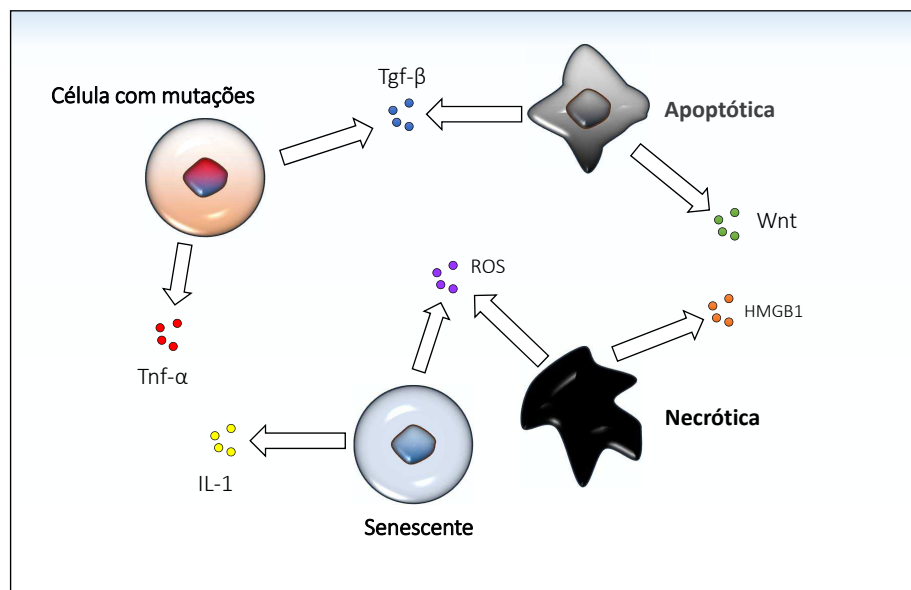


FIGURA 5.3: **Fatores Parácrinos.** Fontes de fatores parácrinos no modelo.

Como os fatores parácrinos agem localmente, descrevemos as concentrações desses fatores por equações recursivas locais. A grande vantagem dessa abordagem em relação às equações de reação-difusão é o tempo de simulação substancialmente menor.

As concentrações na posição \vec{x} no tempo t para os fatores parácrinos Wnt, Tgf- β , Tnf- α , IL-1, HMGB1, e ROS são dadas, respectivamente, pelas seguintes equações recursivas:

$$\text{wnt}(\vec{x}, t) = (1 - \lambda_1) \text{wnt}(\vec{x}, t - 1) + \sum_{|\vec{x}-\vec{x}'| \leq 2} f_1(\alpha_1, r_1) e^{-\alpha_1(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_{ap}(\vec{x}', t) \quad (5.9)$$

$$\text{tgf-}\beta(\vec{x}, t) = (1 - \lambda_2) \text{tgf-}\beta(\vec{x}, t - 1) + \sum_{|\vec{x}-\vec{x}'| \leq 2} \left(f_2(\alpha_2, r_2) e^{-\alpha_2(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_{ap}(\vec{x}', t) + f_{2m}(\alpha_{2m}, r_{2m}) e^{-\alpha_{2m}(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_{tgf}^f(\vec{x}', t) \right) \quad (5.10)$$

$$\text{tnf-}\alpha(\vec{x}, t) = (1 - \lambda_3) \text{tnf-}\alpha(\vec{x}, t - 1) + \sum_{|\vec{x}-\vec{x}'| \leq 2} f_{3m}(\alpha_{3m}, r_{3m}) e^{-\alpha_{3m}(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_{tnf}^f(\vec{x}', t) \quad (5.11)$$

$$\text{il-1}(\vec{x}, t) = (1 - \lambda_4) \text{il-1}(\vec{x}, t - 1) + \sum_{|\vec{x}-\vec{x}'| \leq 2} f_{4m}(\alpha_{4m}, r_{4m}) e^{-\alpha_{4m}(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_s^f(\vec{x}', t) \quad (5.12)$$

$$\text{hmgb1}(\vec{x}, t) = (1 - \lambda_5) \text{hmgb1}(\vec{x}, t - 1) + \sum_{|\vec{x}-\vec{x}'| \leq 2} f_5(\alpha_5, r_5) e^{-\alpha_5(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_{nec}(\vec{x}', t) \quad (5.13)$$

$$\text{ros}(\vec{x}, t) = (1 - \lambda_6) \text{ros}(\vec{x}, t - 1) + \sum_{|\vec{x}-\vec{x}'| \leq 2} \left(f_6(\alpha_6, r_6) e^{-\alpha_6(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_{nec}(\vec{x}', t) + f_{6m}(\alpha_{6m}, r_{6m}) e^{-\alpha_{6m}(\vec{x}-\vec{x}')^2} \sigma_s^f(\vec{x}', t) \right) \quad (5.14)$$

Em todas as equações temos que:

$$f_i(\alpha_i, r_i) = \frac{r_i}{1 + 4e^{-\alpha_i} (1 + 2e^{-3\alpha_i})} \quad (5.15)$$

Nos somatórios, o termo $|\vec{x} - \vec{x}'| \leq 2$ refere-se à vizinhança de Manhattan de raio 2 em torno do ponto \vec{x} (Figura 5.4). Dessa forma, todos os fatores parácrinos atuam em 13 sítios da rede. Observe que os fatores parácrinos liberados na posição \vec{x}' no tempo t distribuem-se com um perfil Gaussiano:

$$c(r, \alpha) = f(\alpha)e^{-\alpha r^2} \tag{5.16}$$

em que $c(r, \alpha)$ é a concentração nos sítios localizados a uma distância r (na métrica de Manhattan) do ponto \vec{x} .

A concentração de todos os fatores parácrinos no tempo $t = 0$ é igual a 0 ($wnt(\vec{x}, 0) = \text{tgf-}\beta(\vec{x}, 0) = \text{tnf-}\alpha(\vec{x}, 0) = \text{il-1}(\vec{x}, 0) = \text{hmgbl}(\vec{x}, 0) = \text{ros}(\vec{x}, 0) = 0$).

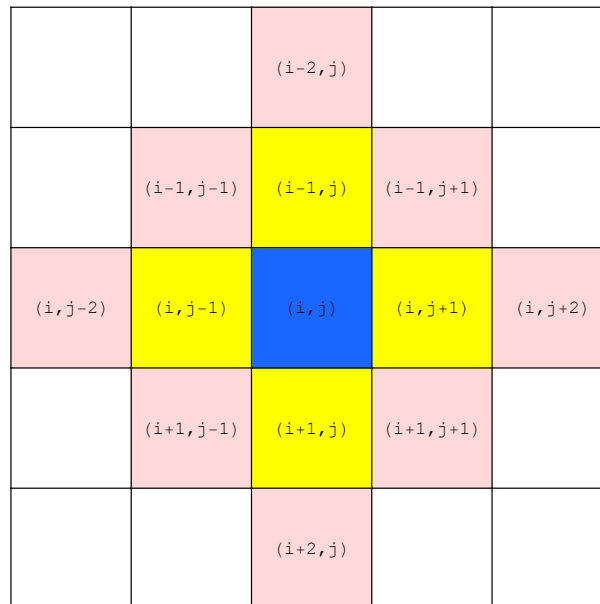


FIGURA 5.4: **Vizinhança de Manhattan.** Na métrica de Manhattan, a distância entre dois pontos $P_1(x_1, y_1)$ e $P_2(x_2, y_2)$ é dada por $r = |x_2 - x_1| + |y_2 - y_1|$. Em relação ao sítio (i, j) (em azul), os sítios em amarelo se encontram a uma distância $r = 1$ e, os sítios em rosa, a uma distância $r = 2$. Todos os sítios da Figura, incluindo o sítio (i, j) ($r = 0$), constituem-se na vizinhança de Manhattan de raio 2 do ponto (i, j) .

5.2.5 As condições ambientais

A condição ambiental que uma célula na posição \vec{x} encontra é determinada a partir dos valores das concentrações das diversas substâncias químicas nessa

posição. Admitimos que os nós da rede de regulação associada à célula, a saber, *Hipóxia*, *Nutrientes*, *Tgf-β*, *Tnf-α*, *Wnt*, *IL-1*, *ROS*, *HMGB1*, *Acidose*, e *Acidose Extrema* adotam o valor 1 de acordo as probabilidades $P_{hip}(\vec{x})$, $P_{nut}(\vec{x})$, $P_{tgf}(\vec{x})$, $P_{tnf}(\vec{x})$, $P_{wnt}(\vec{x})$, $P_{il1}(\vec{x})$, $P_{ros}(\vec{x})$, $P_{acid}(\vec{x})$, $P_{acid+}(\vec{x})$, respectivamente. Essas probabilidades são definidas como:

$$P_{hip}(\vec{x}) = \exp\left(-\theta_o \left(\frac{O(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.17)$$

$$P_{nut}(\vec{x}) = 1 - \exp\left(-\theta_n \left(\frac{N(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.18)$$

$$P_{tgf}(\vec{x}) = 1 - \exp\left(-\theta_{tgf} \left(\frac{tgf-\beta(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.19)$$

$$P_{tnf}(\vec{x}) = 1 - \exp\left(-\theta_{tnf} \left(\frac{tnf-\alpha(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.20)$$

$$P_{wnt}(\vec{x}) = 1 - \exp\left(-\theta_{wnt} \left(\frac{wnt(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.21)$$

$$P_{il1}(\vec{x}) = 1 - \exp\left(-\theta_{il1} \left(\frac{il-1(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.22)$$

$$P_{ros}(\vec{x}) = 1 - \exp\left(-\theta_{ros} \left(\frac{ros(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.23)$$

$$P_{hmgbl}(\vec{x}) = 1 - \exp\left(-\theta_{hm} \left(\frac{hmgbl(\vec{x})}{\sigma_p(\vec{x})}\right)^2\right), \quad (5.24)$$

$$P_{acid}(\vec{x}) = \begin{cases} 0 & \text{se } H(\vec{x}) < H_0 \\ 1 - \exp(-\theta_h (H(\vec{x}) - H_0)^2) & \text{se } H(\vec{x}) \geq H_0 \end{cases} \quad (5.25)$$

$$P_{acid+}(\vec{x}) = \begin{cases} 0 & \text{se } H(\vec{x}) < H_{0+} \\ 1 - \exp(-\theta_{h+} (H(\vec{x}) - H_{0+})^2) & \text{se } H(\vec{x}) \geq H_{0+} \end{cases} \quad (5.26)$$

em que $\sigma_p(\vec{x}) = \sigma_n(\vec{x}) + \sigma_m(\vec{x})$ é a população total de células vivas no sítio \vec{x} .

A forma funcional adotada para a probabilidade de ativação do nó *Hipóxia* (Equação 5.17), produz uma curva que possui o seu valor máximo quando não há oxigênio (Figura 5.5).

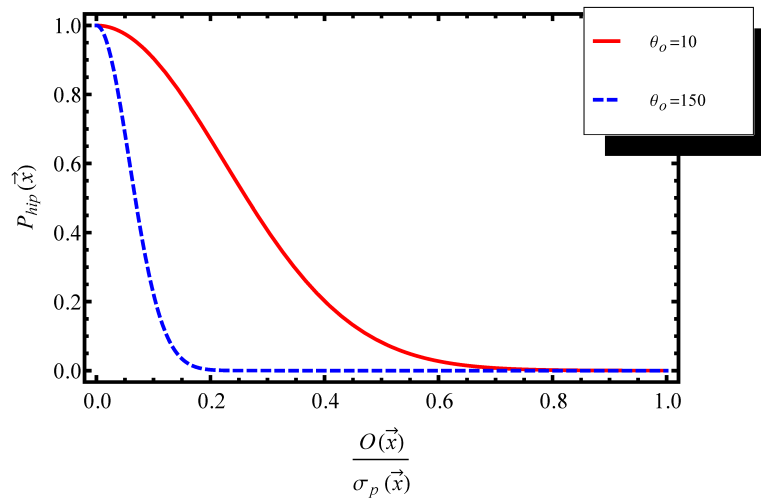


FIGURA 5.5: **Probabilidade de ativação.** A probabilidade de ativação do nó *Hipóxia* é tanto maior quanto menor for a quantidade de oxigênio disponível por célula.

A forma funcional adotada para a probabilidade de ativação dos nós relacionados aos fatores parácrinos e aos nutrientes (Equações 5.18-5.24), produzem curvas sigmoidais que saturam na unidade (Figura 5.6).

A forma funcional das probabilidades de ativação dos nós *Acidose* e *Acidose Extrema* são iguais a dos nutrientes, mas deslocadas para a direita. Em geral, $H_{0+} > H_0$.

Na Figura 5.7, é apresentado o comportamento de uma célula normal em diversas condições ambientais.

5.2.6 A dinâmica das populações

A cada passo de simulação, uma célula pertencente à população das células normais ou mutadas é selecionada ao acaso. As condições ambientais na posição \vec{x} são calculadas e, com essa informação, determina-se o fenótipo exibido pela célula. Existem três ações celulares que podem ser executadas: a morte por

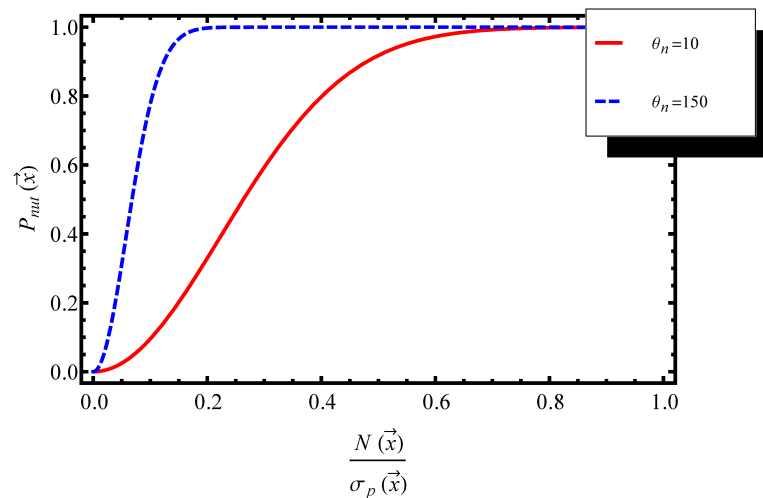


FIGURA 5.6: **Probabilidade de ativação.** A probabilidade de ativação do nó *Nutrientes* é tanto maior quanto maior for a quantidade de nutrientes disponível por célula. As probabilidades de ativação dos nós relacionados aos fatores parácrinos possuem a mesma forma funcional dos nutrientes.

apoptose, a morte por necrose, ou a divisão celular. Cada ação celular passa por uma rotina própria para sua execução. As rotinas para a morte por apoptose e morte por necrose são aplicadas da mesma forma tanto para as células normais quanto para as células mutadas.

1. Divisão para as células normais:

(a) **Condições para a divisão:** a divisão ocorre se a célula não tiver um fenótipo apoptótico ou necrótico e se houver algum sítio vazio entre os seus primeiros e segundos vizinhos ³.

(b) **Mutações:** modelando os possíveis erros de replicação, existe uma probabilidade P_{mut} de que um nó da rede seja mutado. Entre os nós da rede representando genes, um é escolhido aleatoriamente de forma equiprovável. O nó pode ser deletado ou superexpresso (com o peso das regulações aumentado por um fator α) e ambos os tipos de mutações possuem a mesma chance. Modelando os mecanismos de detecção e correção de erros no DNA, admitimos que há uma probabilidade $P_{rep} > 0$ da mutação ser corrigida.

³A célula que ocupa o vizinho vazio não é resultado da divisão da célula escolhida. Ela é proveniente das células tronco do tecido que se encontram fora do tecido simulado. O requisito de que a célula escolhida não seja apoptótica ou necrótica e que haja espaço vazio entre os seus vizinhos, significa que ela é capaz de sinalizar para a renovação tecidual.

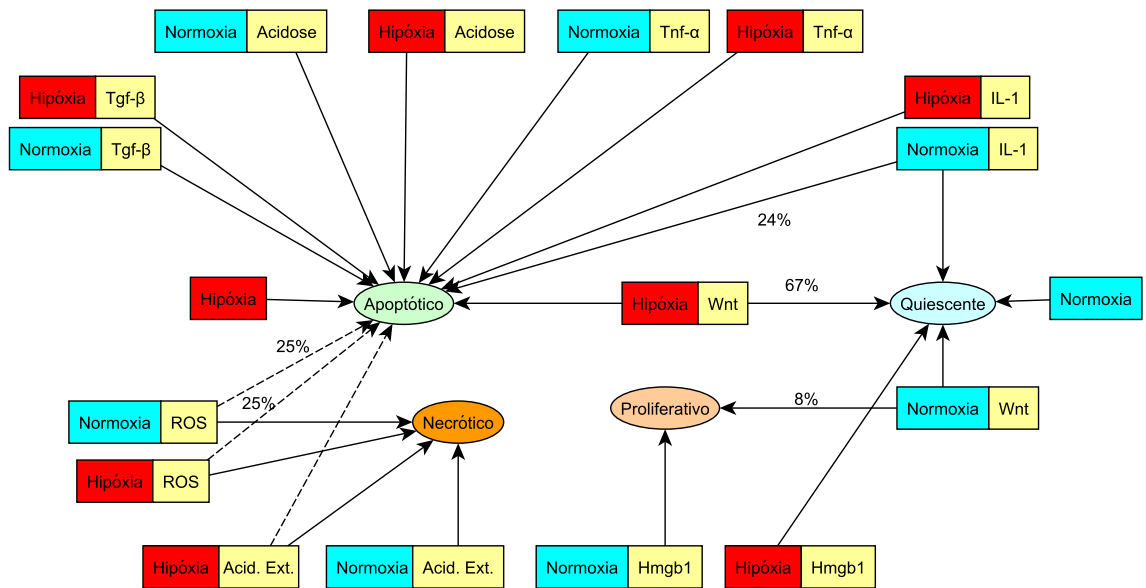


FIGURA 5.7: **Condições ambientais.** Fenótipo exibido por uma célula normal em diversas condições ambientais. Os fatores parácrino Wnt e Hmgb1 atuam como indutores da proliferação celular. IL-1, Tnf- α , e Tgf- β induzem a apoptose ou a quiescência. Ros, Hipóxia, Acidose e Acidose Extrema induzem a apoptose e/ou necrose. Nos casos em que uma condição ambiental pode levar a dois fenótipos distintos, indicamos o percentual de estados iniciais atraído por um dos fenótipos. As linhas tracejadas que apontam tanto para o fenótipo apoptótico quanto para o fenótipo necrótico, indicam que os dois fenótipos são observados simultaneamente. Na condição ambiental Normoxia e ROS, por exemplo, dos estados iniciais são levados a atratores com esses dois fenótipos simultaneamente.

Dessa forma, a probabilidade de uma mutação se estabelecer na célula é dada por $P_{mut} (1 - P_{rep})$.

(c) **A divisão:** satisfeitas as condições, um sítio entre os primeiros e segundos vizinhos da célula normal é escolhido aleatoriamente de forma equiprovável. Se nenhuma mutação ocorreu ou se ocorreu e foi corrigida, o sítio escolhido recebe uma célula normal ($\sigma_n(\vec{x}') \rightarrow 1$). Se uma mutação se estabeleceu, o sítio escolhido recebe uma célula mutada ($\sigma_m(\vec{x}') \rightarrow 1$).

2. **Divisão para as células mutadas (Figura 5.8):**

(a) **Condições para a divisão:** a divisão ocorre se a célula tiver o fenótipo proliferativo.

(b) **Mutações:** o mesmo processo das células normais. Contudo, se algum dos nós envolvidos no reparo do DNA (*Atm/Atr*, *Brca1* ou *Brca2*) estiver

deletado ou se o número máximo de divisões n_{max} tiver sido alcançado, e a célula não for imortal (ver (d)), temos que $P_{rep} = 0$ ⁴. Se o dano não for reparado, a célula se divide e a célula-filha carrega consigo a mutação que ocorreu. Se o dano for reparado, a divisão ocorre como se nunca tivesse havido uma mutação, ou seja, mãe e filha possuem a mesma rede.

(c) A divisão: existem nove sítios que são acessíveis à célula-filha; os primeiros e segundos vizinhos da célula-mãe e o próprio sítio da célula-mãe. Entre esses nove sítios, determinam-se aqueles que possuem o menor nível de ocupação, isto é, a população total do sítio $\sigma_p(\vec{x}) = \sigma_m(\vec{x}) + \sigma_n(\vec{x})$. Desse grupo, um sítio é escolhido aleatoriamente com igual chance para ser ocupado pela célula-filha.

(d) O encurtamento dos telômeros: cada célula mutada possui um contador do número de divisões efetuadas⁵. Toda vez que ocorre uma divisão, a célula-mãe e filha aumentam uma unidade nesse contador. Se o nó *hTert* não estiver ativo, quando o contador atinge um valor n_{max} , o nó *Dano no DNA* é ativado. Essa etapa modela o processo natural de encurtamento dos telômeros a cada ciclo de divisão. Quando *hTert* se torna ativo, através de mutações em *hTert* ou em outros genes que o regulam, a enzima telomerase passa a ser produzida e o encurtamento dos telômeros é interrompido⁶.

3. Morte por apoptose: se a célula tiver o fenótipo apoptótico ela morrerá. Sendo assim, temos as seguintes operações: $\sigma_n(\vec{x}) \rightarrow 0$ ou $\sigma_m(\vec{x}) \rightarrow \sigma_m(\vec{x}) - 1$ e $\sigma_{apop}(\vec{x}) \rightarrow \sigma_{apop}(\vec{x}) + 1$. A célula apoptótica permanece no tecido durante um tempo t_e , depois ela desaparece ($\sigma_{apop}(\vec{x}) = \sigma_{apop}(\vec{x}) - 1$)⁷. **Obs.:** Eventualmente, algumas células mutadas podem obter outras mutações que não a ativação de *hTert* que as permitem dividir mesmo após o número de divisões n_{max} ter sido alcançado. Nesse caso, supomos que elas podem se dividir mais n_{cris} vezes. Se entre essas divisões a célula mutada não ativar o nó *hTert*, ela morrerá por apoptose quando o número n_{cris} de divisões for alcançado.

⁴Estamos admitindo que o caos genético produzido nessa situação impede que o reparo seja efetivo.

⁵Como as células normais são provenientes das células tronco, elas surgem no tecido com os telômeros intactos.

⁶Essa etapa não se aplica às células normais. Estamos supondo que as células normais que renovam o tecido são originárias das células-tronco.

⁷As células apoptóticas são fagocitadas.

4. **Morte por necrose:** se a célula tiver o fenótipo necrótico ela morrerá. Sendo assim, temos as seguintes operações: $\sigma_n(\vec{x}) \rightarrow 0$ ou $\sigma_m(\vec{x}) \rightarrow \sigma_m(\vec{x}) - 1$ e $\sigma_{nec}(\vec{x}) \rightarrow \sigma_{nec}(\vec{x}) + 1$. A célula necrótica permanece no tecido durante um tempo t_e , depois ela desaparece ($\sigma_{nec}(\vec{x}) = \sigma_{nec}(\vec{x}) - 1$)⁸. **Obs.:** Apoptose e necrose são processos necessariamente excludentes apenas quando não há produção de ATP, caso em que só pode ocorrer necrose. Como pode ser visto da Figura 5.7, em alguns casos o fenótipo apontado é apoptótico e necrótico ao mesmo tempo (linhas tracejadas). Nesses casos, escolhemos aleatoriamente com igual probabilidade a apoptose ou a necrose⁹.

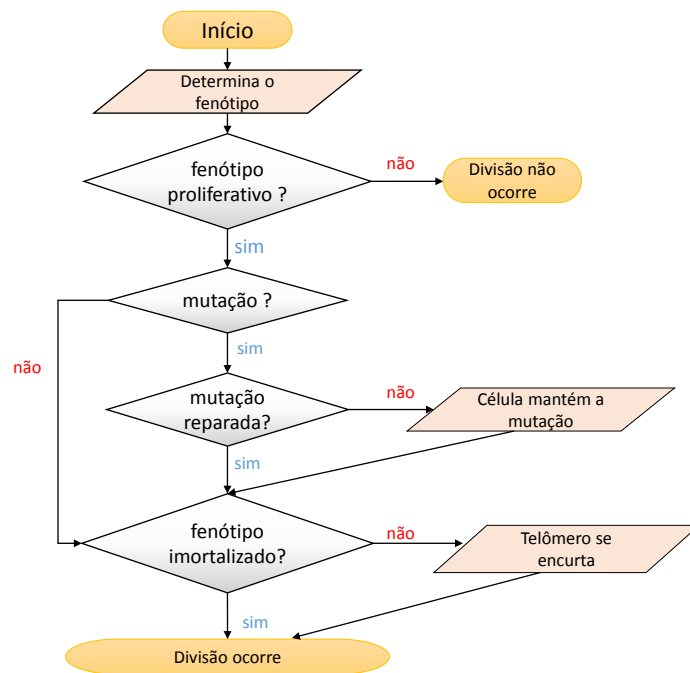


FIGURA 5.8: **Rotina de divisão.** Fluxograma das etapas seguidas na rotina da ação de divisão para as células mutadas.

5.2.7 Algoritmo da simulação

No modelo, um passo de simulação (1 MCS¹⁰) corresponde a uma tentativa de executar uma ação celular sobre uma célula escolhida aleatoriamente. Suponha

⁸Ainda não é muito claro como as células necróticas são removidas do tecido. Sabe-se que a fagocitose participa nesse processo, embora não seja tão efetiva quanto na eliminação das células apoptóticas [79].

⁹Nesses casos, acreditamos que a escolha de um tipo de morte ou outra dependa da intensidade com a qual as rotas de sinalização são ativadas. Como em nosso modelo os nós só admitem dois estados, essa ambiguidade ocorre.

¹⁰Monte Carlo *step*.

que em um determinado tempo t o número total de células normais e mutadas seja $N(t)$. Definimos um passo de tempo $t = 1$ como $N(t)$ passos de simulação, i.e., $N(t)$ MCS.

A simulação pode ser dividida em duas etapas. Na primeira, o tecido encontra-se preenchido completamente apenas com células normais ($\sigma_n(\vec{x}) = 1$ para cada sítio da rede). Sem permitir que hajam mutações, evoluímos o sistema um número de passos de simulação suficientes para que a população de células normais se estabilize em torno de uma média. O tecido assim obtido corresponde a um tecido normal em homeostase.

A partir desse momento, $t = 0$, permite-se que as mutações ocorram e, eventualmente, células mutadas com mutações aleatórias surgem em posições aleatórias. As equações de reação-difusão para os nutrientes, oxigênio e íons H^+ são resolvidas sempre que a soma de células que dividem e morrem ultrapassa um percentual ϵ do número de células totais (utilizamos $\epsilon = 1\%$). Fazendo isso, aceleramos consideravelmente a simulação e, desde que ϵ seja pequeno, não esperamos grandes variações nos resultados. As equações são resolvidas numericamente no estado estacionário ($\partial N/\partial t = \partial O/\partial t = \partial H/\partial t = 0$) através do método de Gauss-Siedel [80]. O tempo de difusão para essas substâncias ao longo do tecido é da ordem de segundos, o que justifica a aproximação estacionária.

Devido ao rápido tempo de decaimento e à pequena demanda computacional, as equações recursivas para os fatores parácrinos são solucionadas a cada passo de simulação (MCS).

5.2.8 Estimativa dos valores dos parâmetros

Nesta seção, estimamos os valores para os parâmetros do modelo. Para uma melhor apresentação, dividimos os parâmetros em duas subseções.

5.2.8.1 Nutrientes, oxigênio, H^+

Na Tabela 5.1, apresentamos os valores estimados para alguns parâmetros. A seguir, comentamos brevemente sobre a estimativa de alguns desses parâmetros.

Segundo Casciari *et al.* [81], a constante de consumo de glicose por células normais está entre $[10^{-6} - 5 \times 10^{-4}] \text{ s}^{-1}$. Como as células normais estão predominantemente em um estado não-proliferativo, utilizamos esse intervalo para a constante de consumo de nutrientes por células com um fenótipo quiescente ou senescente γ_q .

Calculamos a constante de consumo de oxigênio para as células quiescentes ou senescentes μ_q a partir da constante de consumo de nutrientes (glicose) γ_q . Como essas células utilizam a rota aeróbica para a produção de ATP, para cada mol de glicose consumido são necessários 6 mols de oxigênio. Dessa forma, a taxa de consumo de oxigênio por célula $\mu_q O(\vec{x})$ é seis vezes maior que a taxa de consumo de glicose $\gamma_q N(\vec{x})$. Utilizando a concentração de oxigênio O_0 e de nutrientes N_0 no capilar ¹¹, obtemos que $\mu_q = 6\gamma_q N_0/O_0$. Dessa forma, o valor de μ_q encontra-se entre $[5 \times 10^{-4} - 2,4 \times 10^{-1}] \text{ s}^{-1}$. Nas simulações, com objetivo de diminuir um dos parâmetros, dada a constante de consumo μ_q , utilizamos $\gamma_q = O_0\mu_q/6N_0$.

Segundo Casciari *et al.* [81], a constante de consumo de nutrientes (glicose) por células cancerosas está entre $[10^{-5} - 10^{-3}] \text{ s}^{-1}$. Como a maior parte dos cânceres são glicolíticos, podemos estimar o valor de λ_g entre $[10-100]$. Utilizando medidas mais recentes de Sander & Deisboeck [82], Ferreira *et al.* [68] estimam o valor de λ_g entre $[10 - 200]$. Adotaremos esse intervalo para λ_g .

O tempo t_e que as células apoptóticas e necróticas permanecem no tecido é difícil de estimar. Assumimos que seja igual a um passo de tempo ($t = 1$).

Conforme utilizado por Dairkee *et al.* [83], células não resistentes à acidose morrem quando o pH está por volta de 6,8. Por volta de 6,0, mesmo as células resistentes irão morrer. No modelo, utilizamos o pH de 6,8 como o limiar H_{0+} . Os parâmetros das probabilidades θ_h e θ_{h+} precisam ser ajustados a partir das simulações. Entretanto, devem ser tais que as probabilidades de ativação dos nós *Acidose* e *Acidose Extrema* sejam significativas quando o pH é igual a 6,8 e 6,0, respectivamente.

Os valores para os parâmetros θ_n e θ_o não puderam ser estimados e, portanto, precisam ser ajustados através das simulações.

¹¹Nas concentrações ideais de oxigênio e glicose essa relação é particularmente válida.

Parâmetro	Significado	Valor adotado
D_N	Constante de difusão dos nutrientes	$5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [84] ($d_N \approx 0,34$)
D_O	Constante de difusão do oxigênio	$1,46 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [81]
D_H	Constante de difusão dos íons H^+	$1,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [70] ($d_H \approx 0,75$)
N_0	Concentração de nutrientes no capilar	5,5 mM [70]
O_0	Concentração de oxigênio no capilar	0,0695 mM [70]
H_0	Concentração de H^+ no capilar	$3,98 \times 10^{-5} \text{ mM}$, pH=7,4[81]
H_{0+}	Concentração de H^+ na qual as células não resistentes morrem	$15,84 \times 10^{-5} \text{ mM}$, pH=6,8 [83]
γ_q	Constante de consumo de nutrientes por células quiescentes e senescentes	$10^{-6} - 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ [81] ($\alpha_N \approx 0,00026 - 0,0059$)
λ_p	Quantas vezes as células proliferativas consomem mais nutrientes que as quiescentes	2 [85]
λ_g	Quantas vezes as células glicolíticas consomem mais nutrientes que as quiescentes	[10 – 200] ([68],[81])
μ_q	Constante de consumo de oxigênio por células quiescentes(μ_q) e senescentes	$5 \times 10^{-4} - 2,4 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($\alpha_O \approx 0,0059 - 0,128$)
κ_p	Quantas vezes as células proliferativas consomem mais oxigênio que as células quiescentes	2 [85]
κ_g	Quantas vezes as células glicolíticas consomem mais oxigênio que as células quiescentes	κ_p [85]
t_e	Tempo de eliminação das células necróticas e apoptóticas	1 dia (1 passo de tempo)
β	Taxa de produção íons H^+	$10^{-5} - 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$ [70] ($\alpha_H \approx 0,131 - 0,415$)
n_{max}	Número máximo de replicações	50 – 70 [86]

TABELA 5.1: **Parâmetros I:** Notação, significado e estimativa dos valores de alguns parâmetros usados no modelo.

5.2.8.2 Fatores parácrinos

Na farmacologia, uma dose efetiva (ED50) é quantidade de uma determinada substância ou radiação que produz uma resposta esperada em 50% de uma população em teste. Vamos tornar adimensionais as concentrações dos fatores parácrinos dividindo-as pelo seu ED50:

$$wnt' = \frac{wnt}{wnt_{ED50}}; \quad tgf'-\beta = \frac{tgf-\beta}{tgf_{ED50}}, \quad tnf'-\alpha = \frac{tnf-\alpha}{tnf_{ED50}} \quad (5.27)$$

$$il'-1 = \frac{il-1}{il-1_{ED50}}; \quad hmgb1' = \frac{hmgb1}{hmgb1_{ED50}}; \quad ros' = \frac{ros}{ros_{ED50}} \quad (5.28)$$

Vamos admitir que na concentração correspondente ao ED50 de um determinado fator parácrino, a probabilidade de ativar o nó em questão é igual a 50%. Em termos dessas concentrações adimensionais e como as probabilidades de ativação de todos os nós associados aos fatores parácrinos possuem a mesma forma funcional, assumimos que:

$$\theta_{tgf} = \theta_{tnf} = \theta_{wnt} = \theta_{il1} = \theta_{ros} = \theta_{hm} = \ln(2), \quad (5.29)$$

de modo a garantir que $P(ED50) = 0,5$.

Na Tabela 5.2, estimamos os valores de alguns parâmetros do modelo. Os que não puderam ser estimados permanecem como parâmetros a serem variados no modelo.

Fator parácrino	Parâmetro	Significado	Valor estimado
<u>wnt</u>	λ_1	Taxa de degradação	?
	r_1	Taxa de produção por células apoptóticas	?
	wnt_{ED50}	ED50	0, 2 ng/mL [87]
	<hr/>		
<u>tgf-β</u>	λ_2	Taxa de degradação	10 dia ⁻¹ [88]
	r_2	Taxa de produção por células apoptóticas	0, 15 dia ⁻¹ ng/mL [89]
	r_{2m}	Taxa de produção pelas células capazes de sintetizá-lo	(0, 5 – 990) dia ⁻¹ ng/mL ([90],[88])
	tgf_{ED50}	ED50	0, 1 ng/mL [91]
	<hr/>		
<u>tnf-α</u>	λ_3	Taxa de degradação	14 dia ⁻¹ (meia-vida: 70 min) [92]
	r_{3m}	Taxa de produção pelas células capazes de sintetizá-lo	(150 – 8000) dia ⁻¹ ng/mL ([93],[94])
	tnf_{ED50}	ED50	0, 5 ng/mL [95]
	<hr/>		
<u>il-1</u>	λ_4	Taxa de degradação	10, 5 dia ⁻¹ (meia-vida: 95 min) [96]
	r_{4m}	Taxa de produção por células senescentes	?
	$il-1_{ED50}$	ED50	12 pg/mL [97]
<hr/>			
<u>hmgb1</u>	λ_5	Taxa de degradação	5, 5 dia ⁻¹ (meia-vida: 180 min) [98]
	r_5	Taxa de produção por células necróticas	?
	$hmgb1_{ED50}$	ED50	14 μ g/mL [99]
<hr/>			
<u>ROS</u>	λ_6	Taxa de degradação	76 dia ⁻¹ (meia-vida: 13 min) [100]
	r_6	Taxa de produção por células necróticas	?
	r_{6m}	Taxa de produção por células senescentes	?
	ROS_{ED50}	ED50	86 mM [100]

TABELA 5.2: **Parâmetros II.** Notação, significado e estimativa dos parâmetros associados aos fatores parácrinos. Aqueles que não puderam ser estimados estão com uma interrogação (?).

5.2.8.3 Outras considerações sobre os parâmetros

Em média, durante um passo de tempo t do modelo, todas as células podem se dividir uma vez. Isso não ocorre porque fatores como a concentração local das substâncias e o espaço disponível para a divisão (células normais) influenciam na capacidade das células dividirem. Contudo, se todas as células do tecido estivessem em condições ideais, a média de uma divisão por célula por passo de tempo seria observada. Dessa forma, associamos ao passo de tempo t a duração de 24 horas. Esse é o tempo típico que células humanas em cultura necessitam para se dividir [101].

A taxa de erro no processo de replicação está por volta de 10^{-8} erros por par de base. As enzimas de reparo consertam por volta de 99% desses erros [102]. Como o número médio de bases por gene está entre 10 – 15 kbp [103], a taxa de mutação P_{mut} é estimada em 10^{-4} e a de reparo P_{rep} em 0,99. Nas simulações, utilizamos $P_{rep} = 0,99$, como o estimado. Contudo, o valor estimado para a taxa de mutações mostrou-se computacionalmente proibitivo. O valor utilizado foi de $P_{mut} = 10^{-2}$.

O parâmetro de rede Δ está associado ao tamanho celular típico (5 – 20 μm) [104]. Adotamos o valor de $\Delta = 10 \mu\text{m}$.

Devido ao grande número de parâmetros a serem variados, definimos o que denominamos de Conjunto Base (CB) (Tabela 5.4). Sempre que especificarmos o valor de um ou mais parâmetros utilizados em uma simulação, fica subentendido que os demais parâmetros não especificados são aqueles do Conjunto Base (CB).

5.3 Resultados

Na primeira parte da simulação, preenchamos o tecido (rede quadrada $(L + 1) \times (L + 1)$) totalmente por células normais σ_n . Sem permitir que hajam mutações, o sistema é evoluído um número de passos de simulação k suficientes para que a população de células normais σ_n se estabilize (Figura 5.9). O tecido final encontrado é formado predominantemente por células normais σ_n e por algumas células apoptóticas σ_{ap} . Células necróticas σ_{nec} não são observadas. Essa distribuição final de células é interpretada como um tecido normal em homeostase.

Parâmetros	Valores usados na simulação	Interpretação biológica
Passo de tempo (t)	1	1 dia
Δ	1	10 μm
L	300	3 mm
α_O	$0,0059 - 0,128 \approx (\approx \frac{2}{L} - \frac{40}{L})$	Consumo de oxigênio por células quiescentes e senescentes
α_H	$0,131 - 0,415 \approx (\approx \frac{40}{L} - \frac{120}{L})$	Produção de íons H^+ por células glicolíticas
λ_g	10 - 200	Metabolismo acelerado
P_{mut}	0,01	Probabilidade de mutação
P_{rep}	0,99	Probabilidade de reparo da mutação

TABELA 5.3: **Parâmetros III:** Alguns parâmetros e sua interpretação biológica.

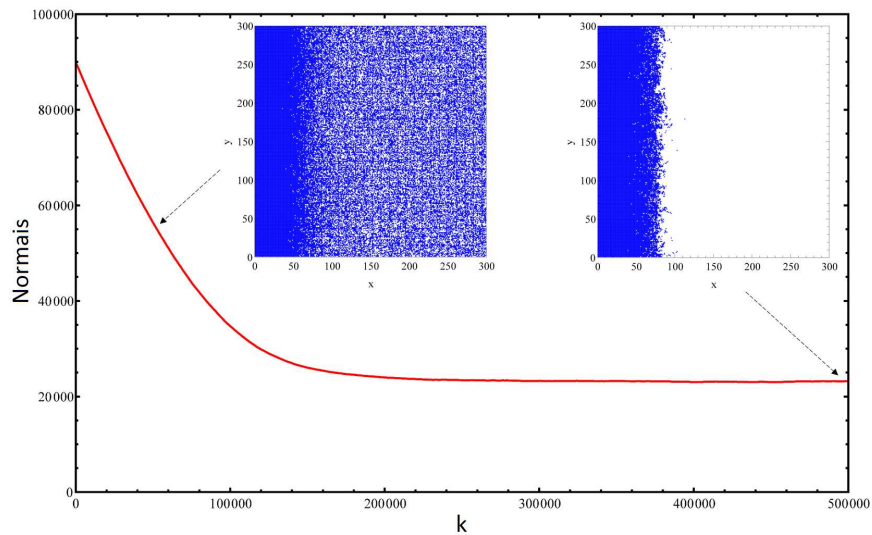


FIGURA 5.9: **Tecido normal.** Após um número suficiente de passos de simulação k , o número de células normais σ_n atinge um valor estacionário. Nesse estágio, assumimos que temos um tecido normal em homeostase.

O tecido normal obtido é sempre similar; a densidade de células normais σ_n diminui conforme as células ficam mais distantes do capilar localizado em $x = 0$.

Parâmetro	Valor
θ_o	50
θ_n	50
θ_h	0,52
θ_{h+}	0,01
α_O	$10/L$
α_H	$40/L$
λ_g	10
λ_1	10
r_1	5
r_{2m}	100
r_{3m}	300
r_{4m}	100
r_5	1
r_6	1
r_{6m}	1
$\alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_{6m}$	1,5
n_{max}	70

TABELA 5.4: **Conjunto Base:** Os parâmetros estão em sua forma adimensional. O parâmetro r_1 , por exemplo, corresponde a r'_1 , em que $r'_1 = r_1/wnt_{ED50}$. Os apóstrofes são omitidos.

Isso ocorre devido ao aumento na taxa de apoptose, que é desencadeada pela diminuição da concentração de oxigênio $O(\vec{x})$ com a distância do capilar. Essa diminuição é mais abrupta do que a diminuição na concentração dos nutrientes $N(\vec{x})$ ¹². Sendo assim, o oxigênio $O(\vec{x})$ atua como o principal determinante da distribuição final das células normais σ_n no tecido. Na Figura 5.10, podemos ver como a constante de consumo de oxigênio α_O afeta o tecido normal obtido.

Para acelerar as simulações, utilizamos a seguinte estratégia. A partir do tempo $t = 0$, sempre que não houver nenhuma célula mutada σ_m no tecido, a probabilidade de mutação P_{mut} se torna igual a 1. Assim que surge uma célula mutada σ_m , ela retorna ao seu valor anterior.

As simulações empreendidas apenas quando a população de células mutadas σ_m atingem um estado estacionário (Figura 5.11) formado por células imortais. Como veremos posteriormente, nesse estado, as células alcançam o ápice da agressividade possível no modelo.

¹²Isso ocorre porque a concentração de oxigênio no capilar O_0 é muito menor do que a de nutrientes N_0 ($N_0/O_0 \approx 79$), e a constante de consumo de oxigênio em condição de normoxia é seis vezes superior à de nutrientes.

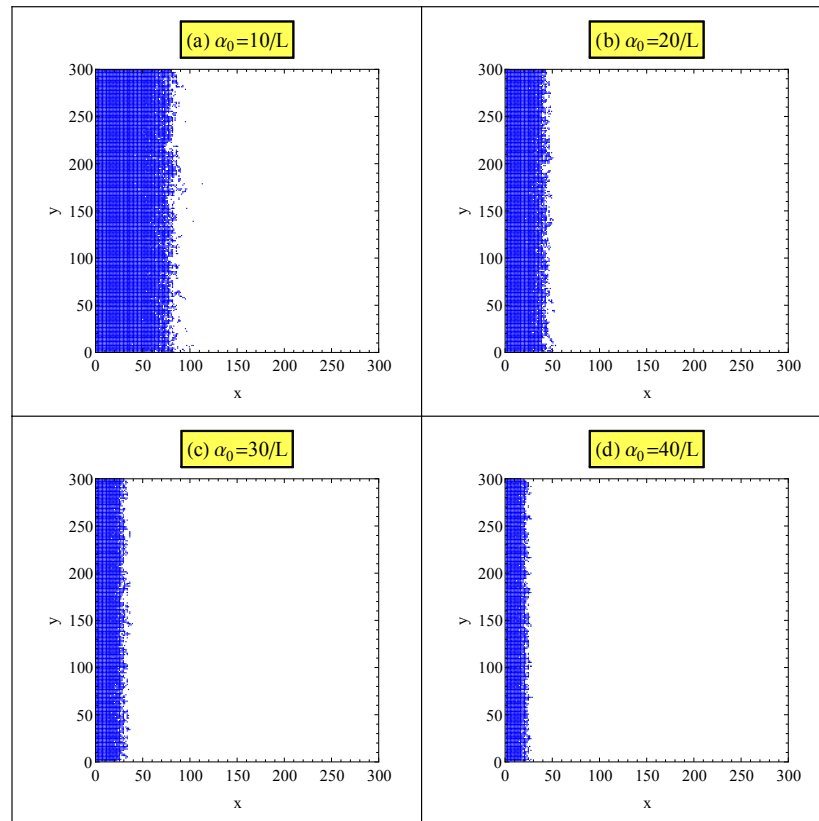


FIGURA 5.10: **Tecido normal para diferentes constantes de consumo de oxigênio.** Nos tecidos normais cujas células possuem maiores constantes de consumo de oxigênio α_O , as células normais permanecem mais próximas ao capilar.

A menos que seja dito o contrário, todas as grandezas medidas foram valoradas 200 passos de tempo t após o início do estado estacionário (Figura 5.11).

5.3.1 A dinâmica de crescimento

Mesmo para parâmetros idênticos, a evolução temporal da população de células mutadas σ_m pode ser bastante distinta (Figura 5.12). Isso é um reflexo da aquisição estocástica das mutações no modelo e sugere que cada tumor tem a sua própria história evolutiva. Apesar dessas diferenças, constatamos a existência de esquemas de evolução similar em todos os casos analisados. Esses esquemas tornam-se compreensíveis ao enxergarmos a evolução tumoral como uma aquisição progressiva de determinadas características fenotípicas pelas células mutadas σ_m . Por esse motivo, vamos definir as seguintes características fenotípicas:

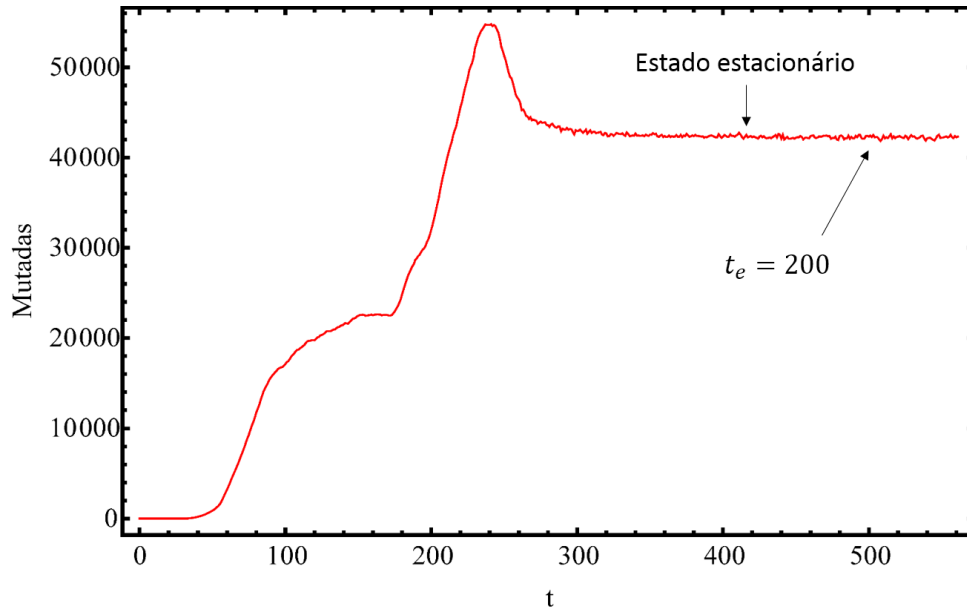


FIGURA 5.11: **Estado estacionário.** A simulação termina quando a população de células mutadas σ_m atinge um estado estacionário formado por células imortais. Todas as grandezas são valoradas no tempo $t_e = 200$ contado a partir do início do estado estacionário.

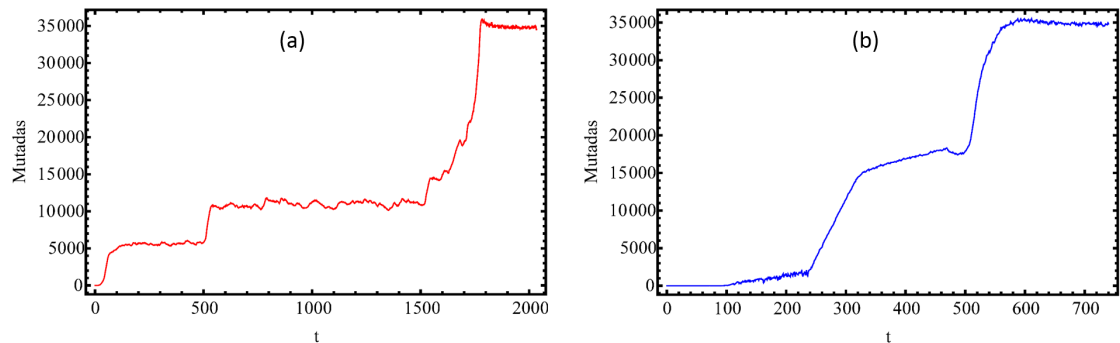


FIGURA 5.12: **Evolução temporal.** Evolução temporal para a população de células mutadas σ_m em duas simulações distintas com os mesmos valores para os parâmetros.

Autossuficiência em fatores de crescimento (ASFC): a célula possui um fenótipo proliferativo se houver Nutrientes $N(\vec{x})$ e Oxigênio $O(\vec{x})$ em quantidades adequadas. Em outras palavras, se o nó *Nutrientes* estiver ativo e as demais entradas ambientais¹³ estiverem inativas, a dinâmica da rede conduz a um atrator com fenótipo proliferativo. Nessa situação, uma célula normal σ_n tem um fenótipo quiescente. Obs.: Os termos célula e rede devem ser entendidos como sinônimos.

¹³Relembrando, as estradas ambientais consideradas no modelo são: *Hipóxia, Nutrientes, Tgf- β , Tnf- α , IL-1, Hmgb1, Ros, Acidose, e Acidose Extrema.*

Evasão da apoptose induzida por hipóxia (EAH): se os nós *Nutrientes* e *Hipóxia* estiverem ativos e as demais entradas ambientais inativas, a dinâmica da rede conduz a um atrator com fenótipo quiescente. Nessa situação e na próxima, uma célula normal σ_n tem um fenótipo apoptótico;

Proliferativa em hipóxia (PH): se os nós *Nutrientes* e *Hipóxia* estiverem ativos e as demais entradas ambientais inativas, a dinâmica da rede conduz a um atrator com fenótipo proliferativo;

Evasão da apoptose induzida por hipóxia e acidose (EAHA): se os nós *Nutrientes*, *Hipóxia*, e *Acidose* estiverem ativos e as demais entradas ambientais inativas, a dinâmica da rede conduz a um atrator com fenótipo quiescente. Nessa situação e na próxima, uma célula normal σ_n tem um fenótipo apoptótico;

Proliferativa em hipóxia e acidose (PHA): se os nós *Nutrientes*, *Hipóxia*, e *Acidose* estiverem ativos e as demais entradas ambientais inativas, a dinâmica da rede conduz a um atrator com fenótipo proliferativo;

Evasão da senescência programada (ESP): se o nó *Dano no DNA* estiver ativo, a entrada ambiental *Nutrientes* estiver ativa e as demais entradas ambientais inativas, a dinâmica da rede conduz a um atrator com fenótipo proliferativo. O nó *Dano no DNA* é ativado quando a célula atinge o número máximo de replicações n_{max} ;

Fenótipo mutador (FM): se os nós *Atm/Atr*, *Brca1*, ou *Brca2* estiverem deletados ¹⁴, a rede possui o fenótipo mutador;

Fenótipo imortal(FI): se o nó *hTert* estiver ativado, a rede possui o fenótipo imortal.

Insensibilidade a fatores inibidores de crescimento (IFIC): se o nó *Nutrientes* e o nó correspondente a um determinado fator inibidor de crescimento (*Tnf- α* , *Tgf- β* , *IL-1*, ou *Ros*) estiver ativo, e as demais entradas ambientais estiverem inativas, a dinâmica da rede conduz a um atrator com fenótipo proliferativo.

Em todas as simulações, no estado estacionário, as células sempre possuem as seguintes características fenotípicas: ASFC, EAH, PH, EAHA, PHA e FI. Na maior parte dos casos, elas também possuem um fenótipo mutador (FM) e insensibilidade a todos os fatores inibidores de crescimento (IFIC), com exceção de

¹⁴Ou seja, inativados permanentemente por mutações.

Ros. Dessa maneira, o estado estacionário representa um estágio avançado da tumorigênese.

Na Tabela 5.5, apresentamos algumas sequências de mutações obtidas nas simulações. Associamos cada mutação com a característica fenotípica obtida pela célula. Por exemplo, na primeira linha, a superexpressão de Pdk1, identificada por Pdk1(+), é responsável pela aquisição de ASFC e EAH. Por sua vez, a deleção de Atm/Atr, identificada por Atm/Atr(-), é responsável pela aquisição de ESP e FM.

Sequência de mutações	ASFC	EAH	ESP	FM	FI	PH	EAHA	PHA	IFIC
<u>Esquema 1</u>									
(1) Pdk1(+) \rightarrow Atm/Atr(-) \rightarrow hTert(+) \rightarrow Akt(+) \rightarrow Mdm2(+)	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	4 ^a	5 ^a	(IL-1, Tnf- α , Ros) \rightarrow Não Tgf- β \rightarrow 4 ^a
(2) Ras(+) \rightarrow Atm/Atr(-) \rightarrow hTert(+) \rightarrow Myc(+) \rightarrow p53(-)	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	—	5 ^a	(IL-1, Tnf- α , Tgf- β) \rightarrow 5 ^a Ros \rightarrow Não
(3) Slug(+) \rightarrow Atm/Atr(-) \rightarrow hTert(+) \rightarrow Mxi1(-) \rightarrow p53(-)	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	5 ^a	(IL-1, Tnf- α) \rightarrow 5 ^a (Ros, Tgf- β) \rightarrow Não
<u>Esquema 2</u>									
(4) Tcf/Lef/Cbp(+) \rightarrow Chk1/2(-) \rightarrow Myc(+) \rightarrow Akt(+)	1 ^a	1 ^a	2 ^a	Tp.	4 ^a	3 ^a (24%) 4 ^a (100%)	1 ^a	3 ^a (24%) 4 ^a (100%)	(IL-1, Tnf- α , Tgf- β) \rightarrow 1 ^a Ros \rightarrow Não
(5) Pkc(+) \rightarrow Chk1/2(-) \rightarrow hTert(+) \rightarrow Akt(+) \rightarrow Mdm2(-)	1 ^a	1 ^a	2 ^a	Tp.	3 ^a	4 ^a	4 ^a	5 ^a	(IL-1, Tnf- α , Tgf- β) \rightarrow 4 ^a Ros \rightarrow Não
<u>Esquema 3</u>									
(7) Slug(+) \rightarrow Akt(+) \rightarrow Nf- κ B(+) \rightarrow p53(-)	1 ^a	1 ^a	2 ^a	—	2 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a (11,5%) 4 ^a (100%)	(IL-1, Tnf- α , Tgf- β) \rightarrow 2 ^a Ros \rightarrow Não
(8) hTert(+) \rightarrow p27(-) \rightarrow Hsp70(+) \rightarrow Mdm2(+)	1 ^a	1 ^a	1 ^a	—	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	(IL-1, Tnf- α , Tgf- β) \rightarrow 4 ^a Ros \rightarrow Não

TABELA 5.5: **Sequências de mutações.** As simulações sugerem que existem pelo menos três esquemas distintos de evolução. Os números 1^a, 2^a, ..., indicam qual mutação de uma dada sequência confere a característica fenotípica. Os percentuais indicam o quanto a característica fenotípica é observada (estados iniciais atraídos pelos atratores). Se nenhum percentual é indicado, entenda-se que é 100%.

Os três esquemas da Tabela 5.5 não são equiprováveis. O Esquema I é o mais frequente, sendo observado em 81,5% das simulações. Os Esquemas II e III aparecem em 11,1% e 7,4% das simulações, respectivamente.

Devido a sua importância, faremos uma análise detalhada de uma simulação pertencente ao Esquema I. Nessa análise, explicaremos como as modificações no microambiente agem como pressão seletiva para aquisição de novas características e, também, discutiremos sobre outros aspectos da dinâmica do modelo. Posteriormente, discutiremos onde os Esquemas II e III afastam-se do I e porque são menos prováveis.

5.3.1.1 Esquema I

A Figura 5.13, apresenta a evolução da população de células mutadas σ_m em função do tempo t para o caso a ser analisado. A figura está dividida em regiões que marcam onde, nesse caso, surgem populações com novas características fenotípicas.

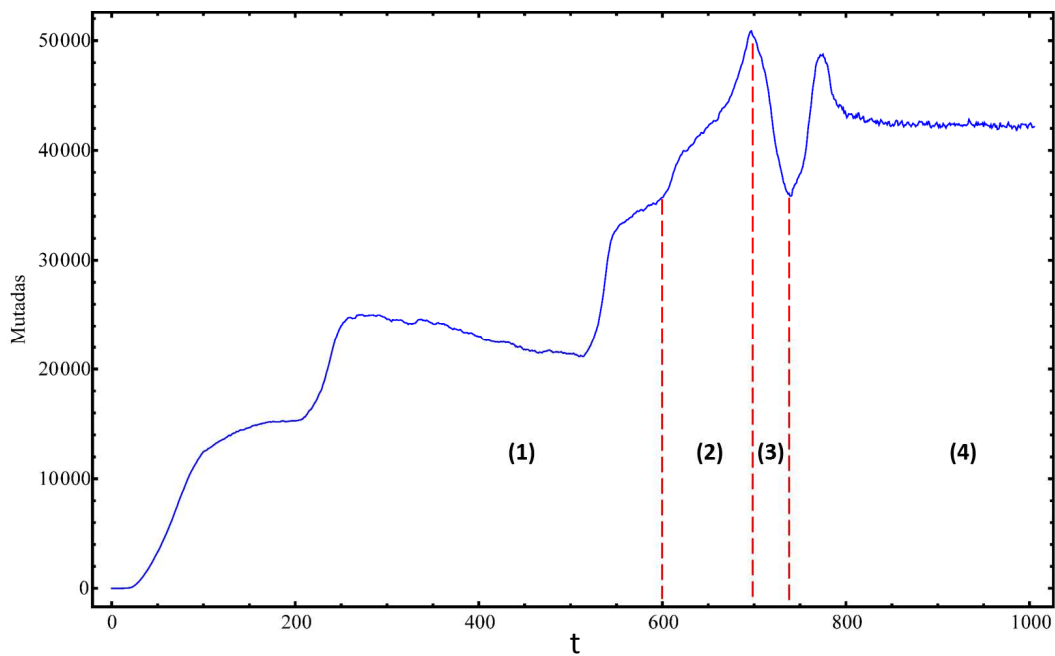


FIGURA 5.13: **Células mutadas.** Evolução temporal da população de células mutadas. Cada uma das regiões está associada a aquisição de novas características fenotípicas. ($\alpha_o = 10/L$; $\lambda_g = 100$; $\alpha_H = 40/L$). O restante dos parâmetros são aqueles do Conjunto Base apontado no Apêndice B.

Região (1) - A mutação iniciadora: Uma célula normal σ_n sofre uma única mutação, denominada mutação iniciadora, que lhe confere um fenótipo proliferativo na condição de normoxia (ASFC). A célula normal torna-se uma célula mutada σ_m . Essa célula produz clones que também possuem um fenótipo proliferativo nessa condição e, dessa forma, o número de células mutadas σ_m no tecido aumenta. Como consequência desse aumento, temos uma diminuição na quantidade de oxigênio $O(\vec{x})$ disponível por célula. Como pode ser visto da Tabela 5.5, a mutação iniciadora confere a capacidade de evasão da apoptose induzida por hipóxia (EAH), mas não a de proliferação nessa condição (PH). Dessa forma, as células em regiões com oxigenação insuficiente entram em um estado quiescente. O aumento no número de células mutadas σ_m também implica em um encurtamento progressivo dos telômeros. Quando as células efetuam o número máximo de replicações n_{max} , o encurtamento crítico dos telômeros ativa a rota de Dano no DNA. Dependendo do tipo de mutação iniciadora, essa ativação desencadeia à apoptose e/ou a quiescência. Observamos que o encurtamento dos telômero é um limitante mais importante que a disponibilidade de oxigênio $O(\vec{x})$ nessa fase da progressão tumoral.

O número de mutações iniciadoras depende da probabilidade de mutação P_{mut} adotada. Para $P_{mut} = 0,01$, valor adotado em nossas simulações, é comum o aparecimento de mais de uma mutação iniciadora. Na presente simulação, por exemplo, quatro mutações iniciadoras surgem em tempos distintos na Região (1); Gab1(+), Slug(+), Pten(-), e Ras(+) (Figura 5.14).

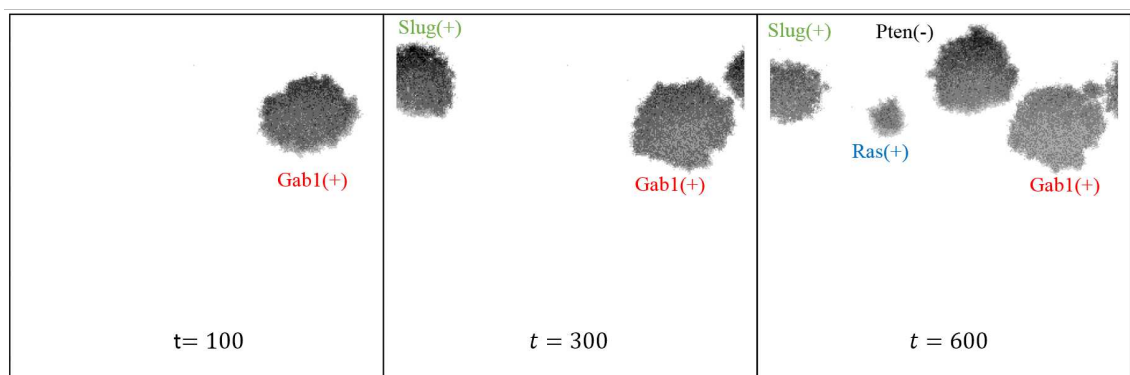


FIGURA 5.14: **Mutações iniciadoras.** Densidade de células mutadas σ_m em três tempos distintos na Região (1). As mutações iniciadoras responsáveis por cada sub-população estão indicadas. A densidade de células mutadas σ_m está em escala de cinza, quanto mais escuro, maior a densidade. O capilar encontra-se localizado no topo da figura.

A primeira mutação iniciadora é $Gab1(+)$. Ela surge por volta de $t = 25$ e permanece sendo a única até por volta de $t = 200$. A Figura 5.15, mostra a população de células mutadas σ_m originadas da mutação em $Gab1(+)$ em três instantes de tempo. Em vermelho, temos células com fenótipo proliferativo σ_p^f e, em preto, com fenótipo quiescente σ_q^f . Quanto mais próximo ao capilar, maior é a concentração de oxigênio $O(\vec{x})$ e, conseqüentemente, maior a chance de que as células tenham um fenótipo proliferativo. Aliado ao fato de que ao se dividirem as células ocupam preferencialmente sítios com menor densidade de células, isso explica porque o crescimento do tumor ocorre preferencialmente em direção ao capilar.

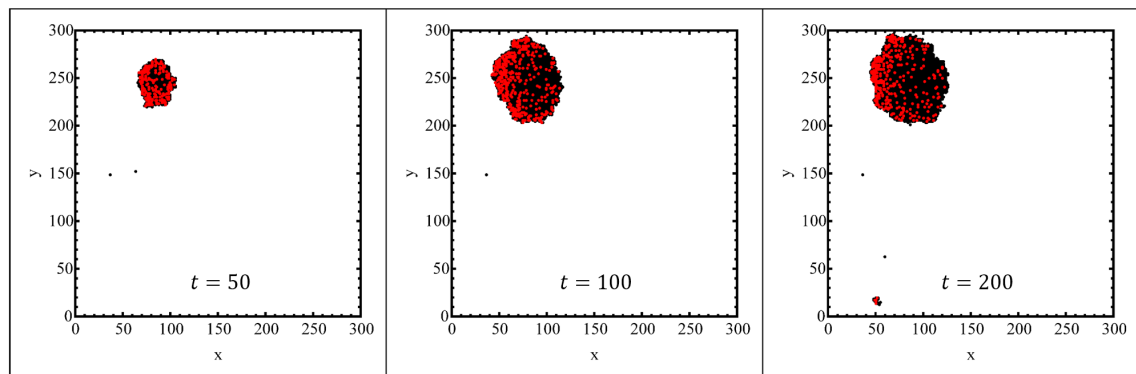


FIGURA 5.15: **Células proliferativas e quiescentes.** População de células com fenótipos proliferativo σ_p^f , em vermelho, e quiescente σ_q^f , em preto, para diferentes tempos. Observe que o tumor cresce em direção ao capilar localizado em $x = 0$. Note também que a maior parte das células proliferativas σ_p^f concentra-se próxima a borda do tumor mais perto do capilar.

Na Figura 5.13, podemos notar que em $t = 200$ a população de células mutadas σ_m aproxima-se de um estado estacionário. Isso ocorre pelo encurtamento dos telômeros. Como podemos ver da Figura 5.16, em $t = 200$, um grande percentual de células mutadas σ_m já efetuou ou está perto de efetuar o número máximo de replicações $n_{max} = 70$. Essas células encontram-se, principalmente, nas regiões do tumor mais próximas ao capilar. A medida que essas células vão atingindo o número crítico de replicações n_{max} elas morrem ou entram em um estado quiescente ¹⁵. As células que replicaram poucas vezes encontram-se em regiões com

¹⁵Para $Gab1(+)$, a chance de apoptose é de 99,4% e de quiescência é 0,6%. Como comparação, para a segunda mutação $Slug(+)$, a chance de apoptose é de 60,1% e de quiescência é de 39,9%.

pouca concentração de oxigênio $O(\vec{x})$ e, dessa forma, estão em um estado quiescente. Sendo assim, a população de células mutadas σ_m aproxima-se de um estado estacionário ¹⁶.

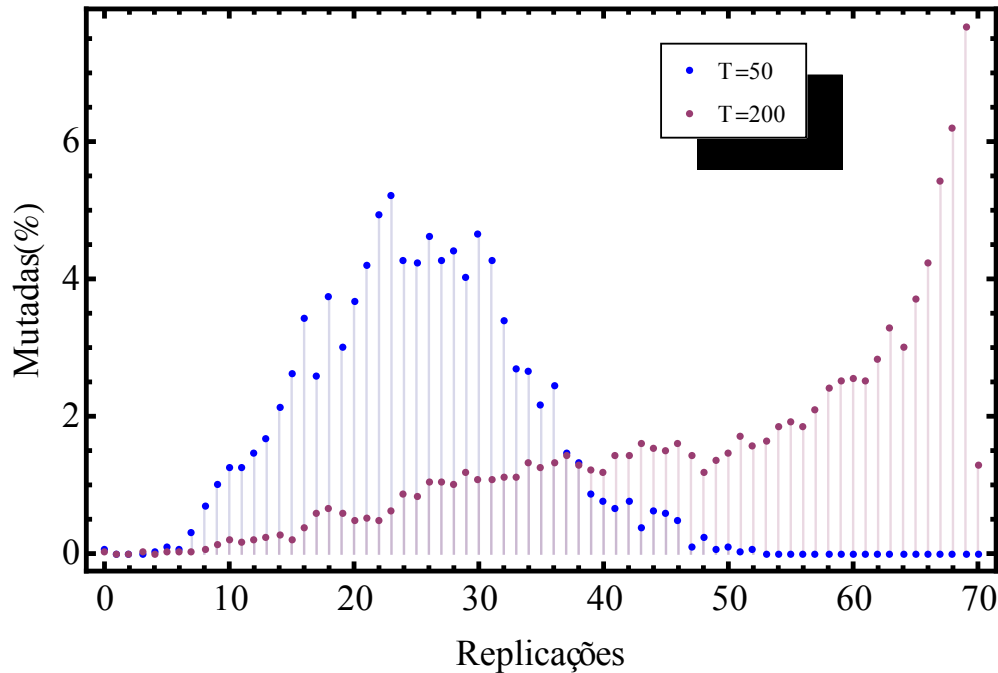


FIGURA 5.16: **Número de replicações.** Percentual de células mutadas σ_n pelo número de replicações executadas em dois tempos distintos. Para $t = 50$, nenhuma célula atingiu o número crítico de replicações. Para $t = 200$, 24,84% das células já se replicaram mais que 65 vezes.

A segunda mutação iniciadora, $\text{Slug}(+)$, surge a partir de $t = 200$. Na Figura 5.13, podemos observar o aumento na população de células mutadas σ_m decorrente dessa nova mutação iniciadora. Similarmente a população resultante de $\text{Gab1}(+)$, a população de $\text{Slug}(+)$ também é freada pelo encurtamento dos telômeros. A terceira e a quarta mutação iniciadora, respectivamente, $\text{Pten}(-)$ e $\text{Ras}(+)$, surgem a partir de $t = 500$. Novamente, podemos observar o aumento na população de células mutadas σ_m decorrente dessas novas mutações iniciadoras. Contudo, algo novo ocorre. Como veremos a seguir, um dos clones da população de $\text{Pten}(-)$ adquire uma nova característica fenotípica, o que nos leva a Região (2).

Região (2) - O fenótipo mutador e a imortalização: A deleção do gene $\text{Atm}/\text{Atr}(-)$ confere à célula mutada σ_m a capacidade de evadir da senescência

¹⁶Esse estado não é realmente estacionário. Se nenhuma nova mutação surgir, a longo prazo, todas as células irão alcançar o número máximo de replicações n_{max} e, eventualmente, morrer.

programada (ESP). Isso quer dizer que mesmo quando o número máximo de replicações n_{max} é alcançado, a célula ainda continua com um fenótipo proliferativo. Entretanto, a célula não pode se dividir indefinidamente. Após a evasão da senescência programada (ESP), ela é capaz de se dividir apenas um número n_{crit} de vezes antes de entrar no estado de crise e morrer por apoptose. Portanto, antes que esse número adicional de replicações seja alcançado, é necessário que a célula se torne imortal (FI). A imortalização celular é alcançada através da ativação do nó hTert. Essa ativação pode ser direta, através da mutação em hTert, ou indireta, através da mutação em genes que controlam hTert.

A chance de obtenção do fenótipo imortal (FI) após a ESP é aumentada devido a aquisição do fenótipo mutador (FM) que, necessariamente, é obtido conjuntamente com a ESP. Tanto a deleção de Atm/Atr quanto o encurtamento dos telômeros além do limite n_{max} conferem esse fenótipo.

Um testemunho eloquente da vantagem oferecida pela imortalização (FI) após a evasão da senescência (ESP) pode ser visto na Figura 5.17. Em azul, temos células que evadiram da senescência programada (ESP) e, em amarelo, células que, além da ESP, também adquiriram um fenótipo imortal. Observe que enquanto as subpopulações apenas com ESP permanecem praticamente estacionárias ¹⁷, a subpopulação imortal aumenta rapidamente.

Região (3) - A capacidade de proliferar em hipóxia e acidose: Como consequência do aumento da taxa de estabelecimento das mutações, surgem células capazes de dividir em hipóxia (PH). A capacidade de dividir em hipóxia implica em um fenótipo glicolítico nessa condição, ou seja, as células mutadas σ_m tornam-se células glicolíticas σ_g^f quando em região de hipóxia. Como subproduto do metabolismo glicolítico, as células glicolíticas σ_g^f produzem íons H^+ , o que produz a acidificação do meio. Como podemos ver da Tabela 5.5, a aquisição da capacidade de dividir em hipóxia pode vir ou não com a capacidade de evadir da apoptose induzida por hipóxia e acidose (EAHA). Dessa forma, a diminuição do pH induz a apoptose das células não-resistentes e a quiescência das células resistentes à acidose. De qualquer forma, a acidose limita o aumento da população.

O ambiente acidificado age como pressão seletiva para mutações que conferem às células a capacidade de proliferação na condição de acidose e hipóxia (PHA). Células que adquirem essa capacidade formam uma população crescente. Como

¹⁷Na verdade populações apenas com ESP se extinguem com o tempo.

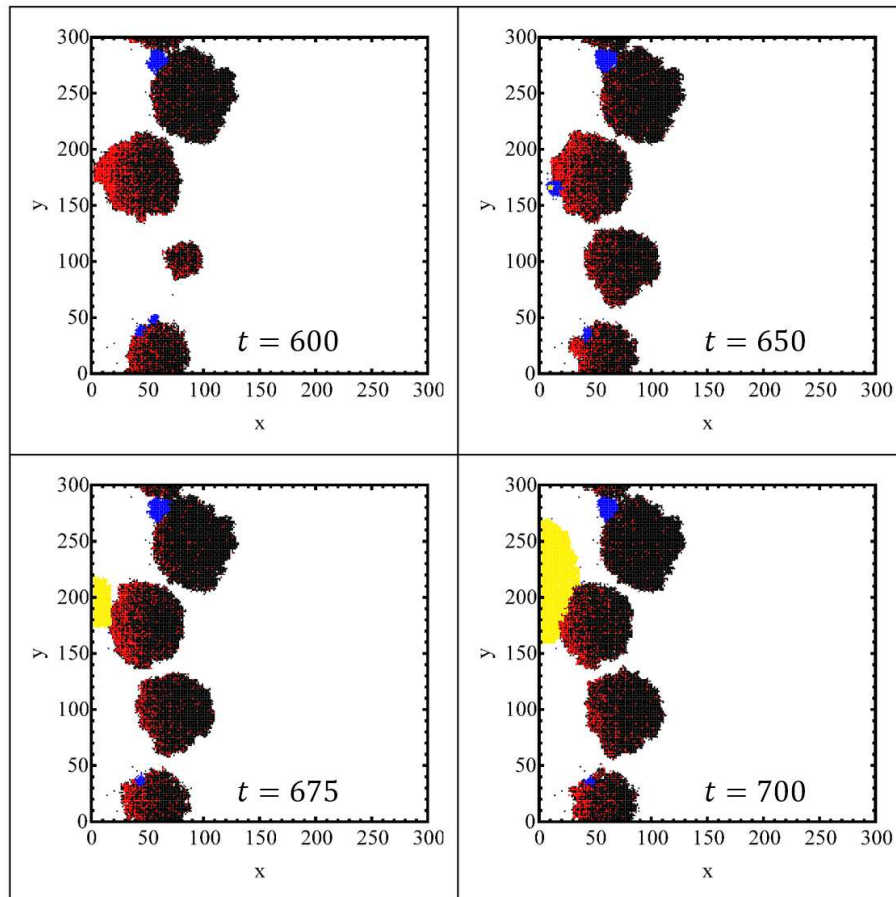


FIGURA 5.17: **ESP e FI.** Em azul, temos populações que adquiriram a ESP. Em amarelo, populações que adquiriram a ESP e o FI.

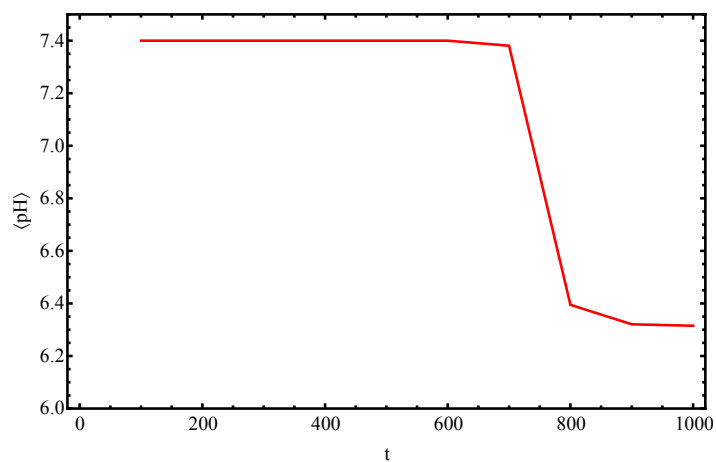


FIGURA 5.18: **pH médio.** Ao longo do tempo de simulação, apresentamos o $\langle pH \rangle$ do tecido. Observe que a diminuição do $\langle pH \rangle$ ocorre após o aparecimento das células capazes de dividir em hipóxia (PH).

efeito adverso, o aumento dessa população diminui ainda mais o pH, o que desencadeia a necrose. Como não há mutação que confira resistência à necrose induzida por acidose, a população alcança um estado estacionário. Todas as populações que não se adaptam, ou seja, não adquirem a característica fenotípica PHA, são eliminadas.

Na Figura 5.19, mostramos em diferentes tempos ao longo da Região (3) populações com distintas características fenotípicas. Em verde, temos células capazes de dividir na condição de hipóxia (PH). Observe que elas surgem por volta de $t = 700$ em meio a população de células imortalizadas (ver Figura 5.17). Essa população se expande ocasionando uma diminuição do pH (Figura 5.18). A diminuição do pH seleciona células capazes de dividir em hipóxia e acidose (EAHA), que estão em marrom na Figura 5.19.

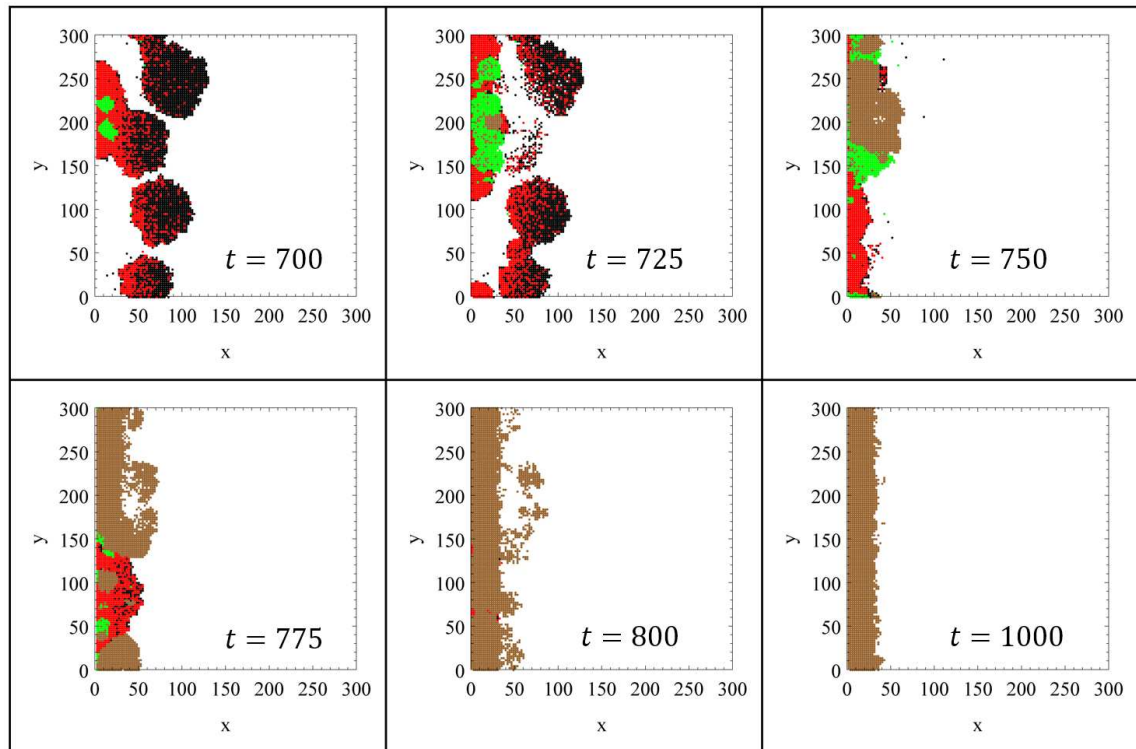


FIGURA 5.19: **PH e PHA**. Em verde, temos células capazes de dividir em hipóxia (PH) e, em marrom, células capazes de dividir em hipóxia e acidose (PHA). Observe que a característica fenotípica PHA surge em meio a células que possuem PH.

Embora quatro mutações iniciadoras tenha surgido, a população final é originária apenas de Pten(-) (Figura 5.20). Em todas as simulações analisadas, apenas duas

produziram tumores finais coexistente originários de mutações iniciadoras distintas. Provavelmente, esses casos serão ainda mais raros para simulações em que P_{mut} seja menor. Dessa forma, o modelo produz tumores que são, essencialmente, monoclonais.

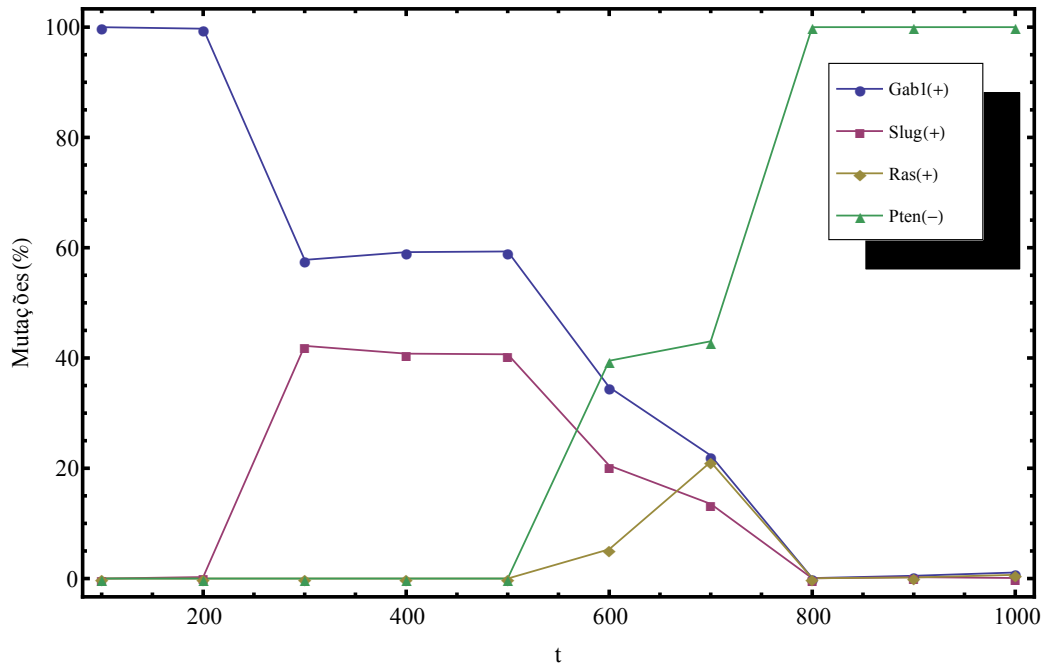


FIGURA 5.20: **Mutações.** Percentual da população de células mutadas σ_m com uma determinada mutação iniciadora. Observe que a população final é originária de Pten(-).

5.3.1.2 Os Esquemas II e III

A diferença entre os Esquema I e II está na forma como evasão da senescência programada (ESP) ocorre. Tanto a deleção de Atm/Atr, no Esquema I, quanto a deleção de Chk1/2, no Esquema II, permitem essa evasão. Contudo, duas diferenças tornam o Esquema I mais provável. A primeira delas é que a deleção de Atm/Atr é mais eficaz em conferir a ESP. Como pode ser visto na Figura 5.21, o número de mutações iniciadoras que adquirem a ESP quando Chk1/2 é deletado é bem menor do que as que adquirem através da deleção de Atm/Atr(-). Uma consequência disso é que existem sequências “proibidas” de mutações para o Esquema II.

A segunda diferença é que o fenótipo mutador (FM) obtido através da deleção de Chk1/2 é apenas temporário. Ele se deve à instabilidade genética gerada

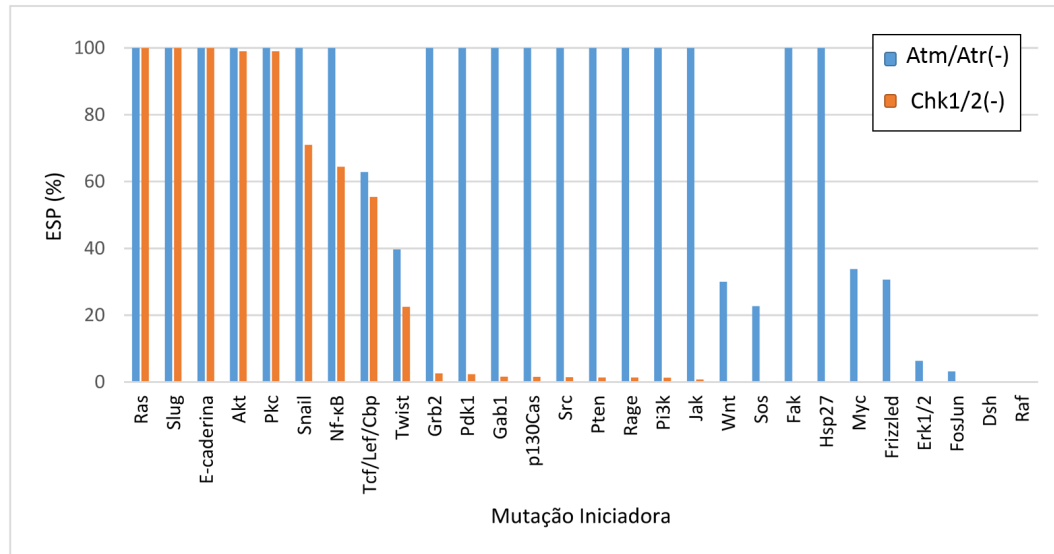


FIGURA 5.21: **Atm/Atr(-)** e **Chk1/2(-)**. Percentual de evasão da senescência programada (ESP) para diferentes mutações iniciadoras quando a segunda mutação é em **Atm/Atr(-)** ou em **Chk1/2(-)**.

pela encurtamento progressivo dos telômeros depois que o número máximo de replicações n_{max} é ultrapassado. Quando a célula se torna imortal (FI), o fenótipo mutador (FM) é perdido. No Esquema I, ele permanece porque a deleção de **Atm/Atr** também confere esse fenótipo. Dessa forma, após a immortalização, a taxa de mutações no Esquema I é muito maior do que no Esquema II (100 vezes no modelo). Conseqüentemente, a probabilidade das células no Esquema I adquirirem um fenótipo proliferativo em hipóxia (PH) e um fenótipo que divide em hipóxia e acidose (PHA) na sequência é muito maior.

No Esquema III, o fenótipo mutador não é adquirido. De fato, as células se tornam imortais antes que o número máximo de replicações n_{max} seja atingido. Nesse esquema, a mutação iniciadora deve ser em hTert ou, então, as duas primeiras mutações devem ser tais que ativem hTert. Dessa forma, as possibilidades para o Esquema III são mais limitadas que as do Esquema I, onde várias mutações iniciadoras são possíveis e não há a necessidade de conjunção de duas mutações para a immortalização.

5.3.2 A frequência das mutações

Para identificar os principais genes mutados no modelo, analisamos 100 simulações com diversos valores de parâmetros ¹⁸. Determinamos a frequência f das mutações e o que denominamos de **penetrância** p . A penetrância p de uma mutação corresponde ao percentual de células mutadas σ_m , no estado estacionário, em que ela está presente.

Para diminuir o número de mutações *passengers*, em cada simulação, catalogamos apenas as mutações com penetrância p maior que 25%. Embora essa abordagem elimine muitas mutações *passengers*, muitas ainda permanecem. Por exemplo, nas 100 simulações, identificamos um total de 58 mutações distintas do tipo superexpressão. Desse número, 41 tem frequência f menor que 5, sendo que 27 tem frequência f igual a 1.

Na Figura 5.22, temos a frequência f e penetrância média $\langle p \rangle$ das mutações do tipo superexpressão para as quais $f > 5$. Na Figura 5.23, temos o mesmo para as mutações do tipo deleção.

As mutações em *Rage*, *Jak*, *Grb2*, *Slug*, *Ras*, *Gab1*, *Pkc*, e *Pten*, possuem uma alta penetrância média $\langle p \rangle$ e uma baixa frequência f . Isso ocorre por serem mutações iniciadoras (Tabela do Apêndice B). Como existem várias mutações iniciadoras, a frequência é baixa; mas por iniciarem a progressão tumoral, estão presentes em quase todas as células do tumor final. A alta penetrância média $\langle p \rangle$ e alta frequência f de *Atm/Atr* e *hTert* devem-se à forte seleção para a obtenção do fenótipo mutador (FM) e imortal (FI). Por outro lado, a penetrância média $\langle p \rangle$ e frequência f intermediária das mutações em *Tcf/Lef/Cbp*, *p53*, *Akt*, *Nf-κB*, *Mdm2*, *Myc*, *p27*, e *Ciclina D*, devem-se ao fato dessas mutações surgirem, principalmente, após a obtenção do fenótipo mutador (FM), que permite o tumor selecionar mais de uma saída para evadir da apoptose induzida por hipóxia e pela acidose (Figura 5.24).

¹⁸O número de simulações para cada parâmetro foi: $\alpha_O = 10/L$ (20 simulações); $\alpha_O = 20/L$ (5 simulações); $\alpha_O = 30/L$ (3 simulações); $\alpha_O = 40/L$ (20 simulações); $\alpha_H = 80/L$ (2 simulações); $\alpha_H = 120/L$ (20 simulações); $r_{2m} = 1000$ (3 simulações); $r_{3m} = 3000$ (3 simulações); $r_5 = 1000$ (3 simulações); $r_{4m} = 3000$ (3 simulações); $r_6 = 100$ (7 simulações); $r_6 = 1000$ (7 simulações); $\lambda_g = 200$ (4 simulações).

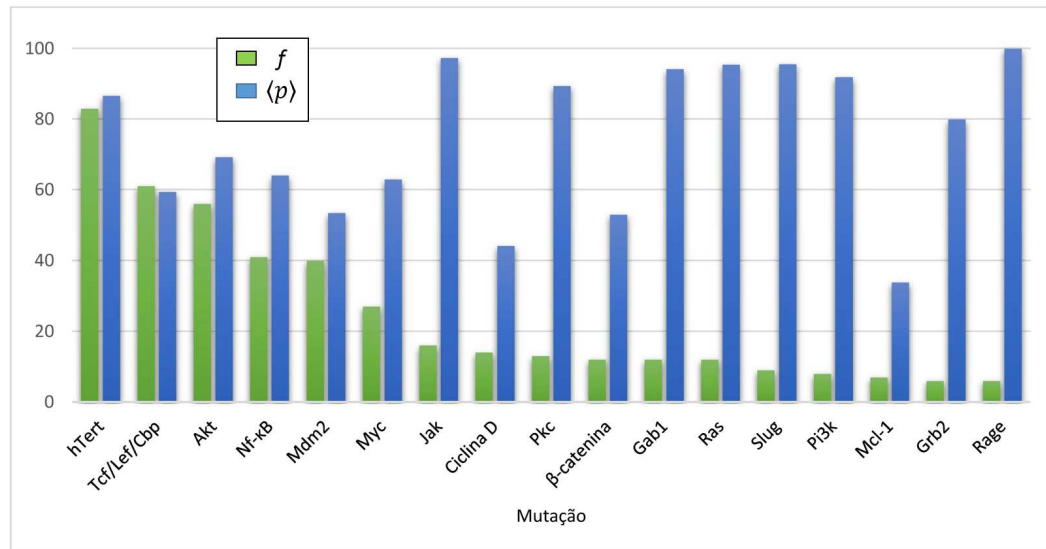


FIGURA 5.22: **Superexpressão.** Frequência f e penetrância média $\langle p \rangle$ para mutações do tipo superexpressão. O valor máximo possível para a frequência f e a penetrância média $\langle p \rangle$ é 100 (são 100 simulações e a penetrância p , por definição, tem o valor máximo de 100%).

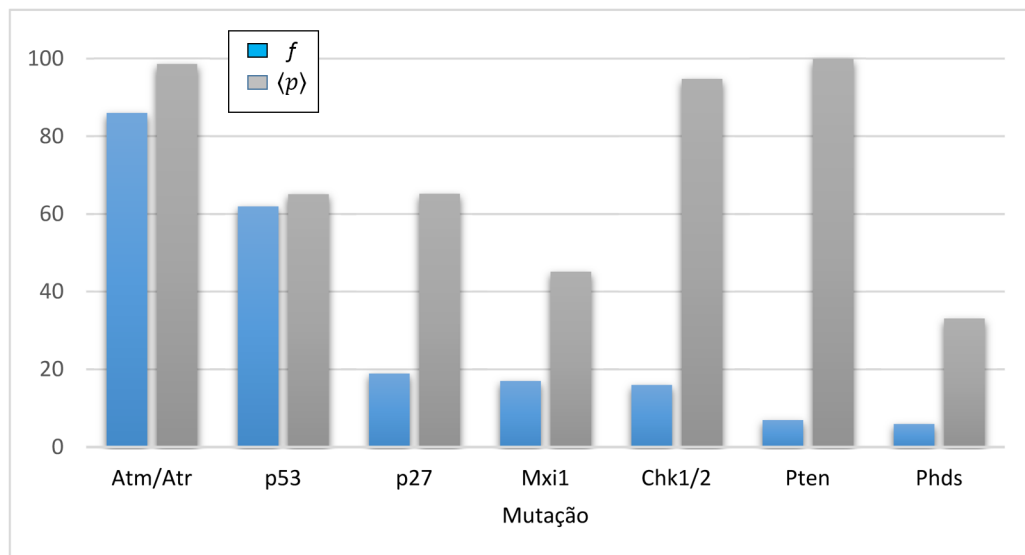


FIGURA 5.23: **Deleção.** Frequência f e penetrância média $\langle p \rangle$ para mutações do tipo deleção.

5.3.2.1 Características metabólicas *versus* mutações

A constante de consumo de oxigênio α_O depende do tecido em questão. A constante de produção de íons H^+ também é variável, assim como vários outros

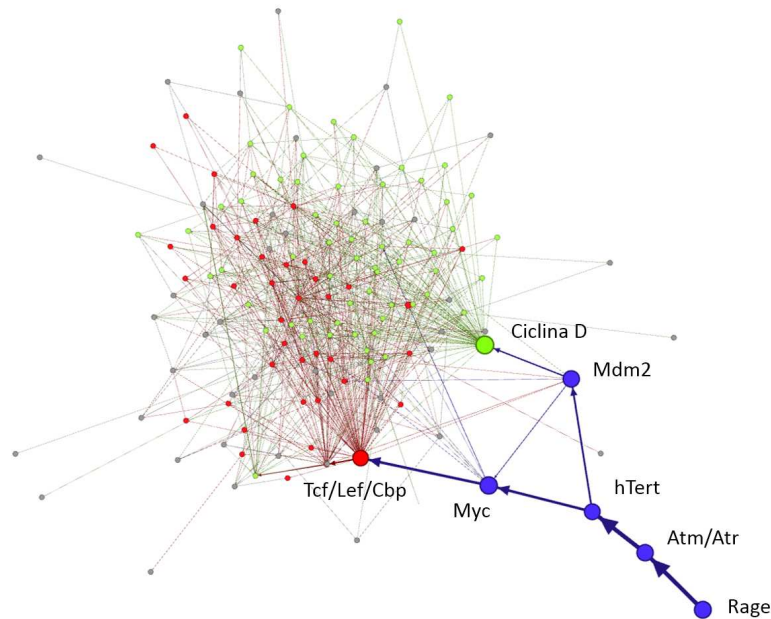


FIGURA 5.24: **Sequência de mutações.** O grafo representa a sequência de mutações sofridas pelas células do tumor final para uma dada simulação. Os nós representam as mutações presentes e as arestas apontam para uma nova mutação que aparece em acréscimo à anterior. Dessa forma, inicialmente, todas as células possuem apenas uma mutação em Rage. A partir daí, graças a aquisição do fenótipo mutador, uma parte das células sofre uma mutação em Mdm2 e a outra em Myc, que são seguidas, respectivamente, por mutações em Ciclina D e Tcf/Lef/Cbp. Nesse ponto, as células já encontram-se no estado estacionário. Naturalmente, novas mutações continuam ocorrendo. Entretanto, como o tumor já atingiu o estágio máximo de agressividade possível no modelo, essas mutações são *passengers* ou mutações deletérias. Mutações que ocorrem a partir de Tcf/Lef/Cbp estão em vermelho e, a partir de Ciclina D, em verde.

parâmetros do modelo. Isso nos levanta a pergunta; tumores originários de tecidos com diferentes características metabólicas selecionam diferentes conjuntos de mutações ao longo do seu desenvolvimento?

Para lançar alguma luz sobre essa questão, comparamos as mutações selecionadas em dois casos. No primeiro caso, comparamos a frequência f e a penetrância média $\langle p \rangle$ das mutações quando as constantes de consumo de oxigênio são $\alpha_O = 10/L$ e $\alpha_O = 40/L$. Como podemos ver da Tabela 5.6, o conjunto de genes mutados, a frequência f , e a penetrância média $\langle p \rangle$ das mutações são similares nos dois casos. As diferenças significativas recaem em três genes. Os dados parecem sugerir que a deleção de p27 é um evento mais provável em tecidos com maior consumo de oxigênio e, a superexpressão de Nf- κ B e Tcf/Lef/Cbp, em tecidos com menor consumo de oxigênio.

Mutação	Natureza	$f_{\alpha_O=10/L}$	$f_{\alpha_O=40/L}$	$\langle p \rangle_{\alpha_O=10/L}$ (%)	$\langle p \rangle_{\alpha_O=40/L}$ (%)
Atm/Atr	Del.	18	18	100 ± 10	100 ± 0
Nf-κB	Super.	16	7	70 ± 20	60 ± 30
Akt	Super.	13	14	70 ± 30	90 ± 20
hTert	Super.	13	13	60 ± 30	90 ± 20
p53	Del.	12	10	70 ± 20	90 ± 20
Tcf/Lef/Cbp	Super.	12	8	80 ± 20	70 ± 30
Mdm2	Super.	7	6	60 ± 20	70 ± 30
p27	Del.	0	5	—	80 ± 30
Myc	Super.	5	5	50 ± 30	80 ± 30
Mxi1	Del.	4	3	50 ± 30	60 ± 40
β -catenina	Super.	4	3	40 ± 10	70 ± 40
Pi3k	Super.	3	2	100 ± 0	70 ± 50
Ras	Super.	3	2	100 ± 0	100 ± 0
Jak	Super.	3	2	90 ± 20	100 ± 0
Pkc	Super.	3	1	50 ± 40	100
Chk1/2	Del.	3	2	90 ± 20	100 ± 0
Phds	Del.	3	2	32 ± 2	40 ± 10
Slug	Super.	2	3	100 ± 0	100 ± 0
Grb2	Super.	2	1	100 ± 0	100
Gab1	Super.	2	0	100 ± 0	—
Irei	Super.	2	0	30 ± 40	—
RalGap	Del.	2	0	37 ± 1	—
Tak1	Del.	2	0	80 ± 10	—

TABELA 5.6: **Conjunto de mutações observadas em 20 simulações para duas constantes de consumo de oxigênio α_O distintas:** Observe que o conjunto de mutações observadas, a frequência f e a penetrância média $\langle p \rangle$ são similares nos dois casos. As diferenças recaem nas mutações em p27, Nf- κ B, e Tcf/Lef/Cbp.

No segundo caso, fizemos a mesma comparação para as constantes de produção de íons H^+ $\alpha_H = 40/L$ e $\alpha_H = 120/L$. Novamente, da Tabela 5.7, observamos similaridades no conjunto de genes mutados, na frequência f , e na penetrância média $\langle p \rangle$ das mutações. As diferenças que parecem mais significantes surgem em Nf- κ B, que é mais frequente para $\alpha_H = 40/L$; e em hTert, que é mais frequente para $\alpha_H = 120/L$.

Mutação	Natureza	$f_{\alpha_H=40/L}$	$f_{\alpha_H=120/L}$	$m_{\alpha_H=40/L}(\%)$	$m_{\alpha_H=120/L}(\%)$
Atm/Atr	Del.	18	17	100 ± 10	100 ± 15
Nf-κB	Super.	16	7	70 ± 20	80 ± 30
Akt	Super.	13	10	70 ± 30	40 ± 20
hTert	Super.	13	19	60 ± 30	90 ± 20
p53	Del.	12	11	70 ± 20	60 ± 20
Tcf/Lef/Cbp	Super.	12	14	80 ± 20	50 ± 25
Mdm2	Super.	7	8	60 ± 20	60 ± 20
p27	Del.	0	2	—	70 ± 40
Myc	Super.	5	2	50 ± 30	50 ± 30
Mxi1	Del.	4	4	50 ± 30	34 ± 7
β -catenina	Super.	4	1	40 ± 10	60
Pi3k	Super.	3	0	100 ± 0	—
Ras	Super.	3	5	100 ± 0	90 ± 20
Jak	Super.	3	1	90 ± 20	100
Pkc	Super.	3	2	50 ± 40	100 ± 0
Chk1/2	Del.	3	3	90 ± 20	90 ± 20
Phds	Del.	3	0	32 ± 2	—
Slug	Super.	2	2	100 ± 0	80 ± 30
Grb2	Super.	2	3	100 ± 0	60 ± 30
Gab1	Super.	2	5	100 ± 0	90 ± 20
Irei	Super.	2	0	30 ± 40	—
RalGap	Del.	2	0	37 ± 1	—
Tak1	Del.	2	0	80 ± 10	—
Vhl	Del.	1	2	31	34 ± 2
Pten	Del.	0	2	—	100
Rankl	Del.	0	2	—	37 ± 6

TABELA 5.7: **Conjunto de mutações observadas em 20 simulações para duas constantes de produção de íons H^+** : Observe que o conjunto de mutações observadas, a frequência f e a penetrância média $\langle p \rangle$ são similares nos dois casos. As diferenças recaem nas mutações em Nf- κ B, e hTert.

5.3.3 Oxigênio, nutrientes, e H^+

Uma característica geral do estado estacionário é a presença, em grande quantidade, de células mutadas σ_m e necróticas σ_{nec} . As células normais σ_n são inexistentes nessa fase e as apoptóticas σ_{ap} são raras (tipicamente, menos de 2 células apoptóticas para cada 100 mutadas). A ausência de células normais σ_n ocorre porque essas células não sobrevivem no novo ambiente acidificado e com baixa

concentração de oxigênio. A presença de poucas células apoptóticas σ_{ap} é explicada pela resistência adquirida pela maior parte das células tumorais. As células necróticas σ_{nec} estão presentes devido a diminuição do pH e da concentração de nutrientes $N(\vec{x})$.

Outro aspecto geral observado é a coexistência de células com fenótipos quiescente σ_q^f , proliferativo σ_p^f , e glicolítico σ_g^f . Para um determinado conjunto de parâmetros, o percentual dessas populações permanece fixo. Esses percentuais dependem apenas dos parâmetros relacionados ao oxigênio $O(\vec{x})$, nutrientes $N(\vec{x})$, e íons H^+ .

Na primeira linha da Tabela 5.8, temos o percentual das populações supracitadas para o conjunto de parâmetros do Conjunto Base ($\alpha_O = 10/L$; $\alpha_H = 40/L$; $\lambda_g = 10$, e os demais listadas na Tabela 5.4). Nas outras linhas, variamos um determinado parâmetro e mantivemos os outros fixos. Dessa maneira, essas linhas devem ser comparadas com a primeira.

Parâmetros	$\langle \sigma_g^f \rangle$	$\langle \sigma_p^f \rangle$	$\langle \sigma_q^f \rangle$
$\alpha_O = 10/L$; $\alpha_H = 40/L$; $\lambda_g = 10$ (Controle)	$(43,6 \pm 0,4)\%$	$(30,4 \pm 0,1)\%$	$(26,0 \pm 0,4)\%$
$\alpha_O = 40/L$	$(49,1 \pm 0,4)\%$	$(25,7 \pm 0,4)\%$	$(25,2 \pm 0,5)\%$
$\alpha_H = 120/L$	$(28 \pm 3)\%$	$(40 \pm 1)\%$	$(32 \pm 1)\%$
$\lambda_g = 200$	$(39,4 \pm 0,2)\%$	$(33,5 \pm 0,3)\%$	$(27,1 \pm 0,4)\%$

TABELA 5.8: **Percentual das populações:** Percentual médio das populações com fenótipos glicolítico $\langle \sigma_g^f \rangle$, proliferativo $\langle \sigma_p^f \rangle$, e quiescente $\langle \sigma_q^f \rangle$ no estado estacionário. Na primeira linha, os parâmetros são aqueles do Conjunto Base. As demais linhas devem ser comparadas à primeira.

Da primeira e segunda linha, observamos que o aumento de $\alpha_O = 10/L$ para $\alpha_O = 40/L$ produz um acréscimo no percentual de células com fenótipo glicolítico σ_g^f . Isso ocorre às custas de uma diminuição, principalmente, no percentual das células proliferativas σ_p^f . O motivo do aumento das células glicolíticas σ_g^f está na queda abrupta na concentração de oxigênio $O(\vec{x})$ resultante do aumento no consumo (Figura 5.25). Embora a população de células mutadas σ_m diminua (Figura 5.26) e, conseqüentemente, a densidade de células mutadas σ_m (Figura 5.32), a quantidade de oxigênio disponível por célula cai, o que obriga mais células a adotarem o fenótipo glicolítico.

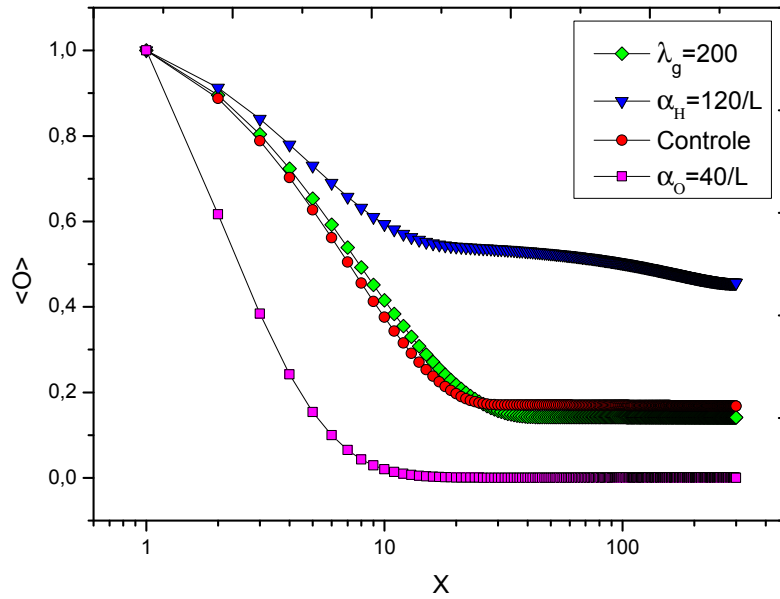


FIGURA 5.25: **Oxigênio.** Concentração média de oxigênio $\langle O \rangle$ ao longo de Y em função da distância ao capilar em $X = 0$ para diferentes parâmetros.

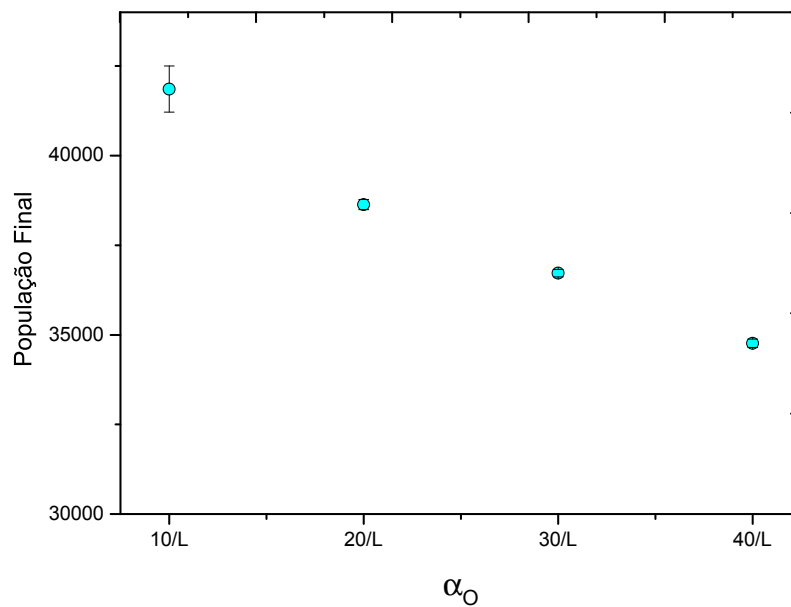


FIGURA 5.26: **População final em função de α_O .** O aumento no consumo de oxigênio implica em um menor número de células no estado estacionário. Dessa forma, tumores originários de tecidos com maiores demandas por oxigênio irão produzir tumores de menor dimensão.

Da primeira e terceira linha, vemos que o aumento de $\alpha_H = 40/L$ para $\alpha_H = 120/L$ produz um decréscimo no percentual de células com fenótipo glicolítico σ_g^f . Uma das consequências do aumento em α_H é a diminuição do pH (Figura 5.27). Essa diminuição aumenta a chance de morte por necrose, o que se reflete

na diminuição da população de células mutadas σ_m (Figura 5.28). Por outro lado, uma população menor implica em uma maior concentração de oxigênio $O(\vec{x})$ no tecido (Figura 5.25). Mais oxigênio $O(\vec{x})$ significa menos células em regiões de hipóxia e, portanto, menos células com um fenótipo glicolítico σ_g^f .

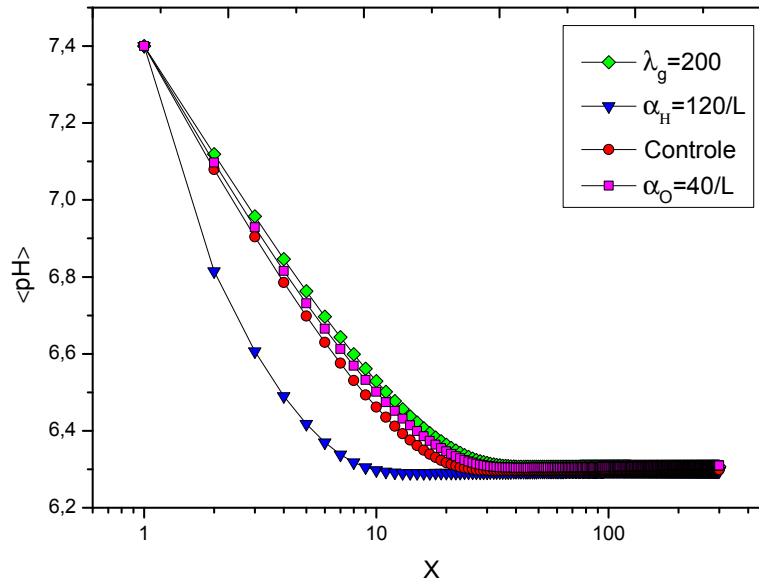


FIGURA 5.27: **pH.** pH médio $\langle pH \rangle$ ao longo de Y em função da distância ao capilar em $X = 0$ para diferentes parâmetros.

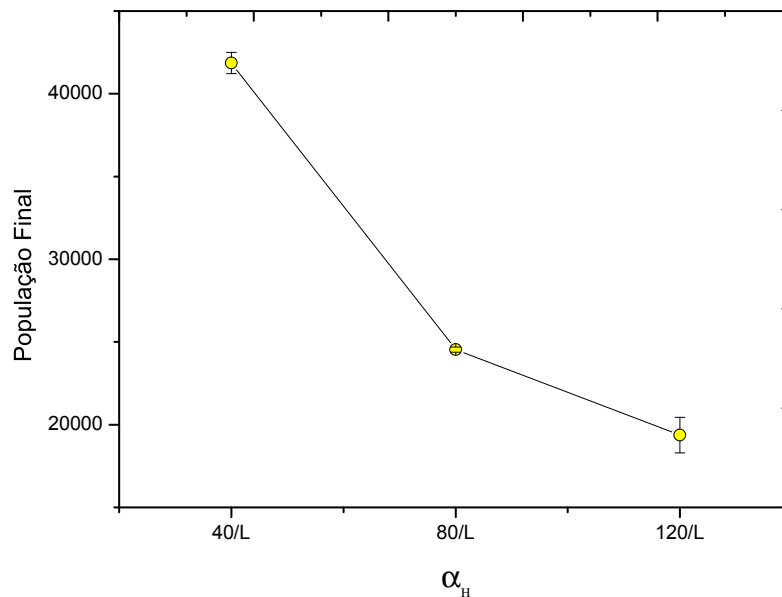


FIGURA 5.28: **População final em função de α_H .** Quanto maior α_H , maior o potencial de acidificação do tecido por célula. Como a diminuição do pH leva à necrose, a população de células diminui.

Da primeira e quarta linha, observamos que o aumento de $\lambda_g = 10$ para $\lambda_g = 200$ produz uma diminuição na população de células glicolíticas σ_g^f . Essa diminuição ocorre porque o aumento de λ_g provoca uma diminuição na concentração de nutrientes $N(\vec{x})$ ao longo do tecido (Figura 5.29). Essa diminuição aumenta a taxa de necrose, o que diminui a população de células mutadas σ_m (Figura 5.30). Com uma população menor, temos uma maior quantidade de oxigênio $O(\vec{x})$ por célula e, conseqüentemente, menos células glicolíticas.

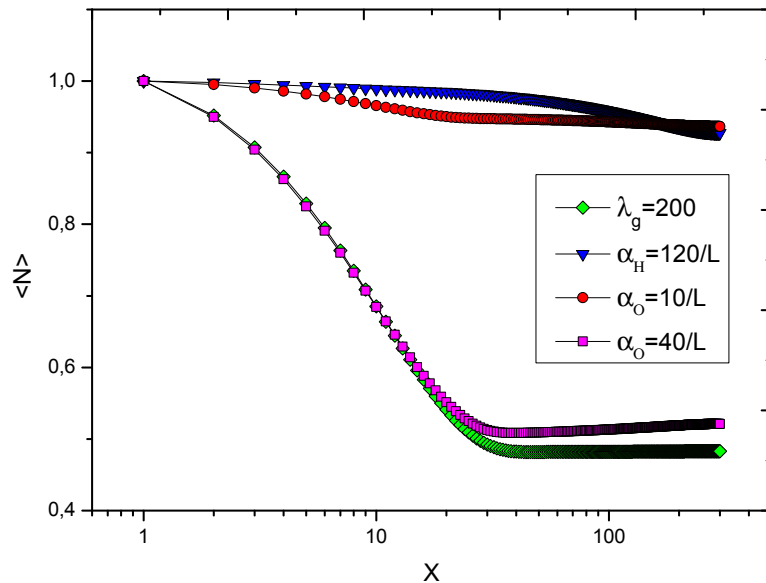


FIGURA 5.29: **Nutrientes.** Concentração média de nutrientes $\langle N \rangle$ ao longo de Y em função da distância ao capilar em $X = 0$ para diferentes parâmetros.

Na Figura 5.31, apresentamos o percentual das populações σ_p^f , σ_g^f , e σ_q^f ao longo do tempo para uma simulação. Conforme o tumor adquire novas mutações, o percentual de células quiescentes σ_q^f torna-se menor, enquanto o percentual de células em divisão (σ_p^f e σ_g^f) aumenta. Portanto, as mutações sofridas ao longo da progressão tumoral procuram maximizar a capacidade de proliferação celular.

5.3.4 Os fatores parácrinos

Nesta seção, analisaremos o papel dos fatores parácrinos na progressão tumoral. Como vimos na Figura 5.7, Tgf- α , IL-1, Tgf- β , e ROS, agem sobre as células normais σ_n induzindo a morte por necrose ou apoptose. Se tiverem o mesmo efeito nas células mutadas σ_m , é possível que atuem como supressores tumorais.

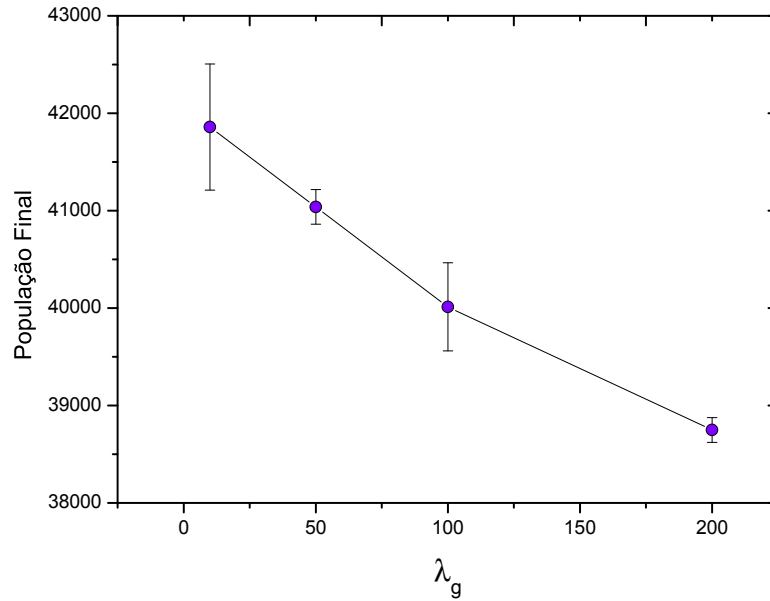


FIGURA 5.30: **População final em função de λ_g .** Talvez de forma pouco intuitiva, o aumento em λ_g diminui apenas ligeiramente a população final.

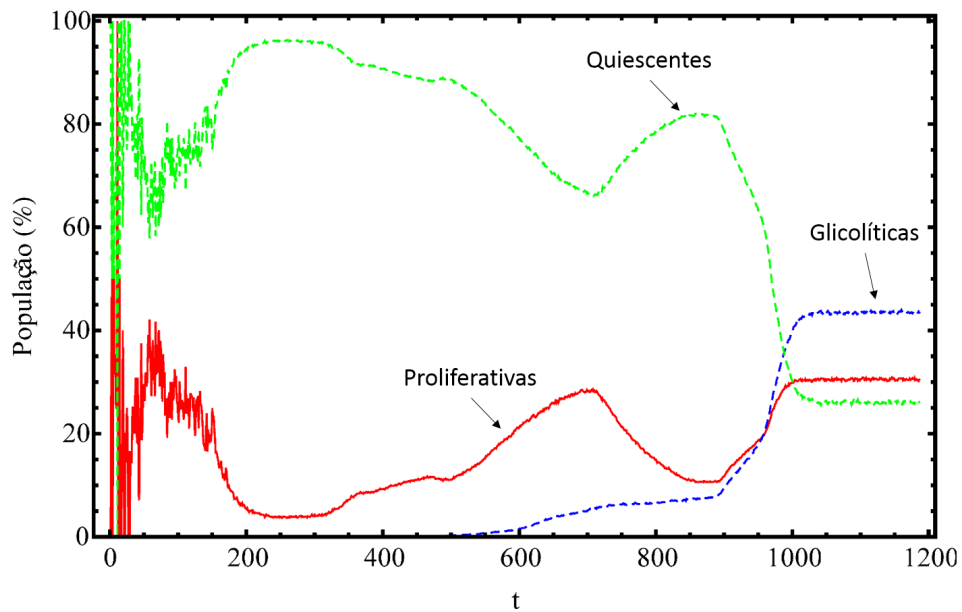


FIGURA 5.31: **Populações no tempo.** O percentual de células quiescentes σ_q^f diminui ao longo da progressão tumoral. Por outro lado, o percentual de células em divisão (σ_p^f e σ_g^f) aumenta. (CB)

Por outro lado, Hmgb1 e Wnt estimulam a proliferação e a sobrevivência das células normais σ_n . Pelo mesmo raciocínio, é possível que auxiliem a progressão do tumor.

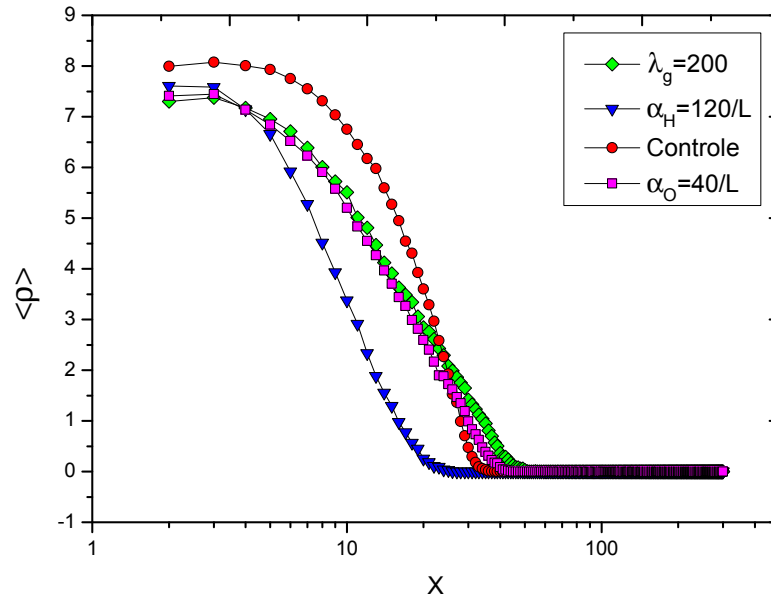


FIGURA 5.32: **Densidade.** Densidade média $\langle \rho \rangle$ ao longo de Y em função da distância ao capilar em $X = 0$ para diferentes parâmetros.

Tnf- α : No modelo, a única fonte de Tnf- α são as células que adquirem a capacidade de sintetizá-lo σ_{tnf}^f . Verificamos no modelo, que o aparecimento dessas células está associado à ocorrência de uma mutação do tipo superexpressão em Nf- κ B¹⁹, o que pode ou não ocorrer (ver Tabela 5.22). Por esse motivo, em muitas simulações não observamos a presença de Tnf- α no meio. Apesar disso, no estado estacionário, quase todas as células possuem insensibilidade à Tnf- α (IFIC) (em média, 91%).

Na Figura 5.33, temos um gráfico do percentual de células mutadas σ_m que são insensíveis à Tnf- α *versus* a probabilidade média de ativação dessa entrada $\langle P_{tnf} \rangle$. Cada ponto representa uma simulação. Como podemos ver, não parece existir correlação entre a concentração de Tnf- α no meio e a aquisição da insensibilidade ao mesmo. Isso sugere que as células não se tornam insensíveis à Tnf- α por adaptação, mas como consequência das mutações sofridas ao longo da evolução tumoral.

Portanto, em nosso modelo, Tnf- α não apresenta um papel relevante na supressão tumoral. Contudo, há evidências de que o cenário pode mudar se forem inseridos

¹⁹Mutações em Foxo e Creb também conferem esse fenótipo. Contudo, quase não aparecem nas simulações.

Gene	Sem FIC	Tnf- α	Tgf- β	Il-1	Ros
Akt	100%	16,6%	—	6,5%	—
Gli	100%	—	—	—	—
hTert	100%	1,2%	—	0,5%	—
Nf- κ B	100%	90,6%	—	92,7%	—
Pdk1	100%	6,0%	—	2,9%	—
Pi3k	100%	1,4%	—	0,6%	—
Pkc	100%	—	—	—	—
Pten	100%	5,2%	2,0%	—	—
Ras	100%	0,8%	—	0,3%	—
Abl	42%	—	—	—	—
Erk1/2	35%	—	—	—	—
Fak	100%	—	—	—	—
FosJun	0,23%	—	—	—	—
Frizzled	93%	—	—	—	—
Gab1	100%	1,3%	—	0,5%	—
Grb2	100%	0,8%	—	0,3%	—
Jak	100%	0,7%	—	0,3%	—
Myc	84%	—	—	—	—
p130Cas	100%	1,0%	—	0,5%	—
Slug	70%	10,2%	—	4,0%	—
Snail	97%	2,3%	—	0,2%	—
SOS	100%	0,7%	—	0,3%	—
Src	100%	—	—	—	—
Tcf/Lef/Cbp	95%	77,3%	72,3%	92,3%	—
Rage	100%	0,3%	—	—	—
Twist	44%	—	—	—	—
Dsh	4%	—	—	—	—
Hsp27	55%	1,3%	—	0,6%	—
Raf	0,06%	—	—	—	—
E-caderina	100%	37,97%	—	14,0%	—

TABELA 5.9: **Mutações iniciadoras na presença dos fatores inibidores.**

As mutações capazes de conferir um fenótipo proliferativo às células variam com a presença dos fatores inibidores no meio. Comparando a situação sem fatores inibidores (Sem FIC) com aquela em que há Tgf- β , por exemplo, vemos que apenas as mutações em Tcf/Lef/Cbp e Pten continuam conferindo um fenótipo proliferativo. Os percentuais indicados correspondem ao percentual de estados iniciais atraídos por atratores com um fenótipo proliferativo.

mais elementos. Na maior parte dos casos, a primeira mutação não torna as células insensíveis à Tnf- α (ver Tabela 5.9). Isso é irrelevante no modelo porque,

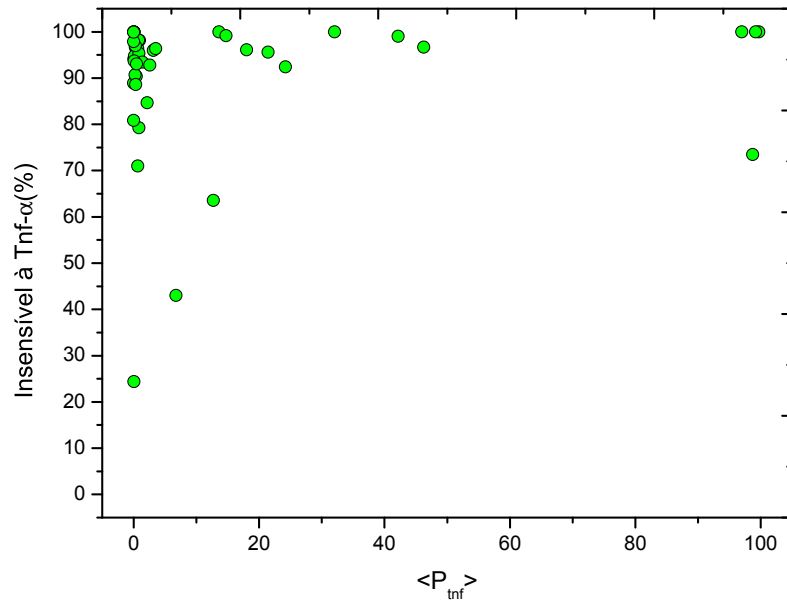


FIGURA 5.33: **IFIC (Tnf- α)**. Percentual de células mutadas σ_m insensíveis à Tnf- α em função da probabilidade média de ativação dessa entrada $\langle P_{tnf} \rangle$. Cada ponto representa uma simulação. Os valores são calculados 200 passos de tempo t após o início do estado estacionário.

nessa etapa, também não há células que sintetizem essa substância. Entretanto, o Tnf- α proveniente de outras fontes não incluídas no modelo, como o sistema imune, poderia exercer um papel supressor nessa fase.

IL-1: No modelo, a única fonte de IL-1 são as células com fenótipo senescente σ_s^f . Essas células surgem, principalmente, quando as células mutadas σ_m atingem o número máximo de replicações n_{max} . Observamos nas simulações que, após a evasão da senescência programada (ESP), o número de células senescentes σ_s^f diminui e, no estado estacionário, anula-se (Figura 5.34).

As células senescentes σ_s^f surgem em apenas 32,1% das simulações. Contudo, considerando todas as simulações, em média, 94,6% das células mutadas σ_m são insensíveis à IL-1 no estado estacionário. Além disso, considerando apenas as simulações em que as células senescentes σ_s^f aparecem, em 89% dos casos a insensibilidade à IL-1 aparece antes do surgimento das células senescentes σ_s^f . Portanto, não identificamos relação de causalidade entre o surgimento de células senescentes σ_s^f e a seleção de células insensíveis a IL-1. Similarmente a Tnf- α , a insensibilidade é consequência das mutações selecionadas por outros

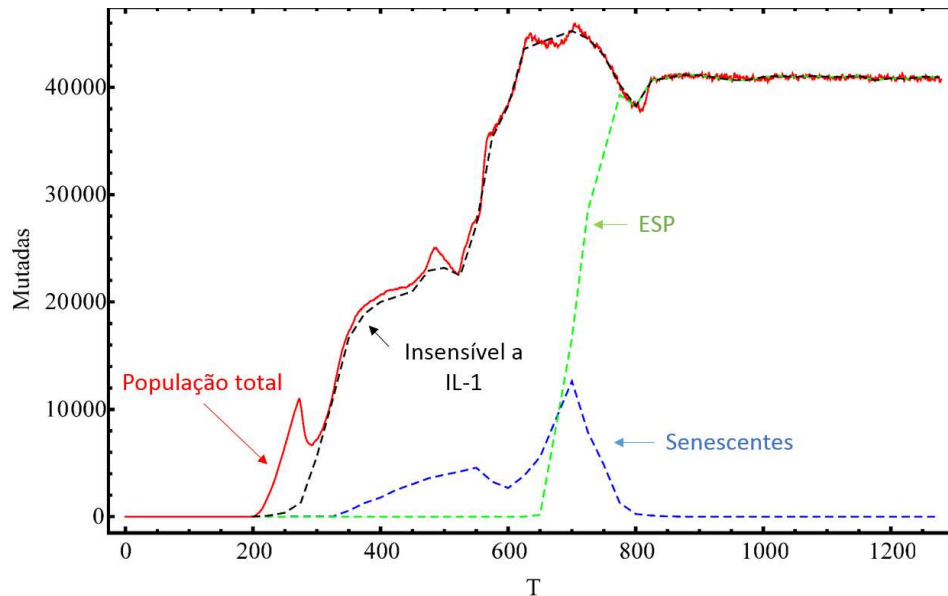


FIGURA 5.34: **Células senescentes e IFIC (IL-1)**. Em vermelho, temos a população total de células mutadas σ_m e, em preto, aquelas que são insensíveis à IL-1. Em azul, temos as células com fenótipo senescentes σ_s^f e, em verde, células que evadiram da senescência programada (ESP). Nesse caso, as células resistentes a IL-1 surgem antes das células senescentes σ_s^f . Isso sugere que a resistência não é selecionada pelo aumento de IL-1 no meio (produzido pelas células senescentes σ_s^f).

processos. Ainda semelhantemente à Tnf- α , IL-1 pode ter um efeito supressor quando atuando no início da progressão tumoral (ver Tabela 5.9).

Tgf- β : No modelo, a única fonte de Tgf- β são as células que adquirem a capacidade de sintetizá-lo σ_{tgf}^f . O aparecimento dessas células está associado a mutações em Creb e HIF1. Como podemos ver das Tabelas 5.22 e 5.23, essas mutações não são mutações selecionadas frequentemente no modelo. Dessa forma, no geral, a concentração de Tgf- β permanece baixa ($\langle P_{tgf} \rangle < 1\%$). Entretanto, a maior parte das células no estado estacionário são insensíveis à Tgf- β (em média, 91,8% das células). Como a pressão seletiva para a insensibilidade à Tgf- β é praticamente nula, a insensibilidade adquirida pelas células é um “efeito colateral” das mutações selecionadas ao longo da carcinogênese.

Similarmente à Tnf- α e IL-1, é possível que Tgf- β aja como supressor tumoral no início da carcinogênese. Pela Tabela 5.9, pode-se ver que Tgf- β é o supressor

tumoral mais potente do modelo; de todas as mutações iniciadoras, apenas as mutações em Tcf/Lef/Cbp e Pten conferem alguma insensibilidade à Tgf- β .

ROS: No modelo, as duas fontes de ROS são as células senescentes σ_{sen}^f e as células necróticas σ_{nec} . Como as células senescentes σ_{sen}^f aparecem ocasionalmente nas simulações e o seu tempo de permanência é efêmero, as células necróticas σ_{nec} constituem-se na principal fonte. Diferentemente dos outros fatores inibidores, a insensibilidade à ROS é selecionada. Quando a taxa de produção de ROS é baixa ($r_6 = r_{6m} = 1$, por exemplo), menos de 1% das células são insensíveis à ROS no estado estacionário. Contudo, para simulações com altas taxas de produção de ROS ($r_6 = r_{6m} = 1000$, por exemplo), mais do que 99,9% das células tornam-se insensíveis.

A análise do perfil de mutações das células insensíveis à ROS no modelo, revela que a insensibilidade é alcançada através da deleção de Parp1 ou da superexpressão de SOD2. De fato, Zhou e Du [105] mostraram que em células insensíveis à ROS, SOD2 é superexpresso. Herceg e Wang [106] observaram que em fibroblastos nos quais Parp1 é deletado, não ocorre necrose ou a depleção de ATP. Como ROS desencadeia a necrose através da ativação de Parp1, a deleção de Parp1 confere resistência à necrose induzida por ROS [107].

O papel da insensibilidade à ROS não pode ser subestimado. Zhou e Du [105] sugerem que cânceres resistentes à radioterapia e à quimioterapia, como o câncer pancreático, devem essa resistência a mutações nas proteínas mitocondriais. Essas mutações, supostamente, são selecionadas com o intuito de tornar as células insensíveis à ROS.

Hmgb1: No modelo, a única fonte de Hmgb1 são as células necróticas σ_{nec} . Comparamos simulações em que as taxas de produção de Hmgb1 r_5 são iguais a 1 e a 1000. No estado estacionário, para $r_5 = 1$, a concentração de Hmgb1 é tal que a probabilidade média de ativação dessa entrada $\langle P_{hmgb} \rangle$ é de $(0,63 \pm 0,03)\%$, enquanto para $r_5 = 1000$ é de $(99,49 \pm 0,03)\%$. Excetuando-se a concentração de Hmgb1, nenhuma outra diferença foi observada; população final de células

mutadas σ_m , percentual de células glicolíticas σ_g^f , necróticas σ_{nec} , pH médio, etc, nada se altera. Dessa forma, os resultados sugerem que Hmgb1 não influencia a carcinogênese atuando diretamente nas células tumorais, pelo menos não na fase avascular.

Embora, aparentemente, irrelevante no modelo atual, Hmgb1 pode ser um componente importante se o sistema imune for incluído. Sabe-se que a secreção de fatores como Tnf- α e IL-1 ativam a secreção de Hmgb1 por monócitos e macrófagos, o que ativa outras células envolvidas na resposta imune ou nas reações inflamatórias [108]. Hmgb1 pode ser atuante também em fases posteriores da progressão tumoral, já que existem evidências de que ele estimula a migração, secreção de MMPs, e a metástase das células tumorais [109].

Wnt: No modelo, a única fonte de Wnt são as células apoptóticas σ_{ap} . Observamos que valores altos para a taxa de produção de Wnt r_1 resultam em concentrações elevadas mesmo no início da progressão tumoral. Diferentemente das células necróticas σ_{nec} que aparecem posteriormente devido ao aumento da população de células mutadas σ_m , as células apoptóticas σ_{ap} estão presentes desde o início, ainda que em menor número. Como resultado, observamos que a alta concentração de Wnt seleciona mutações iniciadoras outrora “esquecidas”. Mutações iniciadoras como Raf, FosJun, Erk1/2, e Hsp27 que atraem, respectivamente, 0,06%, 0,23%, 35%, e 55% das condições iniciais para atratores com fenótipo proliferativo em baixas concentrações de Wnt, atraem, respectivamente, 47,6%, 78,0%, 65,0%, e 100% em altas concentrações.

5.3.5 Células glicolíticas permanentes

As simulações revelam que, eventualmente, podem surgir no grupo das células glicolíticas σ_p^f , células que sustentam esse fenótipo mesmo na condição de normoxia. Essas células são o que podemos chamar de **glicolíticas permanentes** ou de glicolíticas no sentido do efeito Warburg.

Em geral, as células glicolíticas permanentes surgem nas proximidades do estado estacionário e, para 85% das simulações analisadas, representam uma parcela

menor que 3% da população de células mutadas σ_m ²⁰. Simulações em tempos longos demonstram que a população de células glicolíticas não se torna dominante; ela coexiste com as demais populações (Figura 5.35). Dessa forma, essas células não são mais adaptadas ao meio.

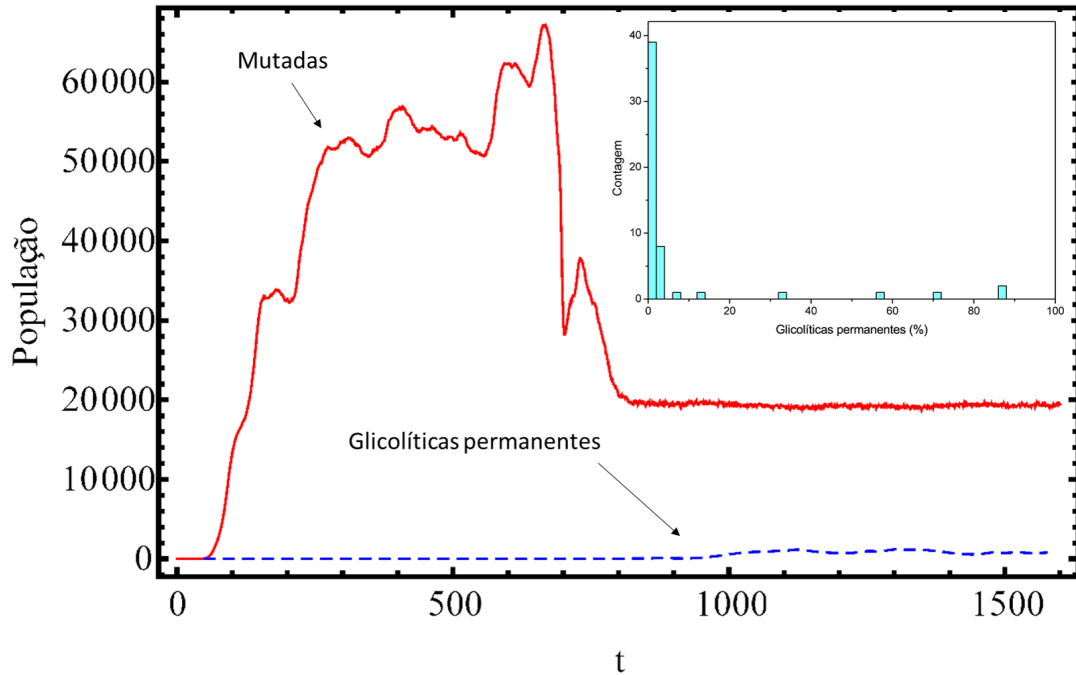


FIGURA 5.35: **Glicolíticas permanentes.** Populações mais adaptadas ao meio rapidamente dominam sobre as demais. Isso não ocorre com a população de células glicolíticas permanentes. No *inset*, temos um histograma do percentual de células glicolíticas permanentes nas simulações. ($\alpha_H = 120/L$)

Comparamos a frequência f das mutações com penetrância p maior que 25% entre o conjunto de todas as células mutadas σ_m e o subconjunto de células glicolíticas permanentes. Analisamos um total de 49 simulações. Na Figura 5.36, vemos as mutações do tipo deleção e, na Figura 5.37, as mutações do tipo superexpressão.

A maior frequência de deleções em Phds e Vhl sugere que essas mutações podem estar associadas a aquisição do fenótipo glicolítico permanente. Da mesma forma, a superexpressão de Myc, Pkc, Xbp1, e EIF4E também podem estar relacionadas. Por outro lado, mutações em Tcf/Lef/Cbp, Akt, Nf- κ B, e Mdm2, parecem ser menos frequentes nessas células.

²⁰Valoradas a 200 passos de tempo t após o início do estado estacionário

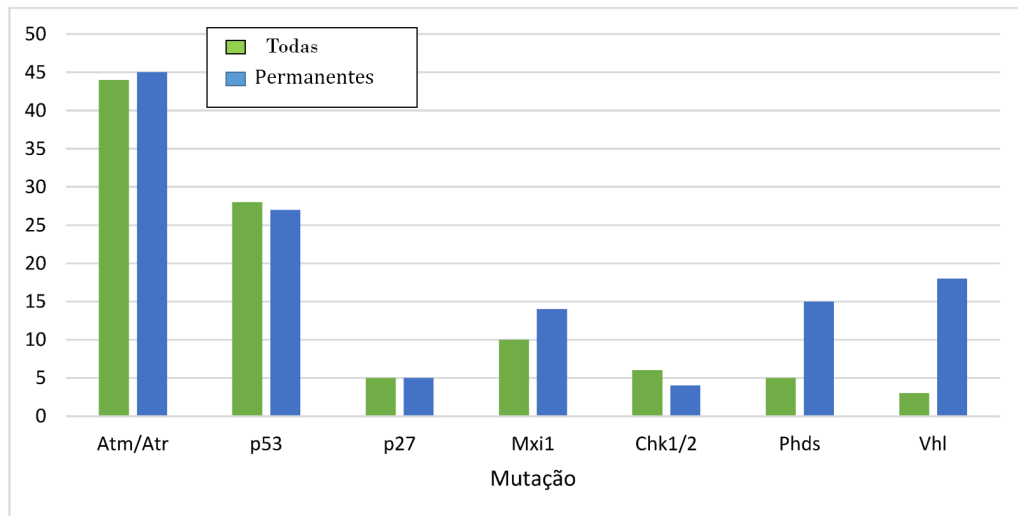


FIGURA 5.36: **Deleção.** Comparação das mutações do tipo deleção entre o conjunto de todas as células mutadas σ_m (Todas) e o subconjunto de células glicolíticas permanentes (Permanentes).

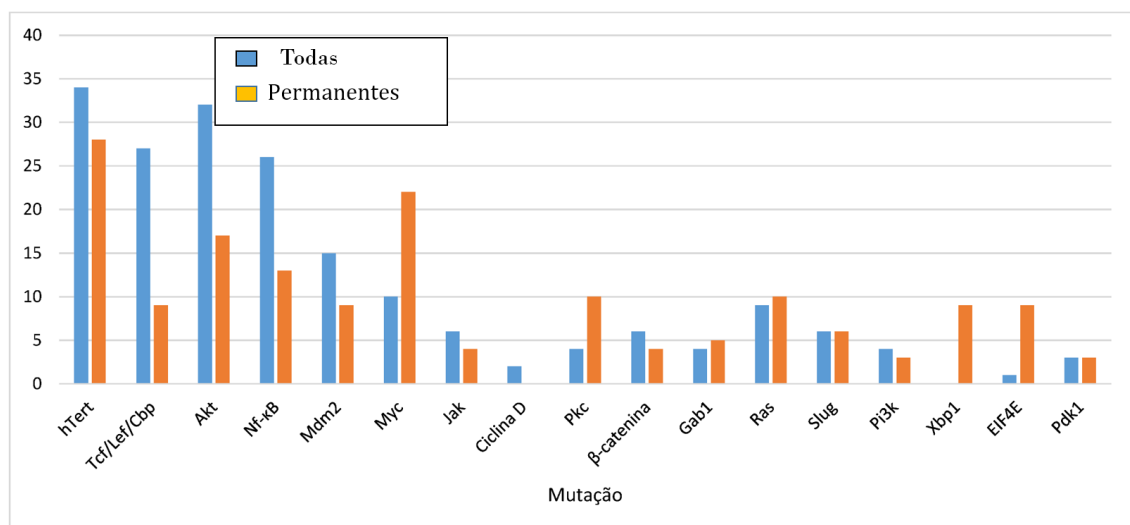


FIGURA 5.37: **Superexpressão.** Comparação das mutações do tipo superexpressão entre o conjunto de todas as células mutadas σ_m (Todas) e o subconjunto de células glicolíticas permanentes (Permanentes).

5.4 Discussão e conclusão

Propusemos um modelo multiescala para o processo de carcinogênese restrito à fase avascular. Os nossos resultados estão em concordância com a hipótese de Knudson [110], segundo a qual uma série de eventos mutacionais são necessários

para que uma célula normal se torne cancerosa. Pressionado por um microambiente em permanente mudança, as células tumorais selecionam mutações que as tornam progressivamente mais agressivas. No estágio final, observamos que as células são autossuficientes em fatores de crescimento, insensíveis a fatores inibidores de crescimento, evadiram da apoptose, e possuem um potencial replicativo ilimitado. Segundo Hanahan e Weinberg, essas são quatro das seis capacidades adquiridas pelo câncer [9]. As duas restantes, a saber, angiogênese sustentada, invasão dos tecidos e metástase, estão associadas à fase vascular do tumor, que será inserida futuramente no modelo.

Segundo nosso modelo, para adquirir as capacidades supracitadas, o tumor pode seguir três esquemas em sua evolução. Esses esquemas diferem na forma pela qual as células contornam o problema do encurtamento dos telômeros e a consequente senescência, fenômenos que ocorrem no início da progressão tumoral. Nos Esquemas I e II, que conjuntamente representam 92,6% dos casos, as células desativam os nós Atm/Atr e Chk1/2, respectivamente. Em ambos os casos um fenótipo mutador é adquirido. Todavia, no Esquema I, a deleção de Atm/Atr confere esse fenótipo permanentemente. No Esquema II, o fenótipo mutador é transiente, sendo observado apenas entre a evasão da senescência programada e a imortalização. No Esquema III, o fenótipo mutador não é adquirido; as células se tornam imortais antes que os telômeros encurtem-se a um nível crítico.

Em concordância com nossos resultados, trabalhos recentes para vários tipos de tumores indicam que o encurtamento dos telômeros ocorre nos estágios iniciais da progressão tumoral ([111], [112]). Similarmente, acredita-se que o fenótipo mutador também seja adquirido nos estágios iniciais [113]. É proposto que a deficiência em telomerase contribui para as etapas iniciais da carcinogênese através da instabilidade cromossomal que ela permite. Porém, a ativação posterior da telomerase pode ser necessária para permitir o crescimento tumoral e a progressão em direção a estados de maior malignidade [114].

É interessante notar que embora genes como Brca1 e Brca2 também confirmem o fenótipo mutador no modelo, esses genes não são frequentemente mutados. Isso ocorre porque não há pressão seletiva para o fenótipo mutador, mas sim para a evasão da senescência. O gene Atm/Atr é selecionado com essa finalidade, o fenótipo mutador é uma vantagem que vem “no pacote”. Os resultados experimentais parecem dar suporte ao nosso resultado. Os genes Brca1 e Brca2 são

frequentemente mutados em cânceres hereditários. Nesse caso, as mutações nesses genes são herdadas e, portanto, não há nenhuma seleção. Por outro lado, em cânceres esporádicos, as mutações em Brca1 e Brca2 são raras [115]. Distintamente, mutações em Atm/Atr são frequentes nos cânceres esporádicos, estando associadas tanto ao fenótipo mutador quanto a evasão da apoptose e da senescência [116].

Em conclusão, nossos resultados concordam com as observações de que quase todos os tumores exibem um fenótipo mutador [116]. O “quase todos”, permitido pelo Esquema III, é uma ressalva importante. Segundo Bodmer [117], os adenomas não apresentam o fenótipo mutador, assim como muitas leucemias e linfomas ²¹. Nesses casos, o modelo sugere que há uma imortalização precoce.

Grande parte das mutações catalogadas nas simulações (Figuras 5.22 e 5.23), correspondem a mutações já bem conhecidas. Os genes supressores de tumor p53, Pten, p27 e os oncogenes Akt, Myc, Mdm2, Ras, e Pi3k podem ser consideradas mutações “clássicas”. p53, por exemplo, é o gene mais frequentemente mutado em todos os tipos de câncer [1].

Tentamos confirmar o envolvimento na carcinogênese de todas as mutações apontadas pelo modelo. Com esse intuito, acessamos o banco de dados COSMIC [10], que mantém um censo de inúmeras mutações associadas ao câncer. As mutações que não puderam ser encontradas no COSMIC, foram procuradas na literatura.

Na Tabela 5.10, apresentamos as mutações do tipo deleção, que ocorrem em genes de estabilidade e genes supressores de tumor, conjuntamente com informações sobre o tipo de câncer em que são observadas. Na Tabela 5.11, o mesmo é feito para mutações do tipo superexpressão, que correspondem a oncogenes.

²¹De fato, Bodmer se opõem a hipótese do fenótipo mutador. Segundo Bodmer, os partidários dessa hipótese repetem o mesmo erro de De Vries ao argumentar que a força motriz da evolução são as mutações e não a seleção. Supostamente, a força da seleção estaria sendo novamente subestimada.

Mutação (deleção)	Tipo de câncer
Atm/Atr	Leucemia, linfoma, meduloblastoma, glioma
p53	Múltiplos tipos de tumores. Mutado em 42% de todos os tumores [116]
p27	Mama; tumores neuroendócrinos, intestino delgado
Mxi1	Próstata (53%) [118], neurofibrosarcoma [119]
Chk1/2	Mama
Pten	Glioblastoma multiforme (20 – 30%), pâncreas (40%) próstata (20%) [120], todos os cânceres (9,7%) [116]
Phds	Nenhuma informação encontrada

TABELA 5.10: **Mutações (deleção)**. Mutações do tipo deleção apontadas pelo modelo conjuntamente com as informações encontradas acerca do seu envolvimento no câncer. Entre parênteses, temos a frequência da mutação em um determinado tipo de tumor. A menos que a referência seja apontada, entenda-se que a fonte foi o COSMIC [10].

A nossa análise do papel dos fatores parácrinos no modelo revela a necessidade de considerar a interação tumor-estroma. O estroma, tecido de suporte a uma estrutura em particular, é formado por diferentes tipos de células, tais como macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais, pericitos, etc [129]. Podendo representar mais que 80% da massa tumoral [130], o estroma influencia e é influenciado pelo tumor. Essa interação é mediada por inúmeros fatores de sinalização, entre eles, os fatores parácrinos considerados no modelo. Os macrófagos, por exemplo, possuem um papel importante na síntese de $Tnf-\alpha$ e $IL-1$ [131]. Os fibroblastos associados ao tumor secretam toda sorte de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, entre os quais se encontra $Tgf-\beta$ e Wnt [129].

A inclusão da interação tumor-estroma pode, entre outras coisas, auxiliar a responder qual o papel da imunovigilância²³ no câncer. Como a maior parte das

²³Imunovigilância é um termo usado para descrever o processo pelo qual as células do sistema imune procuram e reconhecem agentes patogênicos estranhos, tais como bactérias e vírus, ou células pré-cancerosas e cancerosas no corpo. Traduzido de [132].

células tumorais exprimem moléculas anormais ou quantitativamente anormais em sua superfície, é natural esperar que as células tumorais sejam atacadas pelo sistema imune. Contudo, ainda não é claro se a imunovigilância desempenha um papel importante na proteção contra os tumores [131].

A maior parte das células com fenótipo glicolítico no modelo são o que podemos denominar de glicolíticas ocasionais. Como conseguem sobreviver em condição de hipóxia, elas mudam para esse fenótipo quando enfrentam essa condição. Contudo, uma vez em normoxia, elas abandonam o fenótipo glicolítico e utilizam a rota mais eficaz da fosforilação oxidativa. Isso difere do fenótipo glicolítico observado nas células cancerígenas. Nessas células, o fenótipo glicolítico é uma aquisição permanente, mesmo em situação de normoxia.

Embora quase 60 anos tenham se passado desde a descoberta desse fenômeno por Warburg [133], o fato é que ainda não se sabe quando esse fenótipo permanente surge e quais as vantagens do mesmo. Segundo nosso modelo, esse fenótipo pode surgir na fase avascular. Contudo, ele não é selecionado. O acúmulo de mutações que ocorre após a obtenção do fenótipo mutador é o responsável pelo aparecimento eventual de células glicolíticas permanentes. Os motivos desse fenótipo se tornar dominante no câncer devem ser encontrados em etapas posteriores da carcinogênese, onde, certamente, devem representar algum tipo de vantagem para o mesmo.

Mutação (superexpressão)	Tipo de câncer
hTert	Sistema nervoso central (43%), bexiga (59%), tireoide (10%), pele (melanoma, 29%) [121]
Tcf/Lef/Cbp	Colorretal
Akt	Ovário (12%), pâncreas (10%) [120]
Nf- κ B	Linfoma não-Hodgkin B
Mdm2	Sarcomas, gliomas, colorretal, outros tipos de tumor.
Myc	Linfoma de Burkitt, leucemia linfoide crônica
Jak	Leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica aguda, neoplasias mieloproliferativas
Ciclina D ²²	Mama, leucemia linfocítica crônica e aguda
Pkc	Mutado em tumores da tireoide [122]
β -catenina	Colorretal, ovário, adenoma, outros tipos de tumor
Gab1	Mama [123], colorretal [124]
Ras	Pâncreas (90%), colorretal (45%), tireoide(55%) melanoma (15%), bexiga (10%), fígado (30%) [120] todos os cânceres (6, 7%)[116]
Slug	Exerce um papel crítico na patogênese de tumores mesenquimais [125]
Pi3k	Mama (33%), endometrial (56%) [10], ovário (40%) [120], todos os cânceres (17, 8%)[116]
Mcl-1	Cânceres hematológicos e tumores sólidos [126]
Grb2	Mama, bexiga, e próstata [127]
Rage	Gástrico, cólon, vários outros [128]

TABELA 5.11: **Mutações (superexpressão)**. Mutações do tipo deleção apontadas pelo modelo conjuntamente com as informações encontradas acerca do seu envolvimento no câncer. Entre parênteses, temos a frequência da mutação em um determinado tipo de tumor. A menos que a referência seja apontada, entenda-se que a fonte foi o COSMIC [10].

Conclusão e Perspectivas Futuras

O objetivo dessa tese foi o desenvolvimento de um modelo multiescala para a carcinogênese. Para isso, fez-se necessário a construção de um modelo para a escala microscópica. Dessa forma, propusemos um modelo booleano que engloba as principais rotas de sinalização alteradas no câncer. Esse modelo descreve com sucesso o comportamento celular conhecido em diversas condições ambientais. Além disso, os resultados mostraram que perturbações em alguns nós da rede são capazes de conferir às células características observadas nas células cancerosas, tais como: autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores e evasão da apoptose. Associamos essas alterações às mutações *drivers*. Várias dessas mutações identificadas são observadas no câncer, conferindo às células mutadas as mesmas características apontadas pelo modelo. Também estudamos o resultado produzido quando a rede sofre a sequência de mutações associada ao desenvolvimento do câncer colorretal. Como resultado, observamos que cada uma dessas mutações contribui para um aumento na capacidade proliferativa e/ou de resistência a apoptose. Dessa forma, as células cancerosas empreendem uma busca por soluções fenotípicas que as permitam tornar-se cada vez mais adaptadas ao seu microambiente em frequente modificação. Por último, estudamos o efeito da terapia molecularmente direcionada através da inibição e/ou ativação de determinados nós da rede. Alterações em alguns nós são capazes de diminuir a proliferação celular. Contudo, nenhum nó alterado foi capaz de reverter todas as características da malignidade. Dessa forma, o modelo suporta a ideia de que várias drogas devem ser utilizadas concomitantemente para bloquear diversas rotas do câncer. Os resultados do modelo booleano foram publicados na revista PLOS ONE [134].

No meio tempo entre a conclusão do modelo booleano e a construção do modelo multiescala, melhorias foram implementadas na rede. As principais modificações referem-se a inclusão da rota metabólica e a inclusão da necrose na rota de apoptose (agora denominada rota de apoptose-necrose). A necrose regulada, denominada necroptose, é uma descoberta recente que quebra o pensamento clássico da necrose como o resultado apenas de estresse celular (anoxia, acidose, etc.) [135].

No modelo multiescala proposto, a competição entre as células e um microambiente em permanente alteração produzem a seleção de populações com fenótipos cada vez mais agressivos. No estado final, as células selecionadas possuem características fenotípicas tipicamente associadas a células cancerosas. O modelo sugere inúmeras sequências de mutações que podem levar as células até esse estágio. Contudo, todas essas sequências podem ser classificadas em apenas três esquemas de evolução, sendo um dos esquemas muito mais frequente que os outros dois.

Células que mudam permanentemente para o fenótipo glicolítico também surgem no modelo. Aparecendo após a obtenção de um fenótipo mutador pelas células tumorais, o fenótipo glicolítico permanente não é produto da seleção. Ele é consequência das mutações em oncogenes e genes supressores de tumor selecionadas com o objetivo de evadir da apoptose induzida por hipóxia e acidose.

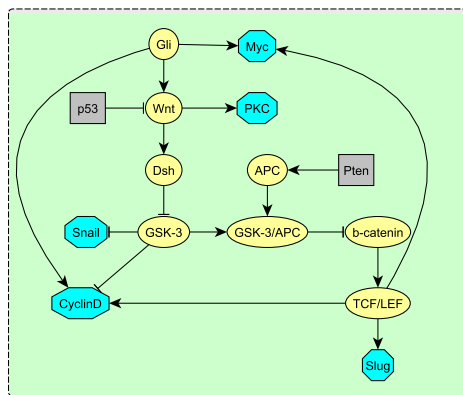
As limitações inerentes a um modelo de dois estados, nos motivam a procurar outras possibilidades para descrever a dinâmica da regulação. Nesse sentido, modelos que se apresentam como um meio termo entre a descrição booleana e a descrição contínua podem ser uma alternativa. Analisamos a viabilidade do uso das Máquinas de Estado Finito para esse fim [136].

O modelo multiescala na forma atual é adequado para o estágio avascular da carcinogênese. Contudo, as sementes da sua extensão já estão presentes no modelo. Embora ignorado no modelo atual, a rede utilizada já descreve a produção de Vegf. Esse é o fator que atua nas células endoteliais estimulando a angiogênese tumoral, o que nos permite ir além da fase avascular. A rede também já possui a rota associada à migração celular e à produção de MMPs que degradam a matriz extracelular. Dessa forma, esses processos essenciais para a invasão e metástase podem ser incluídos. Por último, é necessário a inclusão das células do estroma no modelo. Sabe-se que o ambiente tumoral é muito heterogêneo, com a presença de macrófagos, monócitos, fibroblastos entre outros. Torna-se cada vez mais claro que essas células possuem um papel preponderante na carcinogênese [129, 137].

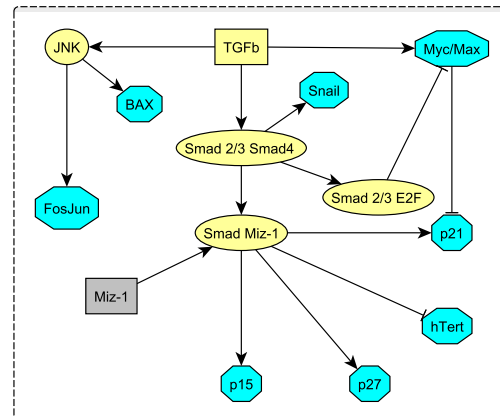
Complemento ao Capítulo 4

A.1 Rotas de Sinalização

A rede proposta pode ser dividida em 8 rotas de sinalização. Cada uma dessas rotas é apresentada a seguir. Os nós que pertencem a rota em questão correspondem a elipses amarelas, nós de outras rotas que influenciam a rota em questão são representados por retângulos cinzas, e nós de outras rotas que são regulados pelos nós da rota em questão são representados por octógonos azuis.

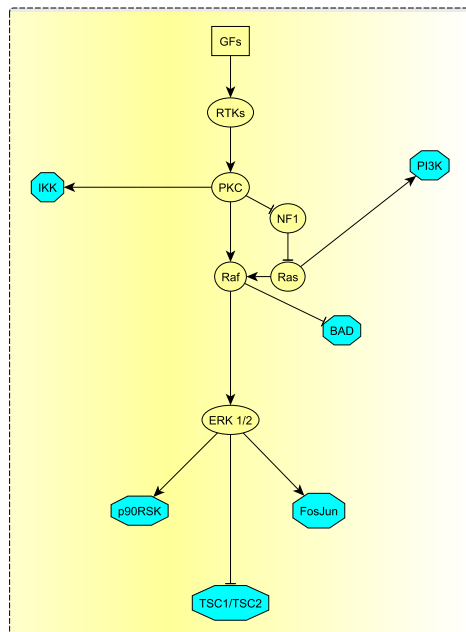


(a) Rota Wnt

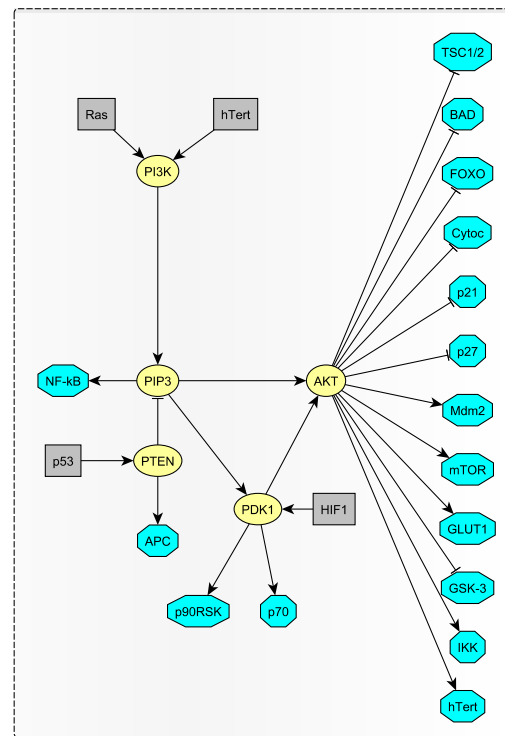


(b) Rota TGF- β -Smad

FIGURA A.1: (a) Envolvida na regulação do processo de desenvolvimento embrionário. No organismo adulto está associada a homeostase e a renovação tecidual [44]. (b) Associada à percepção e sinalização de fatores de inibição proliferativa.

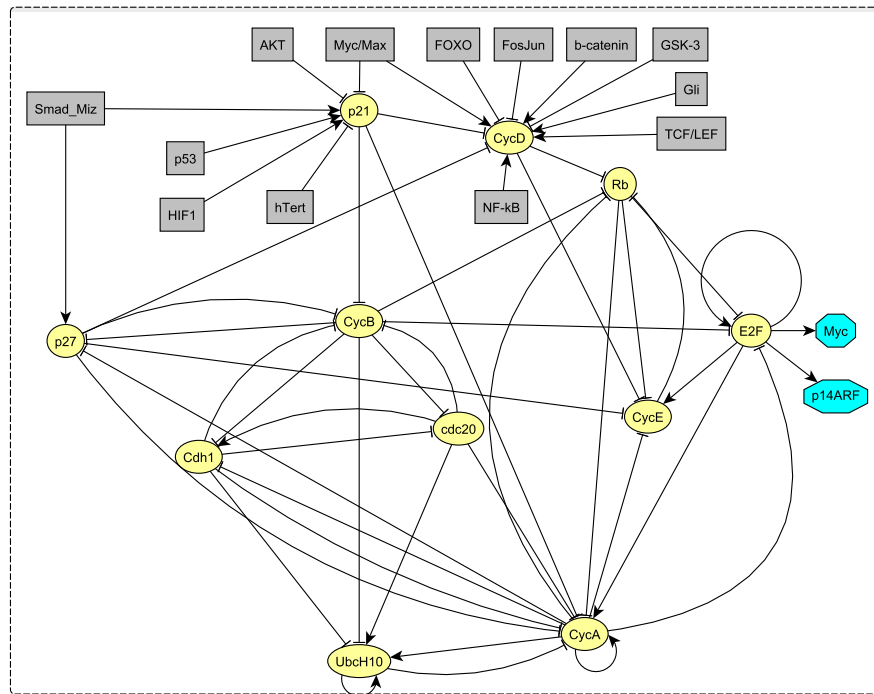


(a) Rota RTK

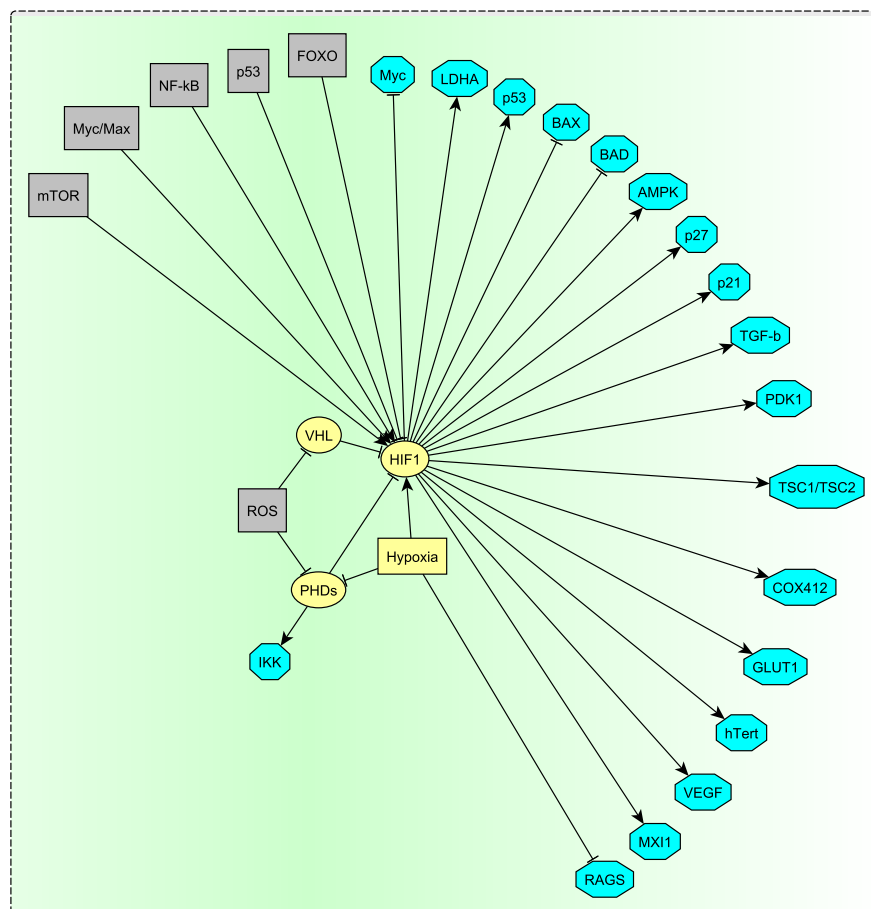


(b) Rota PI3K-Akt

FIGURA A.2: (a) Associada à regulação da proliferação e diferenciação celular, promoção da sobrevivência da célula, e modulação do metabolismo celular. (b) Associada com sinalização dependente da concentração de fatores de crescimento. Fortemente associada com a sinalização para a sobrevivência celular e captação de glicose [43].

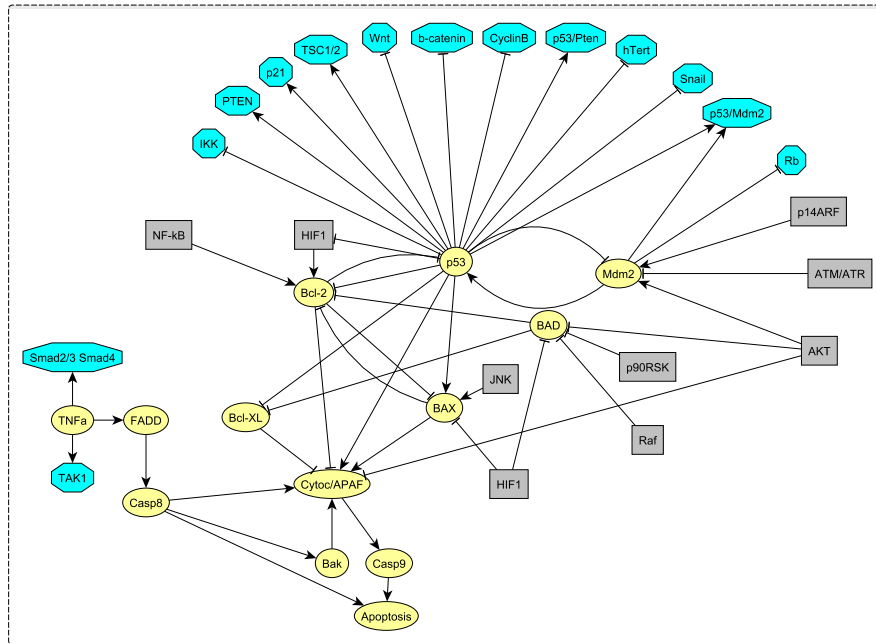


(a) Rota Rb/E2F

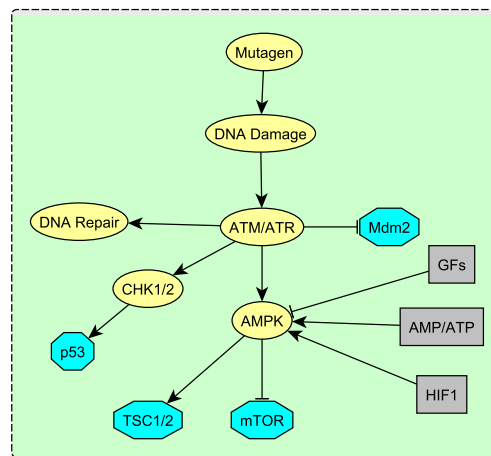


(b) Rota HIF1

FIGURA A.3: (a) Associada a regulação da iniciação da replicação do DNA [45]. (b) Associada à percepção da concentração de oxigênio no meio e às mudanças metabólicas adequadas a essa situação [46].



(a) Rota de apoptose



(b) Rota ATM/ATR

FIGURA A.4: (a) Associada à decisão celular de entrar ou não em apoptose. (b) Associada à percepção de danos no DNA.

A.2 Propriedades Topológicas

Definiremos as seguintes propriedades topológicas: conectividade, distribuição de conectividade, coeficiente de aglomeração, menor caminho médio e centralidade de intermediação.

A.2.1 Conectividade

Chamamos os elementos da rede que se conectam uns com os outros de **vértices** ou **nós**, e as ligações de **arestas** ou **arcos**. Cada nó i em uma rede possui um número k_i de arestas. Chamamos esse número de **conectividade** ou **grau** do nó. Dizemos que uma rede é **direcionada** se as arestas que ligam os nós possuem uma direção. Por isso, para redes direcionadas cada nó i tem dois tipos de conectividade: uma que mede o número de arestas direcionadas do nó i para os outros nós (k_{out} , ou seja, saindo do nó), e uma que mede o número de arestas vindas de outros nós para o nó i (k_{in} , ou seja, entrando no nó). Em redes **não-direcionadas** as arestas não possuem uma direção, consequentemente só temos um tipo de conectividade.

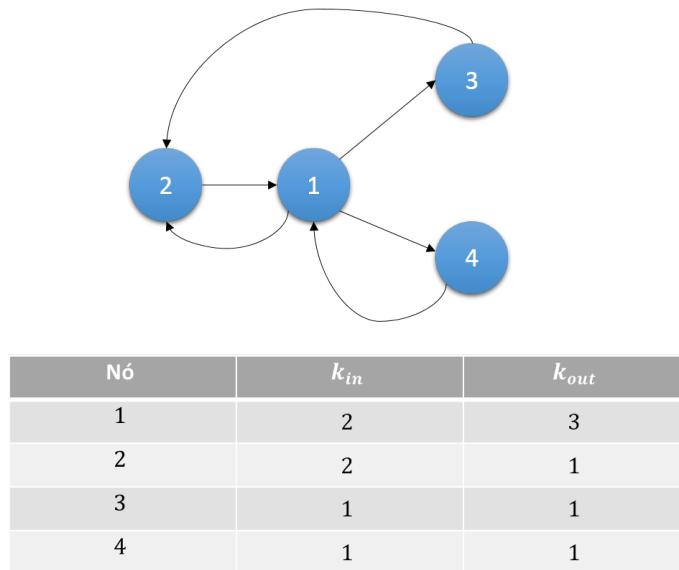


FIGURA A.5: **Conectividade em uma rede direcionada.** Observe que os nós possuem dois tipos de conectividade. O nó 1, por exemplo, possui uma conectividade de entrada k_{in} igual 2 já que arestas vindas do nó 2 e 4 apontam para ele. A conectividade de saída k_{out} é igual a 3 já que arestas saindo do nó 1 apontam para os nós 3, 2 e 4.

A.2.2 Distribuição de conectividade

A conectividade de um nó é uma informação local importante. Contudo, uma informação global da conectividade da rede também pode ser necessária. A distribuição de conectividades $P(k)$ nos fornece essa informação. Essa medida informa qual a probabilidade de um nó i possuir um grau k_i . Redes aleatórias,

por exemplo, possuem uma distribuição de conectividades do tipo Poisson com um pico na conectividade média dos nós. Para várias redes reais a distribuição de conectividades é do tipo lei de potência ou exponencial ¹. Para redes direcionadas podemos calcular dois tipos de distribuição de conectividades: (I) aquela das arestas que entram nos nós $P(k_{in})$; (II) aquela das arestas que saem dos nós $P(k_{out})$.

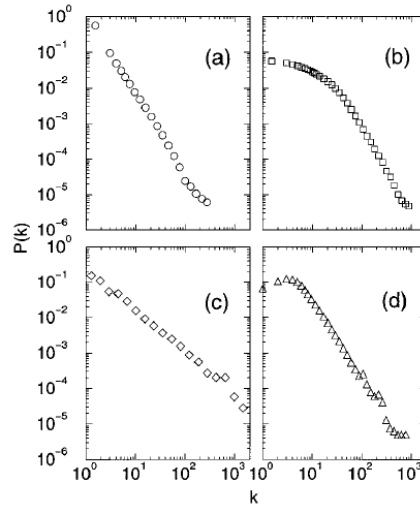


FIGURA A.6: **Distribuição de conectividade de algumas redes reais.**

(a) Internet no nível de roteadores; (b) rede de co-atuação de atores; (c) rede de co-autoria de físicos de alta-energia; (d) rede de co-autoria de neurocientistas.

Figura retirada de [?]

A.2.3 Coeficiente de aglomeração

Uma característica notada na maioria das redes reais é que os nós tendem a criar grupos que são muito conectados entre si. Um exemplo é uma rede formada por laços de amizade, na qual observamos uma grande chance de vários amigos serem amigos entre si. O coeficiente de aglomeração é uma quantificação de quão coeso um determinado grupo de nós está. Ele é definido para um nó i , como a razão entre o número de arestas entre os vizinhos desse nó, denotado por A_i , e o número máximo possível de arestas entre esses vizinhos, dado por $(k_i(k_i - 1))/2$ (veja a Figura A.7).

O coeficiente de aglomeração médio da rede é definido como:

¹Informação que nos permite concluir que essas redes não são aleatórias, como já se pensou.

$$\langle C \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N c_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{2A_i}{k_i(k_i - 1)} \quad (\text{A.1})$$

em que N é o número de nós da rede.

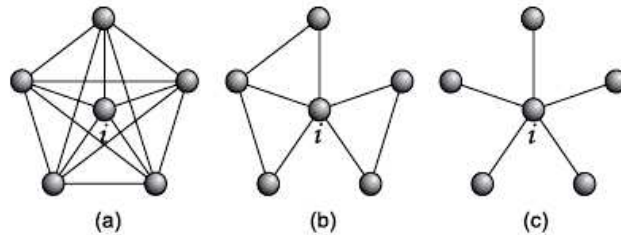


FIGURA A.7: **Exemplos do valor do coeficiente de aglomeração do nó i para três redes.** (a) Os nós estão totalmente conectados, $\langle C \rangle = 1$. Em (b), $\langle C \rangle = 3/10$. Em (c), $\langle C \rangle = 0$, já que os vizinhos não possuem conexões entre si. Figura retirada de [?]

A.2.4 Menor caminho médio

A distância entre os nós de uma rede é uma informação relevante. Na rede da Internet, por exemplo, a perda de pacotes trocados entre computadores aumenta com a distância entre eles. Quanto maior a distância, maior o número de roteadores no caminho e, conseqüentemente, maior a probabilidade da ocorrência de falhas ou congestionamentos [?].

O menor caminho que leva de um nó a outro é, de todos os caminhos possíveis, aquele que passa pelo menor número de arestas. Na Figura A.8, o menor caminho que liga o vértice **n1** ao vértice **n5** é aquele que faz o trajeto **n1-n2-n5**. Portanto, o menor caminho de **n1** a **n5** tem valor 2, já que passa por duas arestas.

Geralmente, estaremos interessados no menor caminho médio. Para calculá-lo, temos que tomar a média sobre o menor caminho entre todos os pares de vértices i e j da rede.

Um fenômeno interessante, presente em muitas redes reais, é o chamado efeito mundo pequeno (*“small world”*). Redes com esse efeito podem apresentar milhares de vértices e, apesar disso, ter um menor caminho médio muito pequeno. A mais popular manifestação do efeito mundo pequeno é o conceito dos “seis graus

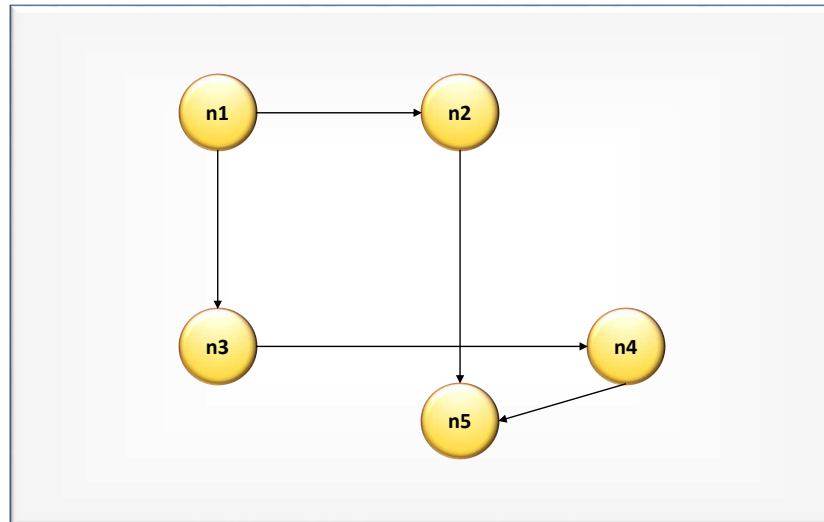


FIGURA A.8: **Menor caminho médio.** O menor caminho médio entre dois nós quaisquer de uma rede é aquele que passa pelo menor número de arestas.

de separação”, descoberto pelo psicólogo social Stanley Milgram (1967), que concluiu que em média quaisquer duas pessoas nos EUA estão separadas através de laços de familiaridade por seis outras pessoas [?].

A.3 Valores dos parâmetros utilizados

Peso	Natureza	Interação regulatória
+2	Ativação	$Nf-\kappa B \rightarrow Bcl-2$ $Ikk \rightarrow Nf-\kappa B$
-2	Inativação	$Gsk-3 \rightarrow Cyclin D$ $Rb \rightarrow E2f$ $Vhl \rightarrow Hif1$

TABELA A.1: Pesos das interações com valores especiais.

Limiar	Nó	Comentário
-3	Gsk-3	Ativo na ausência de FCs.
	E-caderina	Ativo em células epiteliais não-transformadas
-2	Rb	Ativo em células que não estão em ciclo.
	Foxo Hif1	Ativo a menos que Akt esteja superexpressado. Ativo em hipóxia.
-1	Max	Nó sem reguladores.
	Ras	Ativado por FCs ou pela inativação de Nf1.
	E2f	Ativado por FCs.
	p21	Ativo em células não-transformadas que não estão em ciclo.
	p53	Inativo em células que não estão sob estresse.
	Ampk Mdm2 Phds	Ativo em células não-transformadas que não estão sob estresse.
	Vhl	
-1	p27	Ativo em células que não estão em ciclo
	Apc	Nó sem reguladores.
	Nf1	Ativo em células não-transformadas que não estão em ciclo.
	Pip3	Ativado por FCs.
	Tsc1/2	Ativo em células não-transformadas na ausência de FCs e estresse.
-1	Ciclina B, Rheb β -catenina, Cdh1 eEf2, Miz-1, Pten Bad, Bcl-Xl, AMP/ATP	Regulado apenas por inibidores. O nó é ativado apenas se os inibidores estão inativos.
	p53/Pten, Myc/Max, Gsk-3/Apc, E2f/Cyclin E, Cdh1/UbcH10, Smad/Miz-1, p53/Mdm2	Complexo binário formado somente se suas partes estão ativas.
	Akt	Demanda que ambos reguladores estejam ativos.
	mTor	Ativo em células não-transformadas em proliferação.
+1	Glut1	Inativo em normoxia e na ausência de sinais proliferativos.
	Nf- κ B	Inativo em células não-transformadas livres de FCs.
	Myc	Inativo em células não-transformadas livres de FCs.
	Ldha	Inativo em normoxia, células não-transformadas.
	Snail	Ativado por TGF- β e sinais proliferativos.
+3	p14 ^{ARF}	Ativado quando E2f é superexpressado.
+4	hTert	Inativa em célula não-imortalizadas.

TABELA A.2: Limiares de ativação com valores especiais.

Complemento ao Capítulo 5

B.1 Propriedades topológicas da rede

N a Figura B.1, apresentamos a nova rede proposta. A Tabela B.1 compara algumas características topológicas da rede com as de um *ensemble* de redes aleatórias com o mesmo número de nós e arestas. Nas Figuras B.2 e B.3 temos, respectivamente, as distribuições de conectividades de entrada $P(k_{in})$ e saída $P(k_{out})$.

Propriedades da Rede	Câncer	Aleatória
Nós	253	253
Arestas	646	637 ± 20
Conectividade média	2,56	$2,52 \pm 0,08$
Menor caminho médio	3,77	$3,55 \pm 0,06$
Coefficiente de aglomeração	0,122	$0,09 \pm 0,02$

TABELA B.1: **Propriedades topológicas da rede:** para o câncer e para um *ensemble* de 500 redes aleatórias.

B.2 As rotas de sinalização

A rede proposta pode ser dividida em 9 rotas de sinalização. Cada uma dessas rotas é apresentada a seguir. Os nós que pertencem a rota em questão correspondem a elipses amarelas, nós de outras rotas que influenciam a rota em

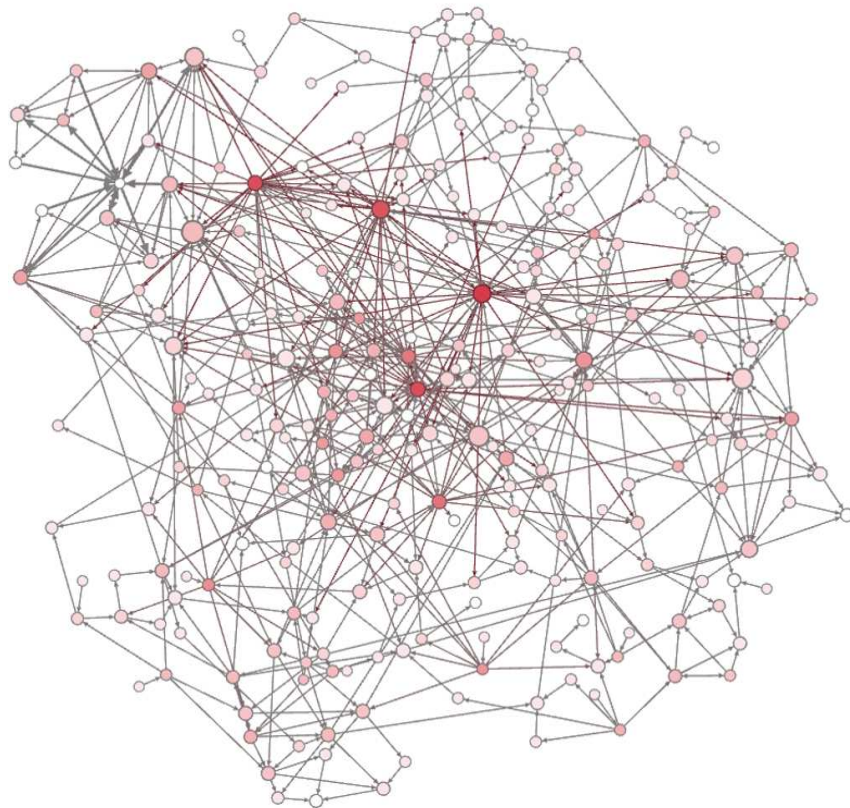


FIGURA B.1: **Rede para o câncer:** Quanto maior o nó, maior é o seu grau de entrada k_{in} . A intensidade do vermelho com a qual os nós são coloridos está associada ao seu grau de saída k_{out} ; quanto mais intenso, maior é k_{out} .

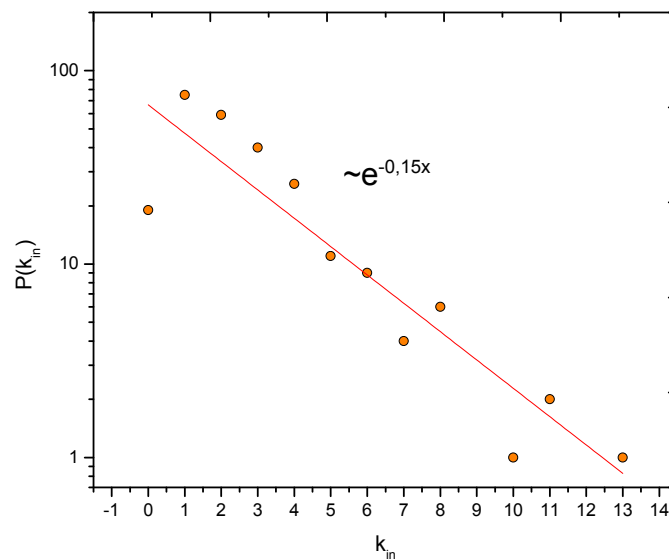


FIGURA B.2: $P(k_{in})$: Distribuição de conectividades de entrada $P(k_{in})$ para a rede proposta.

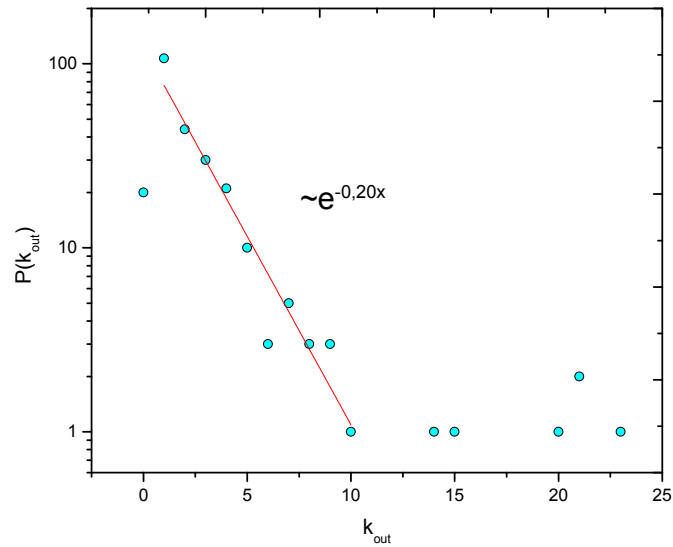


FIGURA B.3: $P(k_{out})$: Distribuição de conectividades de saída $P(k_{in})$ para a rede proposta.

questão são representados por retângulos cinzas, e nós de outras rotas que são regulados pelos nós da rota em questão são representados por octógonos azuis.

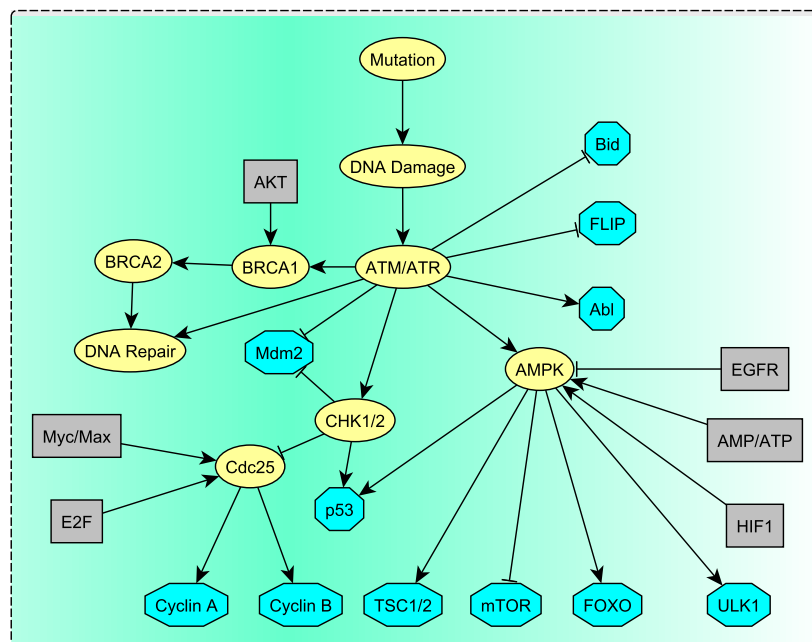


FIGURA B.4: Rota ATM/ATR.

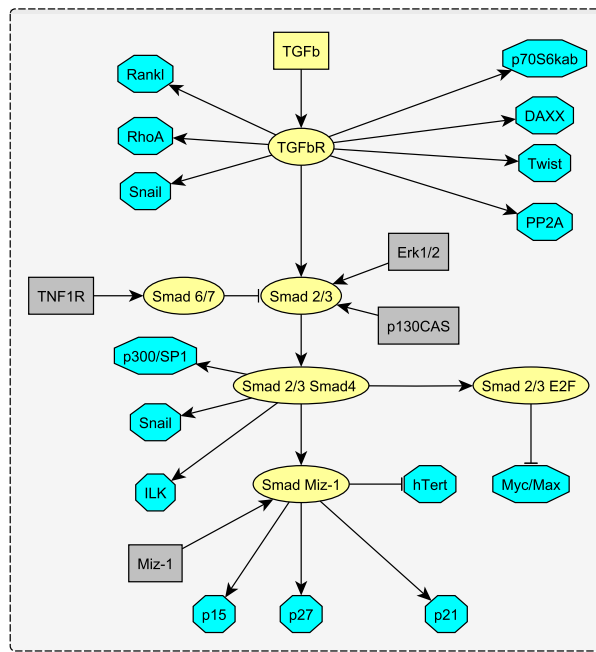


FIGURA B.5: Rota TGF- β -Smad.

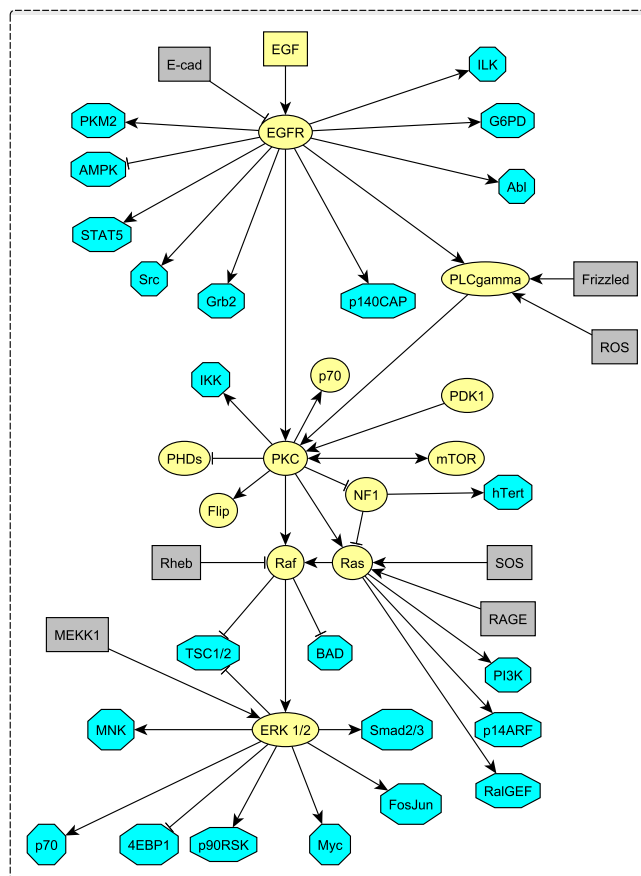


FIGURA B.6: Rota RTK.

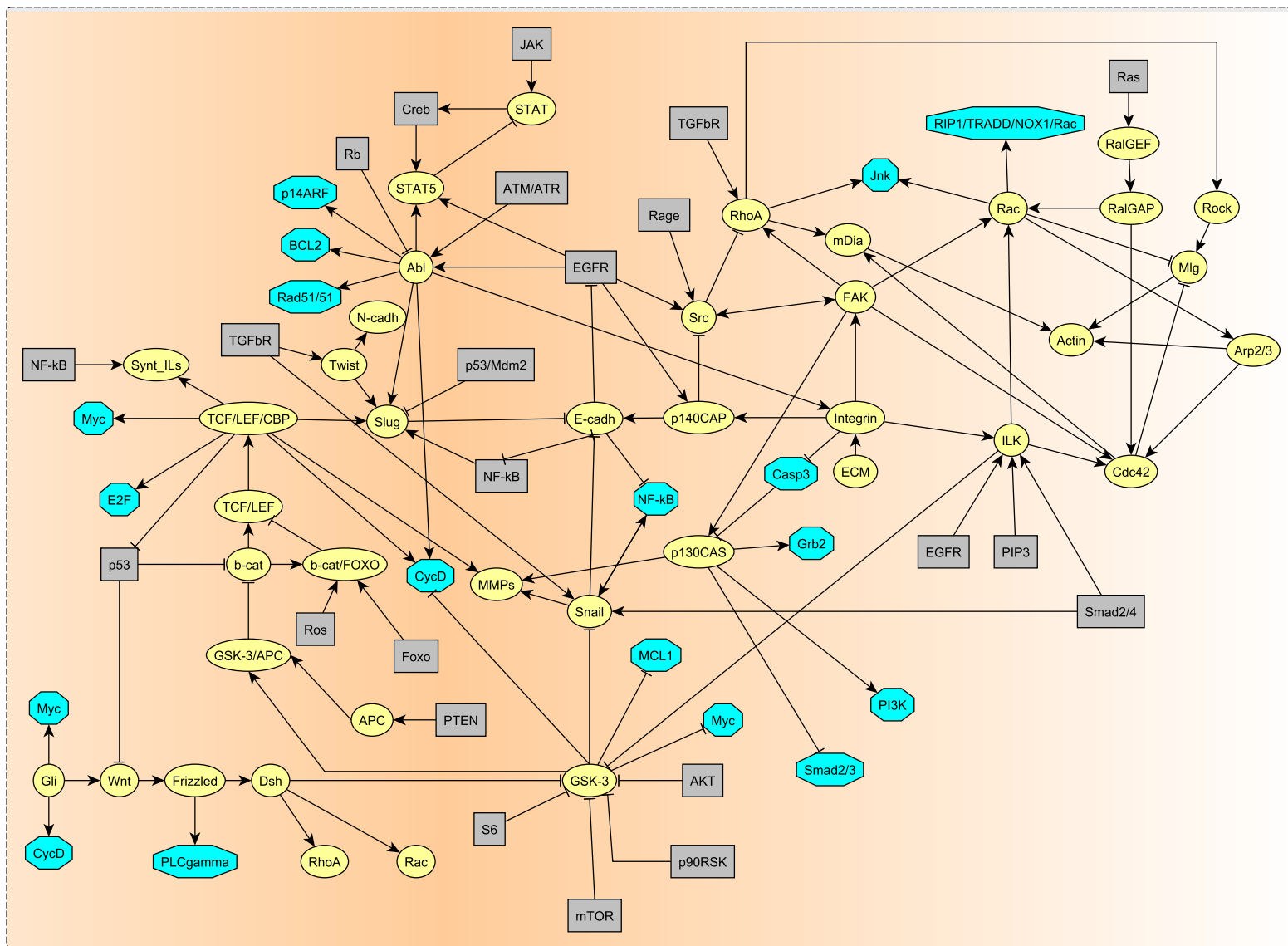


FIGURA B.7: Rota Wnt/E-caderina

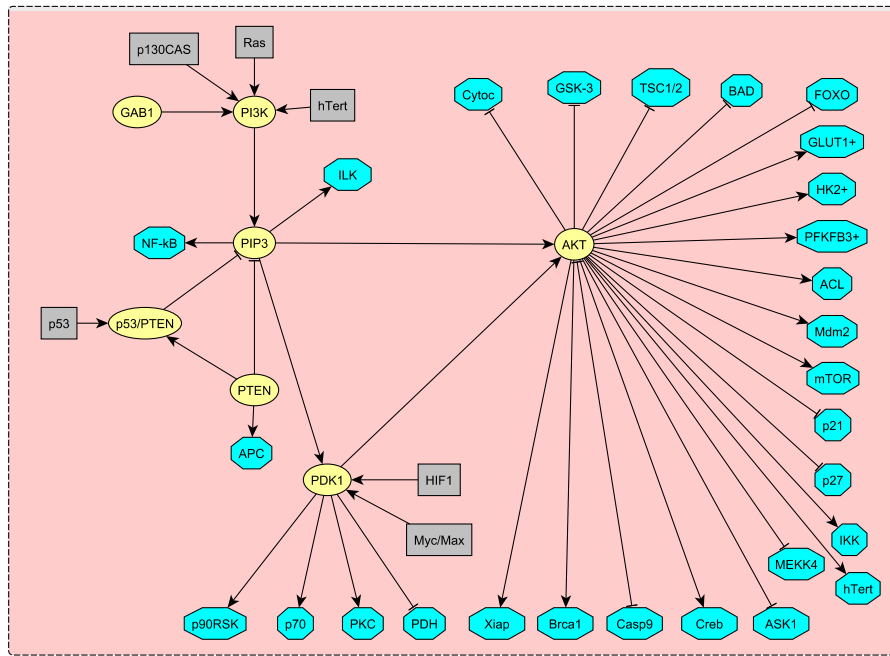


FIGURA B.8: Rota PI3K-Akt.

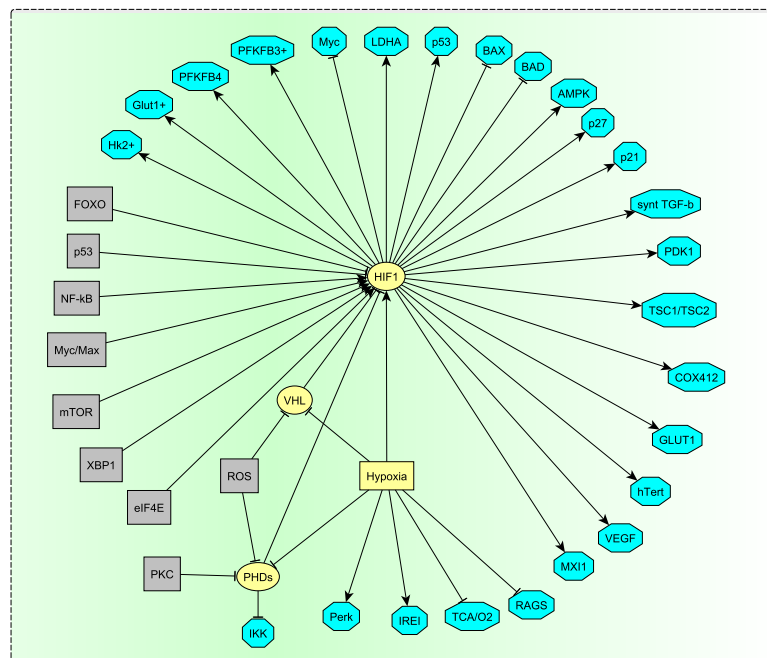


FIGURA B.9: Rota HIF1.

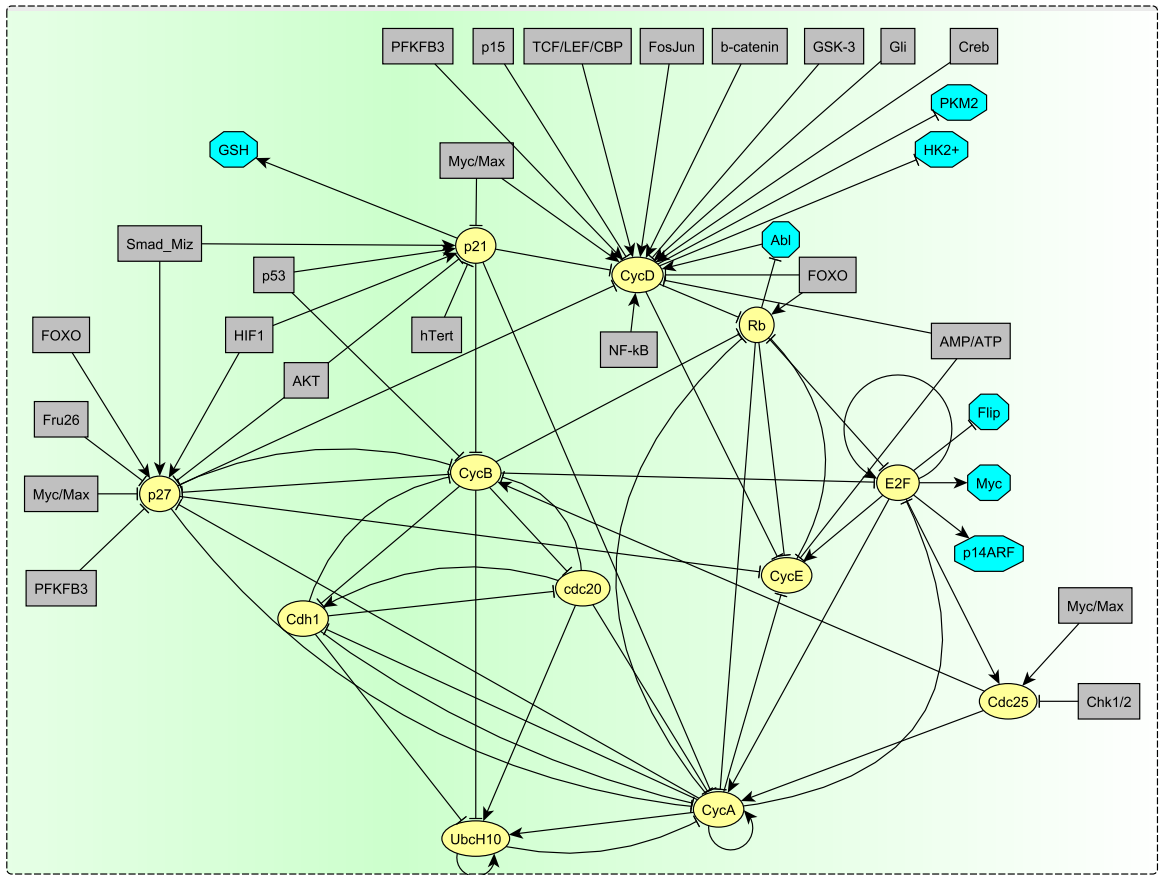


FIGURA B.10: Rota Rb/E2F.

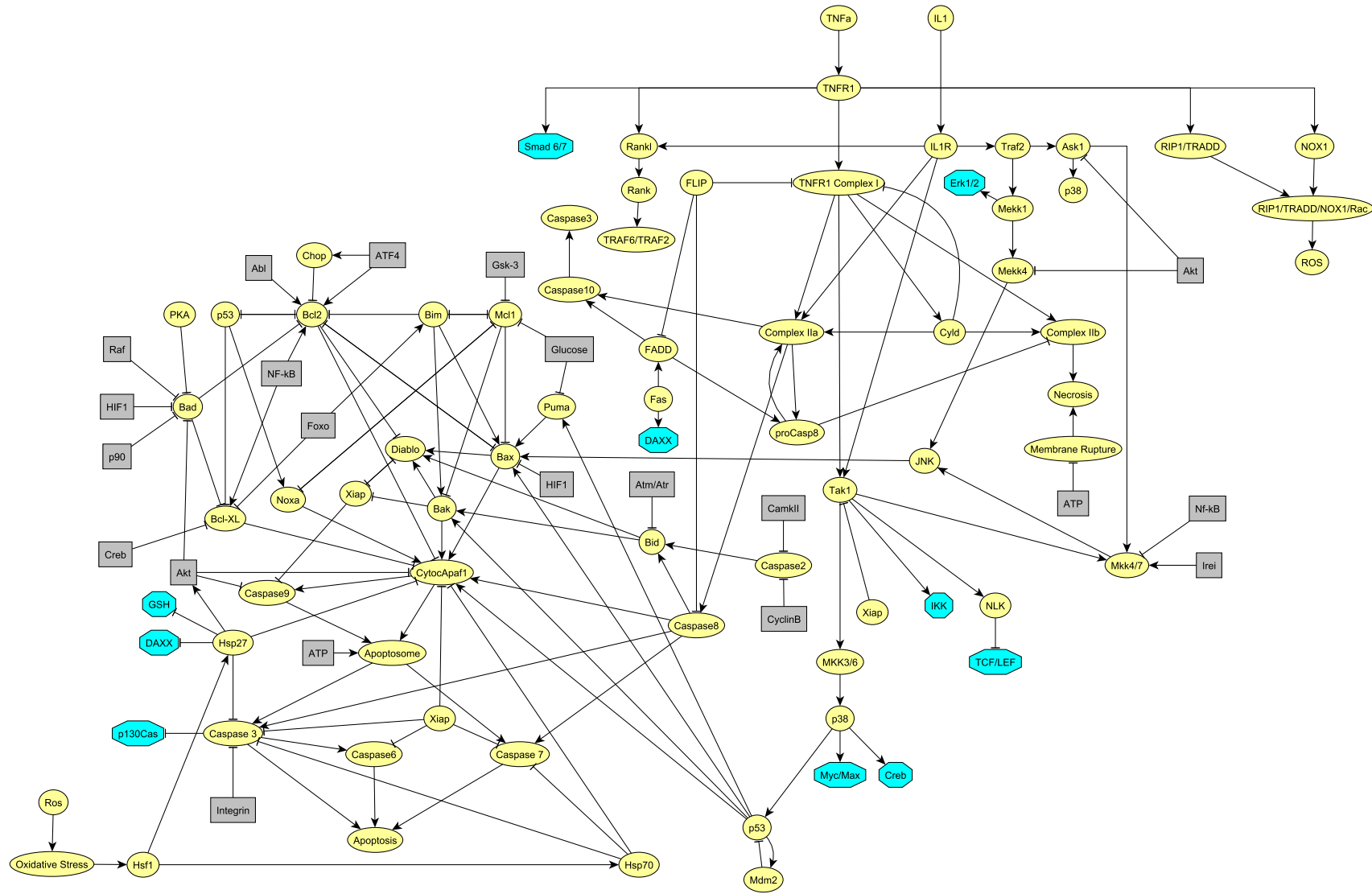


FIGURA B.11: Rota de apoptose-necrose.

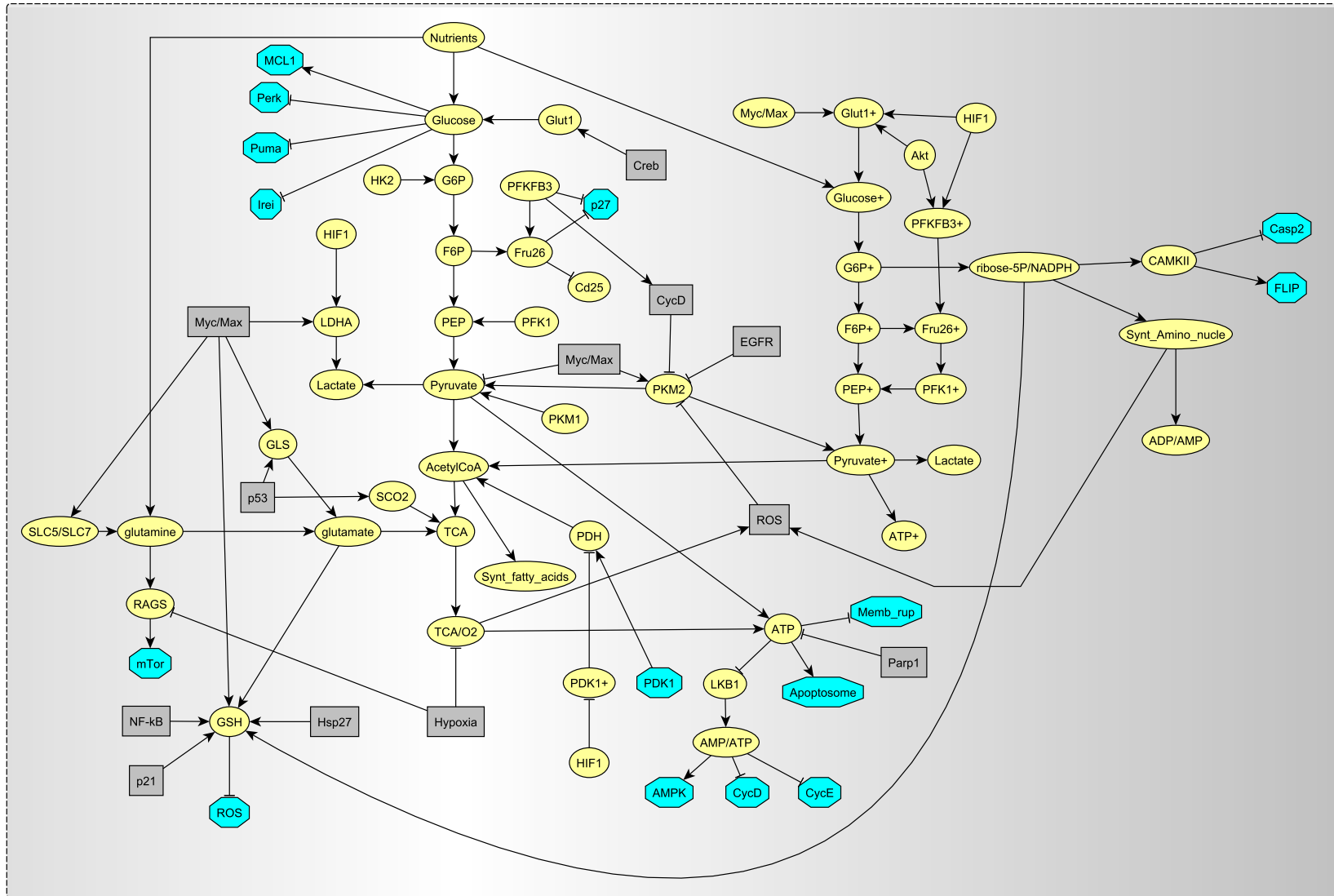


FIGURA B.12: Rota Metabólica.

B.3 Novos fenótipos

Os seguintes fenótipos foram definidos na nova rede:

- **Necrótico:** aquele das células em necrose. A ativação do nó *Necrose* em alguma configuração pertencente ao atrator é condição necessária e suficiente para que esse fenótipo seja observado.
- **Senescente:** Se em todas as configurações do atrator, os nós *p53*, *p21*, e *Dano no DNA* estiverem ativos e o nó *Rb* estiver inativo, esse fenótipo é observado.
- **Necrótico:** aquele das células em necrose. A ativação do nó *Necrose* em alguma configuração pertencente ao atrator é condição necessária e suficiente para que esse fenótipo seja observado.
- **Síntese de $Tnf-\alpha$:** se o nó de mesmo nome estiver ativo em alguma configuração pertencente ao atrator, esse fenótipo é observado.
- **Síntese de $Tgf-\beta$:** se o nó de mesmo nome estiver ativo em alguma configuração pertencente ao atrator, esse fenótipo é observado.

Redefinimos o fenótipo glicolítico da seguinte forma:

- **Glicolítico:** Se em todas as configurações do atrator, o nó *Lactato* está ativo e o nó *TCA/O2* está inativo, esse fenótipo é observado.

B.4 Limiares e pesos para a nova rede

Na Tabela A.1, apresentamos os valores dos pesos adotados na nova rede e, nas Tabelas A.2 e A.3, os valores dos limiares.

Peso	Natureza	Interação regulatória
+3	Ativação	Myc/Max → PKM2 FasL → Fas
+2	Ativação	Acidose → p53 Nf- κ B → Bcl-2 Ikk → Nf- κ B Hif1 → Vegf Hif1 → Ldha Cytoc/Apaf9 → Caspase9 p53 → Noxa Ldha → Lactato AcetylCoA → TCA Tcf/Lef/Cbp → Myc
-2	Inativação	Gsk-3 → Cyclin D Rb → E2f chk1/2 → cdc25 Hipóxia → PHDs Ros → PHDs Parp1 → Atp PHDs → Hif1 Tcf/Lef/Cbp → p53 Vhl → Hif1
-3	Inativação	Mdm2 → p53 Dsh → Gsk-3

TABELA B.2: Pesos das interações com valores especiais.

Limiar	Nó	Limiar	Nó
+1		-1	
	Glucose		Glut1
	Glucose+		Hk2
	G6P		Pfkfb3
	G6P+		Pfk1
	Ribose5P		Pkm1
	Fru26BP		Max
	Fru26BP+		Ras
	PEP		p21
	PEP+		p53
	Pyruvate		Mdm2
	Pyruvate+		β -catenina
	AcetylCoA		E2f
	Ldha		Rheb
	Glutamato		Apc
	Glutamina		Nf1
	GLS		cdh1
	TCA		Bad
	Akt		Bcl-X _L
	Ciclina A		Pip3
	Myc/Max		Pten
	Gsk-3/Apc		Tsc1/2
	E2f/CiclinaE		eEF2
	cdh1/UbcH10		Miz-1
	Foxo		Vhl
	Nf- κ B		Lkb1
	Smad-Miz		4EBP1
	p53/Mdm2		Egfr
	p53/Pten		Puma
	Brca1		Perk
	Pkc		Ruptura Membrana
	Fak		pró-Casp8
	Ras		
	abl		
	Vegf		
	p140Cap		
	Flip/Caspase 8		
	Complexo IIb		

TABELA B.3: Limiares das interações com valores especiais.

Limiar	Nó
+2	Lactato MMPs mTor β -catenina/Foxo Ilk eIF4E Rac Fas Slug Complexo IIa Apoptossomo SintTgf- β SintILs SintTnf- α Foxo
-2	Pdh Hif1 Snail Phds Flip
-3	Gsk-3 p27 E-caderina
3	p14ARF Ros
4	hTert Myc

TABELA B.4: Limiares das interações com valores especiais.

B.5 Mutações *drivers* na nova rede

Nesta seção, comparamos as mutações *driver* produzidas pela nova rede com as da rede anterior. Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$. Analisamos 100.000 condições iniciais para cada nó.

B.5.1 Normoxia: condição (00100)

B.5.1.1 Sensores funcionais

Na condição de normoxia e nutrientes adequados (00100) e com os sensores de integridade do DNA funcionais, a rede anterior aponta 10 genes como mutações *driver* (Tabela 4.2). Para a rede anterior, mesmo quando o dano é detectado ainda existe uma pequena chance ($< 1\%$) da mutação se estabelecer. Na rede atual não existe nenhuma mutação que confira um fenótipo proliferativo para a célula nessa condição. Dessa forma, se a mutação for detectada ela nunca se estabelecerá. Portanto, de acordo com a nova rede, *as falhas no processo de detecção do dano no DNA são as únicas responsáveis pelo estabelecimento das mutações.*

B.5.1.2 Sensores avariados

Na condição de normoxia e nutrientes adequados (00100) e com os sensores de integridade do DNA avariados, a rede anterior aponta 12 genes como mutações *driver*. Na Tabela B.5, comparamos o efeito na nova rede das mutações *driver* da rede anterior. Na Tabela B.6, apresentamos novas mutações *driver* apontadas pela nova rede.

Gene	mutação	eficácia(rede anterior)	eficácia(nova rede)
Akt	ativação	—	56,01%
	superexpressão	54,3%	100%
Egfr	ativação	100%	100%
	superexpressão	100%	—
Gli	ativação	100%	59,44%
	superexpressão	100%	86,24%
hTert	ativação	100%	100%
	superexpressão	100%	100%
Nf1	deleção	100%	—
Nf- κ B	superexpressão	2,1%	100%
Pdk1	superexpressão	36%	100%
PI3K	ativação	100%	100%
	superexpressão	100%	100%
Pkc	ativação	100%	—
	superexpressão	100%	100,00%
Pten	deleção	100%	100,00%
Ras	ativação	100%	100,00%
	superexpressão	100%	100,00%
Wnt	ativação	100%	92,94%
	superexpressão	100%	92,94%

TABELA B.5: **Mutações *driver* nas duas redes (00100).** Na nova rede, 11 das 12 mutações *driver* da rede anterior também são mutações *driver*.

Gene	mutação	eficácia
Abl	superexpressão	41, 86%
Erk1/2	ativação	0, 05%
	superexpressão	35, 07%
Fak	ativação	100%
	superexpressão	100%
FosJun	superexpressão	0, 23%
Frizzled	ativação	92, 84%
	superexpressão	92, 84%
Gab1	ativação	100%
	superexpressão	100%
Grb2	ativação	100%
	superexpressão	100%
Jak	ativação	100%
	superexpressão	100%
Myc	ativação	80, 43%
	superexpressão	83, 75%
p130Cas	ativação	100%
	superexpressão	100%
Slug	ativação	32, 65%
	superexpressão	69, 67%
Snail	superexpressão	97, 42%
SOS	ativação	75, 0%
	superexpressão	100%
Src	superexpressão	100%
Tcf/Lef/Cbp	superexpressão	95, 49%
Rage	ativação	100%
	superexpressão	100%
Twist	ativação	0, 03%
	superexpressão	43, 56%
Dsh	superexpressão	4, 29%
Hsp27	superexpressão	54, 99%
Raf	ativação	0, 06%
	superexpressão	0, 06%
E-caderina	deleção	100%

TABELA B.6: **Novas mutações *driver*** (00100). Aqueles nós já existentes na rede anterior estão em negrito.

B.5.2 Hipóxia: condição (00101)

B.5.2.1 Sensores funcionais

Na condição de hipóxia e nutrientes adequados (00101) e com os sensores de integridade do DNA funcionais, a rede anterior aponta 7 mutações *driver*. Na Tabela B.7, comparamos o efeito dessas mutações nas duas redes.

Gene	mutação	eficácia(rede anterior)	eficácia(nova rede)
Akt	superexpressão	100%	100%
Bcl-2	ativação	100%	—
	superexpressão	100%	—
Bcl-X _L	superexpressão	100%	—
Ikk	superexpressão	88,7%	—
Nf-κB	ativação	91,7%	—
	superexpressão	100%	100%
p53	deleção	100%	100%
Snail	superexpressão	83,6%	63,86%

TABELA B.7: **Mutações *driver* nas duas redes (00101).** Genes afetados e mutações correspondentes que capacitam a rede a evadir da apoptose induzida por hipóxia. Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

Na Tabela B.8, apresentamos as novas mutações *driver* apontadas pela nova rede.

Gene	mutação	eficácia(nova rede)
Egfr	ativação	72, 85%
	superexpressão	74, 05%
Hsf1	ativação	100%
	superexpressão	100%
Hsp70	ativação	100%
	superexpressão	100%
Mdm2	superexpressão	100%
Pdk1	superexpressão	48, 59%
Pkc	superexpressão	38, 23%
Slug	ativação	27, 22%
	superexpressão	96, 96%
Tcf/Lef/Cbp	superexpressão	100%
Twist	superexpressão	18, 40%
Snail	superexpressão	62, 06%
Xiap	ativação	100%
	superexpressão	100%
Caspase 9	deleção	100%
E-caderina	deleção	89, 78%

TABELA B.8: **Novas mutações *driver* na condição de hipóxia.** Genes afetados e mutações correspondentes que capacitam a rede a evadir da apoptose induzida por hipóxia. Os nós já existentes na rede anterior estão em negrito.

Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

B.5.2.2 Sensores avariados

Na condição de hipóxia e nutrientes adequados (00101), mas com os sensores de integridade do DNA avariados, a rede anterior aponta 22 mutações *driver*. Na Tabela B.9, comparamos o efeito dessas mutações nas duas redes. Na Tabela B.10, apresentamos as novas mutações *driver* apontadas pela rede.

Gene	mutação	eficácia (anterior)	eficácia (nova)
Akt	ativação	—	100%
	superexpressão	100%	100%
Bcl-2	ativação	100%	—
	superexpressão	100%	100%
Bcl-X _L	superexpressão	100%	—
Egfr	ativação	2,6%	100%
	superexpressão	2,6%	100%
Gli	ativação	0,7%	—
	superexpressão	3,05%	—
HIF-1	deleção	100%	100%
	superexpressão	—	3,84%
hTert	ativação	0,09%	100%
	superexpressão	0,09%	100%
Ikk	ativação	—	100%
	superexpressão	99%	100%
Mdm2	ativação	—	100%
	superexpressão	100%	100%
mTor	ativação	—	100%
	superexpressão	19%	100%
Myc	ativação	0,03%	9,26%
	superexpressão	0,02%	9,26%
Nf1	deleção	0,08%	—
Nf- κ B	ativação	99%	100%
	superexpressão	100%	100%
p38	superexpressão	—	0,02%
p53	deleção	100%	100%
Phds	superexpressão	100%	100%
Pkc	ativação	2,6%	—
	superexpressão	9,1%	100%
PI3K	ativação	0,18%	100%
	superexpressão	17,3%	100%
Pten	deleção	14,8%	100%
Ras	ativação	0,17%	100%
	superexpressão	0,17%	100%
Snail	superexpressão	98%	99,98%
Vhl	ativação	100%	—
	superexpressão	100%	100%
Wnt	ativação	3,5%	67,9%
	superexpressão	3,5%	67,9%

TABELA B.9: **Mutações *driver* quando existem avarias nos sensores (hipóxia).** Novas mutações *driver* sob hipóxia e suprimento adequado de nutrientes no contexto em que os sensores de integridade do DNA estão avariados.

Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

Gene	mutação	eficácia(nova rede)
Abl	ativação	89, 55%
	superexpressão	96, 36%
Dsh	ativação	21, 37%
Gab1	ativação	100%
	superexpressão	100%
Grb2	ativação	100%
	superexpressão	100%
Hsf1	ativação	100%
	superexpressão	100%
Hsp27	superexpressão	100%
	ativação	83, 53%
Hsp70	ativação	100%
	superexpressão	100%
Frizzled	ativação	68, 12%
	superexpressão	68, 12%
Jak	ativação	100%
	superexpressão	100%
Fak	ativação	100%
	superexpressão	18, 56%
Foxo	ativação	100%
	superexpressão	100%
Nf1	superexpressão	11, 17%
p130Cas	ativação	100%
	superexpressão	100%
Pdk1	superexpressão	100%
Rage	ativação	100%
	superexpressão	100%
Slug	ativação	86, 22%
	superexpressão	100%
Src	superexpressão	100%
Tcf/Lef/Cbp	superexpressão	100%
Twist	superexpressão	64, 29%
Xiap	ativação	100%
	superexpressão	100%
Creb	deleção	100%
p90Rsk	deleção	100%
Caspase 9	deleção	100%
E-caderina	deleção	100%

TABELA B.10: **Novas mutações *driver* na condição de hipóxia.** Genes afetados e mutações correspondentes que capacitam a rede a evadir da apoptose induzida por hipóxia. Os nós já existentes na rede anterior estão em negrito.

Na superexpressão adotamos $\alpha = 2$.

B.6 Espaço dos fenótipos

Comparamos o espaço de fenótipos produzido pela nova rede com aquele produzido pela anterior (a do Capítulo 4). A rede anterior possui apenas 5 entradas ambientais, enquanto a presente possui 12. Portanto, o espaço dos fenótipos apresentado na Figura B.13 é apenas um subconjunto de um espaço formado por 4096 condições ambientais.

Na Figura B.13, as condições ambientais que levam a um fenótipo distinto daquele que levavam na rede anterior estão em vermelho. As modificações observadas são as seguintes:

- **Mudança do tipo de morte celular:** a escassez de nutrientes pode levar tanto à apoptose quanto à necrose. Na nova rede, os nós e as interações regulatórias associadas à necrose foram inseridas. Consequentemente, o fenótipo necrótico surge como destino de algumas das condições ambientais com escassez de nutrientes que, anteriormente, conduziam à apoptose.
- **Aumento da biestabilidade:** várias das condições ambientais que apresentavam como única resposta a apoptose, agora também podem levar a um fenótipo quiescente.

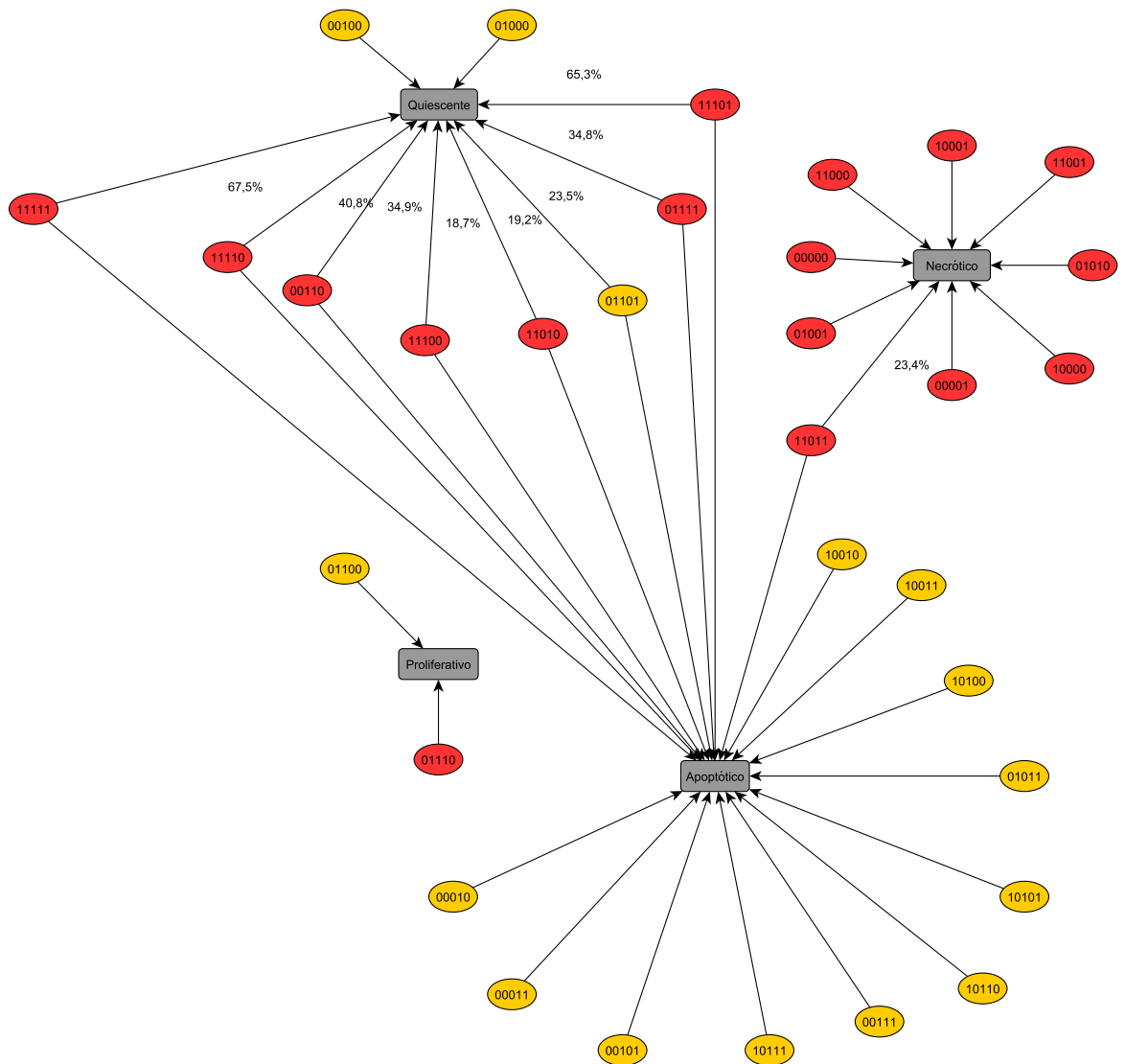


FIGURA B.13: **Espaço dos fenótipos.** Espaço dos fenótipos produzido pela nova rede com as mesmas 32 condições ambientais analisadas para a rede anterior. As condições ambientais que apresentam alguma mudança, como levarem a outro fenótipo, estão em vermelho.

Referências Bibliográficas

- [1] R. Weinberg. *The biology of cancer*. Garland Science, 2013.
- [2] F. Bunz. *Principles of cancer genetics*. Springer, 2008.
- [3] S. Pelengaris and M. Khan. *The molecular biology of cancer: A bridge from bench to bedside*. John Wiley & Sons, 2013.
- [4] S. L. Murphy, J. Xu, and K. D. Kochanek. Deaths: final data for 2010. *Natl. Vital. Stat. Rep.*, 61(4), 2013.
- [5] J. P. Capp. *Nouveau regard sur le cancer : pour une révolution des traitements*. Coll. Pour la science, 2012.
- [6] P. A. Futreal et al. A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer*, 4(3):177–183, 2004.
- [7] C. Carrillo-Infante, G. Abbadessa, L. Bagella, and A. Giordano. Viral infections as a cause of cancer (review). *Int. J. Oncol.*, 30(6):1521–1528, 2007.
- [8] Cancer research uk, 2014. URL <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/incidence/age/#Cancer>.
- [9] D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000.
- [10] S. A. Forbes et al. The catalogue of somatic mutations in cancer (cosmic). *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, pages 10–11, 2008.
- [11] N. Normanno et al. Epidermal growth factor receptor (egfr) signaling in cancer. *Gene*, 366(1):2–16, 2006.

-
- [12] K. Rajalingam, R. Schreck, U. R. Rapp, and Š. Albert. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim. Biophys. Acta*, 1773(8):1177–1195, 2007.
- [13] G. L. Nicolson. Autocrine and paracrine growth mechanisms in cancer progression and metastasis. *Encyclopedia of Cancer, 2nd edition. Bertino JR (ed.), Elsevier Science Ltd.: San Diego, CA*, pages 165–177, 2002.
- [14] R. Derynck, R. J. Akhurst, and A. Balmain. Tgf- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.*, 29(2):117–129, 2001.
- [15] P. I. Knaus et al. A dominant inhibitory mutant of the type ii transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous t-cell lymphoma. *Mol. Cell. Biol.*, 16(7):3480–3489, 1996.
- [16] R. J. Akhurst and R. Derynck. Tgf- β signaling in cancer—a double-edged sword. *Trends Cell Biol.*, 11(11):S44–S51, 2001.
- [17] S. Elmore. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4):495–516, 2007.
- [18] L. M. Franks and N. M. Teich. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Oxford University Press, 1997.
- [19] P. H. Raven and G. B. Johnson. *Biology 6 ed.* McGraw-Hill Higher Education, 2001.
- [20] J. C. Martinou and R. J. Youle. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell*, 21(1):92–101, 2011.
- [21] F. A. Fagagna et al. A dna damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963):194–198, 2003.
- [22] R. C. Allsopp et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *PNAS*, 89(21):10114–10118, 1992.
- [23] H. Jiang, Z. Ju, and K. L. Rudolph. Telomere shortening and ageing. *Z. Gerontol. Geriatr.*, 40(5):314–324, 2007.
- [24] A. A. Qutub et al. Multiscale models of angiogenesis. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, 28(2):14–31, 2009.

- [25] T. Alarcón, H. M. Byrne, and P. K. Maini. A cellular automaton model for tumour growth in an inhomogeneous environment. *J. Theor. Biol.*, 225: 257—274, 2003.
- [26] W. Risau. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386:871—875, 1997.
- [27] Rattcliffe P. Pugh, C. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the hif system. *Nat. Med.*, 9:677—684, 2003.
- [28] V. Gocheva et al. Il-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.*, 24(3):241–255, 2010.
- [29] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674, 2011.
- [30] D. L. Nelson, A. L. Lehninger, and M. M. Cox. *Principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- [31] A. B. Gjuvslund, E. Plahte, and S. W. Omholt. Threshold-dominated regulation hides genetic variation in gene expression networks. *BMC Syst. Biol.*, 1(1):57, 2007.
- [32] L. Bintu et al. Transcriptional regulation by the numbers: applications. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15(2):125–135, 2005.
- [33] J. M. Bower and H. Bolouri. *Computational modeling of genetic and biochemical networks*. MIT press, 2001.
- [34] F. Hinkelmann and A. S. Jarrah. Inferring biologically relevant models: Nested canalizing functions. *ISRN Biomath.*, 2012:Article ID 613174, 2012.
- [35] W. Just, I. Shmulevich, and J. Konvalina. The number and probability of canalizing functions. *Physica D*, 197(3):211–221, 2004.
- [36] F. Li et al. The yeast cell-cycle network is robustly designed. *PNAS*, 101(14):4781–4786, 2004.
- [37] M. I. Davidich and S. Bornholdt. Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. *PloS one*, 3(2):e1672, 2008.
- [38] S. Bornholdt. Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *J. R. Soc. Interface.*, 5(Suppl 1):S85–S94, 2008.

- [39] S. A. Kauffman. The origin of order, 1993.
- [40] A. Ay and D. N. Arnosti. Mathematical modeling of gene expression: a guide for the perplexed biologist. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 46(2): 137–151, 2011.
- [41] Ž. Kurtanjek and A. J. Tušek. Mathematical modelling of gene regulatory networks. In *Ap. Biolog. Engin.Princ. Pract.* InTech, 2012.
- [42] A. W. Rives and T. Galitski. Modular organization of cellular networks. *PNAS*, 100(3):1128–1133, 2003.
- [43] M. Osaki, M. Oshimura, and H. Ito. Pi3k-akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9(6):667–676, 2004.
- [44] M. D. Gordon and R. Nusse. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 281(32): 22429–22433, 2006.
- [45] J. R. Nevins. The rb/e2f pathway and cancer. *Hum. Mol. Gen.*, 10(7): 699–703, 2001.
- [46] G. L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1 (hif-1) pathway. *Sci. Signal.*, 2007(407):cm8, 2007.
- [47] S. Boccaletti et al. Complex networks: Structure and dynamics. *Phys. Rep.*, 424:175–308, 2006.
- [48] C.V. Dang et al. The interplay between myc and hif in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 8(1):51–56, 2008.
- [49] L. T. McGillicuddy et al. Proteasomal and genetic inactivation of the nf1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer Cell*, 16(1):44–54, 2009.
- [50] G. I. Evan and K. H. Vousden. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835):342–348, 2001.
- [51] U. Lendahl, K. L. Lee, H. Yang, and L. Poellinger. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat. Rev. Genet.*, 10(12):821–832, 2009.
- [52] W. G. An et al. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature*, 392(6674):405–408, 1998.

- [53] K. Spring et al. Mice heterozygous for mutation in *atm*, the gene involved in ataxia-telangiectasia, have heightened susceptibility to cancer. *Nat. Genet.*, 32(1):185–190, 2002.
- [54] L. A. Loeb. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 61(8):3230–3239, 2001.
- [55] J. Luo, N. L. Solimini, and S. J. Elledge. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5):823–837, 2009.
- [56] Z. Mai and H. Liu. Boolean network-based analysis of the apoptosis network: irreversible apoptosis and stable surviving. *J. Theor. Biol.*, 259(4):760–769, 2009.
- [57] T. Santarius et al. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer*, 10(1):59–64, 2010.
- [58] M. R. Stratton, P. J. Campbell, and P. A. Futreal. The cancer genome. *Nature*, 458(7239):719–724, 2009.
- [59] P. J. Stephens et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, 486(7403):400–404, 2012.
- [60] S. Banerji et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, 486(7403):405–409, 2012.
- [61] T. Sjöblom et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 314(5797):268–274, 2006.
- [62] Cancer Genome Atlas Research Network et al. Integrated genomic analysis of ovarian carcinoma. *Nature*, (474):609–615, 2011.
- [63] E. D. Pleasance et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*, 463(7403):184–190, 2010.
- [64] Cancer Genome Atlas Research Network et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455:1061–1068, 2008.
- [65] Cancer Genome Atlas Research Network et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489:519–525, 2008.

- [66] Cancer Genome Atlas Research Network et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 467:330–337, 2012.
- [67] M. L. Martins, S. C. Ferreira Jr., and M. J. Vilela. Multiscale model for biological systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 15:18–23, 2010.
- [68] S. C. Ferreira Jr, M. L. Martins, and M. J. Vilela. Reaction-diffusion model for the growth of avascular tumor. *Phys. Rev. E*, 65(2):021907, 2002.
- [69] S. C. Ferreira Jr. Modelos de reação difusão para o crescimento de tumores. *Tese de Doutorado, UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais*, 2003.
- [70] A. A. Patel, E. T. Gawlinski, S. K. Lemieux, and R. A. Gatenby. A cellular automaton model of early tumor growth and invasion: the effects of native tissue vascularity and increased anaerobic tumor metabolism. *J. Theor. Biol.*, 213(3):315–331, 2001.
- [71] S. F. Gilbert. Developmental biology. *Sunderland, Mass.: Sinauer Associates*, 749, 2000.
- [72] P. Held. An introduction to reactive oxygen species. *BioTek White Paper*, 2010.
- [73] H. Y. Lim et al. Ros regulate cardiac function via a distinct paracrine mechanism. *Cell Rep.*, 7(1):35–44, 2014.
- [74] H. D. Ryoo, T. Gorenc, and H. Steller. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the jnk and the wingless signaling pathways. *Dev. Cell*, 7(4):491–501, 2004.
- [75] C. D. Gregory and J. D. Pound. Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. *J. Pathol.*, 223(2):178–195, 2011.
- [76] Francis Rodier and Judith Campisi. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.*, 192(4):547–556, 2011.
- [77] S. Y. Proskuryakov and V. L. Gabai. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr. Pharm. Des.*, 16(1):56–68, 2010.
- [78] C. Nardella et al. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer*, 11(7):503–511, 2011.

- [79] G. Brouckaert et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol. Cell*, 15(3):1089–1100, 2004.
- [80] W. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling, and B. Flannery. Numerical recipes in fortran 77: The art of scientific computing, 933 pp, 1992.
- [81] J. J. Casciari, S. V. Sotirchos, and R. M. Sutherland. Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular ph. *J. Cell. Physiol.*, 151(2):386–394, 1992.
- [82] L. M. Sander and T. S. Deisboeck. Growth patterns of microscopic brain tumors. *Phys. Rev. E*, 66(5):051901, 2002.
- [83] S. H. Dairkee et al. Selective cell culture of primary breast carcinoma. *Cancer Res.*, 55(12):2516–2519, 1995.
- [84] K. Groebe, S. Erz, and W. Mueller-Klieser. Glucose diffusion coefficients determined from concentration profiles in emt6 tumor spheroids incubated in radioactively labeled l-glucose. In *Oxygen Transport to Tissue XVI*, pages 619–625. Springer, 1994.
- [85] F. Zhang et al. Correlation between cell growth rate and glucose consumption determined by electrochemical monitoring. *Sensors Actuat. B-Chem.*, 156(1):416–422, 2011.
- [86] H. Jiang, Z. Ju, and K. L. Rudolph. Telomere shortening and ageing. *Z. Gerontol. Geriat.*, 40(5):314–324, 2007.
- [87] Peprotech. Recombinant human wnt-1, 2015. URL <http://www.peprotech.com/en-US/Pages/Product/120-17>.
- [88] J. C. Arciero, T. L. Jackson, and D. E. Kirschner. A mathematical model of tumor-immune evasion and sirna treatment. *Discrete Cont. Dyn-B*, 4(1): 39–58, 2004.
- [89] W. Chen et al. Tgf- β released by apoptotic t cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*, 14(6), 2001.
- [90] L. M. Wakefield et al. Distribution and modulation of the cellular receptor for transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.*, 105(2):965–975, 1987.

- [91] T. Gebhardt et al. Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor β 1. *Gut*, 54(7):928–934, 2005.
- [92] A. Waage et al. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J. Exp. Med.*, 169(1):333–338, 1989.
- [93] S. C. Lee et al. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. differential induction by lipopolysaccharide and il-1 beta. *J. Immunol.*, 150(7):2659–2667, 1993.
- [94] M. Fiala et al. Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across human blood-brain barrier model. *Molec. Med.*, 4:480–489, 1998.
- [95] C. Q. Earl, J. M. Stadel, and M. A. Anzano. Tumor necrosis factor-mediated biological activities involve a g-protein-dependent mechanism. *J. Immunother.*, 9(4):361–hyhen, 1990.
- [96] S. Kudo, K. Mizuno, and T. Shimizu. Clearance and tissue distribution of recombinant human interleukin 1 beta in rats. *Cancer Res.*, 50(18):5751–5755, 1990.
- [97] M. J. Clemens, A. G. Morris, and A. J. H. Gearing. *Lymphokines and interferons: A practical approach*. IRL Press Washington DC, 1987.
- [98] L. Zandarashvili et al. Real-time kinetics of high-mobility group box 1 (hmgbl) oxidation in extracellular fluids studied by in situ protein nmr spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 288(17):11621–11627, 2013.
- [99] D. Yang et al. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol.*, 81(1):59–66, 2007.
- [100] M. Glden et al. Cytotoxic potency of h2o2 in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic. Biol. Med.*, 49(8):1298–1305, 2010.
- [101] G. M. Cooper. *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates Sunderland, 2000.

- [102] Y. Tago et al. Escherichia coli mutator delta pola is defective in base mismatch correction: The nature of in vivo dna replication errors. *J. Mol. Biol.*, 351(8):299–308, 2005.
- [103] R. Milo et al. Bionumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucl. Ac. Res.*, 38(suppl 1):D750–D753, 2010.
- [104] G. B. Filho. *Bogliolo patologia geral*. Guanabara Koogan, 1998.
- [105] J. Zhou and Y. Du. Acquisition of resistance of pancreatic cancer cells to 2-methoxyestradiol is associated with the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Mol. Cancer Res.*, 10(6):768–777, 2012.
- [106] Z. Herceg and Z. Q. Wang. Failure of poly (adp-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 19(7):5124–5133, 1999.
- [107] M. Los et al. Activation and caspase-mediated inhibition of parp: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell*, 13(3):978–988, 2002.
- [108] N. Kostova et al. The expression of hmgb1 protein and its receptor rage in human malignant tumors. *Mol. Cell. Biochem.*, 337(1-2):251–258, 2010.
- [109] R. Kang et al. Hmgb1 in cancer: good, bad, or both? 19(15):4046–4057, 2013.
- [110] A. G. Knudson. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68(4):820–823, 1971.
- [111] A. K. Meeker et al. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 10(10):3317–3326, 2004.
- [112] A. K. Meeker and other. Telomere shortening occurs in subsets of normal breast epithelium as well as in situ and invasive carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 164(3):925–935, 2004.
- [113] L. A. Loeb. Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv. Cancer. Res.*, 72:25–56, 1997.
- [114] Z. Ding et al. Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. *Cell*, 148(5):896–907, 2012.

- [115] S. Negrini, V. G. Gorgoulis, and T. D. Halazonetis. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 11(3):220–228, 2010.
- [116] M. Macheret and T. D. Halazonetis. Dna replication stress as a hallmark of cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 10:425–48, 2015.
- [117] W. Bodmer. Genetic instability is not a requirement for tumor development. *Cancer Res.*, 68(10):3558–3561, 2008.
- [118] E. V. Prochownik et al. Commonly occurring loss and mutation of the *mx1* gene in prostate cancer. *Gene. Chromosome. Canc.*, 22(4):295–304, 1998.
- [119] X. J. Li et al. *Mxi1* mutations in human neurofibrosarcomas. *Cancer Sci.*, 90(7):740–746, 1999.
- [120] J. Downward. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 3(1):11–22, 2003.
- [121] J. Vinagre et al. Frequency of *tert* promoter mutations in human cancers. *Nat. Commun.*, 4, 2013.
- [122] J. Koivunen, V. Aaltonen, and J. Peltonen. Protein kinase c (*pkc*) family in cancer progression. *Cancer Lett.*, 235(1):1–10, 2006.
- [123] C. Ortiz-Padilla et al. Functional characterization of cancer-associated *gab1* mutations. *Oncogene*, 32(21):2696–2702, 2013.
- [124] I. Seiden-Long et al. *Gab1* but not *grb2* mediates tumor progression in *met* overexpressing colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(3):647–655, 2008.
- [125] P. A. Pérez-Mancera et al. *Slug* in cancer development. *Oncogene*, 24(19):3073–3082, 2005.
- [126] L. W. Thomas, C. Lam, and S. W. Edwards. *Mcl-1*; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.*, 584(14):2981–2989, 2010.
- [127] Atlas of Genetics, Cytogenetics in Oncology, and Haematology, . URL <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GRB2ID386ch17q25.html>.
- [128] Atlas of Genetics, Cytogenetics in Oncology, and Haematology, . URL <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/AGERID594ch6p21.html>.

- [129] K. Pietras and A. Östman. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell. Res.*, 316(8):1324–1331, 2010.
- [130] M. Erkan et al. The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr. Mol. Med.*, 12(3):288–303, 2012.
- [131] European Oncology Nursing Society. *Terapie biologiche e cancro: Una risorsa educativa per gli infermieri*. URL <http://www.cancernurse.eu/documents/EONSBiologicalTherapiesAndCancer-it.pdf>.
- [132] Nature Subject Areas. URL <http://www.nature.com/subjects/immunosurveillance>.
- [133] O. Warburg. On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191):309–314, 1956.
- [134] H. F. Fumiã and M. L. Martins. Boolean network model for cancer pathways: predicting carcinogenesis and targeted therapy outcomes. *PLoS one*, 8(7):e69008, 2013.
- [135] D. E. Christofferson and J. Yuan. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 22(2):263–268, 2010.
- [136] K. Oishi and E. Klavins. Framework for engineering finite state machines in gene regulatory networks. *ACS Synth. Biol.*, 3(9):652–665, 2014.
- [137] R. M. Bremnes et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 6(1):209–217, 2011.