

LETICIA RIBEIRO DE PAIVA

MODELAGEM MULTIESCALA PARA TRATAMENTO DE
TUMORES

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
2011

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, Prof. Marcelo e Prof. Silvio pela oportunidade e por tudo o que me ensinaram

Ao meu filhote Pedro, por iluminar meus dias

A minha mãe, que é minha inspiração

Ao Sidiney, por estar sempre ao meu lado

Aos professores, funcionários e colegas da física

A administração do GISC I e II

Ao Max pela elaboração das figuras que descrevem cada modelo

A CAPES pela bolsa, a Fapemig e ao CNPq e à Universidade Federal de Viçosa.

“Now this is not the end. It is not even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning.” *Winston Churchill, after Britain’s first victorious battle of World War II*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 Introdução	1
2 A biologia do câncer	4
2.1 A célula renegada	5
2.1.1 Proliferação descontrolada	5
2.1.2 Tornando-se imortal	6
2.1.3 Invadindo tecidos adjacentes	8
2.1.4 Obtendo energia	9
2.2 O combate ao câncer	10
2.2.1 O sistema imune e sua manipulação via imunoterapia	11
2.2.2 Remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia.	12
2.2.3 Nanopartículas quimioterápicas	12
2.2.4 Viroterapia: vírus que matam células tumorais	14
3 Modelo multiescala para crescimento de tumores avasculares	18
3.1 Cenário atual	19
3.2 Modelo para o crescimento de tumores <i>in situ</i>	19
3.3 Algoritmo e estimativa de parâmetros	25
3.4 Resultados e discussão	26
3.5 Conclusões	29

4	Modelo para viroterapia oncolítica - Descrição contínua dos vírus	30
4.1	Cenário atual	30
4.2	Modelo para viroterapia	31
4.3	Algoritmo e estimativa dos parâmetros	33
4.4	Resultados e discussão	35
4.5	Conclusões	43
5	Relações entre o vírus oncolítico e a dinâmica de crescimento do tumor	44
5.1	Cenário atual	45
5.2	Modelo para viroterapia com descrição discreta dos vírus	47
5.3	Algoritmo e estimativa dos parâmetros	49
5.4	Resultados e discussão	51
5.5	Conclusões	56
6	Um modelo para a resposta imune na viroterapia contra o câncer	58
6.1	Cenário atual	59
6.2	Modelo para resposta imune na viroterapia	60
6.3	Algoritmo e estimativa de parâmetros	64
6.4	Resultados e discussão	67
6.5	Conclusões	75
7	Modelando o tratamento de câncer com nanopartículas quimioterápicas	76
7.1	Cenário atual	76
7.2	Modelo para quimioterapia com nanopartículas de polímeros quiméricos	77
7.3	Algoritmo e estimativa de parâmetros	81
7.4	Resultados e discussão	84
7.5	Conclusões	89
8	Conclusões e Perspectivas	90
	Referências	92
A	Apêndices	104

LISTA DE FIGURAS

2.1	Como a célula cancerosa pode adquirir resistência à apoptose	7
2.2	Mecanismos de migração celular.	8
2.3	Efeitos de hiperpermeabilidade e retenção no tumor	13
2.4	A nanopartícula de CP-Dox	14
2.5	Estratégias para desenvolver vírus oncolíticos.	15
2.6	Viroterapia oncolítica.	16
3.1	Esquema do tecido.	20
3.2	Concentração de nutrientes na ausência de células cancerosas.	22
3.3	Formas funcionais das probabilidades.	24
3.4	Padrões histológicos de tumores e gerados pelo modelo.	27
3.5	Padrões gerados pelo modelo de crescimento de carcinomas <i>in situ</i>	28
4.1	Esquema da dinâmica de interação vírus e células cancerosas.	31
4.2	Comportamentos observados no modelo para viroterapia em tumores.	36
4.3	Distribuição espacial das células cancerosas após a viroterapia.	37
4.4	Comportamento dominante para T_l e θ_{inf} fixos em cada diagrama.	38
4.5	Comportamento dominante para $\gamma_v = 5 \times 10^{-3}$ e $\gamma_v = 10^{-2}$	39
4.6	Comportamentos dominantes em função de D_v e T_l	40
4.7	Probabilidades de cada comportamento.	41
4.8	Comportamento dominante para $\gamma_v = 5 \times 10^{-3}$ e $\theta_{inf} = 10^{-1}$	42
5.1	Padrões histológicos de tumores e obtidos pelo modelo.	46
5.2	Evolução do número de células cancerosas em cada tipo de tumor	47
5.3	Curvas de população para o tumor difuso	51
5.4	Probabilidade de sucesso do tratamento contra um tumor ramificado.	52
5.5	Probabilidade de sucesso da terapia em um tumor desconexo.	53
5.6	Probabilidade de sucesso da terapia em tumores compactos.	54
5.7	Probabilidade de sucesso em tumores compactos com $MOI = k = 2$	55

6.1	Esquema do modelo.	60
6.2	Estimativa de A_0	65
6.3	Probabilidade de erradicação do tumor sem células B	68
6.4	Curvas de população quando a terapia fracassa	69
6.5	Probabilidade de erradicação do tumor na ausência de células T	70
6.6	Probabilidade de erradicação do tumor	72
6.7	Padrões espaço-temporais	73
6.8	Curvas de população para uma terapia eficiente.	74
7.1	Esquema do modelo.	78
7.2	Concentração de CP-Dox no capilar	79
7.3	Viabilidade celular	81
7.4	Nanopartículas seletivas contra micrometástases.	85
7.5	Nanopartículas não-seletivas contra micrometástases.	86
7.6	Nanopartículas seletivas contra tumores vasculares.	87
7.7	Nanopartículas não-seletivas contra tumores vasculares.	88
7.8	Curvas de população	89
A.1	Algoritmo do modelo do cap. 3 para crescimento de tumores.	108
A.2	Diagramas de blocos para divisão e migração celular.	109
A.3	Algoritmo do modelo do cap. 4 para viroterapia.	110
A.4	Algoritmo do modelo do cap. 5 para viroterapia	111
A.5	Diagramas de blocos para infecção e lise de uma célula infectada (cap. 4)	112
A.6	Diagramas de blocos para infecção e lise de uma célula infectada (cap. 5)	112
A.7	Algoritmo do modelo do cap. 6 para a resposta imune na viroterapia	113
A.8	Diagramas de blocos para migração dos linfócitos	114
A.9	Algoritmo do modelo do cap. 7 para quimioterapia.	115

LISTA DE TABELAS

3.1	Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.	26
4.1	Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.	35
5.1	Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.	50
5.2	Parâmetros que caracterizam os tipos de tumores estudados	51
6.1	Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.	66
7.1	Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.	82

RESUMO

PAIVA, Leticia Ribeiro de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011.
Modelagem multiescala para tratamento de tumores. Orientador: Marcelo Lobato Martins Co-Orientadores: Silvio da Costa Ferreira Junior e Márcio Santos Rocha

Apesar dos progressos recentes em diagnóstico e tratamento de tumores, as taxas de sobrevivência de pacientes com tumores em regiões inacessíveis cirurgicamente, tumores recorrentes e que apresentam metástases são muito baixas. Na busca por tratamentos alternativos, a viroterapia oncolítica e o encapsulamento de drogas quimioterápicas em nanopartículas emergem como estratégias promissoras. Entretanto, vários processos e características fundamentais ainda precisam ser entendidos para aumentar a eficácia desses tratamentos. As não-linearidades e complexidades inerentes as interações tumor-vírus oncolítico ou tumor-droga são um convite a modelagem matemática. Modelos quantitativos permitem ampliar nosso entendimento dos parâmetros que influenciam o resultado da terapia, guiar experimentos indicando os processos fisiológicos mais relevantes e evitar experimentos em excesso. Os modelos multiescala para viroterapia apresentados e discutidos nessa tese sugerem quais características um vírus oncolítico deve possuir e quais as formas menos agressivas de modular a resposta imune antiviral para maximizar a probabilidade de erradicar o tumor. Quanto ao modelo para o tratamento com drogas quimioterápicas encapsuladas em nanopartículas, escolhemos as de polímeros quiméricos ligadas à droga doxorubicina, que estão atualmente em estudo. Usando os parâmetros que caracterizam essas partículas e os protocolos experimentais comumente usados para sua administração, nossos resultados indicam quais aspectos dessas nanopartículas devem ser desenvolvidos de modo a maximizar o sucesso da terapia.

ABSTRACT

PAIVA, Leticia Ribeiro de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011.
Multiscale modelling of tumor therapies. Advisor: Marcelo Lobato Martins
Co-Advisors: Silvio da Costa Ferreira Junior and Márcio Santos Rocha

Despite of the recent progress in cancer diagnosis and treatment, the survival rates of patients with tumors in unresectable locations, recurrent or metastatic tumors are still low. On the quest for alternative treatments, oncolytic virotherapy and encapsulation of chemotherapeutic drugs into nanoscale vehicles emerge as promising strategies. However, several fundamental process and issues still must be understood in order to enhance the efficacy of these treatments. The nonlinearities and complexities inherent to tumor-oncolytic virus and tumor-drug interactions claim for a mathematical approach. Quantitative models allow to enlarge our understanding of the parameters influencing therapeutic outcomes, guide essays by indicating relevant physiological processes for further investigation, and prevent excessive experimentation. The multiscale models for virotherapy presented and discussed in this thesis suggest the appropriate traits an oncolytic virus must have and the less aggressive ways to modulate the antiviral immune response in order to maximize the tumor eradication probability. Concerning the model for treatment with chemotherapeutic drugs encapsulated into nanoparticles, we focused on chimeric polymers attached with the doxorubicin drug, that recently are under active investigation. Using the same parameters that characterize these particles and the experimental protocols commonly used for their administration, our results indicate some of the basic features of these nanoparticles that should be developed in order to maximize the therapy's success.

Capítulo 1

Introdução

A física biológica usa diferentes abordagens teóricas e experimentais para estudar problemas biológicos e compreender os princípios físicos que governam esses processos. Por exemplo, técnicas experimentais como difração de raios-X, microscopia eletrônica e ressonância nuclear magnética podem ser usadas para elucidar a estrutura de biomoléculas, enquanto a elaboração e a análise de modelos matemáticos permitem estudar problemas como dinâmica de populações, redes de interações entre proteínas, crescimento de tumores, motores moleculares e enovelamento de proteínas. Esses modelos matemáticos podem usar mecânica para caracterizar propriedades mecânicas de moléculas (como a interação de uma molécula de DNA com uma droga ou proteína) ou para estudar as forças geradas em uma molécula durante processos como replicação e locomoção. A teoria de grafos pode ser aplicada ao estudo de redes de interação tão distintas como proteínas ou teias tróficas. Equações diferenciais são usadas para descrever concentrações de substâncias, como nutrientes ou drogas em um tecido, ou mesmo para descrever variações temporais de uma população, como as equações de Lotka-Volterra [1], que são um par de equações não-lineares de primeira ordem frequentemente usadas para descrever a dinâmica de sistemas biológicos nos quais duas espécies interagem como presa-predador. Uma outra abordagem teórica muito usada em processos biológicos é via autômatos celulares. Um autômato celular é um sistema em que o espaço e o tempo são discretos, assim como o número de estados que um sítio pode assumir. O estado de um sítio evolui de acordo com uma regra pré-estabelecida que considera o estado do próprio sítio e o de seus vizinhos em um passo de tempo para determinar o estado do sítio no passo seguinte. Autômatos celulares são usados para estudar processos como dinâmica de populações e formação de padrões.

Frequentemente, esses modelos matemáticos descrevem uma única escala bio-

lógica. Entretanto, organismos vivos são organizados em múltiplas escalas, interconectadas. Por exemplo, a descrição do crescimento de tumores pode envolver desde processos subcelulares e moleculares (escala microscópica), como mutações, alterações na expressão gênica, ciclo celular, passando por interações célula-célula e célula-matriz (escala mesoscópica) como a resposta imune e a angiogênese, até processos em escala de tecidos (escala macroscópica) como difusão de nutrientes e migração celular. Múltiplas escalas temporais também estão envolvidas: enquanto a sinalização celular pode ser da ordem de segundos, o crescimento do tumor pode levar de meses a anos. A modelagem multiescala permite integrar processos que ocorrem em escalas temporais e/ou espaciais distintas [2]. Isso pode ser feito, por exemplo, combinando-se abordagens tipo autômato celular com equações diferenciais.

Nessa tese, o crescimento e o tratamento do câncer serão estudados via modelagem multiescala. Apesar de todo o progresso recente em imageamento, diagnóstico, tratamento e compreensão do câncer, as taxas de sobrevivência de pacientes com neoplasias recorrentes ou metastáticas bem como de pacientes com tumores em regiões inacessíveis cirurgicamente ainda são baixas, e novas estratégias terapêuticas são necessárias [3]. A nanotecnologia permite o desenvolvimento de agentes anticâncer inovadores. Agentes quimioterápicos podem ser encapsulados em nanopartículas, que apresentam menor toxicidade. Isso permite reduzir os efeitos colaterais e aumentar a dose e o tempo de permanência da droga no corpo [4]. A viroterapia oncolítica é uma estratégia promissora no combate ao câncer, uma vez que é capaz de promover um controle ou mesmo erradicação de tumores com efeitos colaterais leves. Os vírus oncolíticos são capazes de infectar e matar seletivamente células tumorais explorando os mesmos defeitos celulares que promovem o crescimento do tumor [5]. O ponto de partida para nossa abordagem de múltiplas escalas é o modelo para crescimento de tumores proposto por Ferreira et al. [6], apresentado no capítulo 3. Um modelo para viroterapia em tumores compactos é apresentado e discutido no capítulo 4. É importante observar que esse trabalho foi publicado no periódico *Cancer Research* [7]. A seguir, no capítulo 5, um modelo modificado para viroterapia é aplicado em tumores com diferentes morfologias. Este trabalho será submetido em breve. Devido à importância do sistema imune na viroterapia oncolítica, no capítulo 6 propomos e estudamos um modelo para investigar o papel das respostas celular e humoral aos vírus e às células infectadas. Este trabalho foi submetido recentemente. No capítulo 7 apresentamos um modelo para estudar a eficácia de terapias anticâncer baseadas em nanopartículas de polímeros quiméricos. O artigo correspondente a esse trabalho foi publicado na *Ap-*

plied Physics Letters [8]. Finalmente algumas conclusões e o que está em andamento são discutidos no capítulo 8.

Capítulo 2

A biologia do câncer

Uma vez que os sistemas que queremos modelar são tumores e tratamentos anti-câncer, precisamos inicialmente conhecer melhor esses sistemas. Para descrever o desenvolvimento de um tumor precisamos ter noções sobre a fisiologia¹ das células tumorais e saber quais estratégias elas mais frequentemente usam para driblar os mecanismos de proteção do organismo e se proliferar.

Existem muitos tipos de câncer e, em um mesmo tumor, há diferentes subpopulações de células com fenótipos² distintos [9]. Portanto, a tarefa de propor mecanismos gerais que governem o comportamento dessas células parece bastante ambiciosa. Há cerca de 10 anos, Hanahan e Weinberg [10] propuseram seis alterações essenciais na fisiologia da célula que coletivamente ditam o crescimento maligno e que são compartilhadas pela maioria ou talvez por todos os tipos de tumores humanos. Essas capacidades que as células adquirem são: (i) auto-suficiência em sinais de crescimento, (ii) insensibilidade a sinais que inibem o crescimento, (iii) evasão da morte celular programada (apoptose), (iv) potencial replicativo ilimitado, (v) estimulação da angiogênese³ e (vi) invasão de tecidos e metástases⁴. Discutiremos nesse capítulo essas alterações e o que parece ser a sétima alteração essencial compartilhada pela maioria dos tumores: o metabolismo glicolítico.

Por fim, a viroterapia, que é um tratamento anti-câncer baseado em vírus que

¹A fisiologia é o ramo da biologia que estuda o funcionamento do organismo, ou seja, as funções mecânicas, físicas e bioquímicas nos seres vivos.

²O fenótipo é o conjunto de características observáveis de um organismo como, por exemplo: morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas ou fisiológicas e comportamento.

³Angiogênese é o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes.

⁴Metástase é o espalhamento da doença de um órgão ou região para outro órgão ou região não-adjacente

atacam seletivamente células cancerosas, é discutida em termos gerais. O objetivo desse capítulo é fornecer as bases biológicas necessárias para a elaboração dos modelos que serão apresentados nos capítulos seguintes.

2.1 A célula renegada

Um animal ou planta começa sua vida como uma única célula - um ovo fertilizado. Durante o seu desenvolvimento, essa célula se divide repetidas vezes para produzir células diferentes em um padrão final de complexidade e precisão espetacular. Em última análise, o genoma⁵ determina o padrão, e um dos desafios da biologia é entender como isso ocorre.

O exemplo mais complicado de dinâmica celular ocorre quando uma célula muda, ou se diferencia, para desempenhar uma função especializada [11]. Este processo frequentemente é marcado por uma alteração na aparência microscópica, ou morfologia, da célula. Um mamífero que começou com uma única célula torna-se um organismo com centenas de tipos diferentes de células. Aqui é possível ver o poder do DNA de controlar o comportamento celular: o desenvolvimento é um conjunto de dezenas de milhares de alterações orquestrado pelo DNA.

As seqüências genômicas estão sujeitas a alterações, chamadas de mutações, na sua estrutura e portanto na informação que carregam. Essas mutações ocorrem constantemente, mas existem mecanismos de reparo dessas mutações associados a outros mecanismos que disparam a morte celular programada caso o dano não possa ser reparado. Entretanto, podem acontecer falhas neste processo de manutenção da integridade do genoma levando à fixação de mutações em genes específicos, críticos para o câncer [9].

Essas mutações podem conferir habilidades especiais à célula cancerosa. Nesta seção, trataremos dos mecanismos que elas frequentemente usam para proliferar-se descontroladamente, escapar da morte, invadir outros tecidos e obter energia.

2.1.1 Proliferação descontrolada

Uma célula se reproduz realizando uma seqüência ordenada de eventos nos quais ela duplica seu conteúdo e então se divide em duas. Este ciclo de duplicação e divisão,

⁵O genoma é o conjunto de todo o material genético localizado no núcleo das células de um ser vivo. Ele é distribuído em cromossomos, que por sua vez são compostos por moléculas de DNA.

conhecido como ciclo celular, é um mecanismo pelo qual seres vivos se reproduzem. Em espécies unicelulares, tais como bactérias e leveduras, cada divisão celular produz um novo organismo. Em espécies multicelulares, seqüências longas e complexas de divisão celular são necessárias para produzir um organismo funcional.

Para reproduzirem-se, células normais necessitam de fatores de crescimento⁶ que em geral são produzidos por outro tipo de célula (estimulação parácrina). Entretanto, muitas células cancerosas adquirem a capacidade de sintetizar fatores de crescimento e até mesmo os receptores para os quais elas são sensíveis (estimulação autócrina) [10, 9, 12].

Por outro lado, múltiplos sinais antiproliferativos atuam em um tecido normal para manter a quiescência⁷ celular e a estabilidade do tecido. Células cancerosas adquirem a capacidade de escapar desses sinais ou ignorá-los, por exemplo, intervindo na via da proteína retinoblastoma (pRb), através da qual passam muitos desses sinais antiproliferativos [10].

Portanto, células cancerosas podem adquirir auto-suficiência em sinais de crescimento e se tornarem insensíveis a sinais que inibem sua proliferação.

2.1.2 Tornando-se imortal

A habilidade das populações de células tumorais de se expandirem em número é determinada não apenas pela taxa de proliferação celular, mas também pela taxa de redução do número de células. Em células normais, essa redução ocorre principalmente devido à apoptose, ou morte celular programada [9].

A morte celular programada é muito importante no controle da população por regular o crescimento e a multiplicação celulares. Ainda, a morte celular também elimina células desnecessárias. Ela segue um programa interno de eventos chamado apoptose, cujos primeiros sinais visíveis são a condensação do núcleo e a fragmentação do DNA. A célula logo contrai-se e é consumida por macrófagos⁸. Uma célula é induzida a cometer suicídio quando um fator essencial é removido do meio extracelular ou quando um sinal interno é ativado.

A resistência à apoptose pode ser adquirida pela célula cancerosa por meio de

⁶Um fator de crescimento é uma substância (em geral uma proteína ou um hormônio) capaz de estimular o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular.

⁷Quiescência é o estado da célula quando ela não está se dividindo

⁸Macrófagos são células de grandes dimensões que fagocitam (englobam) elementos estranhos ao corpo.

várias estratégias[10]. A mais comum delas envolve a inativação do gene supressor de tumor *p53*, um componente chave, sensor de danos ao DNA que pode induzir apoptose, como é mostrado na figura 2.1. Estudos [13] comprovam que a inativação do gene *p53* leva à instabilidade genética em células normais *in vitro* e *in vivo*.

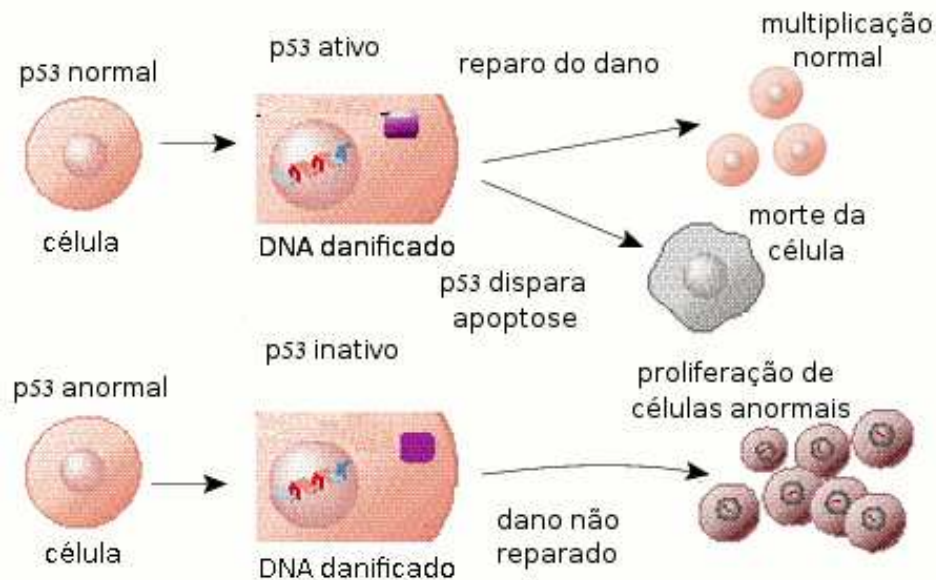


Figura 2.1: A resistência à apoptose pode ser adquirida por meio da inativação do gene *p53*.

Todas as células dos mamíferos carregam um programa intrínseco que limita o número de gerações de uma população celular [12]. Esse mecanismo é controlado pelos telômeros, que são segmentos de DNA nas extremidades dos cromossomos⁹. Eles sofrem um processo de encurtamento durante cada ciclo celular¹⁰. Após sucessivos ciclos, os telômeros perdem sua habilidade de proteger as extremidades do DNA cromossomal e essas extremidades desprotegidas podem se fundir, levando a um desarranjo no cariótipo (conjunto de cromossomos) e a um processo de crise que leva, quase inevitavelmente, à morte da célula [10]. Ou seja, os telômeros limitam a multiplicação celular. Contudo, as células malignas adquirem mecanismos de manutenção dos seus telômeros. A grande maioria delas expressa telomerase, que adiciona nucleotídeos repetidos nas extremidades do DNA telomérico impedindo, assim, que o processo de crise seja

⁹Um cromossomo é uma longa sequência de DNA, que contém vários genes, e outras sequências de nucleotídeos com funções específicas nas células dos seres vivos.

¹⁰O ciclo celular é uma série de eventos que ocorrem em uma célula e que levam a sua divisão

desencadeado. Dessa forma, as células malignas podem multiplicar-se ilimitadamente [10].

2.1.3 Invadindo tecidos adjacentes

Durante o desenvolvimento de um tumor, as células tumorais podem adquirir a capacidade de invadir tecidos adjacentes, viajar através da circulação sanguínea ou linfática¹¹ e estabelecer novos tumores pelo corpo. Este processo, denominado metástase, está relacionado a moléculas de adesão célula-célula e integrinas [10]. A proteína caderina E, por exemplo, tem como função primária a adesão célula-célula e a supressão do gene que a codifica pode favorecer as células cancerosas por contribuir para a invasividade local. Integrinas são proteínas transmembrana que conectam ligantes encontrados na matriz extracelular¹². Elas recebem esse nome pois integram a função da célula com o meio exterior, que é a matriz extracelular.

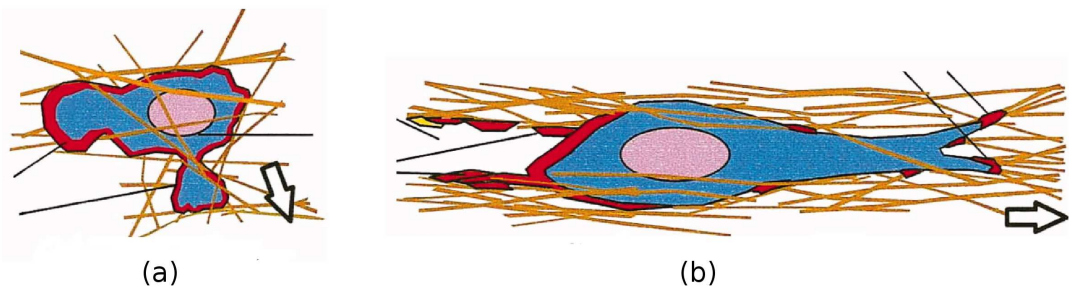


Figura 2.2: Diagrama esquemático mostrando os mecanismos de migração (a) amebóide e (b) mesenquimal (tipo-fibroblasto) na matriz extracelular. A seta indica a direção de migração da célula. Os receptores de superfície da célula, como integrinas ou outras moléculas de adesão, são mostrados na figura em vermelho. Figura adaptada de [14].

Células tumorais movem-se em seu microambiente e invadem tecidos vizinhos usando dois processos distintos: mesenquimal e amebóide, que estão esquematizados na figura 2.2. A migração mesenquimal depende da proteólise¹³ da matriz extracelu-

¹¹O sistema linfático é uma rede complexa que produz e transporta o fluido linfático, ou linfa, constituída essencialmente pelo plasma sanguíneo, proteínas e por glóbulos brancos.

¹²A matriz extracelular pode ser visualizada como uma rede ou um tecido, e é composta por uma grande variedade de moléculas que preenchem o espaço entre as células.

¹³A proteólise (*proteo-*, proteína, *-lise* do grego *lúsis*, separação, dissolução) é o processo de degradação (digestão) de proteínas por enzimas, chamadas proteases, ou por digestão intramolecular.

lar. Ou seja, para passar através da matriz extracelular, a célula quebra partes dessa rede, reorganizando-a. Por outro lado, a migração “amebóide” requer menor adesão célula-substrato e atinge velocidades maiores. Esse modo de migração, que principalmente deforma a matriz extracelular ao invés de apenas degradá-la, é caracterizado pela forma circular da célula e o aparecimento de protuberâncias na membrana [15]. No corpo humano, células do sistema imune como linfócitos movem-se principalmente pelo processo amebóide [14].

2.1.4 Obtendo energia

Enquanto o tumor permanece pequeno - com menos de $1mm$ de diâmetro - ele pode se valer da difusão para sua demanda constante de alimentação e oxigênio e para se livrar dos resíduos de seu próprio metabolismo. No entanto, uma vez que o tumor atinge o tamanho crítico de 1 a $2mm$, o processo de difusão é insuficiente para suprir o tumor com nutrientes e oxigênio e para uma rápida remoção de seus resíduos. As células no interior do tumor ficam famintas e são sufocadas por seus próprios refugos. A hipóxia no tumor induzirá o crescimento de novos vasos, processo chamado de angiogênese ou neovascularização. Por meio desses novos vasos a entrada de nutrientes e a saída de catabólitos (resíduos oriundos do metabolismo) tornam-se mais eficientes. Os capilares¹⁴ também serão importantes para o transporte de fatores de crescimento estimuladores de divisão e facilitarão a metástase. Os vasos capilares são construídos a partir de células endoteliais¹⁵, capazes de se achatar e se curvar em tubos, que se unem para formar capilares. O tumor promove angiogênese liberando proteínas como o fator de crescimento fibroblástico e o fator de crescimento endotelial vascular [16]. Essas proteínas, conhecidas como fatores tumorais de angiogênese, difundem nos tecidos vizinhos e ligam-se a receptores na membrana das células endoteliais. A ativação dessas células promove a secreção de enzimas que degradam a matriz extracelular facilitando a migração das células endoteliais em direção ao tumor, por meio de uma resposta quimiotática¹⁶ aos fatores tumorais de angiogênese.

Entretanto esta nova vascularização é insuficiente e caótica. Isso perpetua os

¹⁴Capilares são vasos sanguíneos de diâmetro muito pequeno (5 a $10\mu m$), por meio dos quais oxigênio e nutrientes são liberados para as células e resíduos do seu metabolismo são captados.

¹⁵Células endoteliais são células achatadas de espessura variável que recobrem o interior dos vasos sanguíneos, especialmente os capilares, constituindo parte da sua parede.

¹⁶Quimiotaxia é o nome dado ao processo de locomoção de células em direção a um gradiente químico.

fatores que estimularam sua indução. Além disso, células cancerosas crescem mais rapidamente que os vasos sanguíneos para nutri-las. Portanto, à medida que tumores sólidos crescem, eles se tornam incapazes de obter oxigênio de modo eficiente, sofrendo hipóxia. Sob estas condições, a glicólise torna-se a fonte primária de ATP (adenosina trifosfato), que é a molécula mais importante para obter e transferir energia livre em sistemas biológicos. Açúcares são moléculas de combustível especialmente importantes, uma vez que sua degradação (em particular a da glicose) domina a produção de energia na maioria das células animais. Na presença de oxigênio, eles são oxidados em pequenas etapas até dióxido de carbono (CO_2) e água e há um ganho total de 36 moléculas de ATP. Entretanto, a glicose pode ser degradada mesmo na ausência de oxigênio, em uma sequência de reações conhecida como glicólise. Ela ocorre no citosol¹⁷ da maioria das células e, durante o processo, uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de piruvato e há um ganho líquido de apenas 2 moléculas de ATP.

É bem estabelecido que tumores exibem taxas de consumo de glicose e glicólise aumentadas [17]. A glicólise é feita de modo mais eficiente em tumores hipóxicos pela ação de um fator de transcrição (*HIF* – 1, do inglês “hypoxia-inducible transcription factor”). Na ausência de oxigênio, o *HIF* – 1 aumenta a expressão da maioria das enzimas glicolíticas e de transportadores de glicose. De fato, o consumo de glicose está relacionado a agressividade do tumor. Essas adaptações das células cancerosas permitem ao tumor sobreviver até que a vascularização ocorra. O fator *HIF* – 1 também estimula o crescimento de novos tumores aumentando a expressão de moléculas sinalizadoras, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que facilita o crescimento de vasos sanguíneos. Sem tal vascularização, o tumor interromperia seu crescimento, morrendo ou permanecendo inofensivo [17].

Apesar de haver indicações de que o metabolismo glicolítico seja o resultado da adaptação ao microambiente do tumor, sua persistência mesmo em condições normais de disponibilidade de oxigênio sugere que esse fenótipo fornece uma grande vantagem seletiva para a progressão do tumor a um câncer invasivo [18].

2.2 O combate ao câncer

A primeira linha de defesa do corpo contra o câncer está nos processos de manutenção da integridade do genoma. Entretanto, se uma ou mais células tumorais

¹⁷O citosol é o líquido que preenche o citoplasma, espaço entre a membrana plasmática e o núcleo das células vivas, que suporta bolsas, canais e organelas citoplasmáticas.

conseguiram burlar esses processos e sustentar as mutações adquiridas, o corpo tem uma última barreira: o sistema imune.

Se, apesar dos mecanismos de defesa do corpo, o tumor conseguiu se estabelecer, existem vários tratamentos disponíveis para eliminar as células cancerosas. A maioria dos tratamentos utilizados hoje se baseia em cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia, apesar de várias outras abordagens estarem em estudo. A procura por novos tratamentos visa diminuir os efeitos colaterais das terapias estabelecidas e propor alternativas para metástases, que ainda são responsáveis pela maioria das mortes por câncer [19], tumores recorrentes ou localizados em regiões cirurgicamente inacessíveis.

2.2.1 O sistema imune e sua manipulação via imunoterapia

Se todos os mecanismos de manutenção da integridade do genoma foram burlados pelas células cancerosas e uma ou mais células foram capazes de sustentar as mutações adquiridas, uma das últimas barreiras de defesa do corpo contra o câncer é a atividade do sistema imune.

O sistema imune é uma rede de processos e estruturas biológicas em um organismo que o protege contra doenças identificando e eliminando patógenos¹⁸ e células tumorais. As células transformadas de tumores expressam antígenos¹⁹ que não são encontrados em células normais. O sistema imune identifica esses antígenos como estranhos, e ataca essas células transformadas. Apesar disso, alguns tumores escapam da resposta imune, usando estratégias como a liberação de produtos que inibem a resposta imune (por exemplo a citocina $TGF - \beta$, que suprime a atividade de macrófagos e linfócitos²⁰).

O papel do sistema imune no desenvolvimento de tumores ainda está longe de ser completo e muitos paradoxos e conceitos permanecem incompreendidos [19]. Macrófagos e neutrófilos²¹, por exemplo, podem ser considerados tanto heróis quanto vilões no contexto de desenvolvimento tumoral. Por um lado, essas células são capazes de fagocitar células tumorais e de secretar citocinas que inibem o crescimento do tumor. Entretanto, estudos epidemiológicos associaram inflamação crônica à incidência tumoral [20, 21] e há trabalhos mostrando que neutrófilos ativados podem induzir a

¹⁸Um patógeno é um agente biológico que causa doença em seu hospedeiro

¹⁹Um antígeno é toda partícula ou molécula capaz de iniciar uma resposta imune.

²⁰Macrófagos e linfócitos são células do sistema imune

²¹Neutrófilos são uma classe de células do sistema imune; são os principais fagócitos do sangue (células que ingerem e destroem matéria estranha ao organismo) e participam da reação inflamatória.

transformação de células normais em cancerosas *in vitro* [22, 23].

A imunoterapia tem como objetivo usar a resposta imune para combater tumores. O uso de vacinas contra o câncer pode ser promissor, e resultados positivos foram obtidos com a transferência de linfócitos T capazes de identificar e atacar o tumor. Além disso, o transplante de medula óssea tem sido usado como imunoterapia de tumores sólidos com resultados encorajadores [24].

2.2.2 Remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia.

As abordagens mais utilizadas no combate ao câncer são a remoção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia. A remoção cirúrgica é incapaz de eradicar as metástases e tumores em regiões cirurgicamente inacessíveis.

A radioterapia usa radiação de alta energia para matar células cancerosas danificando seu DNA. A radioterapia afeta também células normais, causando efeitos colaterais como fibrose, perda de memória, infertilidade e, mais raramente, um segundo câncer devido a exposição a radiação [25]. A radiação usada para combater o câncer pode vir de uma máquina fora do corpo, ou vir de um material radioativo inserido no corpo próximo as células tumorais ou ainda ser injetado na corrente sanguínea.

Quimioterapia é o uso de drogas que danificam e matam células em divisão. Células cancerosas dividem-se muito mais frequentemente que a maioria das células normais, então a quimioterapia afeta principalmente células cancerosas. Entretanto, ela afeta também células normais em divisão, o que pode levar a efeitos colaterais como anemia, perda de cabelos e neutropenia (baixo número de células do sistema imune que combatem infecções). Um grande obstáculo para a quimioterapia é sua deficiência em distribuir doses adequadas de droga às áreas afetadas do corpo [4].

Essas três estratégias não são mutuamente exclusivas. Um paciente pode receber radioterapia antes, durante ou após a cirurgia, dependendo do tipo de câncer sendo tratado. A quimioterapia pode ser usada para reduzir o tamanho de um tumor antes da remoção cirúrgica ou da terapia por radiação. Ou ainda para destruir células cancerosas que sobreviveram a cirurgia ou a radioterapia. E alguns pacientes recebem radioterapia em combinação com quimioterapia.

2.2.3 Nanopartículas quimioterápicas

O maior obstáculo à quimioterapia é sua deficiência em distribuir doses adequadas de droga às áreas afetadas no corpo. A toxicidade das drogas limita sua dose,

enquanto a sua rápida eliminação da circulação requer doses altas para que seja efetiva [4]. Uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer têm surgido com a nanotecnologia.

Encapsular drogas quimioterápicas em polímeros nanométricos é uma estratégia que permite aumentar a dose da droga e reduzir os seus efeitos colaterais. A vasculatura tumoral apresenta uma hiperpermeabilidade que permite o extravasamento de macromoléculas, como os nanomateriais poliméricos. Além disso, o fraco sistema de drenagem linfática no tumor resulta na sua gradual acumulação. Portanto, as nanopartículas acumulam-se em tumores sólidos, como pode ser visto na figura 2.3. E mais, elas são menos tóxicas, uma vez que o encapsulamento da droga limita sua interação com células normais [4]. E uma menor toxicidade permite o aumento da dose.

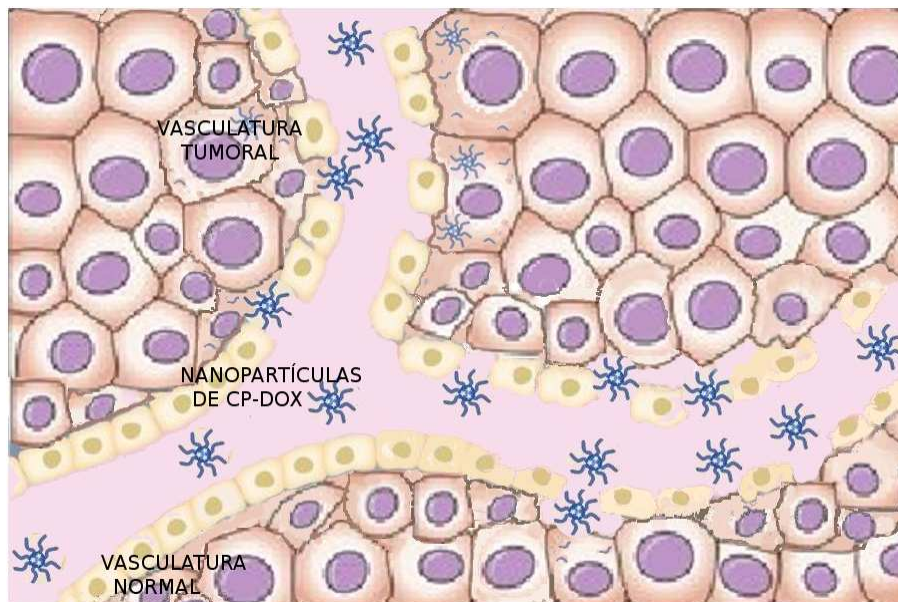


Figura 2.3: A hiperpermeabilidade da vasculatura tumoral permite o extravasamento da nanopartícula, que ficará retida no tumor devido a sua deficiente drenagem linfática. Uma vez dentro da célula, a ligação polímero-droga é quebrada e a droga quimioterápica é liberada.

Polímeros quiméricos consistem de um polipeptídeo hidrofílico, biodegradável e tipo-elastina ²² e um segmento curto que permite a conjugação com diversas moléculas hidrofóbicas, incluindo quimioterápicos. A hidrofobicidade da droga desencadeia a formação espontânea da nanopartícula com a droga no centro cercada pelo polipeptídeo

²²polipeptídeos tipo-elastina são uma classe de polímeros de peptídeos artificiais

hidrofílico [26]. Esta formação pode ser visualizada na figura 2.4.

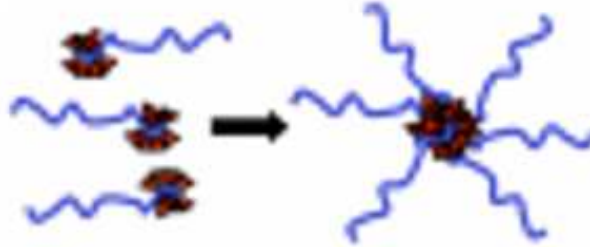


Figura 2.4: A formação espontânea da nanopartícula de CP-Dox é desencadeada pela hidrofobicidade da droga, que fica encapsulada pelo polipeptídeo hidrofílico. Figura extraída de [26]

2.2.4 Viroterapia: vírus que matam células tumorais

Apesar de apresentar muitos resultados positivos, as terapias tradicionais contra o câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, baseiam-se principalmente em agentes que danificam o DNA e a maquinaria que mantém a integridade dos cromossomos das células tumorais. Esses tratamentos matam preferencialmente células cancerosas que têm menor capacidade de sobreviver a danos, selecionando assim as células mais agressivas do tumor. Aliados a isso, os efeitos colaterais desses tratamentos são frequentemente graves, motivando o desenvolvimento de novas estratégias na luta contra o câncer. Uma terapia promissora é baseada em vírus modificados em laboratório para atacar seletivamente as células cancerosas [27]. Há vários processos que conferem aos vírus oncolíticos essa seletividade por células cancerosas. Por exemplo, eles podem ser projetados para que sejam capazes de entrar apenas em células cancerosas, ou podem ser desenvolvidos de modo que consigam penetrar tanto em células normais quanto em cancerosas, mas capazes de se replicar apenas em células cancerosas. Essas estratégias são mostradas na figura 2.5. A viroterapia não é uma idéia nova, ela surgiu quando alguns médicos notaram que alguns pacientes que sofriam de câncer, quando incidentalmente adquiriam certas infecções virais ou eram submetidos a vacinação, melhoravam e seus sintomas regrediam.

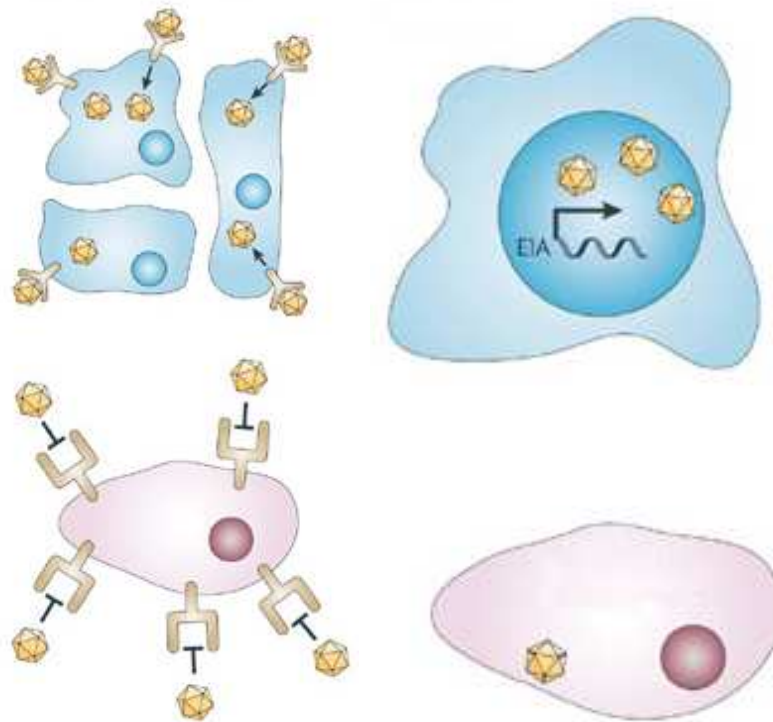


Figura 2.5: Vírus oncolíticos podem ser desenvolvidos para que consigam entrar especificamente em células cancerosas (sendo incapazes de penetrar em uma célula normal) ou podem ser capazes de entrar em ambos os tipos de células para se replicarem exclusivamente em células cancerosas. Figura adaptada de [28].

Vírus têm a capacidade de infectar células de um organismo biológico. Eles são constituídos de material genético contido em uma cápsula proteica, chamada capsídeo, que pode estar envolvida por um envelope que inclui uma membrana. Eles multiplicam-se somente dentro de células vivas e dependem delas para sintetizar proteínas, gerar e armazenar energia.

A engenharia genética permite modificar vírus em laboratório para combater tumores, tornando-os capazes de atacarem preferencialmente células cancerosas levando à sua lise²³ dessas células e à conseqüente amplificação da dose viral dentro do tumor, como ilustrado na figura 2.6. Vírus também podem ser projetados para levar genes anti-câncer²⁴ ou agentes quimioterápicos diretamente às células cancerosas. Esses vírus

²³Processo de ruptura das membranas celulares que levam à morte da célula e à liberação de seu conteúdo

²⁴Terapia gênica é um tratamento experimental que envolve a introdução de material genético (DNA ou RNA) nas células do paciente para prevenir ou combater o câncer, entre outras doenças. Mas em

usados para combater o câncer, devido a sua habilidade de infectar seletivamente células cancerosas, são conhecidos como vírus oncolíticos e podem ser moldados através de distintas abordagens, que levam a diferentes mecanismos de destruição tumoral. Um panorama dessas abordagens pode ser encontrado na referência [27].

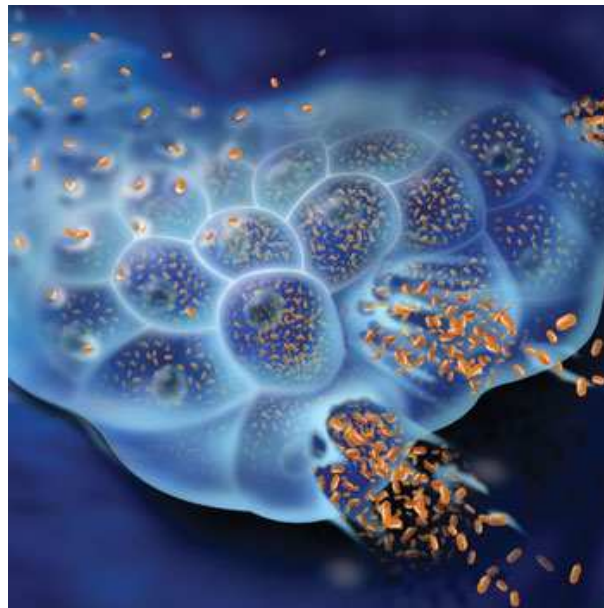


Figura 2.6: Vírus oncolíticos podem ser moldados para se replicarem exclusivamente em células cancerosas, promovendo uma amplificação da dose viral injetada na região do tumor. Figura extraída de <http://oncolyticvirus.wordpress.com/> em março de 2011.

Se por um lado o sistema imune é uma barreira à viroterapia, pois muitos vírus oncolíticos são eliminados, por outro a estimulação viral do sistema imune adaptativo parece ativar a resposta imune anti-tumoral, o que aumenta a eficácia da terapia.

Os vírus oncolíticos são administrados aos pacientes por diferentes estratégias. Por razões de segurança, vetores virais²⁵ baseados no vírus da varíola, no adenovírus, no reovírus, no vírus da doença de New Castle (NDV - New Castle Disease Virus), no Cocksackievirus e no vírus da herpes simples (HSV - Herpes Simplex Virus) foram administrados por injeção intratumoral em testes pré-clínicos²⁶ [29, 30, 31, 32, 33].

geral, um gene não pode ser diretamente inserido na célula de uma pessoa, então vírus são usados para inserir esse material genético.

²⁵Um vetor viral é um vírus modificado com o objetivo de introduzir material genético em um célula.

²⁶Estágio pré-clínico é um estágio da pesquisa que começa antes que os testes clínicos (testes em humanos) possam começar, e durante o qual dados importantes como viabilidade e segurança são coletados.

Tipicamente, a administração intratumoral²⁷ não causa efeitos colaterais significativos, causando apenas um inchaço local temporário. Entretanto, uma baixa eficiência contra metástases é observada, pois em geral há pouco ou nenhum espalhamento do vírus do sítio primário de injeção [34].

Como muitos pacientes desenvolvem metástases, a administração intravenosa²⁸ dos vírus oncolíticos seria mais eficaz para extinguir o tumor primário e suas colônias. Essa abordagem foi usada com sucesso, por exemplo, por McDonald et al. [35]. Entretanto, quando vírus oncolíticos são administrados por via intravenosa a um paciente, muitas barreiras os impedem de atingir o tumor e infectar as células cancerosas. Nessa abordagem, em geral observam-se efeitos colaterais significativos e sistêmicos. Os sintomas são semelhantes aos de uma gripe forte, mas estratégias para minimizar esses sintomas estão em desenvolvimento.

Uma das dificuldades encontradas para o progresso das terapias baseadas em viroses oncolíticas é a discrepância entre estudos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos pré-clínicos fornecem resultados muito mais promissores do que os estudos clínicos. Isso é devido, em parte, ao fato de que linhagens de células cancerosas podem não refletir a biologia de tumores *in vivo* e que tumores humanos, em geral, exibem heterogeneidade clínica e genética. Portanto, um tratamento bem-sucedido em um caso pode não ser eficaz em outros. Uma abordagem para analisar a citotoxicidade e a eficácia de vírus oncolíticos foi proposta por Wang et al. [36]. Nessa abordagem eles sugerem a utilização de espécimes de cânceres humanos primários *ex vivo* para esses estudos. Ou seja, os tumores foram retirados de pacientes e mantidos em cultura para serem infectados com vírus e analisados.

Portanto, a elucidação dos mecanismos de ação dos vírus oncolíticos depende fortemente de estudos em sistemas de cultura heterotípicos *in vitro* e modelos *in vivo* cada vez mais refinados. Dada a complexidade do problema, o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam aspectos fundamentais da ação da viroterapia sobre o crescimento de tumores pode apresentar sugestões valiosas, reduzindo o número de experimentos necessários.

²⁷Na administração intratumoral os vírus são injetados diretamente no tumor.

²⁸A administração intravenosa consiste na injeção dos vírus em uma veia ou artéria do paciente.

Capítulo 3

Modelo multiescala para crescimento de tumores avasculares

Essencialmente todos os tumores passam por um estágio de crescimento avascular, no qual o suprimento de nutrientes é feito apenas por difusão. Nesse estágio, quando o tumor está confinado ao seu tecido de origem e não teve acesso ao sistema vascular, ele é denominado câncer *in situ*. Para modelar carcinomas *in situ*, Ferreira et al. [6] propuseram um modelo multiescala que considera as escalas mesoscópica (dinâmica das células) e macroscópica (difusão de nutrientes no tecido) do crescimento de tumores. A dinâmica celular é controlada por regras probabilísticas locais que conectam as equações de reação-difusão para os nutrientes à resposta celular e interações em escala microscópica. O modelo gera morfologias compactas, conexas e desconexas caracterizadas por um crescimento Gompertziano no tempo e leis de escala distintas para as bordas dos tumores. Posteriormente esse modelo foi aplicado para estudar quimioterapia [37] e viroterapia [38].

Nos capítulos seguintes serão apresentados três modelos para viroterapia, uma promissora terapia anti-câncer baseada em vírus que atacam seletivamente células cancerosas, e um modelo para quimioterapia usando nanopartículas de polímeros quiméricos, todos elaborados a partir do modelo para crescimento de tumores exposto neste capítulo.

3.1 Cenário atual

A modelagem matemática de tumores iniciou-se na década de 1950, e os primeiros modelos de crescimento de tumores sólidos, vistos como uma coleção de células que consomem nutrientes, surgiram nas décadas de 1960 e 1970 [39]. Alguns desses modelos foram desenvolvidos e refinados nas décadas seguintes, mas somente na década de 1990, com o estabelecimento detalhado de vários mecanismos moleculares subjacentes ao crescimento e à progressão de tumores, surgiu uma nova geração de modelos, mais específicos e guiados por dados experimentais, enquanto os trabalhos anteriores limitavam-se a ajustar curvas de crescimento.

Do ponto de vista biológico, muitos processos intratumorais e interações tumor-hospedeiro tem sido estudados via modelagem matemática. Por exemplo, o impacto de diferentes mutações genéticas na emergência e sobrevivência de tumores [40], a competição por espaço e recursos entre células normais e malignas [41], interações entre o tumor e o sistema imune [42, 43], e a remodelagem da rede de vasos sanguíneos ou da matriz extracelular pelo tumor em crescimento [44, 45].

Fenômenos macroscópicos como a evolução da concentração de células tumorais ou de nutrientes são tipicamente modelados usando-se equações diferenciais parciais baseadas em processos de difusão ou desenvolvidas em analogia com problemas de mecânica de fluidos [46, 47]. Fenômenos mesoscópicos, como a dinâmica célula-célula e a angiogênese, são descritos tanto por modelagem determinística [43] quanto estocástica [40]. Na escala microscópica muita ênfase tem sido dada ao estudo quantitativo das interações entre espécies moleculares em compartimentos subcelulares. Tanto abordagens determinísticas [46] quanto abordagens estocásticas [48] tem sido utilizadas para modelar contribuições microscópicas ao crescimento do tumor.

3.2 Modelo para o crescimento de tumores *in situ*

O modelo inclui proliferação, mobilidade e morte celular, além da competição por nutrientes entre células normais e cancerosas. As ações celulares (divisão, movimento e morte) são localmente controladas pelos campos de concentração de nutrientes e por parâmetros que caracterizam a resposta celular à disponibilidade de nutrientes e englobam processos genéticos e metabólicos complexos. Esses nutrientes, que incluem oxigênio, aminoácidos, glicose, íons metálicos, etc., difundem de um vaso capilar pelo tecido e, na sua escassez, a taxa de crescimento das células cancerosas é limitada.

O tecido

A geometria do tecido usada no modelo é particularmente adequada a carcinomas, que são cânceres que se desenvolvem a partir de células epiteliais. Por simplicidade, uma rede regular bidimensional será considerada, representando um corte no tecido epitelial. Será usada uma rede quadrada $(L + 1) \times (L + 1)$ com constante de rede Δ e a fonte de nutrientes é representada por um vaso capilar.

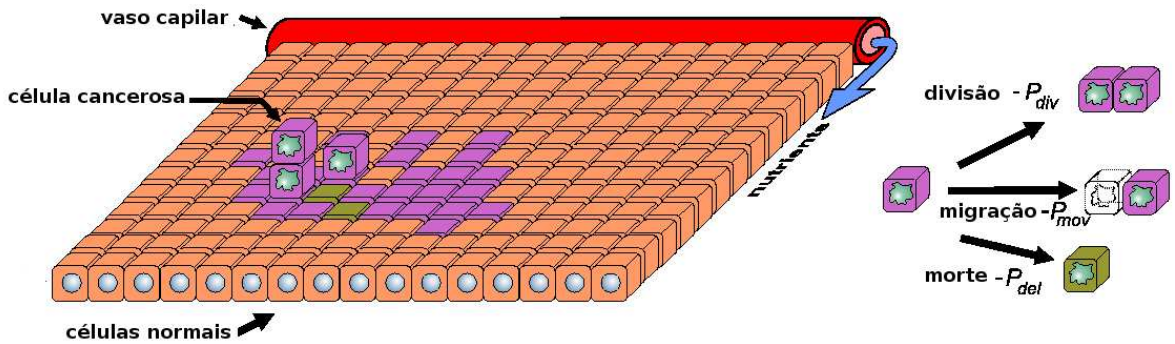


Figura 3.1: O tecido, alimentado por um vaso capilar, é representado por uma rede quadrada em que cada sítio pode estar ocupado por uma célula normal, uma necrótica ou por uma ou mais células cancerosas. Células cancerosas podem dividir, morrer ou migrar no tecido com as probabilidades correspondentes.

Os tumores são sistemas heterotípicos, constituídos por diferentes subpopulações de células além das tumorais, como células do sistema imune, endoteliais e fibroblastos [10]. Entretanto, no modelo, são consideradas apenas células normais e cancerosas. A constante de rede Δ é aproximadamente o diâmetro de uma célula normal. Assim, um sítio da rede pode ser ocupado por uma única célula normal. Contudo, células cancerosas podem empilhar umas sobre as outras. Portanto, cada sítio pode ser ocupado no instante t por uma célula normal, ou uma célula tumoral morta ou por uma ou mais células cancerosas. As células normais são representadas por σ_n , as células mortas por σ_d e as cancerosas por σ_c .

Vamos definir um sistema de coordenadas em que o eixo x é paralelo ao capilar e o eixo y é paralelo ao tecido, como representado na figura 3.1. São usadas condições de contorno periódicas no eixo x e de fluxo nulo em $y = L\Delta$, que representa a borda do tecido. A condição inicial é dada por uma única célula cancerosa introduzida no

tecido normal em $x = L\Delta/2$, a uma distância Y do vaso capilar, em concordância com a teoria clonal do câncer¹.

Os nutrientes

Nutrientes são transportados pelo sistema vascular e podem difundir-se através dos tecidos. A alta taxa de proliferação das células cancerosas as torna especialmente vulneráveis à privação de nutrientes. Então, os nutrientes foram divididos em duas categorias denominadas essenciais e não-essenciais para proliferação, descritos pelos campos de concentração $\phi_1(\vec{x}, t)$ e $\phi_2(\vec{x}, t)$, respectivamente. A escassez dos nutrientes denominados essenciais restringem a divisão celular, mas não a sobrevivência da célula [49]. Exemplos desse tipo de nutrientes para células eucarióticas incluem alguns aminoácidos, glicose e metais como ferro, zinco e cobre. Quando a quantidade de um nutriente essencial é limitada em um microambiente específico, a taxa de crescimento de uma dada população é controlada por sua habilidade em competir por esse nutriente [49]. Por outro lado, o oxigênio é um exemplo de nutriente na classe não-essencial, pois, apesar de ser um fator limitante para muitas funções celulares, incluindo diferenciação, respiração e trabalho mecânico, não restringe de forma significativa a proliferação celular. Estes campos de nutrientes obedecem às equações

$$\frac{\partial \phi_k(\vec{x}, t)}{\partial t} = D_k \nabla^2 \phi_k(\vec{x}, t) - \gamma \phi_k(\vec{x}, t) \sigma_n(\vec{x}, t) - \lambda_k \gamma \phi_k(\vec{x}, t) \sigma_c(\vec{x}, t) \quad (3.1)$$

nas quais D_k representa o coeficiente de difusão dos nutrientes, o segundo termo está relacionado ao consumo de nutrientes pelas células normais e o terceiro ao consumo de nutrientes pelas células cancerosas, que difere do consumo pelas normais por fatores λ_k . Assumimos $D_1 = D_2$ por simplicidade.

Esses campos satisfazem condições de contorno periódicas na direção paralela ao capilar. As condições $\phi_1(y = 0) = \phi_{1,0}$ e $\phi_2(y = 0) = \phi_{2,0}$ foram adotadas representando o suprimento fixo de nutrientes pelo vaso capilar; na borda do tecido foram impostas condições de Neumann (fluxo nulo). Para escrever as equações anteriores em uma forma mais simples, as seguintes variáveis adimensionais são definidas

$$t' = \frac{Dt}{\Delta^2}, \quad \vec{x}' = \frac{\vec{x}}{\Delta}, \quad \phi'_k = \frac{\phi_k}{\phi_{k,0}} \text{ e } \alpha = \Delta \sqrt{\frac{\gamma}{D}} \quad (3.2)$$

¹A teoria clonal do câncer propõe que a maioria dos tumores, se não todos, se origina de uma única célula.

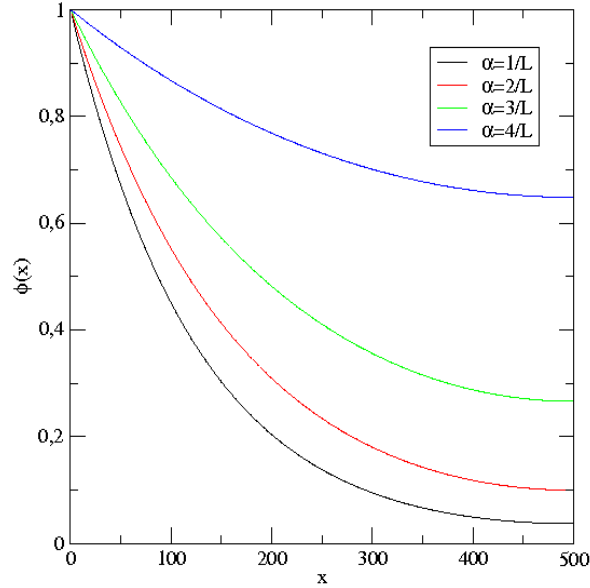


Figura 3.2: Concentração de nutrientes na ausência de células cancerosas em função da distância ao capilar para um tecido de tamanho $L = 500$.

A equação 3.1 pode então ser reescrita, omitindo os apóstrofes, como

$$\frac{\partial \phi_k}{\partial t} = \nabla^2 \phi_k - \alpha^2 \phi_k \sigma_n - \lambda_k \alpha^2 \phi_k \sigma_c \quad (3.3)$$

A condição de contorno no vaso capilar torna-se $\phi_1(y = 0) = \phi_2(y = 0) = 1$ e o valor $\Delta = 1$ é definido. As soluções analíticas para a concentração de nutrientes na ausência de células cancerosas são mostradas na figura 3.2. Pode-se notar que o parâmetro α determina a quantidade inicial de nutrientes no tecido.

Dinâmica celular

Cada célula cancerosa, aleatoriamente escolhida, pode executar uma das três ações:

- **Divisão**

A célula pode dividir-se por mitose com probabilidade

$$P_{div}(\vec{x}) = 1 - \exp \left[- \left(\frac{\phi_1(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x}) \theta_{div}} \right)^2 \right], \quad (3.4)$$

em que o parâmetro θ_{div} controla a forma de P_{div} . Note que a probabilidade de divisão depende somente da quantidade de nutrientes essenciais por célula

cancerosa no sítio. Quando uma célula se divide, a sua posição no tumor irá definir a posição da célula-filha:

- se a célula estiver no interior do tumor, sua filha permanece no mesmo sítio que ela;
- se ela estiver na borda do tumor, sua filha irá ocupar ao acaso um dos seus sítios vizinhos ocupados por uma célula normal ou necrótica.

- **Migração**

A probabilidade de migração é dada por

$$P_{mov}(\vec{x}) = 1 - \exp \left[-\sigma_c(\vec{x}) \left(\frac{\phi_2(\vec{x})}{\theta_{mov}} \right)^2 \right] \quad (3.5)$$

Note que P_{mov} depende da concentração de nutrientes não-essenciais ϕ_2 e aumenta com a população local de células cancerosas. O parâmetro θ_{mov} controla a forma de P_{mov} . A nova posição da célula irá depender de sua posição atual e do número de células cancerosas ali presente.

- se a célula estiver dentro do tumor, ela se move para um dos sítios vizinhos escolhido ao acaso.
- se ela estiver na borda do tumor e não houver outra célula cancerosa no mesmo sítio que ela, ela se move trocando de posição com a célula normal ou necrótica do sítio vizinho aleatoriamente escolhido.
- se a célula está na borda do tumor e existem outras células cancerosas no mesmo sítio que ela, ela ocupa o sítio de uma de suas primeiras vizinhas normais ou necróticas, que irá desaparecer.

- **Morte**

Células cancerosas morrem com probabilidade

$$P_{del}(\vec{x}) = \exp \left[- \left(\frac{\phi_2(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x})\theta_{del}} \right)^2 \right]. \quad (3.6)$$

Assim, $\sigma_c(\vec{x}) \rightarrow \sigma_c(\vec{x}) - 1$. Observe que a probabilidade de morte é determinada pela concentração de nutrientes não-essenciais ϕ_2 por célula cancerosa no sítio da célula considerada.

As formas funcionais das probabilidades P_{div} e P_{mov} apresentam o comportamento mostrado na figura 3.3(a) e P_{del} é mostrado na figura 3.3(b). A forma sigmoidal dessas probabilidades foi escolhida de modo que considerasse alguns aspectos gerais da biologia do câncer. Por exemplo, em uma situação de escassez de nutrientes, a probabilidade de divisão aumenta rapidamente com o aumento da disponibilidade desses nutrientes. Entretanto, essa probabilidade tende a saturar em um valor dependente de θ_{div} quando há uma concentração alta de nutrientes por célula. Ou seja, se o microambiente tem uma quantidade grande de nutrientes, maior do que a necessária para a replicação celular, aumentar essa quantidade não deve alterar a probabilidade de que a célula divida. Outras formas funcionais com comportamento semelhante foram testadas e o modelo é robusto à forma específica das probabilidades.

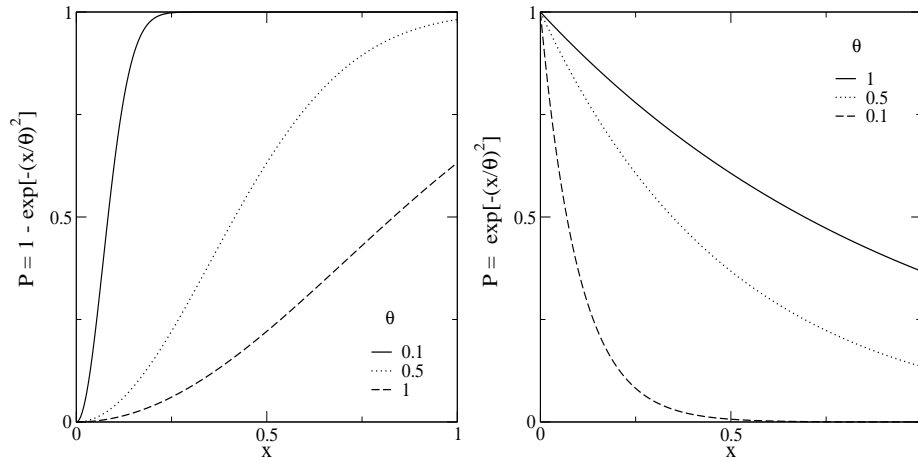


Figura 3.3: Comportamento das probabilidades P_{div} e P_{mov} em (a) e P_{del} em (b) para diferentes valores do parâmetro θ .

As regras para a dinâmica celular usadas nesse modelo consideram que, em regiões onde há uma alta densidade de células e um suprimento de nutrientes via difusão escasso, a divisão celular é inibida e, ao mesmo tempo, a probabilidade de morte celular (necrose) aumenta. Os parâmetros θ_{div} , θ_{mov} e θ_{del} , que caracterizam a resposta das células a concentração de nutrientes e envolvem processos genéticos e metabólicos complexos, não podem ser determinados diretamente de experimentos biológicos e ainda são um problema aberto, ao contrário dos parâmetros α , λ_1 e λ_2 , que podem ser mais facilmente estimados.

3.3 Algoritmo e estimativa de parâmetros

A cada passo de tempo t , o sistema de equações 3.3 é resolvido numericamente no estado estacionário ($\partial\phi_1/\partial t = \partial\phi_2/\partial t = 0$) através do método de relaxação de Gauss-Siedel-Newton². Determinada a concentração de nutrientes, $N_c(t)$ células cancerosas são selecionadas sequencialmente ao acaso com a mesma probabilidade, em que $N_c(t)$ é o número total dessas células no passo de tempo t . Para cada uma delas, uma tentativa de ação (divisão, migração ou morte) é aleatoriamente escolhida com igual probabilidade e o tempo é incrementado em $\Delta t = 1/N_c(t)$. A ação selecionada será implementada, ou não, de acordo com as probabilidades correspondentes determinadas pelas equações 3.4, 3.5 e 3.6. Ao final dessa seqüência de $N_c(t)$ tentativas, começa um novo passo de tempo e todo o procedimento (solução das equações de difusão e aplicação da dinâmica celular) é iterado. As simulações terminam se alguma célula tumoral alcança o vaso capilar ou a borda do tecido. Foram usadas as soluções exatas para o estado estacionário das equações 3.3 em $t = 0$, quando não há células cancerosas. O algoritmo deste modelo é mostrado em detalhes em um diagrama de blocos no apêndice B.

Em todas as simulações foram usadas redes com 500×500 sítios e como o parâmetro de rede Δ foi tomado como o tamanho aproximado de uma célula típica ($\sim 10\mu m$), o sistema corresponde a um tecido de cerca de $5mm \times 5mm$. A célula cancerosa inicialmente inserida no tecido normal é colocada a uma distância de 300 sítios do capilar.

Assumindo que a fase de síntese de DNA do ciclo celular seja de aproximadamente $11h$ [50], e como há três ações possíveis para cada célula, uma célula precisaria, em média, de três passos de tempo para dividir-se. Logo, um passo de tempo nas simulações corresponde a cerca de 3 – 4 h. As estimativas para os demais parâmetros são apresentadas na tabela 3.1. Note que para estimar os parâmetros relacionados aos nutrientes essenciais (ϕ_1) foram usados dados experimentais medidos para a glicose, enquanto para os nutrientes não-essenciais foram usadas estimativas para o oxigênio (ϕ_2). Entretanto, cada uma das equações para os nutrientes se refere a um grupo deles, e glicose e oxigênio foram usados como exemplos para se estimar a ordem de grandeza aproximada dos parâmetros do modelo.

²No apêndice podem ser encontrados detalhes sobre a resolução das equações diferenciais.

Tabela 3.1: Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.

Parâmetro	Descrição	Estimativa
Δt	Passo de tempo do modelo	$3 - 4h$
Δ	Diâmetro de uma célula típica	$\sim 10\mu m$ [51]
D_1	Difusão de glicose no tecido	$9,1 \times 10^{-5} cm^2/s$ [52]
D_2	Difusão de oxigênio no tecido	$1,3 \times 10^{-5} cm^2/s$ [52]
γ	Taxa de consumo de glicose Taxa de consumo de oxigênio	$10^{-5} s^{-1}$ [53] $9,4 \times 10^{-2} s^{-1}$ [53]
λ_1	Consumo aumentado de glicose por células cancerosas	10 [51]
$\phi_{1,0}$	Concentração de glicose no capilar	$6,7mM - 9,9mM$ [54]
$\phi_{2,0}$	Concentração de oxigênio no capilar	$0,0695mM$ [55]
α	$\Delta\sqrt{(\gamma/D)}$	3×10^{-4} (γ e D da glicose) 3×10^{-2} (γ e D do oxigênio)

3.4 Resultados e discussão

O modelo gera morfologias bastante semelhantes às observadas em tumores reais, como pode ser visto na figura 3.4. Nela, são mostrados padrões histológicos de tumores em cães e os padrões correspondentes obtidos pelo modelo para diferentes conjuntos de parâmetros.

Para evidenciar o papel de alguns parâmetros na morfologia do tumor, são mostrados na figura 3.5 os padrões obtidos em redes com 500×500 sítios em função do fator λ_1 , que representa a maior afinidade das células cancerosas por nutrientes essenciais para mitose e da taxa de consumo de nutrientes α pelas células normais. O vaso capilar está na borda inferior de cada figura e as regiões mais escuras representam populações maiores de células cancerosas. Observe que em alguns padrões o “caroço necrótico”³ tipicamente observado em tumores é evidente. Essa figura reproduz fielmente os resultados da referência [6]. Note que os valores de α utilizados são da ordem de 10^{-3} , o que é um valor intermediário entre os valores calculados para a glicose (3×10^{-4}) e o oxigênio (3×10^{-2}).

³O “caroço necrótico” corresponde a região mais interna do tumor com células mortas devido à escassez de nutrientes e acúmulo de resíduos tóxicos do metabolismo.

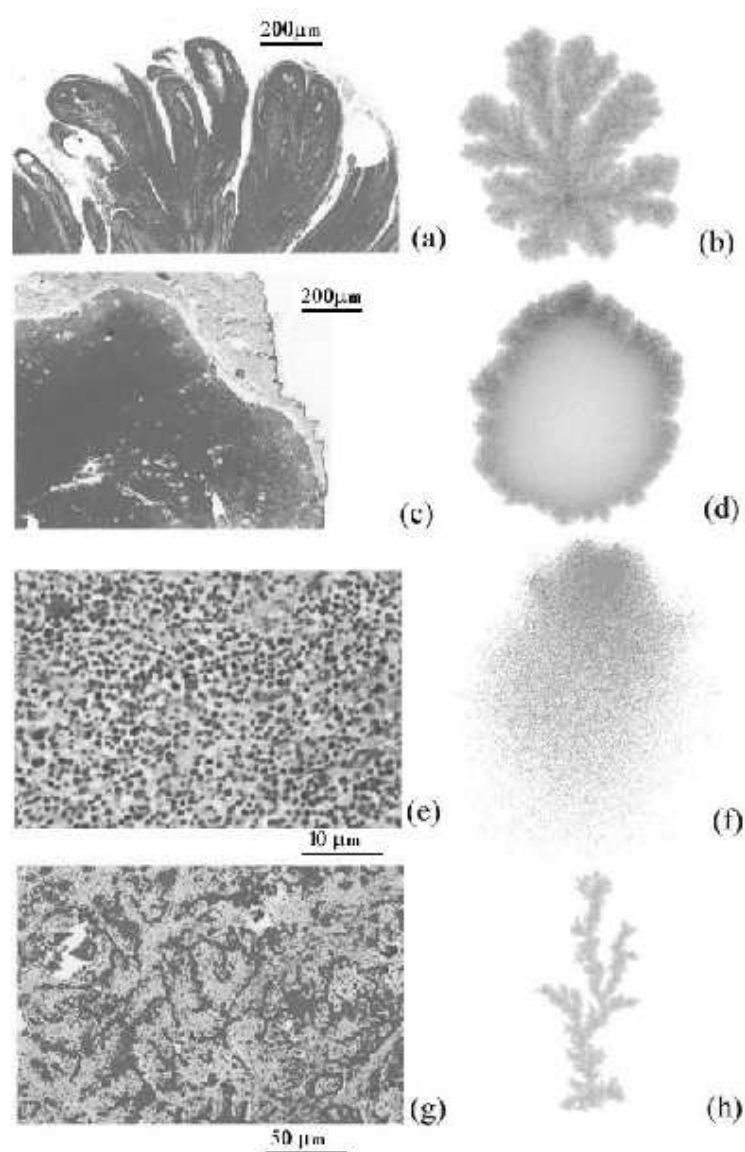


Figura 3.4: Comparação entre algumas morfologias comumente observadas em tumores e os padrões gerados por meio deste modelo. (a) Padrão papilar de um papiloma escamoso; (c) carcinoma basocelular compacto; (e) padrão difuso de um plasmocitoma e (g) filamentos celulares típicos de um tricoblastoma. Todos esses padrões histológicos foram obtidos de cães. Os padrões correspondentes simulados pelo modelo são mostrados em (b), (d), (f) e (h), respectivamente. Esta figura foi extraída da referência [6].

O consumo de nutrientes por células normais e cancerosas, controlado pelos parâmetros α , λ_1 e λ_2 , tem um papel central na determinação da morfologia. Para pequenos valores desses parâmetros, correspondendo a condições de crescimento em que células individuais requerem um baixo suprimento de nutrientes, os padrões tendem a ser compactos e circulares. Entretanto, se a taxa de replicação das células é pequena devido à grande quantidade de nutrientes necessária à divisão celular, o tumor assume morfologias papilares. Se as taxas de consumo de nutrientes são muito altas, são observados apenas tumores papilares e, para baixa taxa de divisão celular, esses padrões gradativamente se transformam em filamentos finos de células.

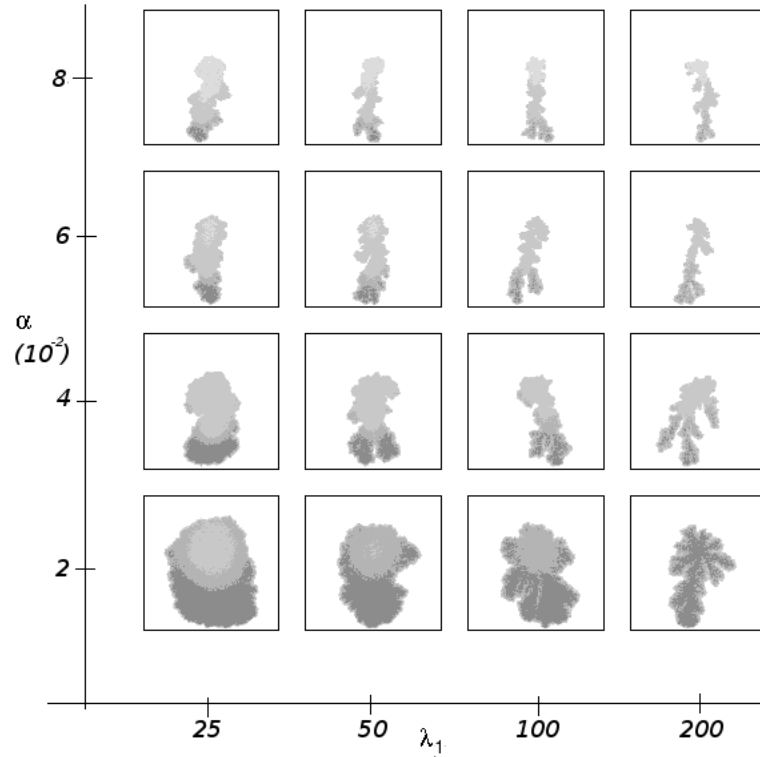


Figura 3.5: Padrões obtidos em uma rede 500×500 , mostrados em função da taxa de consumo de nutrientes α para células normais e do fator multiplicativo λ_1 para a taxa de consumo pelas células cancerosas dos nutrientes essenciais para mitose. Os outros parâmetros foram fixados em $\lambda_2 = 10$, $\theta_{div} = 0,3$ e $\theta_{del} = 0,01$. Os padrões são mostrados em escala de cinza no qual as regiões mais escuras representam populações celulares maiores.

Além disso, quanto menores os valores de α e λ_1 , maior a fração de células necróticas para θ_{del} fixo. Em particular, essa fração é menor para padrões papilares do

que para padrões compactos, sugerindo que a morfologia ótima para crescimento sob forte privação de nutrientes é fractal. Finalmente, quanto maior a taxa de migração celular, mais homogêneos são os padrões, mais rápido é o crescimento do tumor e menor a fração de células necróticas.

Outros resultados interessantes foram obtidos desse modelo, mas foram omitidos por não estarem diretamente relacionados ao escopo dessa tese. Por exemplo, o número total de células cancerosas, o raio de giração e o número de células na borda do tumor são descritos por curvas de Gompertz. Entretanto, os valores dos expoentes são diferentes nas morfologias compacta, papilar e difusa. Enquanto os expoentes obtidos para o tumor compacto indicam padrões efetivos circulares e não-fractais, para padrões papilares os expoentes indicam uma morfologia fractal para o tumor.

3.5 Conclusões

O modelo multiescala para crescimento de tumores avasculares proposto por Ferreira et al. [6] foi apresentado e as principais morfologias obtidas pelo modelo foram mostradas. Os padrões típicos podem variar de compactos a papilares, e a morfologia é determinada principalmente pelas taxas de consumo de nutrientes pelas células. Os padrões simulados reproduzem uma das principais características de tumores avasculares, que é a estrutura em camadas devido a disponibilidade de nutrientes. No centro do tumor, há a formação de um caroço necrótico de células cancerosas mortas devido à escassez de nutrientes, na borda do tumor uma camada de células tumorais em proliferação e, entre essas duas camadas, uma região intermediária de células quiescentes.

Uma das maiores contribuições desse modelo é a conexão das equações de difusão macroscópicas para os nutrientes com as respostas e interações células por meio de um modelo cinético celular efetivo. De fato, as probabilidades locais descrevem de modo estocástico os processos dinâmicos que ocorrem em populações celulares como resposta aos campos de difusão de nutrientes.

Capítulo 4

Modelo para viroterapia oncolítica - Descrição contínua dos vírus

Nesse capítulo será investigado um modelo multiescala para viroterapia do câncer [7]. Foram considerados tumores compactos cujas células podem se dividir ou morrer de acordo com as mesmas regras estocásticas apresentadas no capítulo 3. A probabilidade de migração foi tomada como zero, e nosso estudo será restrito a tumores sólidos. Por simplicidade, consideramos apenas um tipo de nutriente. Uma vez injetados os vírus, cada célula cancerosa poderá ser infectada com uma dada probabilidade e, uma vez infectada, está fadada a morrer por lise, liberando vírus no microambiente da célula lisada e amplificando a dose viral local. Este trabalho foi publicado no periódico *Cancer Research* [7] e, do ponto de vista clínico, nossos resultados indicam que, para erradicar um tumor sólido cujas células apresentam baixa mobilidade, são necessárias uma forte supressão da resposta imune e vírus com alta mobilidade intratumoral. Além disso, devido a natureza discreta e estocástica das células e de suas respostas, foi predito um intervalo ótimo para a citotoxicidade viral, uma vez que a viroterapia falha se o vírus oncolítico demanda um tempo muito curto ou muito longo para matar uma célula tumoral.

4.1 Cenário atual

Uma das estratégias mais promissoras no combate ao câncer é a viroterapia oncolítica, que se baseia em vírus que atacam seletivamente células cancerosas. Recentemente, vários modelos matemáticos tem sido propostos para entender as interações

dinâmicas complexas e os cenários que emergem dessa nova terapia. Os primeiros modelos, propostos por Wu et al. [56, 57] e Wodarz [58, 59], são abordagens via equações diferenciais e propõem que o resultado da terapia é determinado pelas interações entre células tumorais e vírus e que a taxa de morte das células infectadas é um parâmetro chave para o sucesso terapêutico. Outros trabalhos propuseram diferentes abordagens com equações diferenciais [60, 61], e Ferreira et al. [38] apresentaram uma descrição multiescala da viroterapia oncolítica. Um resultado importante obtido por Ferreira et al. foi o comportamento oscilatório das populações de vírus e células cancerosas. Diferentemente das oscilações amortecidas e espacialmente uniformes obtidas por Wu et al [57], no modelo de Ferreira et al. as populações de vírus e de células cancerosas exibem oscilações com amplitudes crescentes. Padrões com regiões necróticas entre as frentes de expansão das células cancerosas infectadas foram mostrados e comparados com padrões histológicos obtidos por Heise et al. [62].

4.2 Modelo para viroterapia

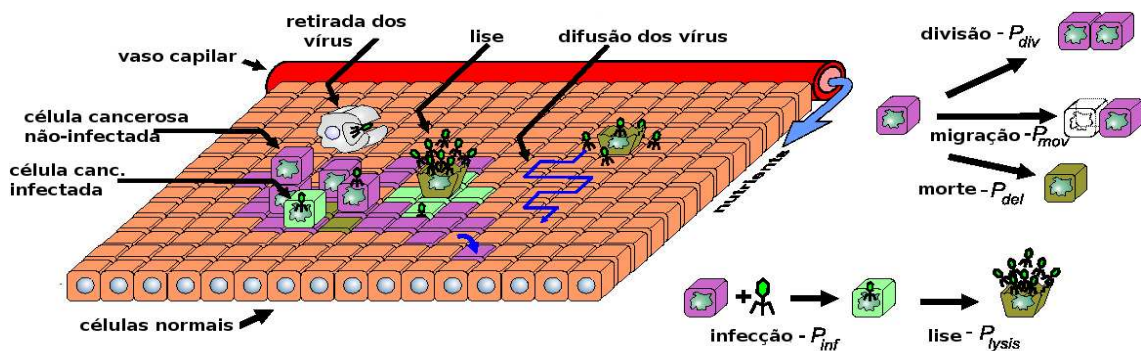


Figura 4.1: Neste modelo, cada célula cancerosa não-infectada pode dividir, morrer ou ser infectada. A probabilidade de migração é nula, o que é uma boa aproximação os tumores sólidos considerados². As infectadas, por sua vez, podem apenas morrer por lise. Após a lise, vírus são liberados na região da célula lisada. Vírus livres difundem na rede e são eliminados a uma taxa constante γ_v .

Na figura 4.1 são mostrados os agentes e processos envolvidos no modelo em escalas de tempo e comprimento distintas. Consideramos o protocolo de uma única administração intratumoral dos vírus quando o tumor atinge N_0 células. Esta injeção

corresponde a suprir todo o tumor com uma concentração uniforme v_0 de vírus. Esse procedimento é amplamente usado em experimentos *in vitro*, pois permite uma melhor análise da ação dos vírus oncolíticos.

As dimensões dos vírus são muito pequenas se comparadas às de uma célula típica. Por exemplo, adenovírus, que são vírus oncolíticos tipicamente usados, têm dimensões da ordem de $70 - 90nm$, enquanto uma célula típica têm diâmetro de aproximadamente $10\mu m$ [34]. Além disso, são considerados vírus altamente replicativos. Logo, a quantidade de vírus que pode ocupar um sítio é muito grande. Por isso, os vírus são tratados como um campo contínuo e não como partículas com caráter discreto. O efeito de vírus discretos será analisado no capítulo 5. A constante de difusão dos vírus ($\sim 10^{-8}cm^2/s$ [63]) é muito maior que a das células ($\sim 10^{-10}cm^2/s$ [64]; no entanto, é muito menor que o coeficiente de difusão dos nutrientes ($\sim 10^{-5}cm^2/s$ [52]).

Portanto, justifica-se considerar as soluções não-estacionárias³ da equação que descreve a evolução temporal da concentração de vírus

$$\frac{\partial v}{\partial t} = D_{virus}\nabla^2 v - \Gamma_v v \quad (4.1)$$

em que D_{virus} é a constante de difusão do vírus e Γ_v a sua taxa de eliminação. Note que o parâmetro Γ_v pode ser considerado uma primeira aproximação para a ação do sistema imune sobre os vírus. Nessa equação, fizemos a seguinte mudança de variáveis:

$$x' = \frac{x}{\Delta}, t' = \frac{t}{\delta t} \text{ e } v' = \frac{v}{V} \quad (4.2)$$

em que $\Delta = 10\mu m$ é o espaçamento de rede, o parâmetro δt foi definido como $\delta t = 4 \times 10^{-2}h$ e V corresponde a concentração de vírus administrada. Portanto, omitindo os apóstrofes por simplicidade, a equação 4.1 pode ser reescrita como

$$\frac{\partial v}{\partial t} = D_v \nabla^2 v - \gamma_v v \quad (4.3)$$

em que os parâmetros adimensionais são definidos por

$$D_v = \frac{\delta t D_{virus}}{\Delta^2} \text{ e } \gamma_v = \Gamma_v \times \delta t \quad (4.4)$$

Foram impostas condições de contorno periódicas ao longo do eixo y , reduzindo efeitos de tamanho finito, e condições de Neumann ($\partial v / \partial x = 0$) na borda do tecido e no capilar, que impedem que os vírus escapem do tecido.

³Ou seja, a equação discretizada para a difusão dos vírus será iterada um número determinado de vezes, e não até o estado quase-estacionário.

Células cancerosas são infectadas com probabilidade

$$P_{inf}(\vec{x}) = 1 - \exp \left[- \left(\frac{v(\vec{x})}{\sigma_c(\vec{x})\theta_{inf}} \right)^2 \right], \quad (4.5)$$

e a infecção das células normais é negligenciada, pois assumimos seletividade perfeita, ou seja, os vírus são capazes de infectar somente as células cancerosas. Essa aproximação é razoável, uma vez que o índice terapêutico da viroterapia pode chegar a $10^4 : 1$, ou seja, para cada 10^4 células cancerosas mortas, apenas uma normal também morre [65]. Enquanto uma célula cancerosa não infectada pode dividir-se, morrer ou ser infectada, uma célula infectada pode apenas morrer por lise com probabilidade

$$P_{lise}(\vec{x}) = 1 - \exp \left(- \frac{T_{inf}}{T_l} \right) \quad (4.6)$$

que está relacionada a razão entre o tempo desde a infecção, T_{inf} , e o período característico para lise celular, T_l . A lise de cada célula infectada libera uma concentração v_0 de vírus no meio extracelular. Uma fração aleatória desses vírus será igualmente distribuída entre os vizinhos mais próximos da célula morta e a fração restante permanece no sítio desta célula. Desse modo, uma distribuição local mais realista dos vírus recém-liberados é usada nas próximas ações celulares, uma vez que eles já se espalharam em torno do sítio da célula que sofreu lise. Assumimos que células infectadas não podem dividir-se, nem migrar localmente, pois os vírus controlam a maquinaria celular para sua própria replicação. Além disso, o modelo não considera a morte das células infectadas por falta de nutrientes ou pelo sistema imune. Uma vez infectada, a célula cancerosa morrerá apenas por lise. Essa aproximação é razoável se o tempo característico para a lise for suficientemente pequeno e se o sistema imune estiver severamente suprimido. Para os dados experimentais utilizados nesse trabalho essas duas condições são satisfeitas. Os efeitos das respostas imunes inata e adaptativa sobre os vírus livres e sobre as células infectadas são considerados no capítulo 6.

4.3 Algoritmo e estimativa dos parâmetros

As simulações são implementadas como segue. A cada passo de tempo, a equação 3.3 para um tipo de nutriente é numericamente resolvida no estado estacionário, como no modelo apresentado no capítulo 3. Então, $N_c(t)$ células cancerosas são sequencialmente selecionadas ao acaso com igual probabilidade. Para cada uma delas,

uma ação tentativa (lise, se for uma célula infectada e divisão, infecção ou morte caso contrário) é aleatoriamente escolhida com igual probabilidade e o tempo é incrementado por $t = 1/N_c(t)$. A célula executará ou não a ação selecionada de acordo com as correspondentes probabilidades determinadas pelas equações 3.4,3.6,4.5 e 4.6. Se a ação selecionada é a lise da célula infectada, um número aleatório uniformemente escolhido $z \in [0, 1)$ é gerado e zv_0 novos vírus são introduzidos no sítio da célula que sofreu lise. Os outros $(1 - z)v_0$ vírus são igualmente distribuídos entre os primeiros vizinhos da célula lisada. Ao final desta sequência de N_c tentativas, a equação 4.1 é iterada 100 vezes. Então, um novo passo de tempo começa e todo o procedimento (solução da equação de difusão dos nutrientes, aplicação da dinâmica celular e difusão dos vírus) é iterado. As simulações são interrompidas se alguma célula tumoral alcança o vaso capilar ou a borda do tecido ou se o tumor é erradicado. O algoritmo deste modelo é mostrado em um diagrama de blocos no apêndice B.

Em todas as simulações, o tecido é representado por uma rede quadrada de tamanho linear $L = 500$ e constante de rede $10\mu m$, e cada passo de tempo nas simulações corresponde a $4 - 5h$. Os parâmetros $\theta_{div} = 0,3$, $\theta_{del} = 0,03$ e $\alpha = 0,004$ foram fixados para gerar padrões tumorais compactos na ausência de tratamento. Por outro lado, os parâmetros controlando a viroterapia (D_v , γ_v , θ_{inf} e T_l) foram variados. A terapia começa quando o tumor compacto possui 10^4 células, o que corresponde a um tumor de cerca de $1,5mm$ de diâmetro.

A quantidade v_0 de vírus liberada quando ocorre a lise é um parâmetro conhecido biologicamente e varia de acordo com o tipo de vírus e com o tipo de célula. Na injeção viral, uma concentração V de vírus é administrada ao tumor e escolhemos $v_0 = V = 1$. Ou seja, estamos assumindo vírus oncolíticos com alto potencial replicativo, uma vez que a cada lise é liberada a mesma quantidade de vírus injetada no tumor. Para vírus selvagens (não-modificados) essa é uma boa aproximação. Por exemplo, adenovírus tipo 2 selvagens são capazes de produzir de 4×10^3 a 10^4 vírus por célula $36 - 48h$ após a infecção [66]. Entretanto, esse valor pode ser muito menor para agentes virais modificados.

Como definimos que $\delta t = 4 \times 10^{-2}h$, cada iteração da equação 4.3 discretizada equivale a um intervalo de tempo de $4 \times 10^{-2}h$. Uma vez que cada passo de tempo no modelo corresponde a $\sim 4h$, a equação 4.3 discretizada deve ser iterada 100 vezes a cada passo de tempo. A constante de difusão dos adenovírus é da ordem de $10^{-2}mm^2/h$ [63], e a difusão efetiva de vírus da herpes simplex (HSV) em tumores com alta concentração de colágeno pode ser estimada em $10^{-4}mm^2/h$ [67]. Logo, o parâmetro relacionado à

Tabela 4.1: Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.

Parâmetro	Descrição	Estimativa
Γ_v	Taxa de remoção dos vírus	$2,5 \times 10^{-2} h^{-1}$ [61]
D_{virus}	Constante de difusão de vírus	$10^{-2} mm^2 s^{-1}$ (Adenovírus) [63]
T_l	Tempo de vida médio de uma célula tumoral infectada	$\sim 18h$ [61], 2 dias [57], $\sim 40h$ [68]
	Prob. de um vírus oncolítico infectar uma célula tumoral	$\sim 70\%$ [61]

difusão viral

$$D_v = \frac{\delta t D_{virus}}{\Delta^2} = \frac{4 \times 10^{-2} D_{virus}}{10^{-4}} \sim 10^2 D_{virus}, \quad (4.7)$$

em que D_{virus} é dado em $mm^2 h^{-1}$. Logo, D_v pode assumir valores no intervalo $D_v \in [10^{-2}, 1]$.

O valor da taxa de eliminação dos vírus Γ_v foi ajustado para concordar com a estimativa de Friedman et al. [61], que assumem $2,5 \times 10^{-2} h^{-1}$. Finalmente, o tempo característico para a lise das células infectadas é um parâmetro altamente variável de acordo com o tipo de vírus oncolítico utilizado. Por exemplo, para o vírus da herpes simplex (hrR3) infectando gliomas ele é da ordem de 18h, enquanto estimativas para o adenovírus geneticamente modificado ONYX-15 sugerem cerca de 2 dias. Portanto, serão usados valores de T_l entre 2 (que corresponde a 8h) e 32 (cerca de 5 dias).

O único parâmetro relacionado à viroterapia que não pode ser diretamente determinado a partir de experimentos é o θ_{inf} , relacionado à eficácia do vírus em infectar células cancerosas. No entanto, sabe-se que a probabilidade de uma célula estar infectada após a administração de vírus oncolíticos em cultura é da ordem de 70% [61]. Logo θ_{inf} pode ser ajustado para fornecer valores coerentes com essa estimativa.

4.4 Resultados e discussão

Para restringir nosso estudo aos tumores sólidos, manteremos fixos os parâmetros que controlam a forma do tumor ($\alpha = 4 \times 10^{-3}$, $\theta_{div} = 3 \times 10^{-1}$, $\theta_{del} = 3 \times 10^{-2}$). Casos típicos observados na evolução temporal do número de células cancerosas e das concentrações de vírus em toda a rede são mostrados na figura 4.2. É importante destacar que cada comportamento é definido não apenas pelo conjunto de parâmetros usados. A componente estocástica é fundamental. Outras simulações usando os

mesmos parâmetros apresentados na figura 4.2 podem apresentar resultados diferentes.

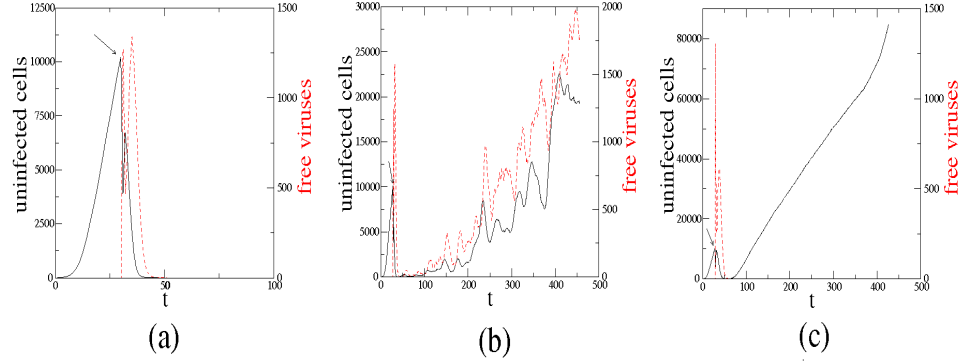


Figura 4.2: Evolução temporal do número total de células cancerosas (N_c) e da concentração total de vírus com infectividade viral fixa ($\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$) e taxa de remoção dos vírus $\gamma_v = 10^{-2}$. Uma única injeção viral é administrada no instante de tempo indicado pela seta. Os seguintes parâmetros foram usados: $D_v = 0,7$ e $T_l = 4$, erradicação do tumor (a); $D_v = 0,2$ e $T_l = 2$, crescimento oscilatório (b); e $D_v = 0,9$ e $T_l = 32$, crescimento exponencial (c).

Foram observados três tipos de comportamento: extinção do tumor logo após a administração dos vírus (comportamento S); redução da taxa de crescimento tumoral, com comportamento oscilatório e coexistência de vírus e células tumorais (C) e o fracasso da terapia, quando N_c volta a crescer exponencialmente mesmo após a terapia (F). Uma coexistência entre as populações do vírus oncolítico MV-CEA e células tumorais equivalente ao comportamento C foi observada em enxertos de câncer de ovário em camundongos por Peng *et al.* [69]. Devido à coexistência entre vírus e células tumorais, uma redução significativa na taxa de crescimento do tumor foi observada, o que resultou em um aumento da sobrevivência dos camundongos. Neste trabalho os autores mostraram que esse comportamento era observado para todas as dosagens administradas ($10^3 - 10^8$ TCID₅₀).

Pode-se ressaltar que as defasagens entre as oscilações das duas populações estão relacionadas ao tempo de lise. Note que o problema pode ser visto como um tipo de sistema presa-predador envolvendo as populações de células cancerosas e de vírus.

A evolução da distribuição espacial da população de células cancerosas pode ser acompanhada na figura 4.3, em que um caso típico do comportamento C é mostrado. Nessa simulação foram usados os parâmetros $D_v = 0,2$, $\gamma_v = 10^{-2}$, $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$ e

$T_l = 2$. Portanto, a onda de infecção se propaga lentamente e as células tumorais que não são infectadas podem se reproduzir mais frequentemente, uma vez que como há poucas células a disponibilidade de nutrientes é maior. Pode-se observar na figura 4.3 que as ondas de infecção não são suficientemente fortes e/ou freqüentes para eliminar o tumor. Apesar do número de células cancerosas aumentar mais lentamente do que na ausência da viroterapia, as células espalham-se aumentando a área do tecido invadida pelo tumor.

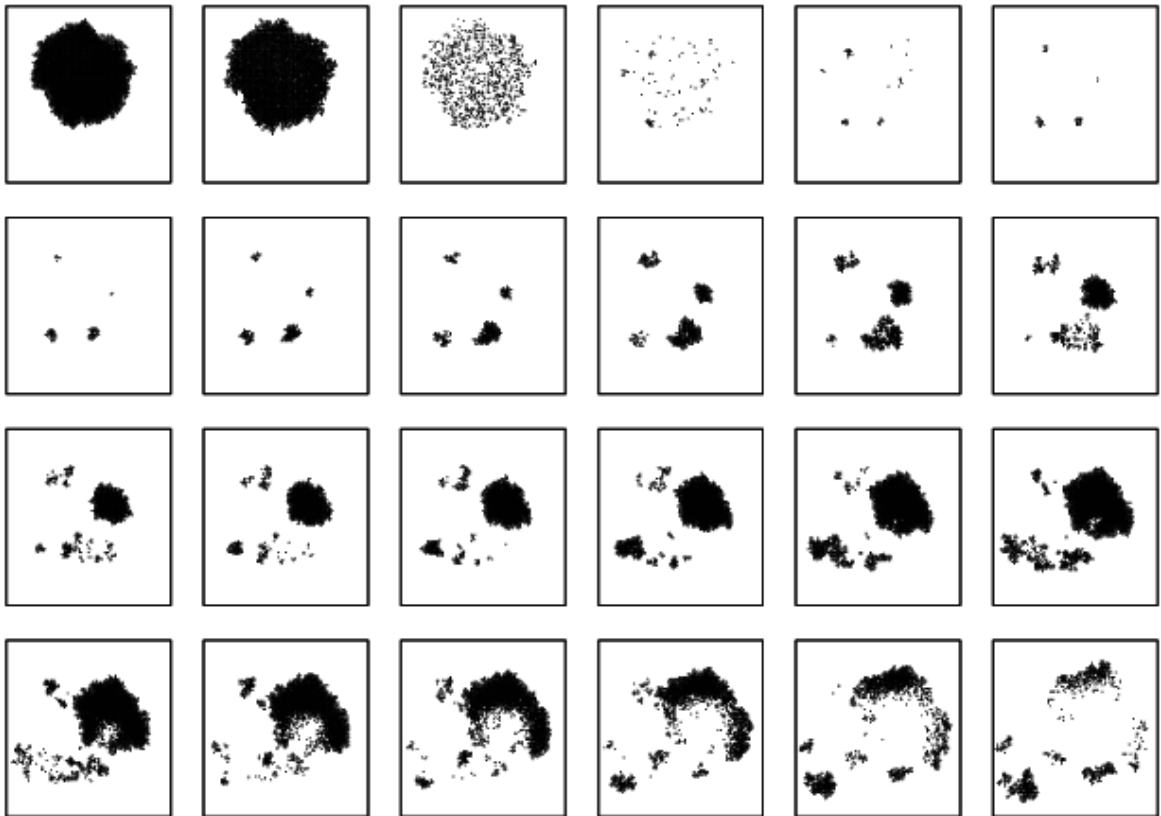


Figura 4.3: No canto superior à esquerda, o tumor é mostrado imediatamente antes da injeção viral e em seguida, o tumor é mostrado a cada três passos de tempo (da esquerda para a direita, de cima para baixo). Apenas as células tumorais são mostradas. Pode-se visualizar as sucessivas ondas de infecção que, nesse caso em particular, não são suficientemente eficazes para eliminar o tumor (comportamento C).

Uma vez que o sistema (câncer e vírus oncolítico) tem uma dinâmica extremamente sensível às flutuações estocásticas de suas populações mesmo para um conjunto fixo de parâmetros dos modelos, nosso objetivo central é caracterizar os comportamentos dominantes em função dos parâmetros γ_v , θ_{inf} , T_l e D_v .

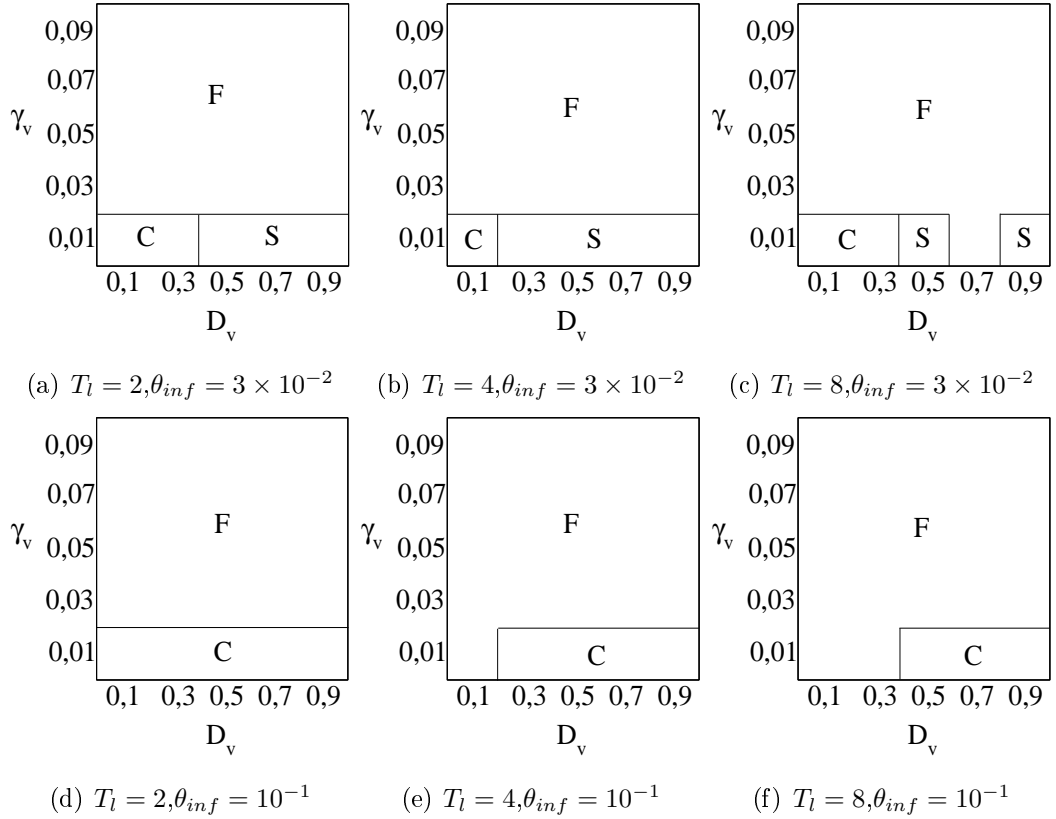


Figura 4.4: Comportamento dominante para cada conjunto de parâmetros. Nas regiões marcadas com S, o tumor é erradicado; em C, o tumor permanece crescendo de modo oscilatório a uma taxa reduzida, enquanto em F o crescimento tumoral é monotônico. Estes resultados foram obtidos considerando médias sobre 5 amostras, por isso eles apenas sugerem os valores de γ_v e θ_{inf} que apresentam comportamento não-trivial e que merecem ser estudados com uma amostragem maior.

Para $\gamma_v > 3 \times 10^{-2}$ e $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$ ou $\theta_{inf} = 0, 1$ a terapia nunca tem sucesso, ou seja, a probabilidade de ocorrer o comportamento F é de 100%, como pode ser visto na figura 4.4. Entretanto, para $\gamma_v = 10^{-2}$ o resultado da terapia depende de θ_{inf} , bem como do tempo característico para lise T_l . Convém ressaltar que quanto menor o valor de θ_{inf} , maior a probabilidade do vírus infectar uma célula cancerosa. Se supomos que a concentração de vírus por célula cancerosa $v/\sigma_c \sim 10^{-1}$, então $\theta_{inf} = 10^{-1}$ implica em uma probabilidade de infecção de aproximadamente 63%, enquanto $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$ corresponde a um vírus capaz de infectar uma célula cancerosa com 99% de probabilidade. Logo, a probabilidade de sucesso da terapia é provavelmente maior para valores mais baixos de θ_{inf} . Se $\gamma_v = 10^{-2}$ e $\theta_{inf} = 10^{-1}$, o tratamento

também fracassa, mas a co-existência entre vírus e tumor emerge como comportamento dominante dependendo da difusão viral, como mostrado nas figuras 4.4(d)-(f). Então estaremos interessados em um protocolo mais agressivo, que seja capaz de erradicar o tumor. Por exemplo, a região $\gamma_v = 10^{-2}$ e $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$ exibe tanto sucesso quanto fracasso terapêutico, determinados pela difusão viral e pelo tempo de lise.

Para $\gamma_v = 5 \times 10^{-3}$ a terapia tem sucesso na maioria dos casos, fracassando apenas quando D_v é menor que 0.3 e $\theta_{inf} > 7 \times 10^{-2}$. Esse resultado pode ser visto na figura 4.5(a). Note que está sendo usado um valor muito baixo para a taxa de retirada de vírus, o que implica em uma forte supressão da resposta imune.

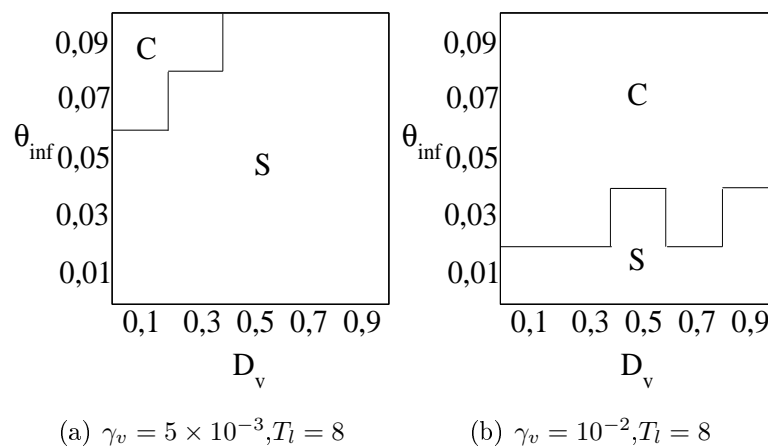


Figura 4.5: Comportamento dominante para cada conjunto de parâmetros, considerando médias sobre comportamentos de 5 amostras. Estes resultados apenas sugerem as ordens de grandeza adequadas dos parâmetros γ_v e θ_{inf}

Portanto, uma vez que para $\gamma_v > 3 \times 10^{-2}$ a terapia fracassa, e para $\gamma_v < 5 \times 10^{-3}$ o tumor é erradicado na maioria dos casos, a região de interesse será em torno de $\gamma_v = 10^{-2}$. Para $\gamma_v = 10^{-2}$ e $\theta_{inf} > 3 \times 10^{-2}$ o tumor cresce de modo oscilatório (comportamento C) na maioria dos casos, independente do valor de difusão dos vírus usado, como pode ser visto na figura 4.5(b). Entretanto, para $\gamma_v = 10^{-2}$ e $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$, o resultado da terapia depende da difusão viral D_v .

Pode-se ver na figura 4.6, na qual os parâmetros $\gamma_v = 10^{-2}$ e $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$ foram mantidos fixos, que nesse caso o resultado da terapia depende não apenas da difusão dos vírus, mas também do seu tempo característico para lise. Neste caso, assumimos um vírus altamente eficiente em infectar seus alvos, uma vez que a probabilidade de infecção é $\sim 99\%$. Na figura 4.6 pode-se ver que a região de maior probabilidade de sucesso se concentra para valores intermediários de T_l , desde que a taxa de difusão dos

vírus não seja suficientemente alta, a terapia é mais eficiente se o tempo característico para a lise da célula cancerosa tiver um valor em uma região ótima.

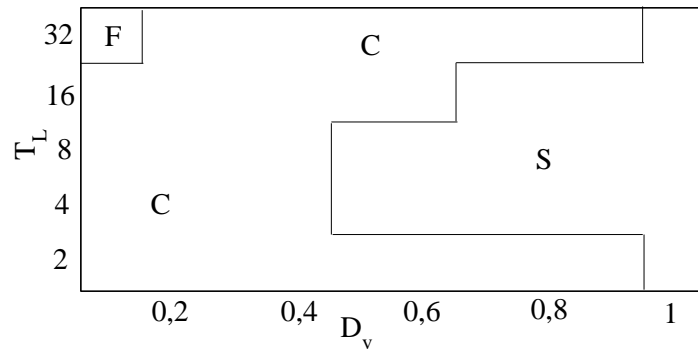


Figura 4.6: Contornos no espaço de parâmetros associados a diferentes respostas do tumor a uma terapia agressiva ($\gamma_v = 10^{-2}$, $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$). Nas regiões marcadas com S, o tumor é erradicado; em C, o tumor permanece crescendo de modo oscilatório a uma taxa reduzida, enquanto em F o crescimento tumoral é monotônico. Foram usados 5×10 pontos no espaço de parâmetros e foram feitas 200 amostras. Cada simulação dura 500 passos de tempo, o que corresponde a aproximadamente 3 meses.

Além de determinar o prognóstico mais provável após a viroterapia, é relevante saber as probabilidades para ocorrência das outras respostas tumorais em cada região do espaço de parâmetros. Para o tratamento agressivo que consideramos aqui, essas probabilidades são mostradas na figura 4.7. Note que o sucesso da terapia nesse caso requer vírus que difundam rapidamente. Quanto mais rápidos os vírus, menores as restrições sobre o tempo de lise que maximiza o sucesso da terapia.

Entretanto, estimativas experimentais indicam que os vírus oncolíticos infectam células cancerosas com uma probabilidade de aproximadamente 70%. Então convém investigar um tratamento com vírus menos eficientes, mas tornando mais severa a supressão do sistema imune para que o tratamento tenha mais chances de ser eficaz. Escolhemos $\gamma_v = 5 \times 10^{-3}$ e $\theta_{inf} = 10^{-1}$, que corresponde a uma probabilidade de infecção de aproximadamente 70%. Os resultados podem ser vistos na figura 4.8. Como para essa figura foi usado um número menor de amostras, se comparado ao diagrama anterior, as fronteiras entre diferentes comportamentos não estão bem definidas. Pode-se observar que, para um tempo característico para lise fixo, o comportamento oscilatório da probabilidade de sucesso em função da constante de difusão dos vírus também ocorre.

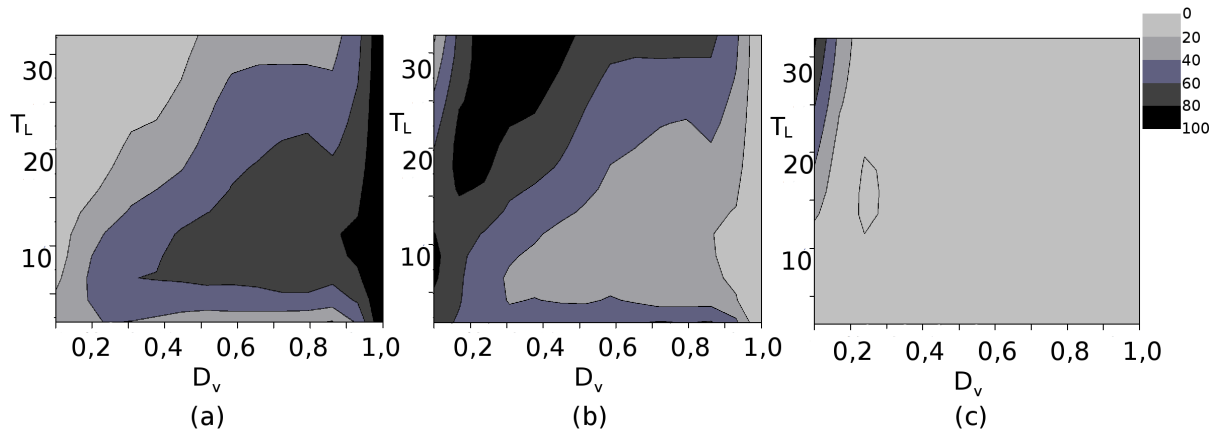


Figura 4.7: Probabilidades para erradicação do tumor (a), crescimento oscilatório (b), e crescimento monotônico (c) em função dos parâmetros T_L e D_v . Ambos $\gamma_v = 10^{-2}$ e $\theta_{inf} = 3 \times 10^{-2}$ permaneceram fixos. As probabilidades foram calculadas usando 200 amostras para cada par (T_L, D_v) .

Comparando com o protocolo anterior (figura 4.6), o sucesso da terapia requer agora vírus que difundam mais rapidamente e que provoquem a lise em um tempo menor. Note que a região onde o comportamento S (sucesso da terapia) é dominante é menor se comparado ao protocolo agressivo (figura 4.6). Ou seja, mesmo aumentando a supressão do sistema imune, esse protocolo ainda é menos eficaz que o anterior. Isso sugere que a busca por vírus mais eficientes em infectar seus alvos possibilita sucesso terapêutico com uma supressão menos severa da resposta imune, o que é vantajoso, uma vez que a supressão da resposta imune implica em riscos para o paciente.

Um problema central no desenvolvimento de protocolos terapêuticos é a determinação dos parâmetros clínicos e/ou biológicos pertinentes a cada problema. Nosso modelo sugere quais os parâmetros-chave que determinam o sucesso da viroterapia. A constante de difusão D_v dos vírus é um dos deles. Uma validação experimental seria possível, por exemplo, variando-se a difusão efetiva dos vírus oncolíticos aplicados a células tumorais *in vitro*. Isso poderia ser feito alterando a viscosidade do meio de cultura. Nesse caso é importante assegurar que a difusão dos nutrientes não seja alterada. Outra possibilidade é crescer as células em uma substância chamada *matrigel*, que é uma versão sintética da matriz extracelular que envolve as células em tecidos reais. Provavelmente o tamanho dos poros dessa substância é pequeno o suficiente para diminuir a difusão viral (e a migração celular) sem afetar a difusão de nutrientes. Portanto, diferentes densidades do *matrigel* estariam associadas a diferentes constan-

tes de difusão dos vírus. Outro parâmetro importante para o resultado da terapia é o período característico para lise celular T_l , que pode ser variado usando vírus oncolíticos diferentes. Por exemplo, deletando a região $E3$ do genoma do Adenovírus é possível aumentar sua velocidade de replicação. É importante assegurar, nesse caso, que as alterações observadas estejam relacionadas apenas à variação do tempo de lise e não a outros aspectos da mutação do vírus.

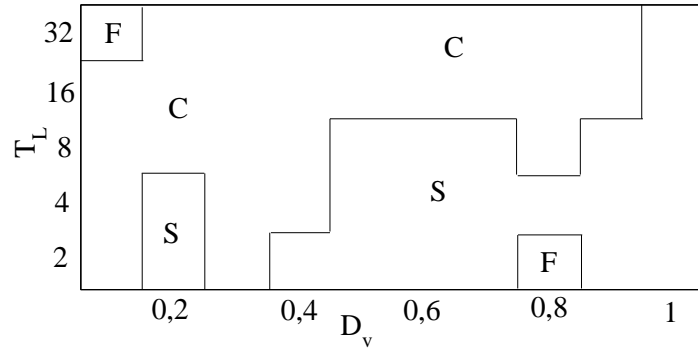


Figura 4.8: Influência do tempo característico de lise T_l e da constante de difusão dos vírus D_v no comportamento dominante do sistema para $\gamma_v = 5 \times 10^{-3}$ e $\theta_{inf} = 10^{-1}$, mantidos fixos. Foram feitas médias sobre 40 simulações diferentes.

Uma questão relevante é como nossos resultados podem ser comparados aos obtidos de testes clínicos [34, 70]. Mesmo administrados por via intratumoral, muitos vírus oncolíticos como adenovírus, vírus da herpes e reovírus em geral induzem apenas reduções transientes no tamanho do tumor [70]. Por exemplo, uma única injeção intratumoral do vírus hrR3 em carcinomas humanos transplantados em camundongos apenas reduziu a taxa de crescimento monotônico desses tumores [71], uma resposta indicada na figura 4.2(c). Além disso, respostas antitumorais transientes foram observadas após uma única administração intratumoral de *Reolysin* (reovírus) e dl1520 (adenovírus ONYX-015) em tumores superficiais [72] e de cabeça e pescoço [73, 74, 75].

Uma vez que o espalhamento intratumoral parece ser ineficiente para adenovírus [70], que apresentam baixa difusividade, as figuras 4.6 e 4.7 podem explicar porque a terapia usando dl1520 fracassa. Os testes clínicos fase I e II com este vírus apresentaram apenas 11% e 14% de respostas positivas, respectivamente. Entretanto, não foi reportado se o crescimento do tumor ocorreu de modo oscilatório ou monotônico. Uma indicação clara do comportamento oscilatório do crescimento do tumor foi observado em um modelo de enxerto de câncer de ovário atacado com MV-CEA (vírus da rubéola

modificado) administrado intratumoralmente [69]. Por outro lado, o vírus *vaccinia* é capaz de induzir respostas completas e duradouras em pacientes após administração intratumoral ou mesmo injeções intravenosas. Especificamente, os vírus *vaccinia* BP [76] e JX-594 [77] erradicaram melanomas em 4 (13%) e 2 (29%) dos pacientes, respectivamente. Esses resultados terapêuticos, correspondentes à figura 4.2(a), têm frequências consistentes com probabilidades de erradicação menores que 35%, obtidas pelas simulações do modelo para $D_v = 0,6$ e $T_l > 5h$ 4.7(a). Novamente, comportamentos oscilatórios não foram evidenciados nos testes clínicos reportados.

4.5 Conclusões

Nesse capítulo, apresentamos os resultados de simulação de um modelo de viroterapia para o tratamento de tumores. Foram obtidos três comportamentos diferentes para a evolução temporal do tumor após a injeção viral: extinção do tumor, oscilações com inclinação global positiva e crescimento exponencial. Esses comportamentos concordam qualitativamente com dados experimentais, mas comparações quantitativas também são possíveis.

As simulações sugerem que, para administração intratumoral dos vírus, um tumor sólido pode ser completamente erradicado ou permanecer crescendo após uma remissão transiente. Além disso, o modelo revela uma dinâmica de oscilações não-amortecidas das populações de vírus e células cancerosas. As condições para as quais cada uma das respostas do tumor dominam, assim como as probabilidades de ocorrência de cada um dos prognósticos terapêuticos, foram determinadas. Nossos resultados indicam que uma viroterapia capaz de erradicar o tumor requer uma forte inibição do sistema imune do paciente⁴ e o uso de vírus potentes com alta mobilidade intratumoral. Entretanto, devido a natureza discreta e estocástica das células e suas respostas, uma região ótima de valores para citotoxicidade viral é predita, pois a viroterapia falha se os vírus oncolíticos requerem um tempo muito curto ou muito longo para matar as células tumorais. Esse resultado sugere que a procura por vírus capazes de destruir células tumorais muito rapidamente não leva necessariamente a um controle mais efetivo do crescimento do tumor.

⁴O sistema imune é representado nesse modelo de forma simplificada pelo parâmetro γ_v .

Capítulo 5

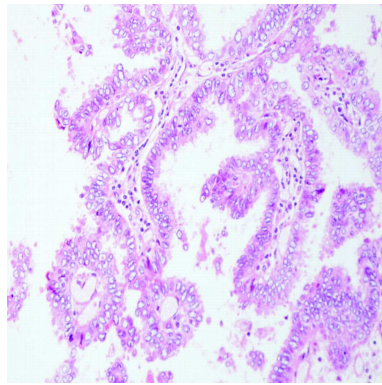
Relações entre o vírus oncolítico e a dinâmica de crescimento do tumor

Neste capítulo o modelo para viroterapia oncolítica descrito no capítulo 4 foi modificado para considerar a natureza individual, discreta dos vírus. Essa abordagem é mais realista, uma vez que os vírus oncolíticos estudados experimentalmente apresentam taxas de replicação muito baixas; alguns vírus oncolíticos são capazes de fazer em média apenas 10 cópias de si mesmos a cada infecção. Logo, as concentrações virais envolvidas são muito menores do que assumimos no capítulo 4 e a descrição mais apropriada para os vírus é tratá-los como agentes discretos. Além disso, pretendemos estudar como a dinâmica de crescimento do tumor e as características do vírus oncolítico se relacionam. Enquanto o modelo do capítulo 4 foi aplicado apenas a tumores sólidos, este modelo será aplicado a tumores sólidos, de baixa mobilidade e taxa de proliferação muito alta, tumores ramificados, cujas células proliferam-se a taxas baixas e apresentam baixa mobilidade, e morfologias difusas, com células altamente móveis e com taxa de proliferação intermediária. O objetivo principal é tentar relacionar vírus oncolíticos e o tipo de tumor de modo a obter o melhor resultado na terapia. Os resultados mostram que, além da alta infectividade e da supressão do sistema imune, a eficácia antitumoral de um vírus é determinada por sua habilidade de espalhar-se pelo tecido, sua eficiência em entrar na célula e sua capacidade replicativa. A relação ótima entre essas características depende do tipo de tumor considerado. Para tumores ramificados, a viroterapia com vírus com baixa difusividade é muito eficiente, mas fracassa se o vírus tem alta difusividade e mata células infectadas rapidamente. Por outro lado, em tumores sólidos a terapia fracassa se o vírus se difunde lentamente pelo tumor. Em tumores difusos uma difusividade viral intermediária maximiza o sucesso da terapia.

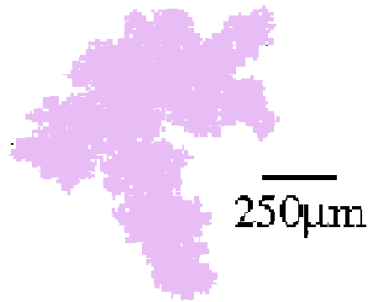
Portanto, o desenvolvimento de vírus oncolíticos eficientes deve considerar a dinâmica de crescimento do tumor. E as características que otimizam o sucesso da terapia não incluem necessariamente espalhamento pelo tumor, replicação e indução da morte celular por lise rápidos, que são comumente assumidos como condições necessárias para o sucesso terapêutico.

5.1 Cenário atual

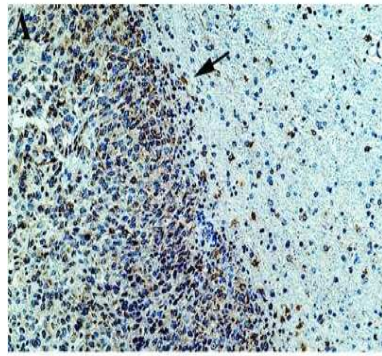
No desenvolvimento de vírus oncolíticos mais eficientes, é importante considerar não apenas as características do vírus, mas também a interação vírus-tumor. A dinâmica de crescimento e/ou a morfologia do tumor devem ser considerados para determinar o vírus que maximiza o sucesso terapêutico. Reis et al. [80] propuseram um modelo 3D discreto para estudar a viroterapia em tumores compactos e tipo-fractais, crescidos de acordo com regras estocásticas. O vírus é introduzido em regiões localizadas do tumor, onde a infecção de cada célula ocorre com uma dada probabilidade. Células infectadas podem fundir com células vizinhas com dada probabilidade, e uma célula infectada morre com uma probabilidade maior do que uma célula não-infectada. Os vírus espalham-se pelo tumor passivamente por meio de fusão célula a célula. Os resultados indicam que o sucesso terapêutico é maior em células cancerosas que morrem lentamente. Em tumores com arquitetura irregular (tipo-fractais) essa é uma característica crucial para o sucesso. Em tumores compactos, a localização da infecção inicial é menos decisiva do que em tumores tipo-fractais, nos quais uma infecção na região central é associada a uma maior probabilidade de erradicação do tumor. Por outro lado, Wodarz et al. [81] se propuseram a identificar a influência da dinâmica de crescimento do tumor no resultado da viroterapia em um modelo baseado em equações diferenciais. Foram examinados crescimento exponencial, crescimento com saturação em um grande número de células e interrupção do crescimento quando o número de células se aproxima de um limite superior. Os resultados obtidos por Wodarz et al. indicam que a resposta terapêutica não depende do termo particular para o crescimento do tumor usado no modelo.



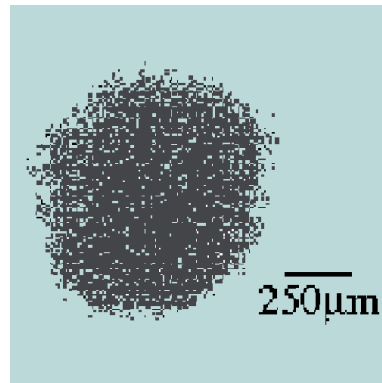
(a) Adenocarcinoma papilar [78]



(b) Tumor gerado pelo modelo



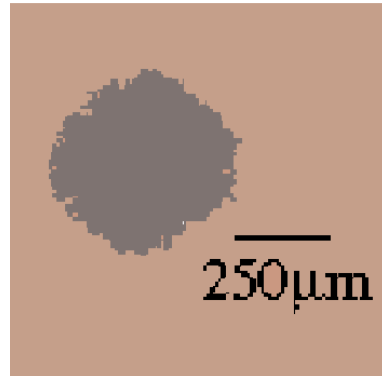
(c) Meningioma invasivo [79]



(d) Tumor gerado pelo modelo



(e) Melanoma *in vivo* [25]



(f) Tumor gerado pelo modelo

Figura 5.1: Em (a), (c) e (e), padrões histológicos de tumores, e em (b), (d) e (f) os padrões obtidos pelo modelo apresentado no capítulo 3, todos com 10^4 células cancerosas, nos quais estudaremos a viroterapia. Em (b) é mostrado um tumor papilar gerado em uma situação de escassez de nutrientes (crescimento lento do tumor). Em (c) a morfologia é classificada como difusa; tumores difusos emergem no modelo quando a disponibilidade de nutrientes é intermediária e as células possuem mobilidade alta. Finalmente, em (f) um tumor sólido ou compacto é mostrado; essa morfologia emerge no modelo quando há abundância de nutrientes e as células têm mobilidade baixa (crescimento rápido do tumor).

5.2 Modelo para viroterapia com descrição discreta dos vírus

Três tipos distintos de morfologias comumente observadas em tumores foram escolhidas: ramificada, sólida e difusa. No modelo os principais fatores que determinam a morfologia do tumor são o consumo de nutrientes e a mobilidade das células cancerosas [6]. Se cada célula consome nutrientes a uma taxa muito alta, o microambiente do tumor terá escassez de nutrientes. Nesse cenário podem emergir morfologias ramificadas, como aquela mostrada na figura 5.1(b). Para esse padrão foram usados $\theta_{del} = 0,01$, $\theta_{mov} = 5$, $\alpha = 0,006$ e $\lambda_1 = 200$. Por outro lado, no modelo apresentado no capítulo 3 padrões difusos emergem para células com alta mobilidade e valores intermediários para as taxas de consumo de nutrientes. Para o padrão mostrado na figura 5.1(d) foram usados $\theta_{del} = 0,01$, $\theta_{mov} = 0,001$, $\alpha = 0,006$ e $\lambda_1 = 50$. Finalmente, morfologias compactas são geradas no modelo quando células normais e cancerosas apresentam baixas taxas de consumo de nutrientes. Logo, há baixa competição por nutrientes e o tumor cresce rapidamente. Os parâmetros $\theta_{del} = 0,03$, $\theta_{mov} = 5$, $\alpha = 0,004$ e $\lambda_1 = 25$ foram mantidos fixos para gerar tumores compactos na ausência de tratamento [6]. Um padrão típico usando esses parâmetros é mostrado na figura 5.1(f).

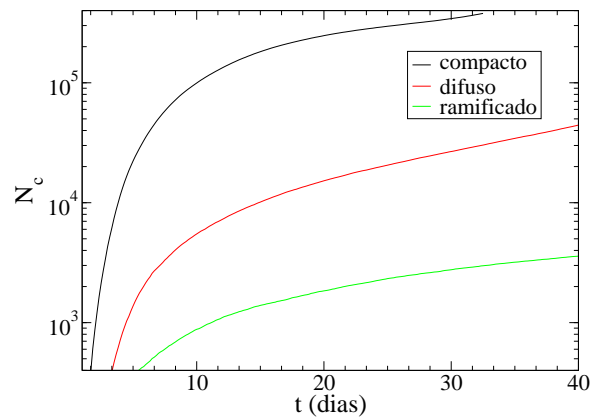


Figura 5.2: Número de células cancerosas em função do tempo para os três tipos de tumor estudados, na ausência de terapia. Note que a população de células do tumor sólido cresce mais rapidamente que a do tumor difuso, que por sua vez cresce mais rapidamente que a do tumor ramificado.

Note que os três padrões obtidos pelo modelo mostrados na figura 5.1 tem o mesmo número de células. A evolução temporal da população de células cancerosas

para cada uma dessas morfologias na ausência de vírus oncolíticos é mostrada na figura 5.2. É importante notar que o tumor ramificado possui a menor taxa de crescimento devido á escassez de nutrientes imposta, enquanto o tumor sólido, que está em um cenário de abundância de nutrientes, cresce mais rapidamente.

Os agentes envolvidos no modelo são os mesmos mostrados na figura 4.1. Entretanto, agora os dois tipos de nutrientes apresentados no capítulo 3, essenciais ($k = 1$) e não-essenciais ($k = 2$) para divisão, são considerados¹. Os agentes do modelo são os mesmos do capítulo anterior; entretanto neste modelo os vírus são descritos como agentes individuais, o que é mais adequado para descrever vírus oncolíticos, que apresentam baixo potencial replicativo. Como vírus são partículas muito pequenas em relação as células, não há restrição para sua população em qualquer sítio. Cada célula não-infectada pode executar uma das ações descritas no capítulo 3: divisão, migração e morte por privação de nutrientes. Além disso, ela pode ser infectada por vírus livres com probabilidade

$$P_{inf} = 1 - \exp \left[- \left(\theta_{div} \frac{\sigma_v}{\sigma_c} \right)^2 \right]. \quad (5.1)$$

análoga a usada no capítulo 4, mas com σ_v ($= 0, 1, 2, \dots$) no lugar de v ($\in \mathbb{R}_{\geq 0}$). Como experimentalmente observado [82], assumimos que o número de vírus n_v que infectam uma dada célula é selecionado de uma distribuição de Poisson,

$$P(n_v) = \frac{k^{n_v} e^{-k}}{n_v!}. \quad (5.2)$$

em que k é um parâmetro do modelo. Essa é uma mudança importante, pois acrescenta um sumidouro de vírus (o modelo apresentado no capítulo 4 desprezava esse sumidouro) além da taxa de remoção uniforme γ_v . A quantidade de vírus infectando uma célula estará relacionada ao número de cópias que o vírus irá liberar na lise. Uma célula infectada não se divide nem é capaz de migrar uma vez que sua maquinaria celular está focada na replicação viral. O modelo assume que células cancerosas infectadas sustentam seu metabolismo até sua lise e que elas morrem apenas por lise. Então, a apoptose induzida pelo vírus e a morte causada por um suprimento de nutrientes insuficiente são negligenciadas. A morte por lise ocorre com probabilidade P_{lise} , que assume a mesma forma apresentada no capítulo 4. Convém ressaltar que, como no capítulo 4, assumimos por simplicidade que nem a probabilidade de lise nem o tempo característico para lise T_l estão relacionados ao número de vírus infectando a célula. A

¹No modelo anterior (cap. 4) apenas um tipo de nutriente era considerado.

lise de cada célula infectada libera v_0 vírus no sítio onde estava a célula que sofreu lise, em que

$$v_0 = b_s \frac{n_v}{A + n_v} \quad (5.3)$$

O parâmetro b_s é número típico de vírus liberados, e assume valores que vão de 10 a 100 para vírus oncolíticos (tabela 5.1). A é um parâmetro do modelo, arbitrariamente escolhido como $A = 0,5$, o que implica que 1 vírus leva à produção de $0,67 \times b_s$. Essa é mais uma diferença importante para o modelo apresentado no capítulo 4, em que a quantidade de vírus liberados na lise era constante e, como já discutido antes, o valor assumido era ordens de grandeza superior ao observado para os vírus oncolíticos em estudo atualmente. No presente modelo, a quantidade de vírus liberados depende da quantidade de vírus que infectaram a célula.

Os vírus livres difundem no tecido. Cada um percorre caminhadas aleatórias na rede, executando q passos de comprimento Δ (a constante de rede) em cada passo de tempo. Por último, vírus livres são retirados com probabilidade γ_v a cada passo de tempo. Essa probabilidade de retirada representa de forma simplificada as complexas respostas do sistema imune inato e adaptativo aos vírus.

A terapia começa quando o tumor atinge N_0 células e consiste em uma única injeção viral. Na administração intratumoral um número $N_0 \times MOI$ de vírus é uniformemente distribuído dentro de um círculo que circunscreve o tumor. MOI , a multiplicidade da infecção, é a razão entre o número de agentes infecciosos (por exemplo, vírus) e o número de alvos para serem infectados (por exemplo, células).

5.3 Algoritmo e estimativa dos parâmetros

As simulações foram implementadas como segue. A cada passo de tempo, as equações para os nutrientes 3.3 são numericamente resolvidas no estado estacionário por meio de métodos de relaxação. Além disso, uma fração de vírus livres presentes em cada sítio é retirada, e cada vírus restante realiza uma caminhada aleatória com q passos. Então, $N_c(t)$ células cancerosas são sequencialmente selecionadas aleatoriamente com igual probabilidade (aqui, $N_c(t)$ é o número total de células cancerosas, infectadas e não-infectadas, no tempo t). Para cada uma delas, uma ação tentativa (divisão, morte, migração ou infecção para uma célula não-infectada e lise para uma célula infectada) é escolhida ao acaso com igual probabilidade. A célula implementará ou não a ação selecionada de acordo com as correspondentes probabilidades locais determinadas pelas

50 Relações entre o vírus oncolítico e a dinâmica de crescimento do tumor

equações 3.4-3.6, 5.1, 4.6, e o tempo é incrementado por $\Delta t = 1/N_c(t)$. Se a ação executada é a infecção da célula, um número aleatório inteiro n_v escolhido de uma distribuição de Poisson é gerado e comparado com a população local de vírus σ_v . Se $\sigma_v \geq n_v$, n_v vírus invadem a célula cancerosa, diminuindo σ_v por n_v . Caso contrário, o processo será repetido até obter $n_v \leq \sigma_v$. Entretanto, se a ação executada é a lise da célula selecionada, v_0 novos vírus são introduzidos no sítio da célula lisada. No final dessa sequência de $N_c(t)$ atualizações, um novo passo de tempo começa e todo o procedimento é iterado. As simulações são interrompidas se alguma célula tumoral atinge o vaso capilar ou a borda do tecido ou ainda se o tumor for erradicado. O algoritmo é mostrado em um diagrama de blocos no apêndice B.

Tabela 5.1: Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.

Parâmetro	Descrição	Estimativa
γ	Probabilidade de remoção dos vírus por unidade de tempo	$2,5 \times 10^{-2} h^{-1}$ [61]
	Constante de difusão de vírus	$3 \times 10^{-2} mm^2 s^{-1}$ [63]
T_l	Tempo de vida médio de uma célula tumoral infectada	$\sim 18h$ [61], 2 dias [57], $\sim 40h$ [68]
P_{inf}	Prob. de um vírus oncolítico infectar uma célula tumoral	$\sim 70\%$ [61]
MOI	Multiplicidade da infecção	1 – 5
b_s	Carga viral típica liberada após a lise	10 – 100 [61]
k	Número típico de vírus que infectam uma célula	1 – 5

O tecido é representado por uma rede quadrada de tamanho linear $L = 500$ e constante de rede $\Delta = 10 \mu m$. Um passo de tempo nas simulações corresponde a $4 - 5h$. Os parâmetros $\theta_{div} = 0,3$ e $\lambda_2 = 10$ são fixos. Para gerar padrões compactos, ramificados e difusos, diferentes valores dos parâmetros θ_{del} , θ_{mov} , λ_1 e α foram usados, como listado na tabela 5.2. Os parâmetros γ_v e θ_{inf} também foram fixos (ver tabela 5.1). A terapia começa quando o tumor tem $N_0 = 5000$ ou 10^4 células. Os parâmetros que controlam a difusão dos vírus q , a entrada viral k , a sua replicação b_s , seu tempo para desencadear a lise T_l e o valor de MOI , assumiram diferentes valores.

Tabela 5.2: Parâmetros que caracterizam os tipos de tumores estudados

Parâmetro	Descrição	Tumor Sólido	Tumor Difuso	Tumor Ramificado
α	consumo de nutrientes	0,04	0,006	0,006
λ_1	consumo acelerado de nutrientes por células cancerosas	25	50	200
θ_{mov}	$P_{mov} = 1 - \exp[-\sigma_c(\phi_2/\theta_{mov})^2]$	5	0,001	5
θ_{del}	$P_{del} = \exp[-(\phi_2/\sigma_c\theta_{del})^2]$	0,03	0,01	0,01

5.4 Resultados e discussão

A figura 5.3 ilustra os resultados típicos obtidos após a administração intratumoral dos vírus: os tumores podem ser completamente erradicados ou continuar crescendo após uma regressão transiente, analogamente ao observado no modelo apresentado no capítulo 4.

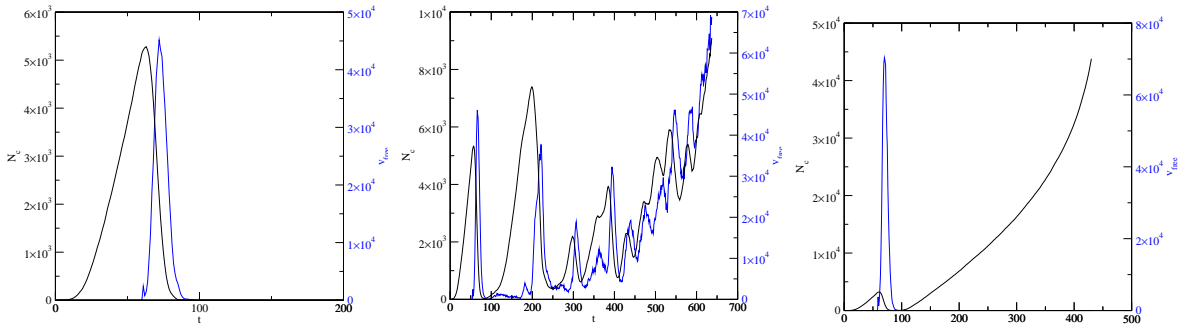


Figura 5.3: Evolução temporal das populações de células cancerosas não-infectadas e vírus em um tumor difuso. Uma única injeção viral foi administrada quando o tumor possuía $N_0 = 5000$ células. Note que os três comportamentos distintos foram obtidos usando exatamente os mesmos parâmetros e condições iniciais ($MOI = 1$, $bs = 100$, $k = 1$, $q = 25$, $T_l = 16$). Esses comportamentos diferentes emergem da estocasticidade.

No caso de crescimento do tumor ele pode ser monótono ou oscilante. Além da erradicação do tumor, oscilações foram observadas em enxertos de mieloma humanos induzidos em ratos e tratados com vírus do sarampo [83] e em um modelo de dinâmica de população para viroterapia [84]. Entretanto, o equilíbrio entre vírus e tumor

observado em um modelo de enxerto de câncer de ovário [69] e em uma abordagem matemática usada por Dingli *et al.* [84] parece ser instável no modelo aqui apresentado. É importante mencionar que os três tipos de comportamentos foram observados nos três tipos de tumores estudados.

Nossas simulações indicam que um vírus oncolítico agressivo ($\theta_{inf} = 0,01$), injetado em um tumor a $MOI = 1,0$ com entrada viral $k = 1$ e $\gamma_v = 0,03$ pode erradicar o tumor ramificado, dependendo de seu tempo característico para lise celular (T_l), difusividade (q) e carga viral típica liberada após a lise (bs). Mesmo vírus com baixo potencial replicativo ($bs = 10$) são altamente eficientes em erradicar tumores papilares se eles difundem lentamente pelo tumor. Como mostrado na figura 5.4(a), a eficácia anti-tumoral de vírus pouco difusivos depende muito fracamente de T_l , o tempo característico gasto pelo vírus para induzir a lise de uma célula infectada. Além disso, a eficácia anti-tumoral decai com o aumento na difusividade viral.

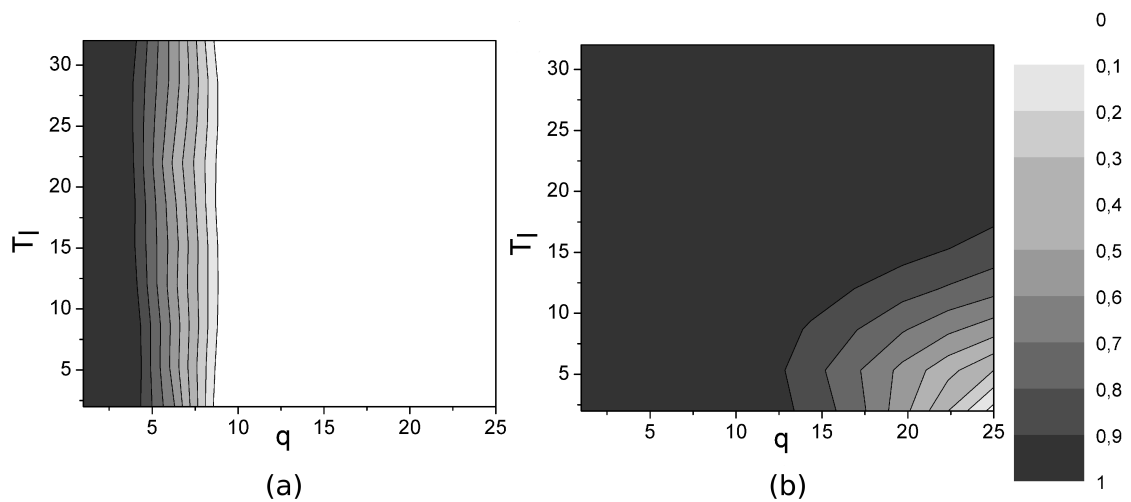


Figura 5.4: Probabilidade de sucesso do tratamento contra um tumor ramificado para diferentes difusividades virais q e tempo característico para lise T_l . Em (a), $bs = 10$ e em (b), $bs = 100$. Em todas as figuras, $\gamma_v = 0,03$, $\theta_{inf} = 0,01$, $MOI = k = 1$, $N_0 = 10^4$. As probabilidades foram calculadas a partir de 50 amostras.

À medida que a carga viral liberada após cada lise (bs) é aumentada, a probabilidade de erradicação do tumor alcança valores muito altos mesmo para altos coeficientes de difusão. Para vírus altamente replicativos ($bs = 100$), a terapia fracassa apenas se o vírus difunde muito rapidamente pelo tecido e mata rapidamente as células cance-

rosas. Esse resultado pode ser compreendido se lembrarmos que um tumor papilar cresce muito lentamente, então o vírus ideal deve difundir lentamente o bastante e seu tempo característico para promover a lise (T_l) deve ser suficientemente grande para manter os vírus localizados na região do tumor. A probabilidade de sucesso da terapia é ligeiramente menor se os vírus são injetados em tumores maiores (com $N_0 = 10^4$ células) do que em tumores menores (com $N_0 = 5000$ células). A estratégia de usar vírus com baixa difusividade é indicada no caso de administração intratumoral dos vírus. Entretanto, vírus com baixa difusividade teriam dificuldade de alcançar o tumor se fossem administrados pela via intravenosa.

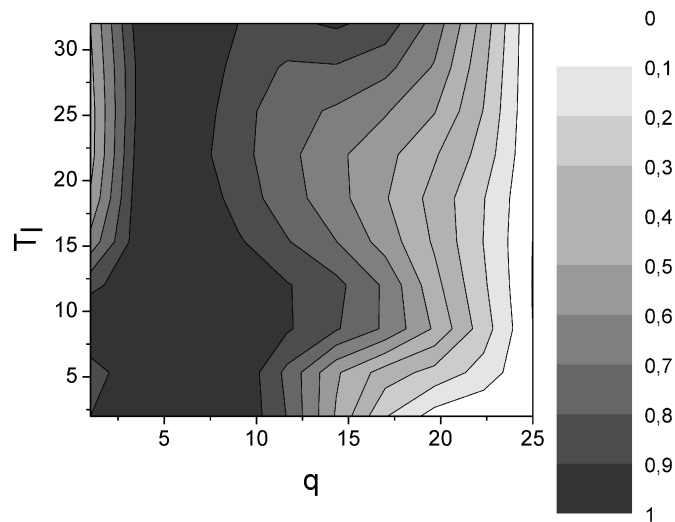


Figura 5.5: Probabilidade de sucesso da terapia em um tumor desconexo. Os valores $bs = 100$, $\gamma_v = 0,03$, $\theta_{inf} = 0,01$, $MOI = 1$, $k = 1$ e $N_0 = 10^4$ são fixos.

Usando os mesmos vírus oncolíticos e protocolos capazes de erradicar tumores ramificados, a probabilidade de sucesso da terapia em tumores difusos pode ser vista na figura 5.5. Note que a probabilidade de sucesso também tende a zero para vírus altamente difusivos e aumenta significativamente para vírus que se espalham lentamente pelo tecido. O vírus oncolítico mais eficiente em erradicar tumores difusos deve combinar altas taxas replicativas e difusividade intermediária. Se o vírus difundir muito lentamente, então o tempo característico para lise deve ser pequeno para maximizar o sucesso terapêutico. Por outro lado, se o vírus tem alta difusividade, a probabilidade de sucesso exhibe um comportamento reentrante caracterizado por um decréscimo inicial, seguido por um aumento do sucesso terapêutico à medida que o período para lise T_l aumenta.

Os resultados discutidos acima devem ser confrontados com aqueles obtidos para um tumor sólido para determinar quais as características mais importantes em um vírus oncolítico eficiente contra tumores sólidos. O mesmo vírus oncolítico e o mesmo protocolo usado para o tumor papilar ($\gamma_v = 0,03$, $\theta_{inf} = 0,01$, $MOI = 1$, $k = 1$ e $N_0 = 10000$) fracassa para um tumor sólido, uma vez que a neoplasia não é erradicada para nenhum dos valores de T_i e q estudados, mesmo para alta replicação viral ($b_s = 100$). Portanto, o vírus mais eficiente em erradicar tumores papilares (de crescimento lento) é ineficaz contra tumores sólidos (taxa de crescimento alta). Enquanto o número de células cancerosas cresce, os vírus são extintos se $q = 1$ ou coexistem com o tumor em crescimento, se $q > 1$. Nesse regime de coexistência, o tumor cresce a uma taxa reduzida.

Uma vez que os tumores sólidos estudados crescem mais rapidamente que os ramificados, seria intuitivo assumir que vírus mais difusivos seriam eficientes em eliminar o tumor. Entretanto, a probabilidade de sucesso permanece nula mesmo para difusividades tão altas como $q = 900$. Uma alternativa seria aumentar a dose viral administrada inicialmente. Contudo, mesmo a altos $MOIs$ ($MOI = 5$) a terapia falha completamente se a entrada média de vírus em uma célula é mantida em $k = 1$. Outra abordagem para tentar erradicar o tumor seria aumentar a entrada viral k .

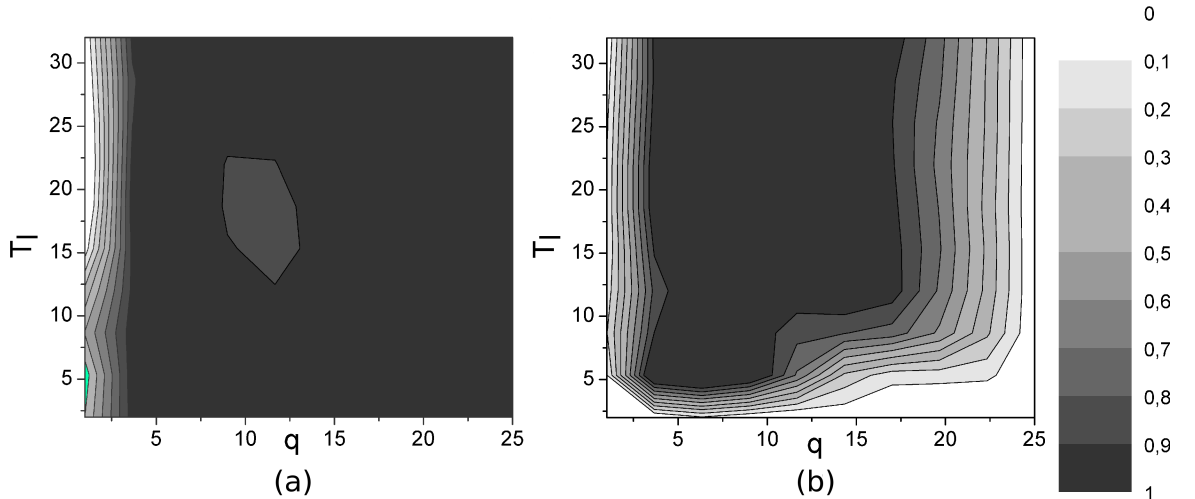


Figura 5.6: (a) $MOI = 1$ e entrada viral média $k = 5$, e (b) $MOI = k = 1, 5$. Os parâmetros $b_s = 100$, $\gamma_v = 0,03$, $\theta_{inf} = 0,01$, e $N_0 = 5000$ são mantidos fixos.

Como pode ser visto na figura 5.6a, uma alta entrada viral ($k = 5$) altera completamente o resultado da terapia. Agora a viroterapia falha apenas, mesmo usando

$MOI = 1$, para vírus com difusividade muito baixa e período lítico muito grande. Além disso, um sucesso significativo é atingido reduzindo k enquanto o valor de MOI é aumentado. Isso pode ser visto na figura 5.6b em que $k = 1,5$ e $MOI = 1,5$. Nesse caso, o sucesso terapêutico requer um vírus com alta difusividade e ciclo lítico apropriado. Uma difusão adequada ($3 \lesssim q \lesssim 16$) permite espalhamento dos vírus pelo tumor a uma taxa similar ou maior que a taxa de crescimento do tumor. Mas se a difusividade viral é fixa, o tempo de lise T_l deve estar em um certo intervalo ($7 \lesssim T_l \leq 32$ para $q = 15$). De fato, se o vírus promove a lise celular muito rapidamente, os vírus liberados ficam confinados em algumas regiões, o que impossibilita a geração de novas ondas de infecção. Por outro lado, um período lítico muito longo gera ondas de infecção sucessivas com baixa frequência, incapazes de destruir o tumor. Esses resultados são consistentes com aqueles obtidos no modelo apresentado no capítulo 4, o que indica a robustez dos dois modelos.

Como pode ser observado na figura 5.7, um inesperado acoplamento entre T_l e bs é observado. Para uma replicação viral muito alta $bs = 100$, a probabilidade de sucesso é praticamente independente de T_l . Entretanto, para baixa replicação viral ($bs = 10$), essa probabilidade decresce com o aumento de T_l para $q < 10$ (baixa difusividade viral) mas aumenta com T_l para valores mais altos de q . Uma possível explicação para esse comportamento é que com alta difusividade mesmo um vírus com baixo potencial replicativo pode sustentar ondas sucessivas de infecção por meio da lise de células.

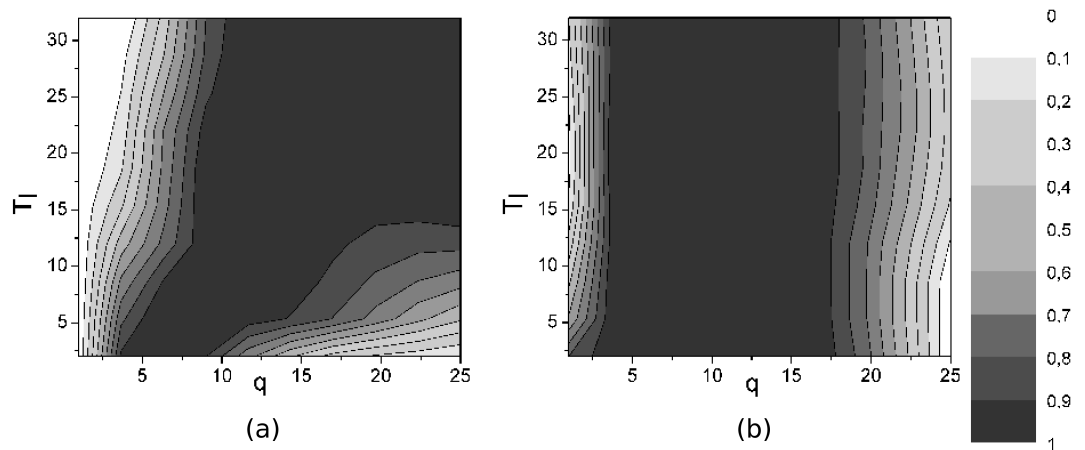


Figura 5.7: Probabilidade de sucesso da terapia em tumores sólidos usando $MOI = k = 2$. À esquerda $bs = 10$ e à direita $bs = 100$ foram usados. $N_0 = 5000$ fixo para a viroterapia.

Uma vez que nossos resultados indicam que a difusividade viral é um parâmetro essencial no resultado da terapia, uma área para intervenção experimental a ser explorada é a difusão do vírus pelo tumor, modificando o próprio vírus ou o microambiente tumoral. Várias citocinas, ou tratamentos físicos, tais como radiação, aumentam a permeabilidade vascular do tumor e o fluxo sanguíneo, levando a uma maior difusividade [85]. A incorporação de enzimas líticas, como a hialuronidase, em um vírus oncolítico, pode aumentar sua taxa de difusão [86]. Além disso, agentes que degradam o colágeno intersticial podem melhorar o transporte em tumores [87, 88]. O colágeno tumoral pode dificultar a difusão significativamente, e foi mostrado por Mok et al. [89] que as metaloproteinases de matriz 1 e 8 podem remodelar a matriz tumoral e aumentar a distribuição de um vírus oncolítico, sem afetar a proliferação celular ou a replicação viral. Mok et al. [89] concluíram que a expressão de ambas as colagenases aumentou o transporte convectivo e a eficácia dos vírus. Além disso, um trabalho anterior havia mostrado que a metaloproteinase de matriz 8 é anti-metastática. Portanto, ela pode ser usada de modo seguro para aumentar a difusividade viral.

5.5 Conclusões

Neste capítulo foi apresentado um modelo multiescala para viroterapia oncolítica com uma modelagem mais realista dos processos de infecção e replicação viral por meio da descrição dos vírus como agentes (discretos). Além de discutir os efeitos da natureza discreta dos vírus oncolíticos, discutimos as relações entre as características do vírus e a dinâmica do tumor.

Nossos resultados evidenciam a necessidade de considerar a dinâmica tumoral para determinar o vírus oncolítico mais eficiente. Provavelmente, o fator mais importante da dinâmica tumoral a ser considerado é a taxa de crescimento do tumor. No nosso modelo, células cancerosas com taxas de replicação diferentes geram tumores com morfologias distintas. Enquanto células tumorais que se replicam a taxas muito altas geram tumores sólidos, células cancerosas que se replicam a taxas muito baixas (devido à escassez de nutrientes) geram tumores ramificados, e células com taxas de crescimento intermediárias e mobilidade alta geram morfologias difusas. Considerando os fatores que aumentam a probabilidade de erradicação do tumor com a viroterapia, nossos resultados indicam fortemente que a taxa de crescimento do tumor e a difusividade do vírus oncolítico estão diretamente correlacionadas. Assim, enquanto vírus altamente difusivos maximizam o sucesso da terapia em tumores sólidos, em tumores

ramificados vírus com menor coeficiente de difusão são mais eficientes, e para tumores difusos um vírus oncolítico eficiente deve apresentar difusividade intermediária. Além disso, o tempo característico para lise é determinante para o resultado da terapia em alguns casos, em particular quando a capacidade replicativa do vírus é alta ($b_s = 100$) mas tanto a dose viral injetada (relacionada ao *MOI*) quanto a entrada viral k são baixas.

Como no modelo apresentado no capítulo 4, os resultados indicam que a infectividade viral θ_{inf} , a persistência no tecido, determinada por γ_v (ambos fixos nas simulações apresentadas aqui), a difusividade q , o tempo característico para lise T_l , as taxas de crescimento do tumor e a mobilidade celular são parâmetros importantes para controlar o sucesso da terapia. Entretanto, este modelo destaca a importância da replicação viral b_s , da entrada viral k e do *MOI* inicial para o sucesso da terapia. Considerando que a dose viral administrada (*MOI*) deve ser a menor possível, de modo a minimizar efeitos colaterais, uma nova estratégia que nossos resultados sugerem é a manipulação viral para permitir que uma célula cancerosa seja infectada por vários vírus simultaneamente. Nesse caso, o número de vírus liberados após a lise é maior, sustentando ondas de infecção mais fortes, com maior probabilidade de eliminar o tumor.

Capítulo 6

Um modelo para a resposta imune na viroterapia contra o câncer

Apesar de diversos trabalhos mostrarem a segurança e especificidade dos vírus oncolíticos, a eficácia antitumoral deve ser aumentada. Há evidências de que a resposta imune do paciente à infecção viral tenha um papel crítico no sucesso da terapia. Logo após a administração dos vírus, a imunidade inata intratumoral (que inclui granulócitos, células assassinas naturais e macrófagos) pode desempenhar um papel importante limitando o espalhamento dos vírus [90, 91]. Fulci *et al.* [92] propuseram que a rápida remoção intratumoral dos vírus resulta da fagocitose por monócitos e que a depleção transiente dessas células durante a administração dos vírus aumentaria o espalhamento dos vírus e o efeito anti-câncer. De fato, o recrutamento de monócitos foi associado à remoção intratumoral de 80% dos vírus oncolíticos (derivados do HSV) logo após sua administração em gliomas [92]. A depleção de monócitos, *microglias* e macrófagos implica em um aumento de até 10 vezes na concentração viral no tumor, levando a uma terapia mais eficiente. Além disso, a resposta imune adaptativa, que se desenvolve mais tarde do que a resposta inata, também tem um papel crítico [93]. Ela envolve um componente baseado em células T, dominantes após ~ 6 dias [94], e uma resposta humoral desencadeada por anticorpos específicos neutralizantes contra os antígenos virais [93]. Esses anticorpos não são sintetizados antes de 5 dias após a infecção [90].

Portanto, nesse capítulo propomos um modelo para estudar como a resposta imune interfere com a atividade oncolítica direta dos vírus. Faremos isso incluindo agentes do sistema imune no modelo para a viroterapia do câncer proposto no capítulo 5. Assumimos que o sistema imune não pode reconhecer as células cancerosas não infectadas, ou seja, o tumor já criou mecanismos de escape da resposta imune. Logo,

esta resposta tem como alvo os vírus isolados no tecido (normal/canceroso) e as células tumorais infectadas que apresentam em sua superfície epítomos¹ virais. Enquanto células T citotóxicas podem induzir apoptose em células cancerosas infectadas, vírus livres podem ser inativados por anticorpos neutralizantes. Esses anticorpos entram no tecido através do vaso capilar, vindos de sítios específicos do sistema imune, ou podem ser levados por células B diretamente ao tecido infectado. Nossos resultados indicam que o sucesso da terapia pode ser alcançado se células B e T citotóxicas tiverem um raio de ação suficientemente pequeno, que está relacionado a sua velocidade bem como a sua habilidade de identificar seus alvos. Esse raio de ação parece ser um parâmetro mais importante do que a taxa de recrutamento dos anticorpos, ou a permeabilidade do vaso capilar aos anticorpos. Além disso, uma supressão do sistema imune inato, representada por uma taxa constante de remoção dos vírus, é necessária.

6.1 Cenário atual

As estratégias comumente usadas para impedir que a resposta imune elimine os vírus oncolíticos antes que eles erradiquem o tumor são a administração de imunossuppressores [33] e o desenvolvimento de vírus mais resistentes à ação do sistema imune. A abordagem do problema via modelagem matemática permite sugerir quais elementos e processos são determinantes para o fracasso comumente observado da viroterapia na presença de resposta imune. Em 2004 Wu *et al.* propuseram um modelo baseado em equações diferenciais parciais para estudar as relações entre um tumor esférico em crescimento, vírus oncolíticos e a resposta imune. Eles mostraram que um vírus capaz de erradicar tumores na ausência de resposta imune perde essa capacidade quando o sistema imune não está suprimido. De fato, os vírus são eliminados pela resposta imune antes de eliminarem o tumor. Somente se a resposta imune for severamente suprimida o tratamento é bem sucedido. Outro modelo baseado em equações diferenciais parciais foi proposto em 2006 por Friedman *et al.* [61] para estudar os efeitos da supressão do sistema imune inato e da replicação viral na viroterapia de gliomas. Eles mostraram que com os atuais valores para replicação viral ($10 < b_s < 100$) o tumor não pode ser erradicado mesmo com o imunossupressor (ciclofosfamida).

¹Epítopo é o sítio de ligação específico que é reconhecido por agentes da resposta imune, como um anticorpo ou um receptor de superfície de um linfócito T. Ou seja, é a menor porção de antígeno com potencial de gerar a resposta imune.

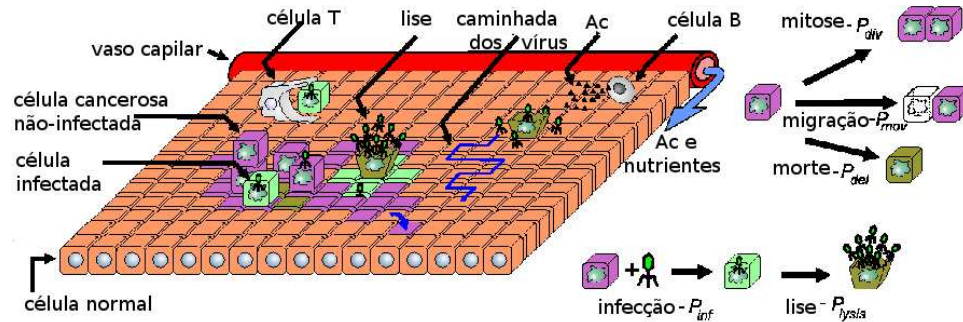


Figura 6.1: Os agentes do modelo são células normais, necróticas, cancerosas (infectadas e não-infectadas), vírus oncolíticos, linfócitos B e T $CD8+$ e anticorpos. Enquanto células cancerosas, linfócitos e vírus realizam caminhadas aleatórias, anticorpos obedecem a uma equação de reação-difusão.

6.2 Modelo para resposta imune na viroterapia

A figura 6.1 ilustra os agentes e processos envolvidos no modelo em diferentes escalas temporais e espaciais. Este modelo é baseado no modelo para viroterapia oncolítica apresentado no capítulo 5. São considerados seis tipos diferentes de células (células normais, cancerosas infectadas, cancerosas não-infectadas, necróticas, linfócitos B e linfócitos T $CD8+$), além de vírus oncolíticos e anticorpos. Esses agentes individuais são descritos por suas populações (σ_n , σ_c , σ_d , σ_B , σ_{CD8} , σ_v e Ac) em cada sítio $\vec{x} = (i, j)$. Uma vez que vírus e anticorpos são partículas muito pequenas comparadas a células, não há restrições para sua população em cada sítio.

Os nutrientes difundem do vaso capilar através do tecido e são divididos em dois grupos: essenciais e não-essenciais para divisão celular. Ambos são descritos por campos contínuos, que evoluem no tempo e no espaço de acordo com as equações de reação difusão (3.3).

Células cancerosas (infectadas ou não) podem se empilhar em um dado sítio, refletindo o fato de que a divisão das células tumorais não está limitada por inibição por contato. Células normais não se dividem. Linfócitos B e T não podem empilhar em um sítio, nem ocupar um sítio ocupado por uma ou mais células cancerosas. As células cancerosas podem dividir, mover, morrer ou ser infectadas por vírus livres. Uma vez infectada, uma célula cancerosa pode morrer por lise, liberando novos vírus no seu microambiente. Linfócitos B são capazes de migrar no tecido e liberar anticorpos, e linfócitos T $CD8+$ podem migrar ou induzir apoptose em uma célula cancerosa

infectada. Os anticorpos podem se ligar a vírus livres e inativá-los.

Células cancerosas

A dinâmica das células cancerosas não-infectadas é idêntica a apresentada no capítulo 5: elas podem, com as correspondentes probabilidades, dividir, migrar ou morrer devido ao suprimento reduzido de nutrientes e ser infectadas por vírus livres. As cancerosas infectadas, por sua vez, além de morrerem por lise, podem ter sua apoptose induzida por linfócitos T citotóxicos ($CD8+$) porque mostram novos epítomos (MHCs e peptídeos virais). A principal diferença é que a morte por lise libera vírus na microrregião da célula que sofreu lise, enquanto a morte por apoptose não libera vírus.

Vírus oncolíticos

A viroterapia começa quando o tumor possui N_0 células e consiste de uma única injeção viral. Na administração intratumoral $N_0 \times MOI$ vírus são uniformemente distribuídos sobre o tumor. Essa abordagem corresponde a protocolos experimentais usados em camundongos imunodeficientes [95] e em ensaios *in vitro* [68, 96]. Cada vírus livre executa uma caminhada aleatória na rede, como apresentado no capítulo 5. Eles infectam uma célula cancerosa com probabilidade P_{inf} (dada pela equação 5.1), e o número de vírus que infectam uma célula é escolhido de acordo com uma distribuição de Poisson (equação 5.2).

A lise de cada célula cancerosa infectada libera v_0 vírus no meio extra-celular. Imediatamente após a lise, os vírus recém-liberados permanecem no sítio da célula que sofreu lise, a partir do qual eles difundirão através do tecido. Além de sofrerem uma degradação constante a uma taxa γ_v (que representa principalmente a resposta imune inata), eles são atacados por anticorpos específicos presentes no tecido. Os anticorpos se ligam aos vírus impedindo sua ligação aos receptores celulares e subsequente entrada na célula, neutralizando-os. Por fim, assumimos que esses vírus neutralizados são destruídos pelos macrófagos, sendo eliminados do sistema.

Resposta Imune

A resposta imune inata será representada por um mecanismo simples, que consiste na retirada de vírus livres do tecido a uma taxa γ_v . Essa resposta é ativada imediatamente após a injeção viral.

A resposta imune adaptativa se desenvolve um pouco mais tarde (5 a 6 dias após a administração dos vírus), e será executada por linfócitos B, que liberam anticorpos específicos, e linfócitos T $CD8+$, que podem induzir apoptose em uma célula infectada. Ambos os linfócitos são descritos como agentes individuais.

O recrutamento de linfócitos é um processo complexo, mas assumiremos que cada célula B ou T $CD8+$ entra no tecido, por meio do vaso capilar, a uma taxa dada por β_B ou β_{CD8} , respectivamente, se o número de células infectadas é maior que um limiar σ_{inf}^{min} . Se o número de células infectadas está abaixo desse limiar, assumimos que o nível de infecção é muito baixo e, conseqüentemente, a sinalização é muito fraca para induzir o recrutamento de linfócitos. Quando a maioria das células infectadas estiverem mortas, o recrutamento dos linfócitos será interrompido, e as populações de células B e T $CD8+$ diminuirão devido aos seus tempos de vida, $T_B \sim 3 - 8$ semanas e $T_{CD8+} \sim 4 - 8$ semanas, respectivamente.

A cada passo de tempo, uma célula T $CD8+$ pode induzir apoptose em uma célula infectada com probabilidade P_{apop} ou mover-se dentro de um círculo definido por R_{CD8} centrado em sua posição. Uma célula T pode induzir apoptose apenas em uma célula infectada primeira-vizinha, uma vez que ela precisa conectar-se a célula alvo. Ela orienta seu aparato de Golgi e seus microtúbulos na direção da célula alvo para liberar as secreções que induzirão a apoptose [97]. Esse processo só pode ser feito em uma célula-alvo de cada vez. Como essa ação citotóxica parece ser fortemente direcionada, nosso modelo assume que, se houver mais de uma célula infectada primeira-vizinha da célula T, ela escolherá aleatoriamente uma delas e induzirá a apoptose nessa célula alvo com probabilidade P_{apop} .

Por sua vez, as células B podem apenas mover-se em um círculo de raio R_B . Os linfócitos B presentes no tecido estão ativados e sintetizam anticorpos antivirais. Uma parcela significativa dessas células B ativadas permanece fora do tecido infectado, e libera seus anticorpos na corrente sanguínea, gerando uma concentração de anticorpos específicos no vaso capilar. Esses anticorpos extravassam para o tecido infectado, unindo-se aos anticorpos liberados localmente pelas células B recrutadas. Então, em nosso modelo os anticorpos infiltram no tecido através do vaso capilar a uma taxa constante β_A e cada célula B na região do tumor sintetiza anticorpos a uma taxa β_A .

O movimento dos linfócitos é governado pelas seguintes regras. Um linfócito escolhido para mover-se verifica sua vizinhança definida pelo círculo centrado em sua posição e por seu raio de ação correspondente. Se não houver nenhuma célula infectada nessa vizinhança, ele salta para um sítio aleatoriamente escolhido na borda do

círculo. Caso contrário, o linfócito ocupará um sítio vizinho de uma célula infectada aleatoriamente escolhida dentro dessa vizinhança. Isso corresponde a um movimento direcionado para a região infectada, com trajetórias menos confinadas em regiões sem células infectadas e trajetórias mais confinadas se há células infectadas na vizinhança do linfócito. Essas regras são sugeridas por imagens *in vivo* dos processos de infiltração e eliminação de células T *CD8+* em um tumor sólido [98].

Os anticorpos neutralizantes formam um campo contínuo cuja concentração obedece a equação de difusão

$$\frac{\partial A}{\partial t} = D_A \nabla^2 A + \sigma_B \beta_A - \gamma_A A. \quad (6.1)$$

O termo $\nabla^2 A$ corresponde à difusão dos anticorpos, o termo $\sigma_B \beta_A$, à produção de anticorpos pelas células B, e o termo $\gamma_A A$ se refere à degradação ou retirada de anticorpos. Essa equação pode ser escrita na forma adimensional executando-se a transformação de variáveis

$$t' = \frac{D_A t}{\Delta^2}; x' = \frac{x}{\Delta}; A' = \frac{A}{A_0}. \quad (6.2)$$

Após alguma manipulação algébrica, pode-se obter a equação

$$\frac{\partial A'}{\partial t'} = \nabla^2 A' + \beta'_A \sigma_B - \gamma'_A A', \quad (6.3)$$

que obedece a condição de contorno no vaso capilar

$$A'(x, 0) = 1,$$

e envolve as taxas adimensionais de síntese e retirada de anticorpos

$$\beta'_A = \frac{\Delta^2 \beta_A}{D_A A_0}; \gamma'_A = \frac{\Delta^2 \gamma_A}{D_A}. \quad (6.4)$$

A estequiometria da neutralização mediada por anticorpos não é completamente entendida, e é usualmente descrita por duas abordagens: modelos que assumem que a neutralização de um vírus pode ser obtida pela ligação de uma única molécula de anticorpo, e modelos que propõem que vários anticorpos são necessários para inativar um único vírus [99]. Além dessas abordagens, a “teoria da cobertura”, proposta por Burton e colaboradores [100], sugere que a estequiometria da neutralização está relacionada ao número de anticorpos necessários para “cobrir” a superfície do vírus, e que essa quantidade pode ser estimada como uma função da área superficial do vírus. Assumimos neste modelo que vírus livres podem ser inativados com uma probabilidade

P_{inat} , uma função da concentração local de anticorpos que satura em 1 quando essa concentração ultrapassa o valor A_{inat} ,

$$P_{inat}^{(\sigma)} = \begin{cases} 1, & \text{se } A(i, j) > A_{inat} \\ \frac{2A(i, j)}{A(i, j) + A_{inat}} & , \text{ caso contrário} \end{cases} \quad (6.5)$$

6.3 Algoritmo e estimativa de parâmetros

As simulações são implementadas como se segue. A cada passo de tempo, a eq. 3.3 é numericamente resolvida no estado estacionário, enquanto a equação 6.3 é iterada por um número definido de vezes. Então, frações dos vírus livres são retiradas, inativadas por anticorpos com probabilidade dada pela equação 6.5, e cada vírus remanescente executa uma caminhada aleatória com q passos. Em seguida, linfócitos T $CD8+$ e B são recrutados para o tecido, e N_1 células cancerosas e N_2 linfócitos são sequencialmente selecionados ao acaso com igual probabilidade. Aqui, N_1 é o número total de células cancerosas, infectadas ou não, e N_2 é o número total de linfócitos B e T $CD8+$ no instante de tempo t . Para cada uma delas, uma ação tentativa é aleatoriamente escolhida com mesma probabilidade. Essas ações são divisão, morte, migração ou infecção para uma célula cancerosa não-infectada, lise para uma célula tumoral infectada, movimento para uma célula B e movimento ou ação citotóxica para um linfócito T $CD8+$. Para uma célula cancerosa, a ação será implementada ou não de acordo com as correspondentes probabilidades locais determinadas pelas equações 3.4-3.6, 4.5, 4.6. A infecção e a lise ocorrem segundo as mesmas regras descritas no capítulo 5. Para a ação citotóxica de uma célula T, a apoptose de uma célula cancerosa infectada vizinha é executada com probabilidade P_{apop} . No fim dessa sequência de $N_1 + N_2$ atualizações, um novo passo de tempo começa e todo o procedimento é iterado. As simulações são interrompidas se alguma célula tumoral alcança o vaso capilar ou a borda do tecido ou se o tumor é erradicado. No apêndice B, este algoritmo é mostrado em um diagrama de blocos.

Por meio da figura 6.2, podemos estimar o atraso típico na resposta imune mediada por anticorpos e o intervalo de valores da concentração de anticorpos no sangue. Note que se o paciente nunca foi exposto ao vírus oncolítico, a resposta será três ordens de grandeza menor do que se o paciente já possuir imunidade ao vírus. De qualquer modo, a figura indica o atraso típico na resposta imune mediada por anticorpos (aproximadamente 6 dias) e as concentrações típicas de anticorpos no soro ($5 \times 10^{-6} g/mL$ para a resposta primária e $5 \times 10^{-3} g/mL$ para a resposta secundária). Como o soro corres-

ponde a cerca de 55% do volume total de sangue, temos que as concentrações típicas no sangue estão no intervalo $(2,5 \times 10^{-6} g/mL$ para a resposta primária e $2,5 \times 10^{-3} g/mL$ para a resposta secundária). As estimativas para os parâmetros usados são mostradas na tabela 6.1.

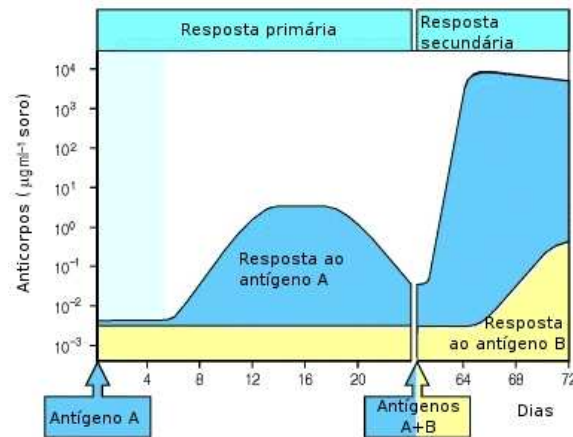


Figura 6.2: No dia 0 ocorre o primeiro encontro com o antígeno A, que gera uma resposta primária. Após cerca de 6 dias, surgem anticorpos contra o antígeno A (azul); sua concentração cresce até saturar, e então decresce. Em seguida, são introduzidos no animal uma mistura dos antígenos A e B. Ocorre uma resposta secundária intensa ao antígeno A, o que ilustra a memória imunológica³. A resposta ao antígeno B é semelhante à resposta inicial ao antígeno A, o que indica que esse é o primeiro encontro do animal com o antígeno B. A partir dessa figura podemos estimar o atraso na resposta imune mediada por anticorpos e o intervalo de valores da concentração de anticorpos no sangue. Figura adaptada de [97].

Nakanishi e colaboradores [101] analisaram a entrada de células T $CD8+$ em tecido vaginal infectado pelo vírus da herpes *simplex* (HSV) e seus resultados indicam que esses linfócitos são recrutados a uma taxa de $2,5$ células/h. Então, os valores de β_T e β_B estarão no intervalo entre $1,25h^{-1}$ e $10h^{-1}$. Considerando que a velocidade média de migração de células T $CD8+$ em um tumor sólido é $(8 \pm 3) \mu\text{m}/\text{min}$ [98], que um passo tem comprimento $10\mu\text{m}$ (constante de rede Δ), e que um passo de tempo (ts) nas simulações equivale a $4h$ ou 240min , podemos estimar os limites inferior e superior para o raio de ação do linfócito T $CD8+$. Se a trajetória do linfócito é balística, em um passo de tempo ele percorrerá uma distância

$$d = \bar{v}t = 8\mu\text{mmin}^{-1}4h = 1920\mu\text{m}. \quad (6.6)$$

Isso corresponde a 192 passos de comprimento Δ . Assumindo uma caminhada aleatória com 192 passos, a distância percorrida seria

$$d = \sqrt{\langle x^2 \rangle} \sim \sqrt{192} \approx 13 \text{passos.} \quad (6.7)$$

Como cada passo tem comprimento $10\mu m$, a distância percorrida nesse caso seria de $130\mu m$. Portanto, o raio de ação dos linfócitos assume valores entre $50\mu m$ e $2000\mu m$. Além disso, como cada célula T tem apenas 50% de chance de migrar a cada passo de tempo, enquanto células B sempre movem, assume-se $R_B = R_T/2$ para que ambos os linfócitos tenham aproximadamente a mesma velocidade média.

Tabela 6.1: Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.

Parâmetro	Descrição	Estimativa
T_B	tempo de vida das células B	< 8 semanas [97]
T_T	tempo de vida das células T	4 – 8 semanas [97]
P_{apop}	poder citotóxico das células T $CD8+$	90%
	atraso na resposta imune	5 dias [90], 6 dias (Ac*) [97] ~ 6 dias (células T) [94]
β_B	taxa de recrutamento das cél. B	$1, 25 - 10h^{-1}$ [101]
β_T	taxa de recrutamento das cél. T	$1, 25 - 10h^{-1}$ [101]
R_B	raio de ação das cél. B	$50 - 2000\mu m$ [98]
R_{CD8}	raio de ação das cél. T	$50 - 2000\mu m$ [98]
\bar{v}	velocidade de células T $CD8+$ dentro do tumor	$(8 \pm 3) \mu m/min$ [98]
Δ	diâmetro de uma célula normal	$10^{-3}cm$
β_A	taxa de produção de Ac	$6, 94 \times 10^{-13}g/ml/s$ [102]
A_0	concentração de Ac no capilar	$2, 5 \times 10^{-9} - 10^{-2}g/ml$ [97]
γ_A	taxa de remoção de Ac	$2, 31 \times 10^{-7}s^{-1}$ [103]
D_A	const. de difusão de Ac	$10^{-8} - 10^{-7}cm^2/s$ [104]
A_{inact}	concentração de Ac necessária para inativar um vírus	$1, 25 \times 10^{-6}g/ml$
σ_{inf}^{min}	número mínimo de linfócitos para ativar a resposta imune	20

* A abreviatura Ac refere-se a anticorpos.

Usando os valores experimentais mostrados na tabela 6.1, as taxas adimensionais

na equação 6.3 assumem nas simulações valores no intervalo $\beta'_A \in [3 \times 10^{-6}, 3 \times 10^{-2}]$ e $\gamma'_A \in [2.3 \times 10^{-6}, 2.3 \times 10^{-5}]$.

6.4 Resultados e discussão

Uma vez que o objetivo desse trabalho é investigar como o sistema imune afeta o resultado da viroterapia, apenas um vírus oncolítico e um tipo de tumor foram escolhidos. Os parâmetros relacionados aos vírus foram fixos em $T_l = 16$, $\theta_{inf} = 0,01$, $MOI = 3$, $bs = 100$, $q = 4$ e $N_0 = 5000$. A resposta imune inata é parcialmente suprimida, de modo que $\gamma_v = 0,03$, o que corresponde a uma taxa de retirada de aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}h^{-1}$, ou apenas 30% da taxa de retirada normal [61]. Esse valor também é fixo em todas as simulações. A viroterapia será estudada em tumores sólidos. Essas morfologias compactas são geradas em nosso modelo quando a competição por nutrientes é fraca e, conseqüentemente, o tumor cresce rapidamente [6]. Se a resposta imune específica é completamente suprimida, tal terapia é capaz de erradicar tumores sólidos, como mostrado no capítulo 5. Entretanto, se o sistema imune é caracterizado por parâmetros imunológicos típicos (mostrados na tabela 6.1), a viroterapia falha. A razão é que vírus livres, assim como suas fontes, as células cancerosas infectadas, são eliminadas pela resposta imune adaptativa.

A questão central é como modular a resposta imune para aumentar a probabilidade de sucesso de viroterapias oncolíticas em pacientes imunocompetentes. Nosso modelo permite calcular os efeitos de cada componente considerada da resposta imune adaptativa. O principal resultado das nossas simulações é que uma terapia eficaz em erradicar o tumor é possível sob três cenários para a modulação da resposta imune.

No primeiro cenário, o recrutamento de células B para o tecido infectado é completamente suprimido e as células T $CD8+$ possuem uma baixa mobilidade, ou seja, uma capacidade de espalhamento no tecido restrita ($R_T < 300\mu m$). Esta condição garante que a concentração de anticorpos no tecido permaneça abaixo do nível necessário para neutralizar os vírus livres. A última condição garante que as células T $CD8+$ não sejam capazes de alcançar o tumor e eliminar as células cancerosas infectadas antes que as sucessivas ondas de infecção matem todas elas. Esse cenário é sustentado mesmo se células T $CD8+$ são recrutadas a taxas tão altas quanto 10 células/ h . As probabilidades correspondentes de sucesso terapêutico para diferentes taxas de recrutamento de células T, com ou sem anticorpos infiltrantes no tecido pelo capilar, são mostradas na figura 6.3. Nossos resultados indicam que células T citotóxicas com uma área de

ação grande ($R_T \geq 300\mu m$) podem induzir apoptose em todas as células cancerosas infectadas se recrutadas a taxas ≥ 5 células/h (dados não mostrados). Nesse caso, as ondas sucessivas de infecção são fortemente atenuadas e, conseqüentemente, a probabilidade de sucesso terapêutico fica menor que 20%. Entretanto, a viroterapia oncolítica fracassa mesmo para linfócitos T com raios de ação de $200\mu m$ se a concentração Ab de anticorpos no capilar é muito grande, como possivelmente provocado por uma potente resposta imune sistêmica. Na verdade, a probabilidade de sucesso terapêutico diminui para cerca de 10% se $Ab = 10A_0$ e se anula para $Ab \sim 10^3 A_0$, a concentração que corresponde a níveis observados em uma resposta imune secundária a um antígeno previamente apresentado.

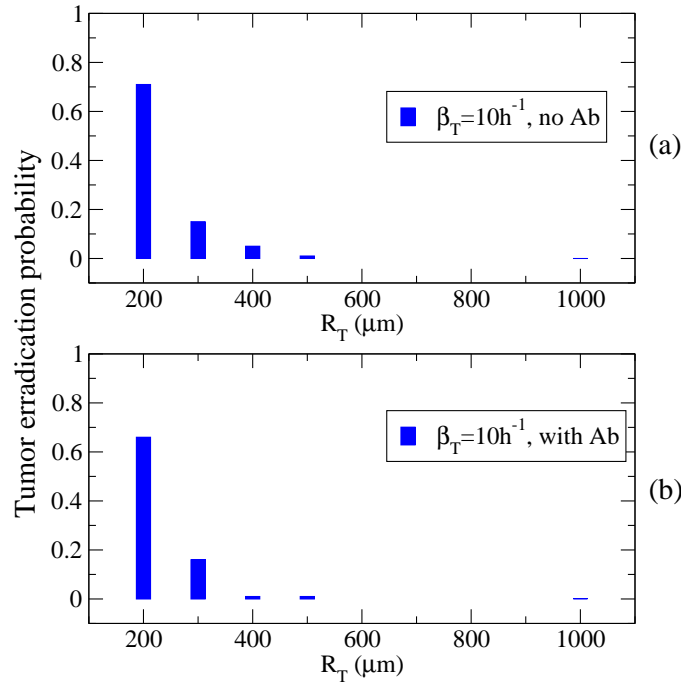


Figura 6.3: Probabilidade de erradicação do tumor como função do raio de ação das células T $CD8+$. O recrutamento das células B foi completamente suprimido ($\beta_B = 0$), enquanto o de células T ocorre a uma taxa $\beta_T = 40$ ($\equiv 10h^{-1}$). Em (a) os anticorpos não infiltram no tecido, enquanto em (b) eles o fazem. Os dados correspondem a médias sobre 100 amostras.

Esses resultados são consistentes com testes clínicos e modelos de tumores em roedores que indicam que anticorpos neutralizantes contra antígenos virais dificultam de forma significativa a eficácia terapêutica de vários vetores de adenovírus [105, 93, 106], mas contrastam com o fato de que vírus da rubéola e da HSV administrados intra-

tumoralmente mantém sua atividade terapêutica apesar de provocarem uma robusta resposta de anticorpos neutralizantes [34].

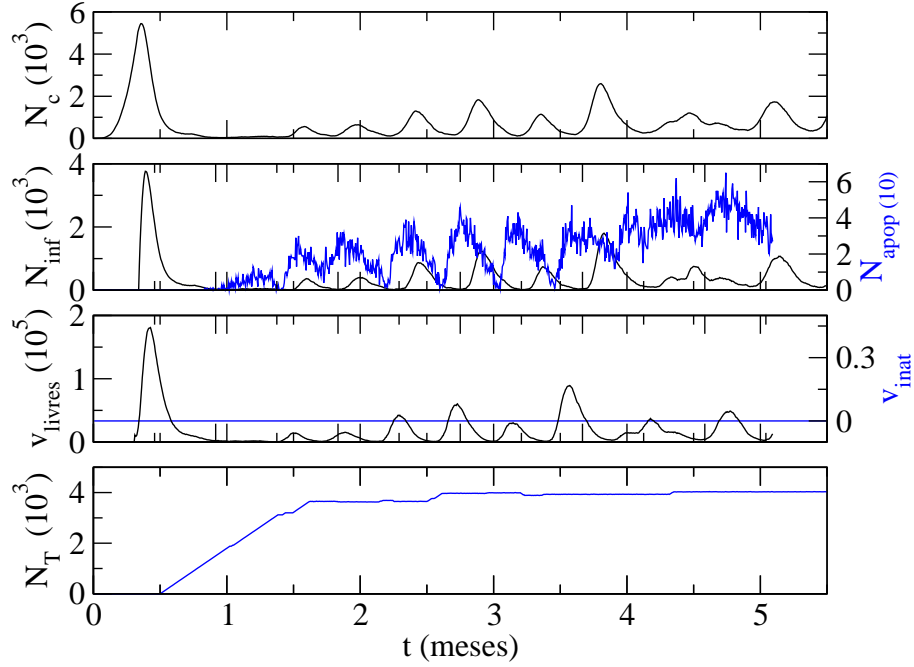


Figura 6.4: Evolução temporal do número total de células cancerosas (N_c), cancerosas infectadas (N_{inf}), cancerosas que sofreram apoptose (N_{apop}), linfócitos T $CD8+$ (N_T), vírus livres (v_{free}) e inativados (v_{inact}). Tanto o recrutamento de células B quanto a infiltração de anticorpos no tecido foram suprimidos. Células T são recrutadas a uma taxa $\beta_T = 5h^{-1}$ e têm raios de ação $R_T = 300\mu m$. Apesar do tumor não ser erradicado, as ondas sucessivas de infecção mantem o tumor sob controle.

O principal papel da mobilidade de células T citotóxicas é evidenciado na figura 6.4. Nela, pode-se ver a curva de população para um caso em que o recrutamento de células B é suprimido ($\beta_B = 0$) e anticorpos não infiltram no tecido, mas as células T $CD8+$ exibem um raio de ação grande, $R_T = 300\mu m$. Uma vez que não há anticorpos no tecido, vírus livres não podem ser inativados. Entretanto, as células T $CD8+$ alcançam o tumor e induzem apoptose em células cancerosas infectadas. Há oscilações não-amortecidas nas populações de células infectadas e vírus livres. Apesar do tumor não ser erradicado, os ciclos sucessivos de infecção viral mantem o tumor sob controle. Esse resultado não muda se anticorpos são capazes de entrar no tecido, ou se a taxa

de recrutamento de células T é aumentada para $\beta_T = 10h^{-1}$. Entretanto, se o raio de ação é reduzido para $R_T = 200\mu m$, o tumor é erradicado.

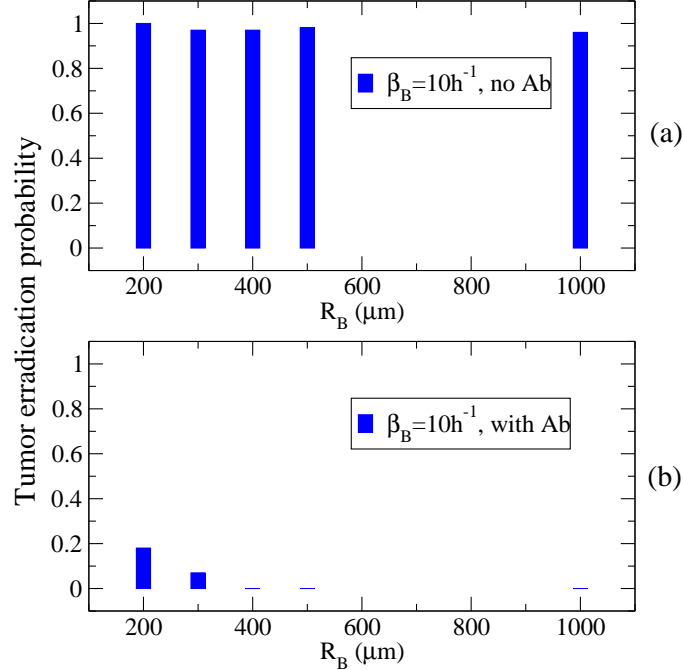


Figura 6.5: Probabilidade de erradicação do tumor para valores crescentes do raio de ação das células B. O recrutamento de linfócitos T é suprimido ($\beta_T = 0$), enquanto células B são recrutadas a uma taxa $\beta_B = 10h^{-1}$. Em (a) anticorpos não podem infiltrar no tecido, mas em (b) eles podem. Os dados correspondem a 100 amostras.

O segundo cenário que resulta na erradicação do tumor envolve a supressão das células T $CD8+$ e da infiltração de anticorpos. Em tal cenário somente células B são recrutadas para o tecido infectado e o tumor é erradicado com pelo menos 90% de probabilidade. Este grande sucesso terapêutico é mantido para células B com raios de ação tão grandes quanto $R_B = 0,5mm$, recrutadas a taxas de até $\beta_B = 40h^{-1}$, e que sintetizam anticorpos a taxas duas ordens de grandeza maiores que β_A . Portanto, apenas linfócitos B não podem provocar uma resposta imune eficaz contra os vírus oncolíticos. Entretanto, se anticorpos extravasam do capilar para o tecido, a concentração total de anticorpos no tumor é suficientemente alta para inativar a maioria dos vírus livres, atenuando drasticamente as novas ondas de infecção e, portanto, diminuindo o sucesso terapêutico. Esses resultados são mostrados na figura 6.5. Eles indicam que a resposta imune humoral sistêmica e o recrutamento local de células T $CD8+$ deveriam ser inibidos para aumentar o sucesso da viroterapia. De fato, o imunossupressor

ciclofosfamida, uma droga quimioterápica que inibe a síntese de anticorpos neutralizantes [107, 108, 109, 110, 111], IFN- γ , e a atividade de células do sistema imune inato [33], é frequentemente co-administrada com HSV [109, 112] e reovírus [34], inibindo a imunidade inata e adaptativa.

Os dois cenários já mencionados envolvem a supressão do recrutamento de linfócitos para o tecido infectado, principalmente de células T $CD8+$. Isto pode ser conseguido, por exemplo, bloqueando a expressão *in situ* de CXCL9 e CXCL10⁴. Essas quimiocinas são necessárias para que os linfócitos T citotóxicos entrem no tecido infectado vindos do sistema circulatório [101]. Isso porque a diminuição na expressão de CXCL9 reduz a infiltração de células T $CD4+$ no tecido infectado [113]. Tal depleção local de células T $CD4+$ bloqueia de forma significativa o recrutamento de células T citotóxicas, primariamente dependentes do IFN- γ secretado por células $CD4+$ [101]. Por outro lado, níveis reduzidos de IFN- γ derivado de células $CD4+$ T afetam negativamente a expressão de CXCL9 e o condicionamento autócrino de células T $CD4+$ para acessar o tecido infectado [101], fechando um ciclo de interações.

Entretanto, mesmo na ausência de células T $CD4+$ ou IFN- γ , um recrutamento residual de células T $CD8+$ pode ser observado. Esse recrutamento pode ser inibido por meio da neutralização do IFN tipo I assim como IFN- $\alpha\beta$ R [101]. Relacionado a esse contexto, podemos mencionar o vírus oncolítico rVSV-gG⁵, que inibe a quimiotaxia de células NK e NKT ao tecido tumoral [114]. Essa proteína viral gG liga-se às quimiocinas C, CC e CXC com afinidade alta, suprimindo a quimiotaxia de células inflamatórias em resposta a essas quimiocinas e possivelmente inibindo também o recrutamento de linfócitos.

O terceiro cenário para a erradicação do tumor consiste em impedir a mobilidade dos linfócitos B e T sem afetar a dinâmica dos anticorpos ou o recrutamento dos linfócitos. Se seus raios de ação são curtos ($R_B \leq 0.1mm$ e $R_T \leq 0.2mm$) o tumor é erradicado com mais que 70% de probabilidade mesmo se ambos os linfócitos são recrutados a taxas $\beta_B = \beta_T = 5h^{-1}$. Na figura 6.6, a probabilidade de erradicação do tumor é mostrada como uma função do raio de ação dos linfócitos e para três taxas de recrutamento distintas. Suas mobilidades parecem ser características mais

⁴As quimiocinas CXCL9 e CXCL10, também conhecidas como monocina induzida por interferon-gama e proteína induzida por interferon 10, estão relacionadas ao recrutamento de linfócitos, principalmente ativando células Th1 $CD4+$, células T $CD8+$ e células NK

⁵rVSV-gG é um vetor viral baseado no VSV (“*vesicular stomatitis virus*”) que expressa a glicoproteína equina do vírus da herpes tipo 1 G

determinates que as suas taxas de recrutamento. A chave para o sucesso é garantir tempo suficiente para que os vírus matem quase todas as células cancerosas antes que o linfócitos B e T infiltrem na vizinhança do tumor a uma distância tal que a resposta imune celular antiviral torne-se efetiva.

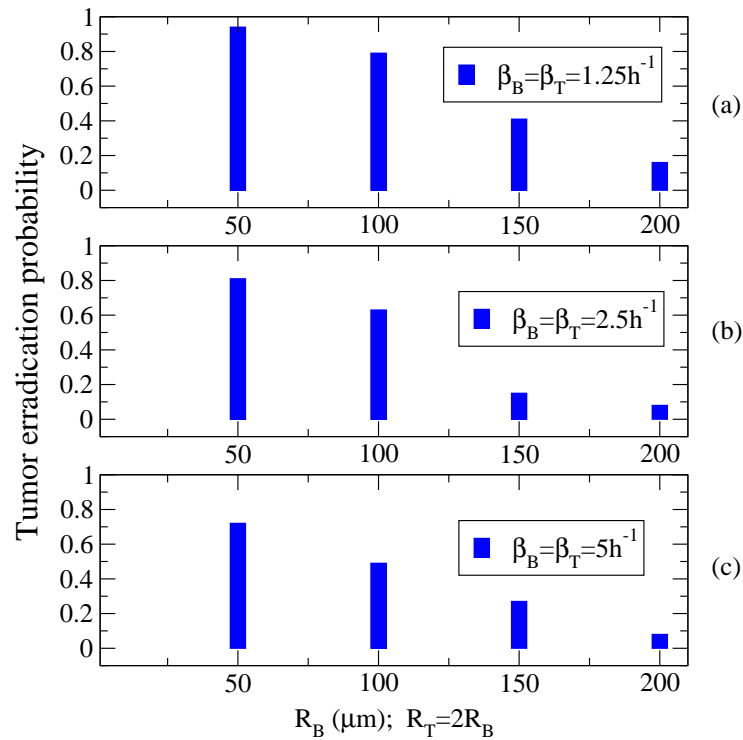


Figura 6.6: Probabilidade de erradicação do tumor como função do raio de ação dos linfócitos. Anticorpos infiltram no tecido vindos do capilar e ambos os linfócitos são recrutados a taxas $\beta_B = \beta_T = 1.25h^{-1}$ (a); $\beta_B = \beta_T = 2.5h^{-1}$ (b); e $\beta_B = \beta_T = 5h^{-1}$ (c). Os dados correspondem a 100 amostras.

Claramente, se algumas células sobrevivem ao ataque dos vírus até que elas caiam dentro da área de ação das células B e T infiltrantes, a viroterapia falha porque os vírus livres e as células cancerosas infectadas são então rapidamente eliminados. Essa situação é ilustrada na figura 6.7. A distribuição espacial de células cancerosas, linfócitos e vírus, bem como as concentrações correspondentes de anticorpos são mostradas para três instantes de tempo. Como pode ser visto, 20 dias após a administração viral o tumor entra em significativa remissão e os primeiros linfócitos tem o tumor dentro da sua área de ação. Então, a resposta imune adaptativa local mediada por células T e B leva cerca de 2 meses para eliminar quase todos os vírus livres e células cancerosas,

permitindo o crescimento do tumor a partir de poucas células malignas.

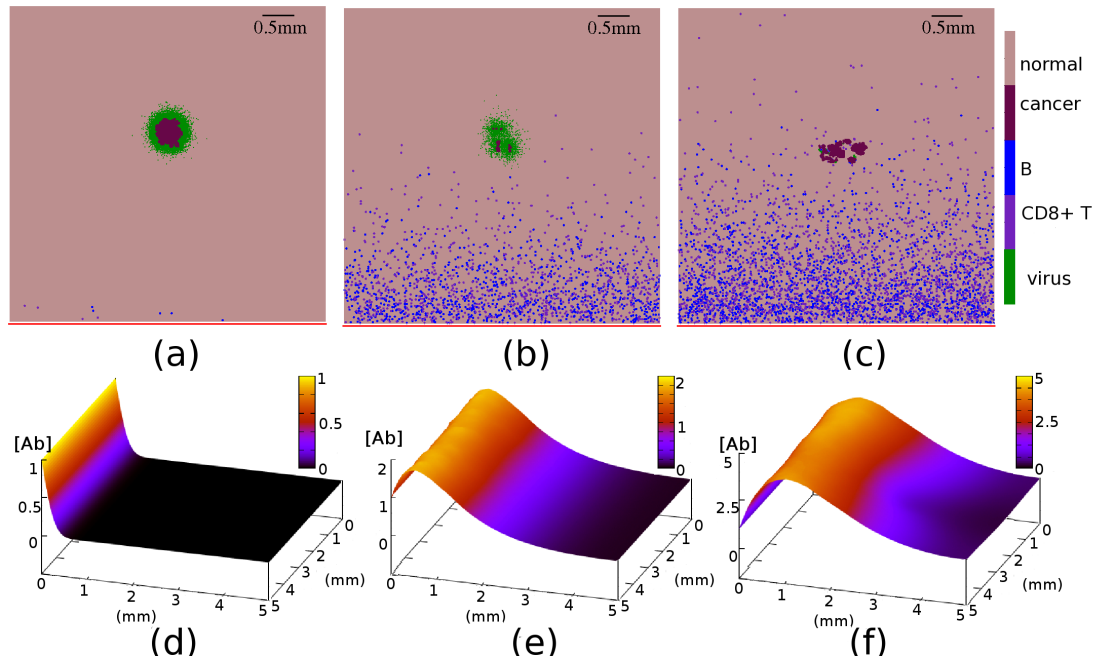


Figura 6.7: Padrões espaço-temporais de células cancerosas, linfócitos e vírus ((a)-(c)) e as concentrações de anticorpos correspondentes ((d)-(f)). (a) e (d): o começo da resposta imune adaptativa, 5 dias após a injeção viral; (b) e (e): 20 dias depois. Nesse instante de tempo o tumor está quase extinto e os linfócitos já alcançaram o tumor. (c) e (f): 2 meses depois. A resposta imune adaptativa eliminou quase todos os vírus livres e células infectadas, e o tumor continua crescendo. $\beta_B = \beta_T = 2.5h^{-1}$ são taxas de recrutamento de linfócitos B e T, e $R_B = 0.15mm$ e $R_T = 0.3mm$ seus respectivos raios de ação. Para esse conjunto de parâmetros, a probabilidade de sucesso terapêutico é 30%. A linha vermelha em (a)-(c) representa o vaso capilar.

Esse terceiro cenário requer uma restrição severa na mobilidade dos linfócitos e, conseqüentemente, uma rígida limitação no raio de ação de células B e T que infiltram no tecido infectado. Talvez, uma alternativa seria desenvolver vírus oncolíticos que expressem produtos de genes virais potentes e altamente difusivos que atuem nos mecanismos de migração dos linfócitos. Linfócitos T usam migração amebóide baseados em polimerização de actina ao longo da membrana plasmática para enrigecer e contrair

o córtex celular [115]. GTPase RhoA⁶ e seu efetor ROCK⁷ controlam criticamente a dinâmica da actina cortical. Interferir em RhoA e/ou ROCK dificulta a contração acto-miosina necessária para movimentos amebóides e reduz dramaticamente a taxa de migração de células T [116]. Portanto, inibidores de tais proteínas emergem como candidatos imediatos para a supressão mediada por vírus da mobilidade dos linfócitos.

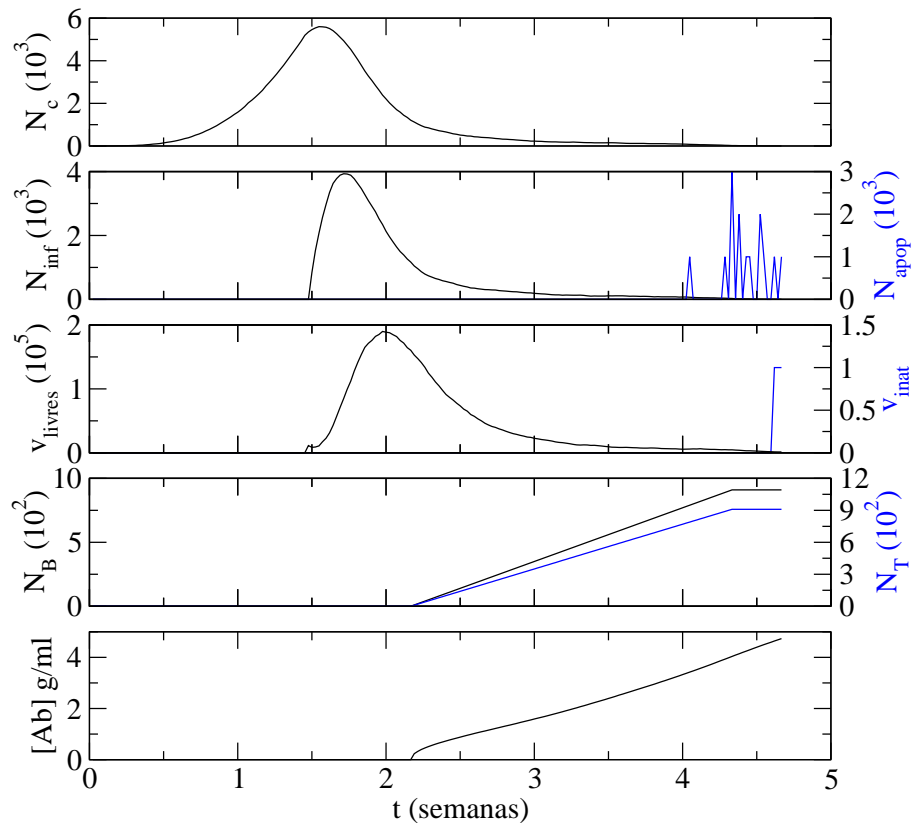


Figura 6.8: Curvas de população para uma terapia eficiente. Os parâmetros usados são os mesmos da figura 6.7 e anticorpos podem infiltrar no tecido. Neste caso a terapia erradica o tumor porque os linfócitos tem raio de ação pequeno, permitindo que os vírus oncolíticos matem todas as células tumorais até que a resposta imune alcance o tumor.

Finalmente, é importante enfatizar que, devido a estocasticidade do modelo,

⁶GTPases são uma família de enzimas hidrolase que podem ligar e hidrolisar a GTP (guanosina-5'-fosfato; age como substrato para a síntese de RNA durante o processo de transcrição.) e RhoA (família de genes homólogos Ras, membro A) é uma proteína de sinalização que controla o citoesqueleto de actina celular.

⁷ROCK (cinase Rho) faz a transdução de sinais para a organização do citoesqueleto e expressão gênica.

outras simulações com os mesmos parâmetros usados na figura 6.7 podem gerar resultados diferentes. Então, por exemplo, as curvas de população para um caso em que o tumor é erradicado são mostradas na figura 6.8. Novamente, os linfócitos são direcionados aos vírus e células infectadas quando o tumor está quase erradicado. Mas, nesse caso, nenhuma célula cancerosa escapou do ataque dos vírus, poucas células infectadas sofreram apoptose, e a inativação de vírus livres ocorre após a erradicação do tumor.

6.5 Conclusões

As estratégias mais comuns para aumentar a eficácia da viroterapia consistem em desenvolver vírus capazes de escapar da resposta imune adaptativa. Neste capítulo foi apresentado um modelo multiescala para viroterapia em pacientes imunocompetentes, e alternativas viáveis para modular a resposta imune adaptativa local foram propostas. Resumindo, nossos resultados indicam três estratégias para modular a resposta imune em prol de aumentar o sucesso terapêutico. As duas primeiras consistem essencialmente em impedir o recrutamento de linfócitos B ou T $CD8+$ para o tecido infectado com o vírus oncolítico. Para as células T $CD8+$, isso pode ser conseguido suprimindo localmente células T $CD4+$ ou $IFN-\gamma$, de modo que o recrutamento de linfócitos T citotóxicos seja bloqueado. A terceira estratégia é baseada em reduzir fortemente a taxa de migração de linfócitos T e B que infiltram o tecido afetado. Interferir com RhoA ou ROCK pode resultar em imobilização dos linfócitos devido à falhas no processo de *detachment* celular. Então, esta alternativa parece ser mais eficiente para aumentar o sucesso da viroterapia oncolítica. Entretanto, o benefício potencial em usar essas duas estratégias sinergicamente é claro.

Nossos resultados sugerem que os raios de ação dos linfócitos, que determinam sua mobilidade bem como sua habilidade de identificar alvos, mais do que as taxas de recrutamento, são as principais características imunológicas a serem moduladas.

Capítulo 7

Modelando o tratamento de câncer com nanopartículas quimioterápicas

Encapsular drogas quimioterápicas em nanomateriais poliméricos é uma alternativa promissora no tratamento de tumores, pois permite aumentar a dose administrada e reduzir os efeitos colaterais. Isso porque a droga encapsulada será retida na região do tumor, que apresenta vasos com maior permeabilidade e fraca drenagem linfática. A droga será liberada gradualmente dentro da célula, causando sua morte.

Um modelo multiescala para o crescimento do tumor e sua quimioterapia usando nanopartículas de polímeros quiméricos é apresentado neste capítulo e os resultados terapêuticos correspondentes são calculados por meio de simulações computacionais do modelo. É importante destacar que esse trabalho foi publicado no periódico *Applied Physics Letters* [8]. Nossos resultados indicam que a administração periódica das nanopartículas em doses altas (próximas a dose máxima tolerada) é capaz de erradicar tanto tumores vasculares quanto metástases. Entretanto, um tratamento seguro exige nanopartículas conjugadas que se ligam as células cancerosas com alta especificidade, de modo a deixar o tecido normal ileso. Além disso, estimamos a taxa de consumo de droga necessária a erradicação do tumor.

7.1 Cenário atual

Alguns modelos foram recentemente propostos para estudar o combate a tumores por meio de nanopartículas quimioterápicas. Mishra et al. [117] propuseram um modelo para descrever estratégias de quimioterapia usando nanopartículas em tumores

esfericamente simétricos por meio de um sistema de equações diferenciais parciais. Os resultados obtidos por eles indicam que a concentração de droga na célula tumoral aumenta linearmente com o aumento da dose inicial. Goodman et al. [118] desenvolveram um modelo baseado em equações diferenciais parciais para estudar a penetração de nanopartículas em esferóides multicelulares que possuem alterações radialmente dependentes na arquitetura tumoral. Essas alterações são representadas pela fração do volume de tecido acessível à difusão das nanopartículas e estão relacionadas a presença de um modulador da matriz extracelular, a colagenase. Enquanto alguns parâmetros foram determinados experimentalmente, outros foram estimados indiretamente, por ajuste de dados experimentais. Os resultados do modelo, combinados a resultados experimentais, sugerem que o tamanho da partícula, sua eficiência de ligação e a porosidade do tecido alvo são parâmetros chave no desenvolvimento de nanopartículas carregadoras de drogas para tratamento de tumores.

7.2 Modelo para quimioterapia com nanopartículas de polímeros quiméricos

O tecido é representado por uma rede quadrada $L \times L$, com constante de rede Δ . Em $j = 0$ há um vaso capilar, de onde difundem os nutrientes. Eles são descritos pela equação de reação-difusão

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \nabla^2 \phi - \alpha_\phi^2 \phi \sigma_n - \lambda_\phi \alpha_\phi^2 \phi \sigma_c. \quad (7.1)$$

em que taxas de consumo distintas para células normais e cancerosas são consideradas pelo fator λ_ϕ . O parâmetro α_ϕ está relacionado ao comprimento característico para a difusão de nutrientes [6]. Fizemos a mesma mudança de variáveis descrita no capítulo 3 nessa equação, de modo a torná-la adimensional. A equação 7.1 obedece a condições de contorno periódicas ao longo do eixo horizontal e condições de contorno de Neumann na borda do tecido ($i = L$). No capilar ($i = 0$) a concentração de nutrientes é $\phi_k = 1$ (suprimento fixo e contínuo). O esquema do modelo é mostrado na figura 7.1.

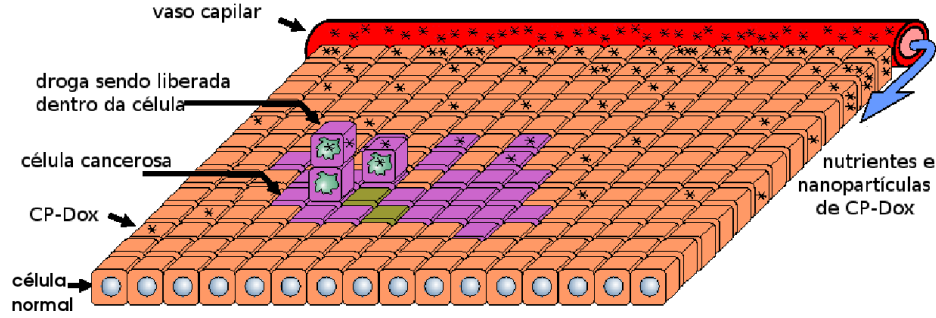


Figura 7.1: Células cancerosas podem dividir, migrar localmente ou morrer por privação de nutrientes ou devido a ação da droga, enquanto a dinâmica das células normais se restringe a morte devido a escassez de nutrientes ou a ação da doxorubicina.

CP-Dox no vaso capilar

O capilar é a fonte das nanopartículas CP-Dox que penetram no tecido a uma taxa k_{pt} . As nanopartículas são eliminadas da circulação a uma taxa k_{el} , e retiradas do tecido para o sangue a uma taxa k_{tp} . A dinâmica das nanopartículas no capilar obedece à equação

$$\frac{dc_1(t)}{dt} = -k_1 c_1(t) + c_0 \delta(t - n\tau), n = 0, 1, 2, \dots \quad (7.2)$$

em que $k_1 = k_{el} + (k_{pt} - k_{tp})$ é a taxa total de retirada de nanopartículas do sangue e o termo $c_0 \delta(t - n\tau)$, com $n = 0, 1, 2, \dots$, representa a administração de nanopartículas CP-Dox em injeções de mesma dose e período τ . Essa equação tem solução analítica,

$$c_1(t) = \begin{cases} c_0 \exp^{-k_1 t} & \text{se } 0 \leq t < \tau \\ c_0 \sum_{n=0}^m \exp^{-k_1(t-n\tau)} & \text{se } t > \tau \text{ e } m = \text{int}(t/\tau) \end{cases}$$

que pode ser visualizada na figura 7.2. O parâmetro c_0 está relacionado à dose administrada. Na dose máxima tolerada (MTD) de nanopartículas CP-Dox tem-se $c_0 \sim 600 \mu M$.

CP-Dox no tecido

No tecido, a concentração de CP-Dox obedece a seguinte equação diferencial:

$$\frac{\partial c_2(\vec{x}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 c_2(\vec{x}, t) - \sum_{\vec{x}} \alpha_c \sigma_c(\vec{x}) - \sum_{\vec{x}} \alpha_n \sigma_n(\vec{x}), \quad (7.3)$$

em que $\sigma_c(\vec{x}) = 0, 1, 2, \dots$ é o número de células cancerosas no sítio \vec{x} e $\sigma_n(\vec{x}) = 0$ ou 1 é o número de células normais no sítio \vec{x} . As células normais absorvem as nanopartículas CP-Dox a uma taxa α_n , enquanto as cancerosas absorvem as nanopartículas a uma taxa α_c . Condições de contorno de Neumann (fluxo nulo) são impostas na borda do tecido ($\partial c_2(y = L, t)/\partial y = 0$) e condições de contorno periódicas são impostas na direção perpendicular ao vaso capilar ($c_2(L + 1) = c_2(1)$ e $c_2(0) = c_2(L)$). As nanopartículas entram no tecido a partir do capilar a uma taxa $c_2(y = 0, t) = (k_{pt} - k_{tp})c_1(t)$.

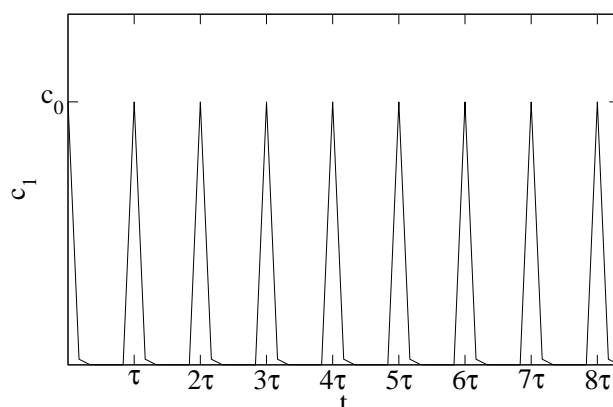


Figura 7.2: Concentração de nanopartículas no capilar (c_1) em função do tempo. c_0 é a dose administrada periodicamente, em intervalos de tempo τ . Note que a concentração de nanopartículas cai exponencialmente após a injeção.

Por simplicidade, vamos realizar a seguinte mudança de variáveis em 7.3:

$$t' = \frac{Dt}{\Delta^2}; \vec{x}' = \frac{\vec{x}}{\Delta}; \alpha'_{c,n} = \frac{\alpha_{c,n}\Delta^2}{D} \quad (7.4)$$

Obtemos então

$$\frac{\partial c_2(\vec{x}', t')}{\partial t'} = \nabla'^2 c_2(\vec{x}', t') - \sum_{\vec{x}'} \alpha'_c \sigma_c(\vec{x}') - \sum_{\vec{x}'} \alpha'_n \sigma_n(\vec{x}'), \quad (7.5)$$

$\partial c_2(y' = L\Delta, t')/\partial y' = 0$, $c_2(L + 1) = c_2(1)$, $c_2(0) = c_2(L)$ e $c_2(y' = 0, t') = (k_{pt} - k_{tp})c_1(t')$. Essa equação será resolvida por diferença finita (método de Gauss-Siedel). Para garantir a convergência, definimos $\Delta t' = 0,25$ e $\Delta x' = 1$. Portanto, devemos resolver a equação (omitindo as apóstrofes)

$$\frac{\partial c_2(\vec{x}, t)}{\partial t} = \nabla^2 c_2(\vec{x}, t) - \sum_{\vec{x}} \alpha_c \sigma_c(\vec{x}) - \sum_{\vec{x}} \alpha_n \sigma_n(\vec{x}), \quad (7.6)$$

$\partial c_2(y = L\Delta, t)/\partial y = 0$, $c_2(L + 1) = c_2(1)$, $c_2(0) = c_2(L)$ e $c_2(y = 0, t) = (k_{pt} - k_{tp})c_1(t)$.

Dinâmica intracelular da CP-Dox

As partículas de CP-Dox podem ser internalizadas por células normais e cancerosas. Em cada passo de tempo, a quantidade de droga em uma célula normal ou cancerosa em \vec{x} é dada por

$$\frac{dc_3}{dt} = \alpha_{n,c} \times c_2(\vec{x}), \quad (7.7)$$

Dentro das células, em seus endossomos e lisossomos, as nanopartículas são degradadas e a droga Doxorubicina é liberada. Assumimos que, a cada passo de tempo ($\sim 4h$), uma fração a das nanopartículas internalizadas será degradada e a droga liberada [26]. A droga liberada na célula k é descrita por $c_4(k)$. A acumulação intracelular da doxorubicina afeta a viabilidade das células. Medidas experimentais [26] indicam que a porcentagem de células viáveis¹ é

$$V_{\%} = \frac{100}{1 + (c_4/ic_{50})^p}, \quad (7.8)$$

em que ic_{50} é um parâmetro medido experimentalmente. A dependência da porcentagem de células viáveis com o parâmetro p e com a quantidade de droga liberada dentro da célula, c_4 , é mostrada na figura 7.3. Analogamente, vamos assumir que a saúde de uma célula k é afetada pela droga de acordo com

$$H_k(t) = \frac{1}{1 + (c_{4k}(t)/ic_{50})^p} \quad (7.9)$$

A saúde de uma célula reflete sua capacidade de executar suas ações.

Efeito da CP-Dox na dinâmica das células normais e cancerosas

A cada passo de tempo, cada célula normal pode morrer por privação de nutrientes ou devido a ação da droga com probabilidade

$$P_{die}^{normal} = 1 - \exp \left[-H^2 \left(\frac{\phi}{\sigma_n \theta_{die}^n} \right)^2 \right] \quad (7.10)$$

em que H está relacionado a saúde da célula (equação 7.9) e o parâmetro θ_{die}^n controla a forma dessa probabilidade. O valor de θ_{die}^n foi escolhido de modo que o tecido normal sobreviva na ausência das nanopartículas. Por outro lado, células cancerosas podem dividir, migrar localmente ou morrer. Essas ações estocásticas, que dependem da

¹Células viáveis são células vivas capazes de se replicar.

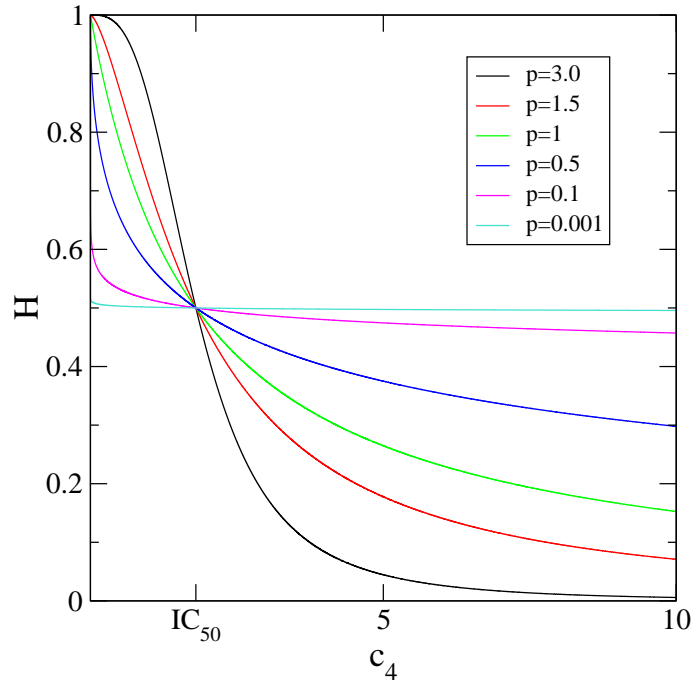


Figura 7.3: Efeito da concentração intracelular de Doxorubicina na viabilidade celular.

concentração local de nutrientes e da quantidade de doxorubicina liberada na célula, ocorrem de acordo com as respectivas probabilidades:

$$P_{div} = 1 - \exp \left[-H^2 \left(\frac{\phi}{\sigma_c \theta_{div}^c} \right)^2 \right] \quad (7.11)$$

$$P_{die} = 1 - \exp \left[-H^2 \left(\frac{\phi}{\sigma_c \theta_{die}^c} \right)^2 \right] \quad (7.12)$$

$$P_{mov} = 1 - \exp \left[-H^2 \left(\frac{\sigma_c}{\phi \theta_{mov}^c} \right)^2 \right] \quad (7.13)$$

em que ϕ é a concentração local de nutrientes e H é dado pela equação 7.9. Células cancerosas podem alcançar os sítios vizinhos ao capilar, mas não são capazes de penetrar no vaso capilar.

7.3 Algoritmo e estimativa de parâmetros

As simulações foram implementadas como segue. A cada passo de tempo, a equação 7.1 é numericamente resolvida no estado estacionário ($\partial\phi/\partial t = 0$) por meio

Tabela 7.1: Estimativas dos valores dos parâmetros usados no modelo.

Parâmetro	Descrição	Estimativa
Δ	Diâmetro típico de uma célula	$\sim 10\mu m$ [51]
Δt	Passo de tempo do modelo	$4 - 5h$
k_{el}	taxa de eliminação de CP-Dox	$0,16h^{-1}$ [26]
k_{pt}	taxa de entrada de CP-Dox no tecido	$4,7h^{-1}$ [26]
k_{tp}	taxa de saída de CP-Dox do tecido	$3,9h^{-1}$ [26]
c_0	dose de CP-Dox administrada	$< 0,6mM$ [26]
D	Constante de difusão das nanopartículas	$2,64 \times 10^{-2}mm^2h^{-1}$
IC_{50}	Relacionado a viabilidade celular	$1,8 \mu M$ [26]
$\alpha_{c,n}$	Relacionado a taxa de consumo de CP-Dox	$5,3 \times 10^{-5}$ [119]
a	fração máxima de droga liberada	68% [26]

de métodos de relaxação. Também, a equação 7.6 para difusão da CP-Dox no tecido é iterada um número determinado de vezes considerando a solução analítica para sua concentração no vaso capilar, obtida da equação 7.3. Determinada a concentração de CP-Dox nos sítios ocupados por células, a fração de droga internalizada pelas células é calculada. Então, a concentração intracelular da droga Doxorubicina livre é determinada e a “saúde” H de cada célula (normal e tumoral) é calculada. Conhecendo a concentração de nutrientes em todos os sítios da rede e a viabilidade de cada célula, N células são sequencialmente selecionadas aleatoriamente com igual probabilidade (aqui, $N(t)$ é o número total de células vivas no tempo t). Para cada uma delas, uma ação tentativa é aleatoriamente escolhida com igual probabilidade. Essas ações são divisão, morte ou migração para uma célula cancerosa e apenas morte para uma célula normal. A célula selecionada executará ou não a ação escolhida de acordo com as probabilidades correspondentes determinadas pelas equações 7.10-7.13 e o tempo é incrementado por $\Delta t = 1/N(t)$. No final dessa sequência de $N(t)$ atualizações, um novo passo de tempo começa e todo o procedimento (solução das equações de difusão para os nutrientes, espalhamento e endocitose da CP-Dox e dinâmica celular) é iterado. As simulações são interrompidas quando o tumor é eliminado. No apêndice B, o algoritmo deste modelo é mostrado em um diagrama de blocos. Em todas as simulações, o tecido é representado por uma rede quadrada de tamanho linear $L = 250$ e constante de rede $\Delta = 10 \mu m$, correspondendo a uma seção de tecido de aproximadamente $2,5mm$ de comprimento

e $2,5mm$ de largura. Assumindo que a fase de síntese de DNA no ciclo celular seja de aproximadamente $11h$ [50], um passo de tempo nas simulações corresponde a cerca de $4 - 5h$. Os parâmetros do modelo $\alpha_\phi = 0,004$, $\lambda_\phi = 25$, $\theta_{die}^n = 0,19$, $\theta_{div}^c = 0,5$, $\theta_{die}^c = 0,5$, e $\theta_{mov}^c = 5$ foram fixados para gerar padrões tumorais compactos. Note que $\theta_{die}^n < \theta_{die}^c$, pois a cada passo de tempo uma célula normal tenta morrer, enquanto uma célula cancerosa tem apenas 33% de chance de tentar executar essa ação. Logo, apesar de assumirmos $\theta_{die}^n < \theta_{die}^c$, em uma mesma situação de disponibilidade de nutrientes e concentração de droga, a probabilidade de morte de uma célula normal é maior que a de uma cancerosa. A quimioterapia começa quando o tumor possui $N_0 = 5000$ células.

Os parâmetros que caracterizam a farmacocinética das nanopartículas de CP-Dox foram extraídos da referência [26]. Logo, as taxas de remoção da droga $k_1 = k_{el} + (k_{pt} - k_{tp}) = 0,96h^{-1}$ e $k_2 = k_{pt} - k_{tp} = 0,8h^{-1}$ foram usadas. Esses valores resultam das taxas $k_{el} = 0,16$, $k_{pt} = 4,7$ e $k_{tp} = 3,9h^{-1}$ apresentadas na referência [26]. Nós assumimos que a difusividade das partículas de CP-Dox é similar a de vírus com dimensões comparáveis. Assim, como para o adenovírus $D_{aden} = 3,67 \times 10^{-8}cm^2/s = 1,32 \times 10^{-2}mm^2/h$ [120], e usando a lei de Stokes

$$D = \frac{kt}{6\pi\eta r}D \sim r^{-1}, \quad (7.14)$$

obtemos

$$D \sim 2,64 \times 10^{-2}mm^2/h. \quad (7.15)$$

Nessa estimativa, usamos $r_{aden} \sim 35 - 45nm$ e $r_{CP-Dox} \sim 20nm$, ou seja, $r_{CP-Dox} \sim r_{aden}/2$, de modo que $D \sim 2D_{aden}$.

Portanto, cada iteração da equação para difusão das nanopartículas corresponde a um intervalo de tempo

$$\Delta t = \frac{\Delta^2 \Delta t'}{D} = \frac{10^{-4}mm^2 \times 0.25}{2.64 \times 10^{-2}mm^2/h} = 9.47 \times 10^{-4}h, \quad (7.16)$$

em que t' foi o parâmetro adimensional definido em 7.4. Logo, como cada passo de tempo no modelo corresponde a $4h$, a equação 7.6 deve ser iterada

$$\frac{4h}{\Delta t} = \frac{4h}{9.47 \times 10^{-4}h} \approx 4224 \quad (7.17)$$

vezes a cada passo de tempo.

E Mackay *et al.* mostraram que $F = a\{1 - \exp[-(\ln 2)(t/t_{1/2})]\}$ é a fração de droga liberada dentro das células. Por simplicidade computacional, uma fração

84 Modelando o tratamento de câncer com nanopartículas quimioterápicas

constante $a = 0,68$, correspondendo a seu valor assintótico, foi usada em nossas simulações. Esse fator incrementa a concentração intracelular de Doxorubicina livre por $\Delta C_3(\vec{x}, t) = a\beta_{n,c}C_2(\vec{x}, t)$ em cada passo de tempo.

Em relação aos efeitos citotóxicos da CP-Dox, os ensaios feitos na referência [26] indicam que a viabilidade celular é dada por $V = 1/[1 + (C_3/IC_{50})^p]$. Em nossas simulações, o valor medido experimentalmente $IC_{50} = 1,8 \mu M$ foi usado. O valor $p = 1$ foi escolhido.

Os parâmetros restantes, C_0 , τ , β_n , e β_c , essenciais para determinar o resultado terapêutico, assumiram diferentes valores nas simulações. Os valores usados foram 300 e 500 μM para C_0 ; 12, 24, e 48h para τ ; e 0, 10^{-3} , 2×10^{-3} , 5×10^{-3} e 5×10^{-4} para $\beta_{n,c}$. A magnitude de β merece uma breve discussão. Das medidas experimentais de Chithrani e Chan [119], parece que as células endocitam cerca de 10^3 nanopartículas de ouro de raio 25nm em 6h. Considerando um volume celular de $1nL$, uma concentração extracelular de nanopartículas de 0,02nM e assumindo que a concentração molar internalizada por hora é dada por $\Delta C_3 = \beta C_2$, encontramos que

$$\delta c_3 = \frac{10^3}{6h} \times \frac{mol}{6 \times 10^{23}} \frac{1}{10^{-9}L} = 2,78 \times 10^{-13} \frac{M}{h} \quad (7.18)$$

e, conseqüentemente,

$$\text{taxa de consumo} = \frac{\delta c_3}{c_2} = \frac{2,78 \times 10^{-13} M/h}{0,02 \times 10^{-9} M} = 1,39 \times 10^{-2} h^{-1}. \quad (7.19)$$

Mas fizemos uma mudança de variáveis na equação para c_2 de modo que o termo de consumo adimensional é estimado em

$$\alpha_{c,n} = \text{taxa de consumo} \frac{\Delta^2}{D} = \frac{1,39 \times 10^{-2} h^{-1} \times 10^{-4} mm^2}{2,64 \times 10^{-2} mm^2/h} = 5,3 \times 10^{-5}. \quad (7.20)$$

Portanto, os valores usados para a taxa de endocitose em nossas simulações estão até duas ordens de magnitude maiores que essa estimativa. Os parâmetros usados no modelo e suas estimativas são listados na tabela 7.1.

7.4 Resultados e discussão

A terapia é aplicada em tumores compactos, crescidos em redes quadradas com $L = 250$, ou seja, um tecido de cerca de 6,25mm². O tratamento com as nanopartículas de CP-Dox é iniciado quando o tumor possui $N_0 = 5000$ células cancerosas. Vamos usar um protocolo agressivo, que consiste da administração intravenosa de $c_0 = 0,5mM$ de CP-Dox (cerca de 83% da dose máxima tolerada) periodicamente a cada 12h.

O parâmetro p que relaciona a concentração intracelular da droga com sua capacidade de executar suas ações, é mantido fixo em $p = 1$. Simulações com $p = 3$ apresentaram resultados similares.

A terapia é aplicada em tumores vasculares e em micrometástases, e um número máximo de 300 doses é administrado na tentativa de erradicar o tumor. Dois tipos de nanopartículas serão estudados: nanopartículas perfeitamente seletivas, que são absorvidas apenas por células cancerosas, e nanopartículas que são absorvidas à mesma taxa por células normais e cancerosas.

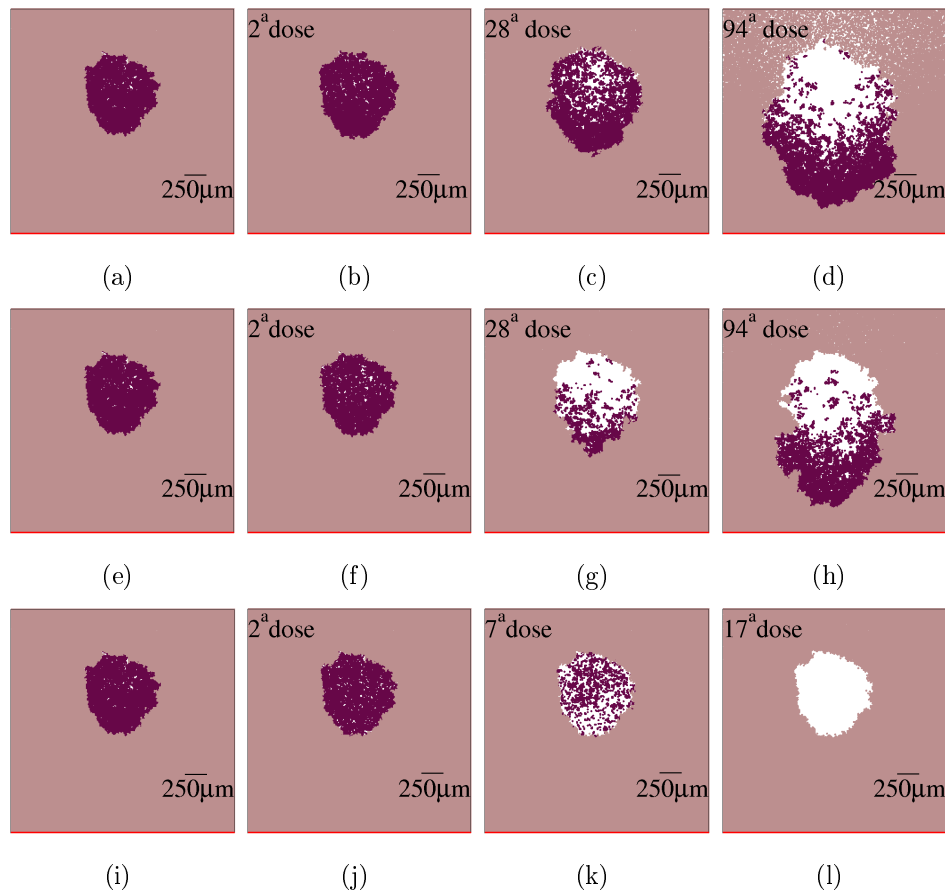


Figura 7.4: Tratamento com nanopartículas perfeitamente seletivas em micrometástases. O tecido normal é mostrado em marrom claro, as células tumorais em marrom escuro, o tecido morto em branco e o capilar é indicado em vermelho. Em (a)-(d) $\alpha_c = 5 \times 10^{-5}$, em (e)-(h) $\alpha_c = 5 \times 10^{-4}$ e em (i)-(l) $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$. Apenas no último caso o tumor foi eliminado. Todas as figuras apresentam comportamentos típicos observados após simulações de 50 amostras de cada caso.

Na figura 7.4 são mostrados três casos de terapia com nanopartículas perfeita-

mente seletivas em micrometástases, para três taxas de absorção de droga pelas células cancerosas. As simulações feitas usando a estimativa de que essa taxa (adimensional) seria de 5×10^{-5} foram incapazes de erradicar o tumor (figura 7.4a). Aumentando essa taxa para 5×10^{-4} , o tratamento é mais eficiente em matar células cancerosas, mas ainda é incapaz de eliminar o tumor (figura 7.4b). Entretanto, se a taxa de absorção assumir o valor 5×10^{-3} , que corresponde a aproximadamente $3 \times 10^{-8} m M h^{-1}$, o tumor é erradicado (figura 7.4c) após cerca de 18 doses (valor médio do número de doses necessárias para eliminar o tumor em 50 amostras). Note que em 7.4a e 7.4b o tumor se desloca em direção ao vaso capilar. Na vizinhança do capilar a concentração de droga é certamente mais alta, mas a disponibilidade de nutrientes é maior. Além disso, a concentração de droga cai exponencialmente no capilar.

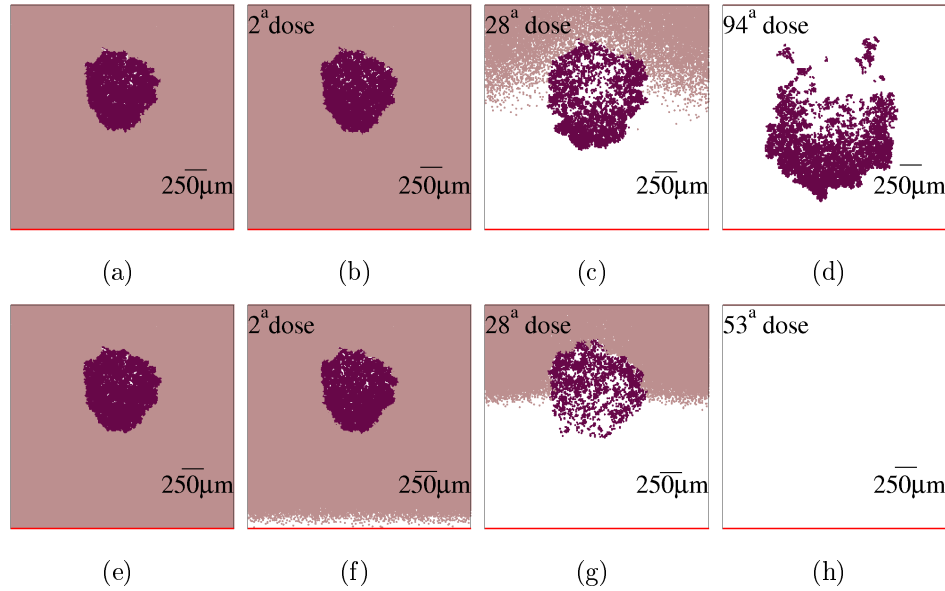


Figura 7.5: Tratamento com nanopartículas não-seletivas em micrometástases. Em (a)-(d) $\alpha_c = 5 \times 10^{-4}$, em (e)-(h) $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$. Apenas no segundo caso o tumor foi eliminado. Entretanto, o tecido normal foi severamente afetado, o que provavelmente causaria efeitos colaterais que poderiam inviabilizar o tratamento. As figuras mostram comportamentos típicos observados após simulações de 50 amostras de cada caso.

Se as nanopartículas também são absorvidas por células normais, o tratamento é capaz de eliminar a micrometástase para $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$ (ou $3 \times 10^{-8} m M h^{-1}$), como pode ser visto na figura 7.5. Entretanto, são necessárias em média 55 doses para eliminar o tumor e todo o tecido normal vizinho ao tumor também é afetado pela droga. Isso certamente implicaria em efeitos colaterais que poderiam inviabilizar o

tratamento. Novamente é possível observar que a massa tumoral migra em direção ao capilar, indicando que essa região é favorável ao tumor.

Quando as micrometástases foram afetadas pelo tratamento, o tumor migrou em direção ao vaso capilar. Então vamos estudar o tratamento feito em tumores que cresceram na vizinhança do capilar. Esses tumores serão identificados como vasculares, e vamos admitir que eles são incapazes de invadir o capilar e provocar metástases. O tratamento com nanopartículas seletivas é ineficiente se a taxa de absorção é $\alpha_c = 5 \times 10^{-4}$ (figura 7.6a), mas é capaz de erradicar o tumor vascular se $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$ (figura 7.6b). Entretanto, foram necessárias em média 33 doses para eliminar o tumor vascular, o que é quase o dobro do número de doses necessárias para erradicar a micrometástase no mesmo cenário. Além disso, note que no caso em que o tratamento foi ineficiente o tumor cresce a uma taxa alta mesmo sob ataque das nanopartículas.

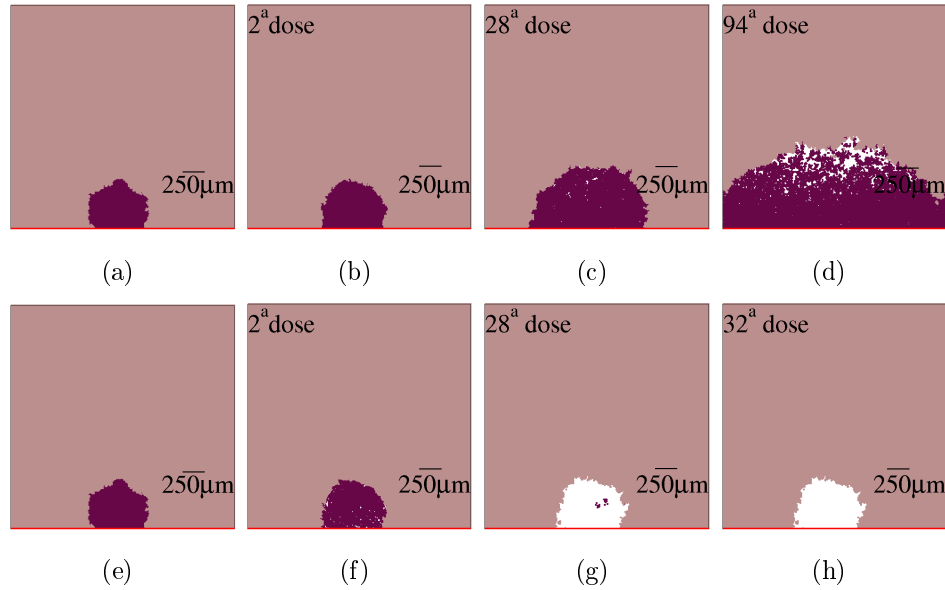


Figura 7.6: Tratamento com nanopartículas perfeitamente seletivas em tumores vasculares. Em (a)-(d) $\alpha_c = 5 \times 10^{-4}$, em (e)-(h) $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$. Apenas no segundo caso o tumor foi eliminado. As figuras mostram comportamentos típicos observados após simulações de 50 amostras de cada caso.

Se as nanopartículas não são seletivas, células tumorais que absorvem as nanopartículas a taxa $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$ são eliminadas, bem como as células normais vizinhas. A erradicação do tumor requer em média 102 doses, ou seja, aproximadamente dois meses de tratamento intensivo, com a administração de uma dose a cada 12h. Por outro lado, se as células absorvem $\alpha_c = 5 \times 10^{-4}$ o tumor cresce apesar do tratamento,

enquanto o tecido normal é devastado. Esses resultados podem ser vistos na figura 7.7.

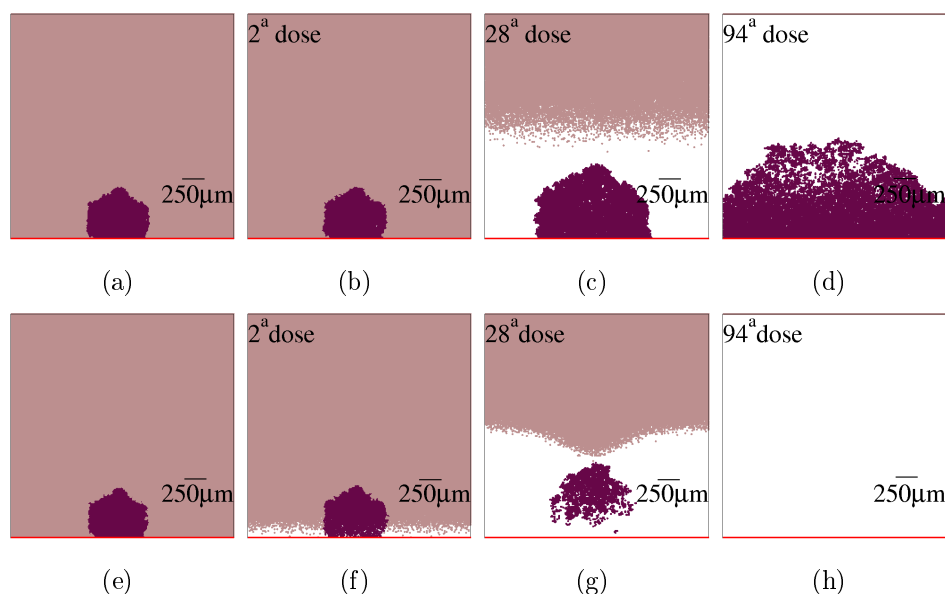


Figura 7.7: Tratamento com nanopartículas não-seletivas em tumores vasculares. Em (a)-(d) $\alpha_c = 5 \times 10^{-4}$, em (e)-(h) $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$. Apenas no segundo caso o tumor foi eliminado. As figuras mostram comportamentos típicos observados após simulações de 50 amostras de cada caso.

As diferenças entre os tratamentos em tumores vasculares e micrometástases, com nanopartículas seletivas ou não, também podem ser observadas na figura 7.8. Nela, é mostrada a evolução do número de células cancerosas em cada cenário. O início do tratamento é indicado por uma seta. Note que os tumores vasculares crescem a uma taxa bem mais alta que as micrometástases, o que pode ser explicado pela maior disponibilidade de nutrientes ao tumor vascular. E como pode ser visto nas figuras 7.8a e b, a erradicação do tumor é muito mais rápida nas micrometástases. Nos casos em que o tumor não foi eliminado devido a baixa taxa de absorção de nanopartículas (figuras 7.8c e d), os tumores crescem até ocuparem toda a região vizinha ao capilar. Enquanto as micrometástases sofrem uma redução importante logo após o início da terapia, os tumores vasculares sofreram apenas uma redução insignificante, retomando seu crescimento em seguida. Note que o tratamento parece mais eficaz contra as micrometástases até o instante em que elas alcançam o capilar. A partir desse momento, o tumor vascularizado é indiferente as consecutivas injeções da droga.

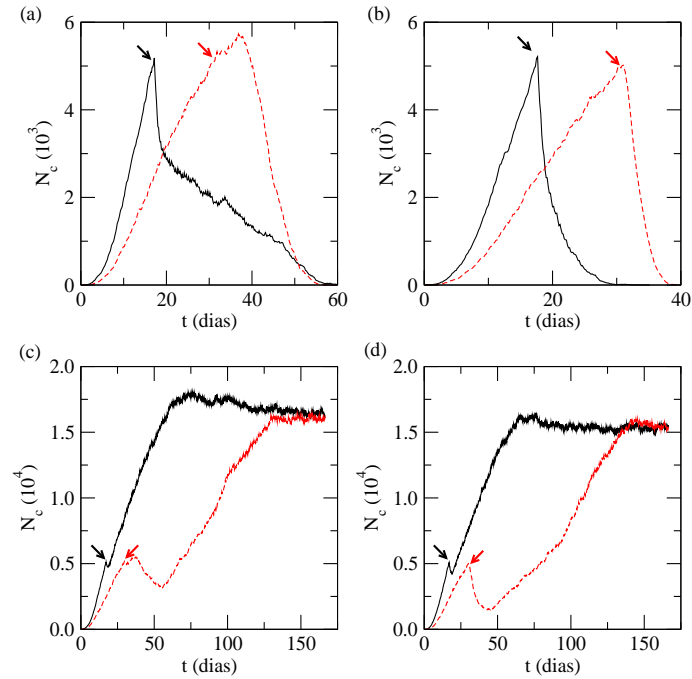


Figura 7.8: Curvas de população para os cenários discutidos anteriormente. Em (a) $\alpha_c = \alpha_n = 5 \times 10^{-3}$, em (b) $\alpha_c = 5 \times 10^{-3}$ e $\alpha_n = 0$, em (c) $\alpha_c = \alpha_n = 5 \times 10^{-4}$, em (d) $\alpha_c = 5 \times 10^{-4}$ e $\alpha_n = 0$. As curvas pretas se referem a tumores vasculares enquanto as vermelhas a micrometástases. As setas indicam o início da terapia.

7.5 Conclusões

A quimioterapia contra o câncer usando nanopartículas de CP-Dox foi estudada por meio de simulações computacionais que combinam equações de reação-difusão para os nutrientes, a farmacocinética das nanopartículas e regras estocásticas para as ações celulares. Nossos resultados indicam que essa terapia fracassa em erradicar tumores sólidos principalmente devido às baixas taxas de endocitose das nanopartículas. Um tratamento bem-sucedido requer que as nanopartículas permaneçam na corrente sanguínea por um longo período de tempo, que haja alta seletividade das nanopartículas pelas células cancerosas e que elas sejam absorvidas a uma alta taxa pelas células malignas. Esses fatores emergem como os principais desafios na busca por nanopartículas oncolíticas eficientes.

Capítulo 8

Conclusões e Perspectivas

Nessa tese de doutoramento foram propostos e discutidos modelos multiescala para tratamento de tumores via viroterapia oncolítica e via nanopartículas quimioterápicas. Os trabalhos apresentados nos capítulos 4 e 7 foram publicados (ref. [7] e [8]), o trabalho apresentado no capítulo 5 será submetido em breve e o apresentado no capítulo 6 já está submetido.

Modelos matemáticos têm o potencial de, mais do que descrever sistemas biológicos, prever quais os mecanismos fundamentais que definem cada fenômeno. Assim, os modelos propostos nessa tese sugerem as características necessárias na construção de vírus oncolíticos e de nanopartículas quimioterápicas para que o tumor seja erradicado em uma terapia que minimize efeitos colaterais.

Quanto aos trabalhos relacionados a viroterapia, as predições dos modelos podem ser verificadas experimentalmente, e algumas sugestões de como implementar tais modificações nos vírus e de como a resposta imune poderia ser modulada foram apresentadas ao longo dos capítulos. Nossos resultados destacam a importância de adequar a difusividade viral à dinâmica do tumor e indicam que a resposta imune não precisa ser completamente suprimida; reduzir a mobilidade dos linfócitos na região tumoral pode ser suficiente para permitir que os vírus eliminem o tumor. Em relação às nanopartículas quimioterápicas, destacamos a importância de aumentar a seletividade e a taxa de endocitose dessas nanopartículas por células cancerosas.

Já está em andamento uma versão tridimensional para o modelo de crescimento de tumores apresentado no capítulo 3. Os próximos passos são um estudo criterioso desse modelo e propor versões tridimensionais para terapias anti-câncer. Além disso, pretendemos progressivamente incluir outros aspectos importantes no desenvolvimento tumoral. Por exemplo, considerar o perfil de expressão gênica de cada célula cancerosa e as interações tumor-estroma-sistema imune.

Além de desenvolver os modelos no sentido de torna-los mais específicos a certos tumores e terapias, ou incluir outros processos e características importantes na progressão de tumores, é importante tentar extrair quais os aspectos realmente essenciais nos modelos. Por exemplo, discutir os efeitos de condições iniciais diferentes, a relevância de cada regra da dinâmica celular, da difusão, etc. Comparações com cálculos de campo médio também podem sugerir quais seriam essas características essenciais.

Portanto, é importante desenvolver esses modelos não apenas incorporando a eles agentes e processos, mas também questionando continuamente o papel de cada uma das considerações feitas anteriormente.

REFERÊNCIAS

- [1] J. D. Murray. *Mathematical Biology I: An Introduction*. Springer-Verlag, 2003.
- [2] M. L. Martins, S. C. Ferreira Jr e M. J. Vilela. Multiscale models for biological systems. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1-2):18–23, 2010.
- [3] A. Ketola, A. Hinkkanen, F. Yongabi, P. Furu, A.-M. Maatta, T. Liimatainen, R. Pirinen, M. Bjorn, T. Hakkarainen, K. Makinen, J. Wahlfors e R. Pellinen. Oncolytic semliki forest virus vector as a novel candidate against unresectable osteosarcoma. *Cancer Res.*, 68(20):8342–8350, 2008.
- [4] E. Brewer, J. Coleman E A. Lowman. Emerging technologies of polymeric nanoparticles in cancer drug delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2011:1–10, 2011.
- [5] X.Q. Lun, H. Zhou, T. Alain, B. Sun, L. Wang, J.W. Barrett, M.M. Stanford, G. McFadden, J. Bell, D.L. Senger e P. A. Forsyth. Targeting human medulloblastoma: Oncolytic virotherapy with myxoma virus is enhanced by rapamycin. *Cancer Res.*, 67(18):8818–8827, 2007.
- [6] S. C. Ferreira Jr., M. L. Martins e M. J. Vilela. Reaction-diffusion model for the growth of avascular tumor. *Phys. Rev. E*, 65:021907, 2002.
- [7] L.R. Paiva, C. Binny, S.C. Ferreira e M.L. Martins. A multiscale mathematical model for oncolytic virotherapy. *Cancer Res.*, 69(3):1205–1211, February 2009.
- [8] L. R. Paiva e M. L. Martins. A multiscale model to evaluate the efficacy of anticancer therapies based on chimeric polypeptide nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 98:0, 2011.
- [9] D.W. Kufe, R.E. Pollock, R.R. Weichselbaum, R.C. Bast, T.S. Gansler, J.F. Holland e E. Frei. *Cancer Medicine 6 ed.* BC Decker, Hamilton (ON), 2003.
- [10] D. Hanahan e R. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57, 2000.

-
- [11] R.A. Weinberg. *Uma célula renegada - como o câncer começa*. Ciência Atual - Rocco, Rio de Janeiro, 2000.
- [12] R.A. Weinberg. How cancer arises. *Scientific American*, 275:62–70, 1996.
- [13] C. Shao, L. Deng, O. Henegariu, L. Liang, P. J. Stambrook e J. A. Tischfield. Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *PNAS*, 97:7405, 2000.
- [14] P. Friedl e E. B. Brocker. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(1):41–64, 2000.
- [15] S. R. K. Vedula, E. Mendoz, W. Sun, T. S. Lim, A. Li, Q. S. Li e C. T. Lim. Human cell as a structure and machine an engineering perspective. *The IES Journal Part A: Civil and Structural Engineering*, 2:153–160, 2009.
- [16] J. Folkman. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American*, September:150, 1996.
- [17] J.M. Berg, J.L. Tymoczko e L. Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Co., New York, 2002.
- [18] R.A.Gatenby e R.J.Gillies. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev. Cancer*, 4:891, 2004.
- [19] M. Jakobisiak, W. Lasek e J. Gołab. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Letters*, 90:103, 2003.
- [20] F. A. Fitzpatrick. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int. Immunopharmacol.*, 1:1651, 2001.
- [21] E. Shacter e S. A. Weitzman. Chronic inflammation and cancer. *Oncology-New York*, 16:217, 2002.
- [22] S. A. Weitzman, A. B. Weitberg, E. P. Clark, T. P. Stossel e L. B. Thomas. Phagocytes as carcinogens - malignant transformation produced by human-neutrophils. *Science*, 227:1231, 1985.
- [23] T. Tamatani , P. Turk , S. Weitzman e R.Oyasu. Tumorigenic conversion of a rat urothelial cell line by human polymorphonuclear leukocytes activated by lipopolysaccharide. *Jpn. J. Cancer Research*, 90:829, 1999.

- [24] K.-J. Malmberg. Effective immunotherapy against cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(10):879–892, 2004.
- [25] National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov>, 2010.
- [26] J. A. Mackay, M. Chen, J. R. McDaniel, W. Liu, A. J. Simnick e A. Chilkoti. Self assembling chimeric polypeptide doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection. *Nat. Mater.*, 8:993–999, 2009.
- [27] D. Kirn , R. L. Martuza e J. Zwiebel. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nature Medicine*, 7:781, 2001.
- [28] R. Cattaneo, T.Miest, E.V.Shashkova e M.A. Barry. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat. Rev. Microbiology*, 6:529, 2008.
- [29] A. C. Shah , D. Benos , G. Y. Gillespie e J. M. Markert. Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J. Neurooncol.*, 65:203, 2003.
- [30] H. L. Kaufman, G. DeRaffele, J. Mitcham, D. Moroziewicz, S. M. Cohen, K. S. Hurst-Wicker, K. Cheung, D. S. Lee, J. Divito, M. Voulo, J. Donovan, K. Dolan, K. Manson, D. Panicali, E. Wang, H. Horige F. M. Marincola. Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J. Clin. Invest.*, 115:1903, 2005.
- [31] E. A. Chiocca, K. M. Abbed, S. Tatter, D. N. Louis, F. H. Hochberga, F. Barker, J. Kracher, S. A. Grossman, J. D. Fisher, K. Carson, M. Rosenblum, T. Mikkelsen, J. Olson, J. Markert, S. Rosenfeld, L. B. Nabors, S. Brem, S. Phuphanich, S. Freeman, R. Kaplan e J. Zwiebel. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol. Ther.*, 10:958, 2004.
- [32] S. Harrow, V. Papanastassiou, J. Harland, R. Mabbs, R. Petty, M. Fraser, D. Hadley, J. Patterson, S. M. Brown e R. Rampling. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumor following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Therapy*, 11:1648, 2004.

-
- [33] G. Fulci, L. Breymann, D. Gianni, K. Kurozomi, S.S. Rhee, J. Yu, B. Kaur, D.N. Louis, R. Weissleder, M.A. Caligiuri e E.A. Chiocca. Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *PNAS*, 103:12873–12878, 2006.
- [34] K. A. Parato, D. Senger, P. A. J. Forsyth e J. C. Bell. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nature Rev. Cancer*, 5:965, 2005.
- [35] C. J. McDonald, C. Erlichman, J. N. Ingle, G. A. Rosales, C. Allen, S. M. Greiner, M. E. Harvey, P. J. Zollman, S. J. Russell e E. Galanis. A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Canc. Res. and Treat.*, 99:177, 2006.
- [36] Y. Wang, S. Thorne, J. Hannonck, J. Francis, T. Au, T. Reid, N. Lemoine, D. Kirn e G. Hallden. A novel assay to assess primary human cancer infectibility by replication-selective oncolytic adenoviruses. *Clin. Cancer Res.*, 11:351, 2005.
- [37] S. C. Ferreira Jr., M. L. Martins e M. J. Vilela. Morphology transitions induced by chemotherapy in carcinomas in situ. *Phys. Rev. E*, 67:51914, 2003.
- [38] S. C. Ferreira Jr. , M. L. Martins e M. J. Vilela. Fighting cancer with viruses. *Physica A*, 345:591, 2005.
- [39] M. Chaplain e J. A. Sherratt. Mathematical modelling of cancer in the uk, 1998.
- [40] S. L. Spencer, R. A. Gerety, K. J. Pienta e S. Forrest. Modeling somatic evolution in tumorigenesis. *PLoS Comput. Biol.*, 2:e108, 2006.
- [41] T. Alarcón, H. M. Byrne e P. K. Maini. A multiple scale model for tumor growth. *Multiscale Model.Simul.*, 3:440–475, 2005.
- [42] N. Bellomo e L. Preziosi. Modelling and mathematical problems related to tumor evolution and its interaction with the immune system. *Math. Comput. Model.*, 32:413, 2000.
- [43] L. G. de Pillis, A. E. Radunskaya e C. L. Wiseman. A validated mathematical model of cell-mediated immune response to tumor growth. *Cancer Res.*, 65:7950, 2005.
- [44] M.A. Chaplain. Mathematical modelling of angiogenesis. *J Neurooncol.*, 50:37–51, 2000.

- [45] J. Gevertz e S. Torquato. Growing heterogeneous tumors in silico. *Phys. Rev. E*, 80:051910, 2009.
- [46] Jr. e M. J. Vilela M. L. Martins, S. C. Ferreira. Multiscale models for the growth of avascular tumors. *Phys. Life Rev.*, 4:128, 2007.
- [47] R. P. Araujo e D. L. S. McElwain. A history of the study of solid tumour growth: the contribution of mathematical modelling. *Bull. Math. Biol.*, 66:1039, 2004.
- [48] C. V. Rao, D. M. Wolf e A. Arkin. Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature London*, 420:231, 2002.
- [49] M. Scalerandi , A. Romano , P. P. Delsanto e C. A. Condat. Nutrient competition as a determinant for cancer growth. *Phys. Rev. E*, 59:2206, 1998.
- [50] D. A. Rew e G. D. Wilson. Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. part II: clinical data. *Eur J Surg Oncol*, 26:405–417, 2000.
- [51] A. L. Lehninger, D. L. Nelson e M. M. Cox. *Biochemistry*. W.H.Freeman and Co, Nova Iorque, 2004.
- [52] A.A. Patel, E. T. Gawlinski, S. K. Lemieux e 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.*, 213:315–331, 2001.
- [53] S.V. Otirchos e R.M. Sutherland J.J. Casciari. Variation in tumor growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular ph. *J. Cell. Phys.*, 151:386–394, 1992.
- [54] L.A. Sauer e R.T. Dauchy. In vivo lactate production and utilization by jensen sarcoma and morris hepatoma 7288CTC1. *Cancer Res.*, 46:689–693, 1986.
- [55] A.G. Hudetz. Mathematical model of oxygen transport in the cerebral cortex. *Brain Res.*, 817:75–83, 1999.
- [56] J.T. Wu, H.M. Byrne, D.H. Kirn e L.M. Wein. Modeling and analysis of a virus that replicates selectively in tumor cells. *Bull. Math. Biol.*, 63:731–768, 2001.
- [57] J.T. Wu, D.H. Kirn e L.M. Wein. Analysis of a three-way race between tumor growth, a replication competent virus and an immune response. *Bull. Math. Biol.*, 66:605–625, 2004.

-
- [58] D. Wodarz. Viruses as antitumor weapons: Defining conditions for tumor remission. *Cancer Res.*, 61:3501–3507, 2001.
- [59] D. Wodarz. Gene therapy for killing p53-negative cancer cells: use of replicating versus nonreplicating agents. *Hum. Gene Ther.*, 14:153–159, 2003.
- [60] Y. Tao e Q. Guo. The competitive dynamics between tumor cells, a replication-competent virus and an immune response. *J. Math. Biol.*, 51:37–74, 2005.
- [61] A. Friedman, J. P. Tian, G. Fulci, E. A. Chiocca e J. Wang. Glioma virotherapy: effects on innate immune suppression and increased viral replication capacity. *Cancer Res.*, 66:2314, 2006.
- [62] C.C. Heise, A.M. Williams, S. Xue, M. Propst e D.H. Kirn. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res.*, 59:2623, 1999.
- [63] D. H. Zhu, S. P. Lennon, M. H. Peters, W. C. Finney e M. Singh M. Brownian diffusion and surface kinetics of liposome and viral particle uptake by human lung cancer cells in-vitro. *Annals of Biomedical Engineering*, 34:1573, 2006.
- [64] A. R. A. ANDERSON, M. A. J. CHAPLAIN, E. L. NEWMAN, R. J. C. STEELE e A. M. THOMPSON. Mathematical modelling of tumour invasion and metastasis. *Journal of Theoretical Medicine*, 2:129–54, 2000.
- [65] D.C. Yu, G.T. Sakamoto e D.R. Henderson. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Res.*, 59:1498–504, 1999.
- [66] M. Green e G.E. Daesch. Biochemical studies on adenovirus multiplication. ii. kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. *Virology*, 13:169–176, 1961.
- [67] W. Mok, T. Stylianopoulos, Y. Boucher e R. K. Jain. Mathematical modeling of herpes simplex virus distribution in solid tumors: Implications for cancer genetherapy. *Clin. Cancer Res.*, 15:2352–2360, 2009.
- [68] J.R. Bischoff, D.H. Kim, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey e F. McCormick. An adenovirus mutant

- that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, 274:373–376, 1996.
- [69] K. W. Peng, E. M. Hadac, B. D. Anderson, R. Myers, M. Harvey, S. M. Greiner, D. Soeffker, M. J. Federspiel e S. J. Russell. Pharmacokinetics of oncolytic measles virotherapy: eventual equilibrium between virus and tumor in an ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Therapy*, 13:732, 2006.
- [70] T.-C. Liu, E. Galanis e D Kirn. Clinical trials results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Prac Onc*, 4:101–17, 2007.
- [71] E.A. Chiocca e K.K. Tanabe S.S. Yoon, N.M. Carroll. Cancer gene therapy using a replication-competent herpes simplex virus type 1 vector. *Ann Surg*, 228:366–74, 1998.
- [72] D.G. Morris, P. Forsyth, G. Roldan et al. A phase i clinical trial evaluating intralesional reolysin (reovirus) in histologically confirmed malignancies. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 21:a24, 2002.
- [73] L. Romel, B. Randlev, T. Reid, S. Kaye e D. Kirn J. Nemunaitis, I. Ganly e, F. Khury, J. Arseneau, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, P. Maples,. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55 kd gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase ii trial. *Cancer Res.*, 60:6359–66, 2000.
- [74] I. Ganly, D. Kirn, S. G. Eckhardt, G. I. Rodriguez, D. S. Soutar, R. Otto, A. G. Robertson, O. Park, M. L. Gulley, C. Heise, D. D. Von Hoff e S. B. Kaye. A phase i study of onyx-015, an e1b attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 6:798–806, 2000.
- [75] J. Nemunaitis, F. Khuri, I. Ganly, J. Arseneau, M. Posner, E. Vokes, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, A. Blackburn, L. Romel, B. Randlev, S. Kaye e D. Kirn. Phase ii trial of intratumoral administration of onyx-015, a replicationselective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 19:289–98, 2001.

- [76] Milton GW e Brown MM. The limited role of attenuated smallpox virus in the management of advanced malignant melanoma. *Aust N Z J Surg*, 35:286–90, 1966.
- [77] M. J. Mastrangelo, H. C. Maguire Jr., L. C. Eisenlohr, C. E. Laughlin, C.E. Monken, P.A. McCue, A.J. Kovatich e E.C. Lattime. Intratumoral recombinant gm-csf-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melenoma. *Cancer Gene Ther*, 6:409–22, 1999.
- [78] Y.H. Kim, G. Ishii, K. Goto, K. Nagai, K. Tsuta, S. Shiono, J. Nitadori, T. Kodama, Y. Nishiwaki e A. Ochiai. Dominant papillary subtype is a significant predictor of the response to gefitinib in adenocarcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res.*, 10(21):7311–7317, 2004.
- [79] S.A. Rempel, S. Ge e J.A. Gutiérrez. Sparc: A potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin. Cancer Res.*, 5(2):237–241, 1999.
- [80] C.L. Reis, J.M. Pacheco, M. K. Ennis e D. Dingli. In silico evolutionary dynamics of tumour virotherapy. *Integr. Biol.*, 2:41–45, 2010.
- [81] D. Wodarz e N. Komarova. Towards predictive computational models of oncolytic virus therapy: Basis for experimental validation and model selection. *PLoS ONE*, 4:e4271, 2009.
- [82] S.S. Ozturk e W.-S. Hu. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. *Biotechnology and bioprocessing series. CRC Press*, 30, 2006.
- [83] R.M. Myers, S.M. Greiner, M.E. Harvey, G. Griesmann, M.J. Kuffel, S.A. Buhrow, J.M. Reid, M. Federspiel, M.M. Ames, D. Dingli, K. Schweikart, A. Welch, A. Dispenzieri, K.-W. Peng e S.J. Russell. Preclinical pharmacology and toxicology of intravenous mv-nis, an oncolytic measles virus administered with or without cyclophosphamide. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82:700–710, 2007.
- [84] D. Dingli, C. Offord, R. Myers, K.-W. Peng, T. W. Carr, K. Josic, S. J. Russell e Z. Bajzer. Dynamics of multiple myeloma tumor therapy with a recombinant measles virus. *Cancer Gene Ther.*, 16:873–882, 2009.
- [85] R.K.Jain. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.*, 50:814–819, 1990.

- [86] R. Alemany. Cancer selective adenoviruses. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(1):42–58, 2007.
- [87] P.A. Netti, D.A. Berk, M.A. Swartz, A.J. Grodzinsky e R.K. Jain. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res.*, 60:2497–503, 2000.
- [88] E. Brown, T. McKee, E. diTomaso, A. Pluen, B. Seed, Y. Boucher e R.K. Jain. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat. Med.*, 9:796–800, 2003.
- [89] W. Mok, Y. Boucher e R.K. Jain. Matrix Metalloproteinases-1 and -8 Improve the Distribution and Efficacy of an Oncolytic Virus. *Cancer Res.*, 67(22):10664–10668, 2007.
- [90] C. Alvarez-Breckenridge, B. Kaur e E. A. Chiocca. Pharmacological and chemical adjuvants in tumor virotherapy. *Chem. Rev.*, 109:3125–40, 2009.
- [91] T. L.-A. Nguyen, H. Abdelbary, M. Arguello, C. Breitbach, S. Leveille, J.S. Diallo, A. Yasmeen, T.A. Bismar, D. Kirn, T. Falls, V.E. Snoultten, B.C. Vanderhyden, J. Werier, H. Atkins, M.J. Vaha-Koskela, D.F. Stojdl, J.C. Bell e J. Hiscott. Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis. *PNAS*, 105:14981–14986, 2008.
- [92] G. Fulci, N. Dmitrieva, D. Gianni, E. J. Fontana, X. Pan, Y. Lu, C. S. Kaufman, B. Kaur, S. E. Lawler, R. J. Lee, C. B. Marsh, D. J. Brat, N. van Rooijen, A. S. Rachamimov, F. H. Hochberg, R. Weissleder, R. L. Martuza e E. A. Chiocca. Depletion of peripheral macrophages and brain microglia increases brain tumor titers of oncolytic viruses. *Cancer Res.*, 67:9398–9406, 2007.
- [93] N. Bessis, F.J. GarciaCozar e M.-C. Boissier. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy*, 11:S10–S17, 2004.
- [94] C. Wulfig, B. Puritic, J. Klem e J.D. Schatzle. Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *PNAS*, 100:7767–72, 2003.

-
- [95] M.C. Coffey, J.E. Strong, P.A. Forsyth, P.W.K. Lee. Reovirus therapy of tumors with activated ras pathway. *Science*, 282:1332–1334, 1998.
- [96] K. Raj, P. Ogston e P. Beard. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature*, 412:914–917, 2001.
- [97] C. A Janeway, P. Travers, M. Walport e M. J. Shlomchik. *Immunobiology*. Garland Science, Nova Iorque, 2001.
- [98] A.Boissonnas, L.Fetler, I.S.Zeelenberg, S.Hugues e S.Amigorena. In vivo imaging of cytotoxic t cell infiltration and elimination of a solid tumor. *Journal of Experimental Medicine*, 204:345–56, 2007.
- [99] T.C. Pierson, Q. Xu, S. Nelson, T. Oliphant, G.E. Nybakken, D.H. Fremont e M.S. Diamond. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of west nile virus infection. *Cell Host and Microbe*, 1:135–145, 2007.
- [100] D.R. Burton, E.O. Saphire e P.W.Parren. A model for neutralization of viruses based on antibody coating of the virion surface. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 260:109–143, 2001.
- [101] Y. Nakanishi, B. Lu, C. Gerard e A. Iwasaki. *CD8+* t lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires *CD4+* t-cell help. *Nature*, 462:510–513, 2009.
- [102] V. Racanelli, M.A. Frassanito, P. Leone, M. Galiano, V. De Re, F.Silvestris e F. Dammacco. Antibody production and in vitro behavior of *CD27*-defined b cell subsets: persistent hepatitis c virus infection changes de rules. *Journal of Virology*, 80:3923–3934, 2006.
- [103] M. T. Figge. Optimization of immunoglobulin substitution therapy by a stochastic immune response model. *PLoS ONE*, 4:e5685, 2009.
- [104] D.A. Berk, F. Yuan, M. Leunig e R.K. Jain. Direct in vivo measurement of targeted binding in a human tumor xenograft. *PNAS*, 94:1785–1790, 1997.
- [105] L. Vidal, H.S. Pandha, T.A. Yap, C.L. White, K. Twigger, R.G.Vile et al. A phase i study of intravenous oncolytic reovirus type 3 dearing in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.*, 14:7127–37, 2008.

- [106] R.Alemaný, C. Balagué e D.T.Curiel. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nature Biotechnology*, 18:723–7, 2000.
- [107] H. Ikeda, L.J. Old e R.D. Schreiber. The roles of ifn γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13:95–109, 2002.
- [108] K. Hirasawa, S.G. Nishikawa, K.L. Norman, M.C. Coffey, B.G. Thompson, C.S. Yoon et al. Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice. *Cancer Res.*, 63:348–53, 2003.
- [109] K. Ikeda, T. Ichikawa, H. Wakimoto, J.S. Silver, T.S. Deisboeck, D. Finkelstein et al. Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nature Med.*, 5:881–7, 1999.
- [110] K. Jooss , Y. Yang e J.M. Wilson. Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung. *Hum. Gene Ther.*, 7:1555–66, 1996.
- [111] S. Kuriyama, K. Tominaga, M. Kikukawa, T. Tsujimoto, T. Nakatani, H. Tsujinoue et al. Transient cyclophosphamide treatment before intraportal readministration of an adenoviral vector can induce re-expression of the original gene construct in rat liver. *Gene Ther.*, 6:749–57, 1999.
- [112] H. Wakimoto, G. Fulci, E. Tyminski e E.A. Chiocca. Altered expression of antiviral cytokine mRNAs associated with cyclophosphamide s enhancement of viral oncolysis. *Gene Ther.*, 11:214–23, 2004.
- [113] T. Wuest, J. Farber, A. Luster e D.J.J. Carr. $CD4^+$ t cell migration into the cornea is reduced in CXCL9 deficient but not CXCL10 deficient mice following herpes simplex virus type 1 infection. *Cellular Immunology*, 243:83–89, 2006.
- [114] J. Altomonte, L. Wu, L. Chen, M. Meseck, O. Ebert, A. Garcia-Sastre et al. Exponential enhancement of oncolytic vesicular stomatitis virus potency by vector-mediated suppression of inflammatory responses in vivo. *Mol. Ther.*, 16:146–53., 2008.
- [115] P. Friedl. Preshpecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 16:14–23, 2004.

-
- [116] A. Smith, M. Bracke, B. Leitinger, J.C. Porter e N. Hogg. LFA-1-induced t cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J. Cell Sci.*, 116:3123–33, 2003.
- [117] S. Mishra, V.K. Katiyar e V. Arora. Mathematical modeling of chemotherapy strategies in vascular tumor growth using nanoparticles. *Applied Mathematics and Computation*, 189:1246–1254, 2007.
- [118] T. T. Goodman, J. Chen, K. Matveev e S. H. Pun. Spatio-temporal modeling of nanoparticle delivery to multicellular tumor spheroids. *Biotechnol Bioeng.*, 101:388–399, 2008.
- [119] B. D. Chitrani e W. C. W. Chan. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.*, 7:1542, 2007.
- [120] C. Oliver, K. Shortridge e G. Belyanin. Diffusion coefficient and molecular weight of type 5 adenovirus by photon-correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 437:589–598, 1976.

A

Apêndices

Apêndice A - Resolução das Equações Diferenciais

O procedimento usado para resolver as equações diferenciais em todos os modelos apresentados é semelhante. Considere a equação

$$\begin{aligned}\frac{\partial \phi}{\partial t} &= D \nabla^2 \phi - \gamma \phi \\ \phi(x=0) &= \phi_0,\end{aligned}\tag{A.1}$$

em que ϕ é, por exemplo, a concentração de nutrientes (ou vírus ou anticorpos), D sua constante de difusão e γ sua taxa de consumo. O objetivo é resolver essa equação em uma rede quadrada com espaçamento de rede Δ .

Substituição de variáveis

Por simplicidade, é conveniente realizar uma substituição de variáveis na equação diferencial para deixá-la “adimensional”. Por exemplo, na A.1, a substituição de variáveis:

$$t' = \frac{Dt}{\Delta^2}, x' = \frac{s}{\Delta}, \phi' = \frac{\phi}{\phi_0}, \gamma' = \frac{\gamma \Delta^2}{D}\tag{A.2}$$

permite que a equação A.1 seja reescrita como

$$\begin{aligned}\frac{\phi_0 D}{\Delta^2} \frac{\partial \phi'}{\partial t'} &= \frac{D \phi_0}{\Delta^2} \nabla'^2 \phi' - \frac{\gamma' D}{\Delta^2} \phi' \phi_0 \\ \phi'(x' = 0) &= 1,\end{aligned}\tag{A.3}$$

ou, dividindo os dois lados da equação por $D \phi_0 / \Delta^2$ tem-se

$$\frac{\partial \phi'}{\partial t'} = \nabla'^2 \phi' - \gamma' \phi' e \phi'(x' = 0) = 1,\tag{A.4}$$

Note que todas as novas variáveis são adimensionais.

Discretização da equação

Usando o método de diferenças finitas, é possível discretizar a equação A.4 para que ela possa ser resolvida na rede com espaçamento Δ . Reescrevendo essa equação omitindo as apóstrofes, temos

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = \nabla^2\phi - \gamma\phi. \quad (\text{A.5})$$

Da série de Taylor temos que

$$\phi(x_i + \Delta) = \phi(x_i) + \Delta \frac{d\phi(x_i)}{dx} + \frac{\Delta^2}{2!} \frac{d^2\phi(x_i)}{dx^2} + O(h^3) \quad (\text{A.6})$$

e

$$\phi(x_i - \Delta) = \phi(x_i) - \Delta \frac{d\phi(x_i)}{dx} + \frac{\Delta^2}{2!} \frac{d^2\phi(x_i)}{dx^2} + O(h^3) \quad (\text{A.7})$$

Definindo

$$\begin{aligned} \phi_{i+1} &= \phi(x_i + \Delta), \phi_i = \phi(x_i), \phi_{i-1} = \phi(x_i - \Delta), \\ \phi'_{i+1} &= \frac{d\phi(x_i + \Delta)}{dx}, \phi'_i = \frac{d\phi(x_i)}{dx}, \phi'_{i-1} = \frac{d\phi(x_i - \Delta)}{dx}, \\ \phi''_{i+1} &= \frac{d^2\phi(x_i + \Delta)}{dx^2}, \phi''_i = \frac{d^2\phi(x_i)}{dx^2}, \phi''_{i-1} = \frac{d^2\phi(x_i - \Delta)}{dx^2}, \dots \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

podemos reescrever as equações A.6 e A.7 como

$$\phi_{i+1} = \phi_i + \Delta\phi'_i + \frac{\Delta^2}{2!}\phi''_i \quad (\text{A.9})$$

e

$$\phi_{i-1} = \phi_i - \Delta\phi'_i + \frac{\Delta^2}{2!}\phi''_i \quad (\text{A.10})$$

Subtraindo A.10 em A.9 tem-se

$$\phi_{i+1} - \phi_{i-1} \approx 2\Delta\phi'_i \Rightarrow \phi'_i \approx \frac{\phi_{i+1} - \phi_{i-1}}{2\Delta} \quad (\text{A.11})$$

e somando A.10 em A.9 tem-se

$$\phi_{i+1} + \phi_{i-1} \approx 2\phi_i + \Delta^2\phi''_i \quad \Rightarrow \quad \phi''_i \approx \frac{\phi_{i+1} - 2\phi_i + \phi_{i-1}}{\Delta^2} \quad (\text{A.12})$$

Usando A.11, temos que a derivada temporal discretizada é dada por:

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} \approx \frac{\phi_{t+1} - \phi_t}{\delta_t} \quad (\text{A.13})$$

e o laplaciano discretizado é dado por

$$(\nabla^2\phi)_{i,j} = \frac{\partial^2\phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\phi}{\partial y^2} = \frac{\phi_{i+1,j} - 2\phi_{i,j} + \phi_{i-1,j}}{\delta_i^2} + \frac{\phi_{i,j+1} - 2\phi_{i,j} + \phi_{i,j-1}}{\delta_j^2} \quad (\text{A.14})$$

Se $\delta_i = \delta_j = \Delta$, então

$$(\nabla^2 \phi)_{i,j} = \frac{\phi_{i+1,j} + \phi_{i-1,j} + \phi_{i,j+1} + \phi_{i,j-1} - 4\phi_{i,j}}{\Delta^2} \quad (\text{A.15})$$

Substituindo A.13 e A.15 em A.1, obtemos

$$\frac{\phi_{i,j}^{t+1} - \phi_{i,j}^t}{\delta_t} = \frac{\phi_{i+1,j}^t + \phi_{i-1,j}^t + \phi_{i,j+1}^t + \phi_{i,j-1}^t - 4\phi_{i,j}^t}{\Delta^2} - \gamma\phi_{i,j}^t \quad (\text{A.16})$$

Método de Jacobi

Considere a equação discretizada A.16. O critério de convergência é dado por

$$\frac{\delta_t}{\Delta^2} \leq \frac{1}{4}. \quad (\text{A.17})$$

Fazendo $\delta_t = \Delta^2/4$ na equação A.16, obtemos

$$\phi_{i,j}^{t+1} - \phi_{i,j}^t = \frac{1}{4}[\phi_{i+1,j}^t + \phi_{i-1,j}^t + \phi_{i,j+1}^t + \phi_{i,j-1}^t - 4\phi_{i,j}^t] - \frac{\Delta^2}{4}\gamma\phi_{i,j}^t \quad (\text{A.18})$$

Logo,

$$\phi_{i,j}^{t+1} = \frac{1}{4}[\phi_{i+1,j}^t + \phi_{i-1,j}^t + \phi_{i,j+1}^t + \phi_{i,j-1}^t] - \frac{\Delta^2}{4}\gamma\phi_{i,j}^t \quad (\text{A.19})$$

Essa equação pode ser reescrita em função do resíduo de um estágio qualquer da iteração. O resíduo $\epsilon_{i,j}^t$ do sítio i, j é definido por

$$\epsilon_{i,j}^t = \frac{1}{\Delta^2}[\phi_{i+1,j}^t + \phi_{i-1,j}^t + \phi_{i,j+1}^t + \phi_{i,j-1}^t - 4\phi_{i,j}^t] - \gamma\phi_{i,j}^t \quad (\text{A.20})$$

Então, a equação A.16 pode ser escrita como

$$\phi_{i,j}^{t+1} = \phi_{i,j}^t + \frac{\Delta^2}{4}\epsilon_{i,j}^t \quad (\text{A.21})$$

Para reduzir o erro, com condições de contorno de Dirichlet nos 4 lados de uma rede $L \times L$ por um fator de 10^{-p} são necessárias aproximadamente $pL^2/2$ iterações para cada sítio.

Método de Gauss-Sidel

$$\phi_{i,j}^{t+1} = \phi_{i,j}^t + \frac{\Delta^2}{4}\epsilon_{i,j}^{t+1}, \quad (\text{A.22})$$

em que

$$\epsilon_{i,j}^{t+1} = \frac{1}{\Delta^2}[\phi_{i+1,j}^t + \phi_{i-1,j}^{t+1} + \phi_{i,j+1}^t + \phi_{i,j-1}^{t+1} - 4\phi_{i,j}^t] - \gamma\phi_{i,j}^t, \quad (\text{A.23})$$

se varremos a rede sequencialmente ($i = 0, L, j = 0, L$). Para reduzir o erro por um fator de 10^{-p} no mesmo caso anterior são necessárias aproximadamente $pL^2/4$ iterações para cada sítio. Ou seja, esse método é duas vezes mais rápido que o método de Jacobi.

Método de Newton

$$\phi_{i,j}^{t+1} = \phi_{i,j}^t + \frac{\varepsilon_{i,j}^t}{\partial \varepsilon_{i,j}^t / \partial \phi_{i,j}^t} \quad (\text{A.24})$$

Este método é usado para problemas de valor de contorno não-lineares.

Detalhes na implementação dos algoritmos

As equações de reação-difusão para os nutrientes usadas em todos os modelos apresentados nesta tese foram iteradas usando o método de Gauss-Siedel Newton. As condições iniciais foram as soluções exatas para estas equações quando não há células cancerosas no tecido ($\sigma_c = 0$ e $\sigma_n = 1$ em todos os sítios). Estas equações foram iteradas até o estado quase-estacionário, ou seja, até que a maior diferença (considerando todos os sítios) entre a concentração de nutrientes em um mesmo sítio entre duas iterações consecutivas seja menor que 10^{-5} . As equações são resolvidas em toda a rede no início de cada passo de tempo t (note que um passo de tempo corresponde ao sorteio de N_c células para tentarem executar uma ação). Contudo, para acelerar a convergência, se a célula sorteada morreu ou se dividiu, resolvemos essas equações na vizinhança do sítio desta célula imediatamente. Ou seja, durante um passo de tempo $\Delta t = 1/N_c$, sempre que o número de células muda, iteramos as equações para os nutrientes algumas vezes na região do tecido onde ocorreu essa mudança. Desse modo, quando as N_c células tiverem sido sorteadas e o próximo passo de tempo iniciar-se ($t = t+1$), será necessário um número menor de iterações das equações até chegar ao estado quase-estacionário.

Entretanto, para equações mais simples como a que descreve a difusão dos vírus (modelo apresentado no capítulo 4), apenas o método de Jacobi foi usado. Note que as equações para a difusão dos vírus e para a difusão dos anticorpos neutralizantes foram iteradas um número determinado de vezes, diferentemente das equações para os nutrientes, que foram iteradas até o estado quase-estacionário.

Apêndice B - Diagramas de blocos com os algoritmos dos modelos

Nesta seção serão apresentados diagramas de blocos com os algoritmos detalhados de cada modelo. Os programas foram desenvolvidos na linguagem de programação FORTRAN 90.

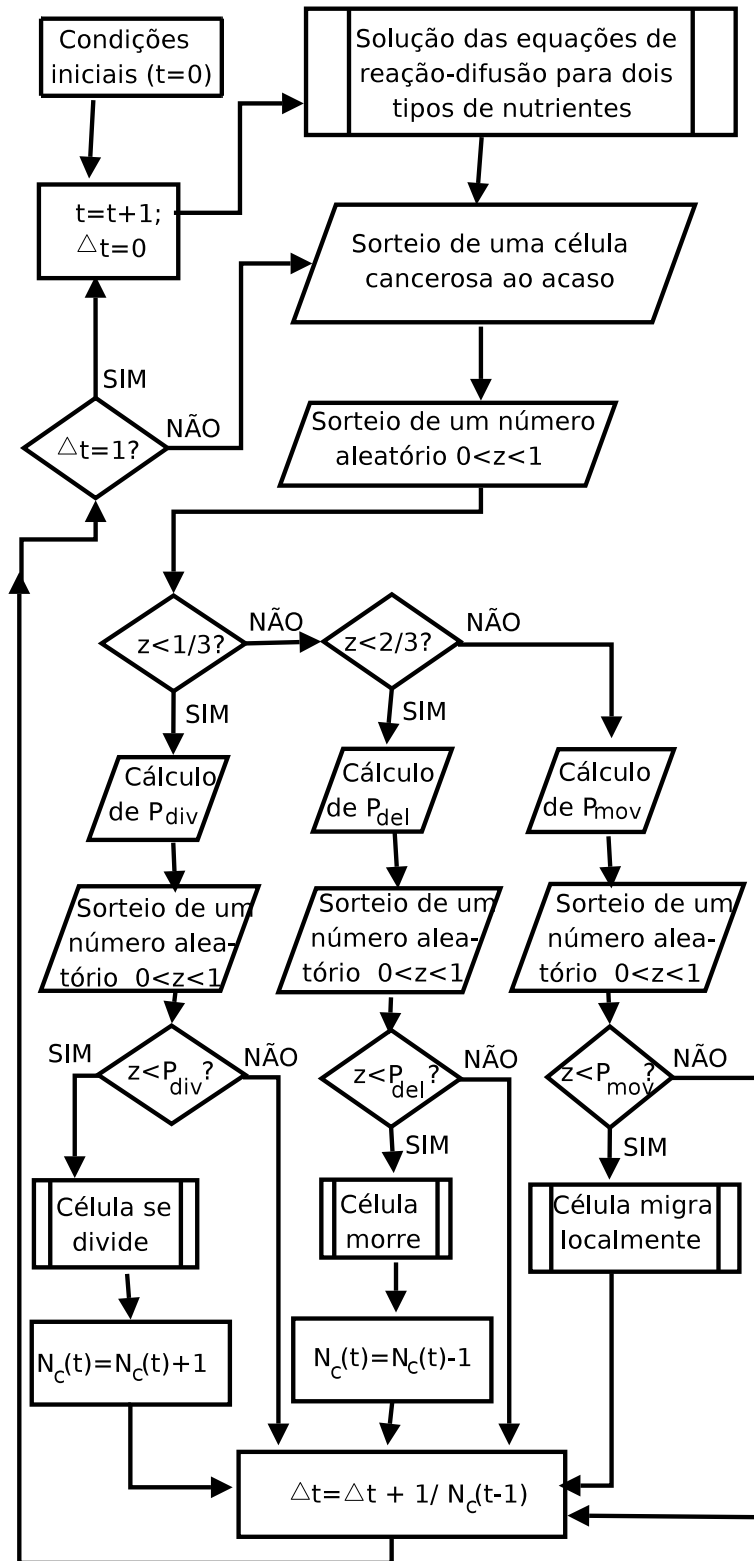


Figura A.1: Algoritmo do modelo do capítulo 3 para crescimento de tumores. As equações de reação-difusão para os nutrientes foram resolvidas usando o método de Gauss-Siedel Newton mostrado na seção anterior, e as regras da dinâmica celular (divisão e migração) são mostradas na figura A.2.

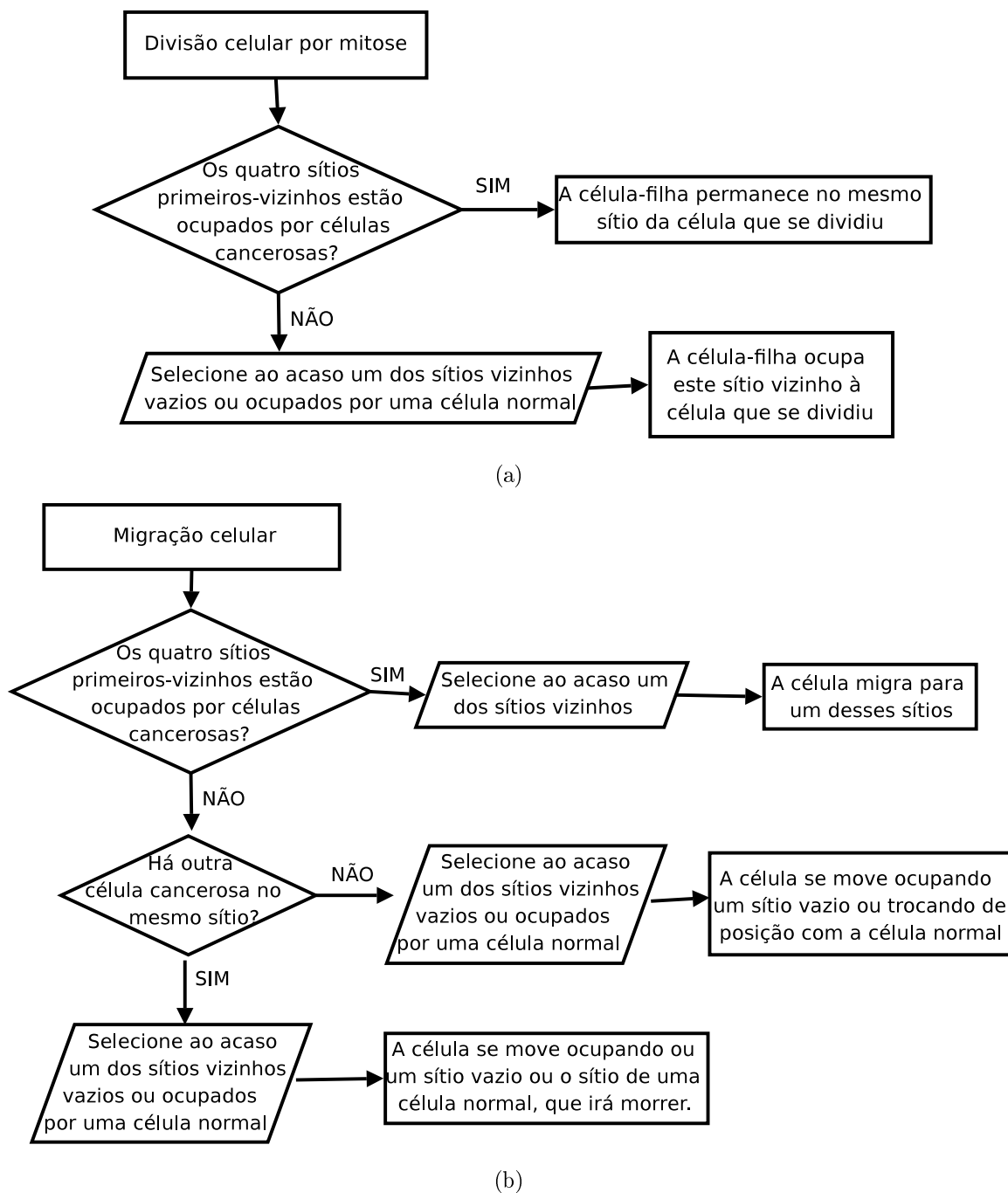


Figura A.2: Divisão (a) e migração (b) de uma célula cancerosa. A morte por privação não foi mostrada porque é um processo trivial.

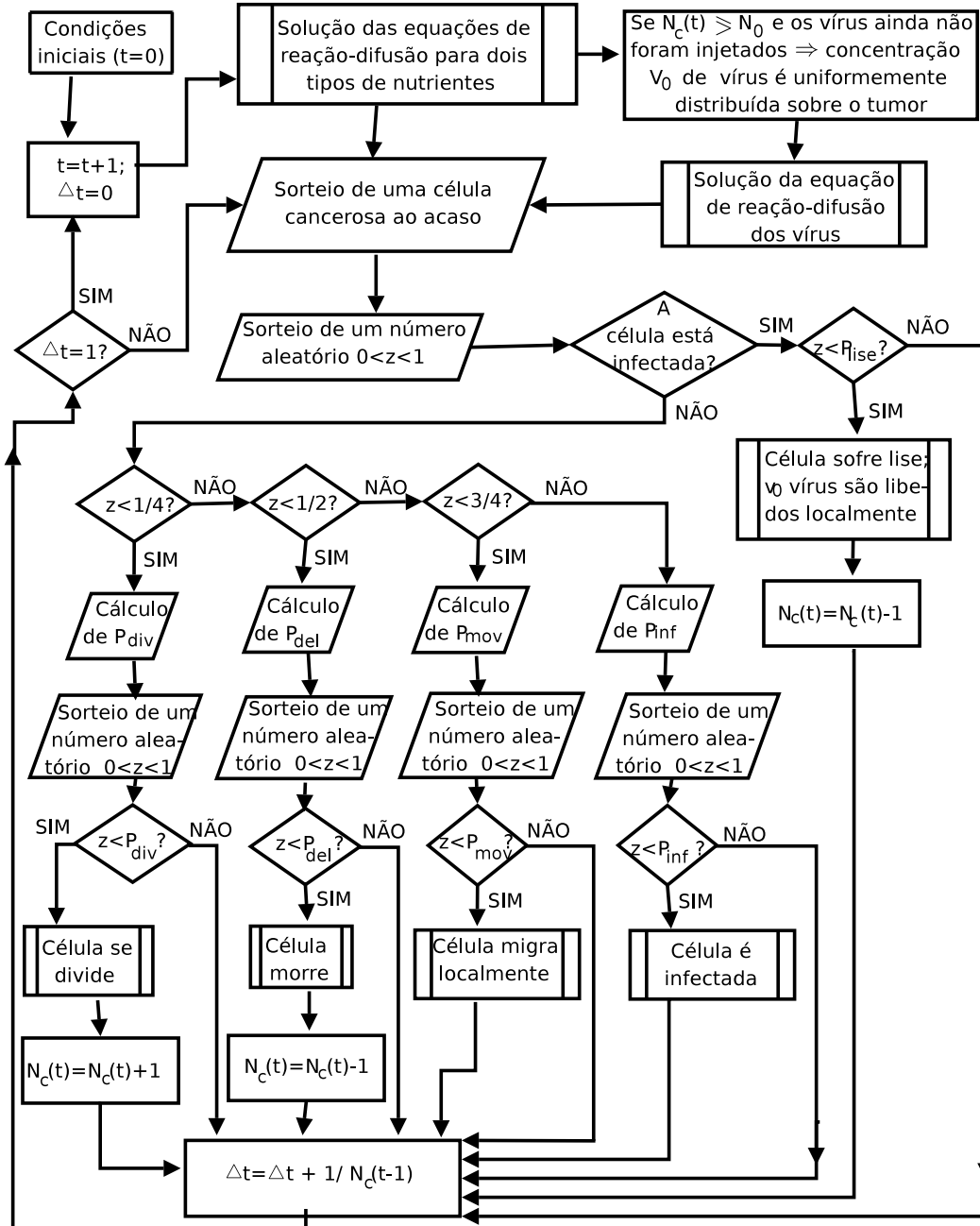


Figura A.3: Algoritmo do modelo do capítulo 4 para viroterapia de tumores sólidos. A equação de reação-difusão dos vírus é resolvida usando o método de Jacobi (apêndice A) por simplicidade. A dinâmica das células cancerosas é detalhada nas figuras A.2 (divisão e migração) e A.5 (infecção e lise).

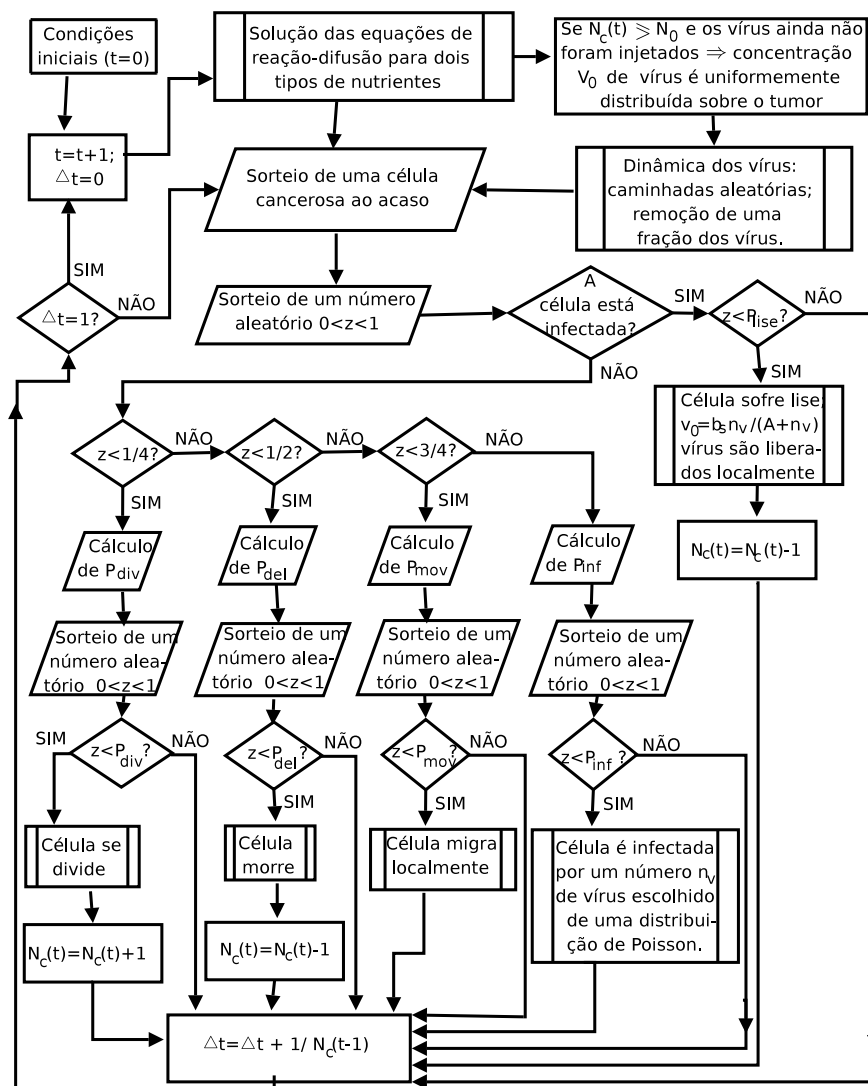


Figura A.4: Algoritmo do modelo do capítulo 5 para viroterapia em diferentes tipos de tumores. A dinâmica das células cancerosas é detalhada nas figuras A.2 (divisão e migração) e A.6 (infecção e lise).

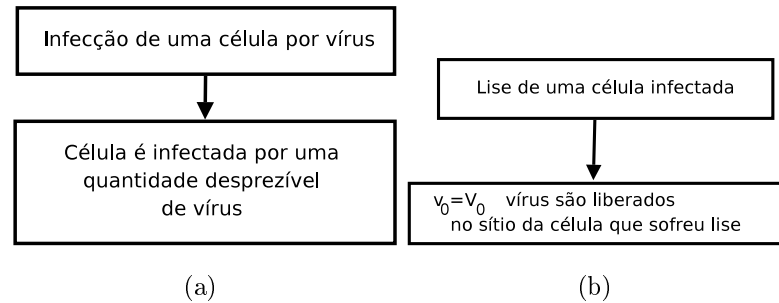


Figura A.5: Infeção e lise de uma célula infectada no modelo apresentado no capítulo 4. Note que aqui os vírus são tratados como um campo contínuo, que obedece a uma equação de reação-difusão.

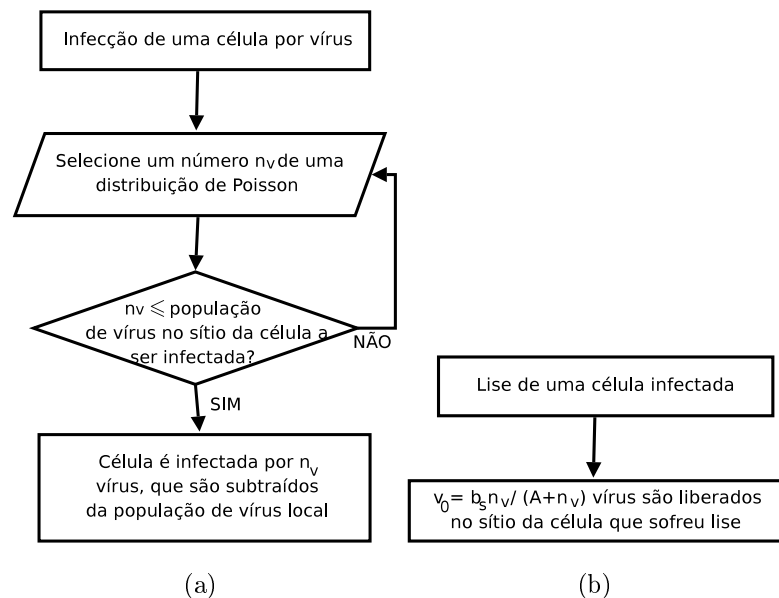


Figura A.6: Infeção e lise de uma célula infectada no modelo apresentado no capítulo 5. Aqui, os vírus são agentes individuais, que realizam caminhadas aleatórias no tecido.

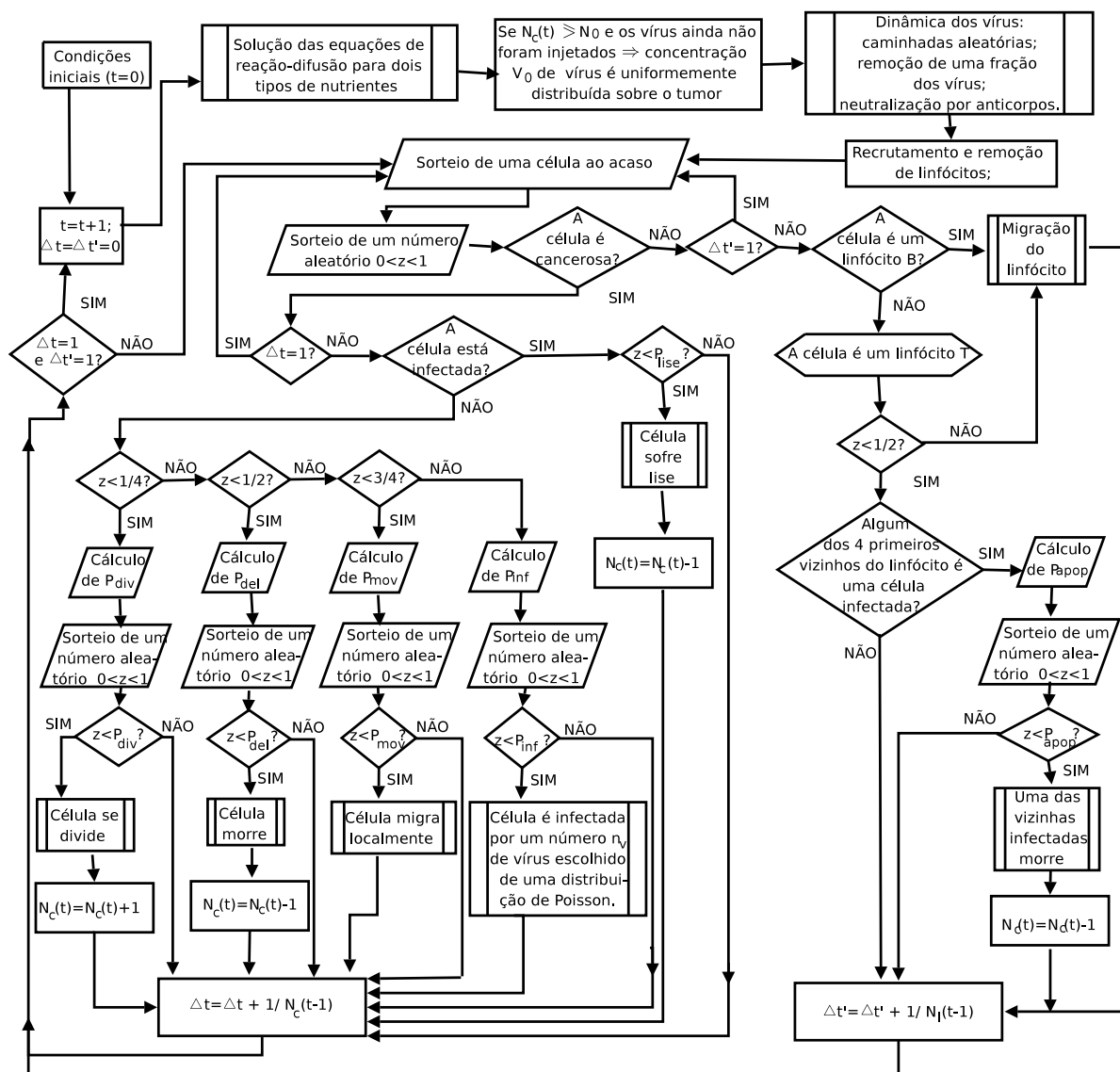


Figura A.7: Algoritmo do modelo do capítulo 6 para a resposta imune na viroterapia oncolítica. A equação de reação-difusão para os anticorpos foi resolvida usando o método de Gauss-Siedel-Newton (apêndice A). A dinâmica das células cancerosas é mostrada em detalhes nas figuras A.2 (divisão e migração) e A.6 (infecção e lise), enquanto o algoritmo para migração dos linfócitos é mostrado na figura A.8.

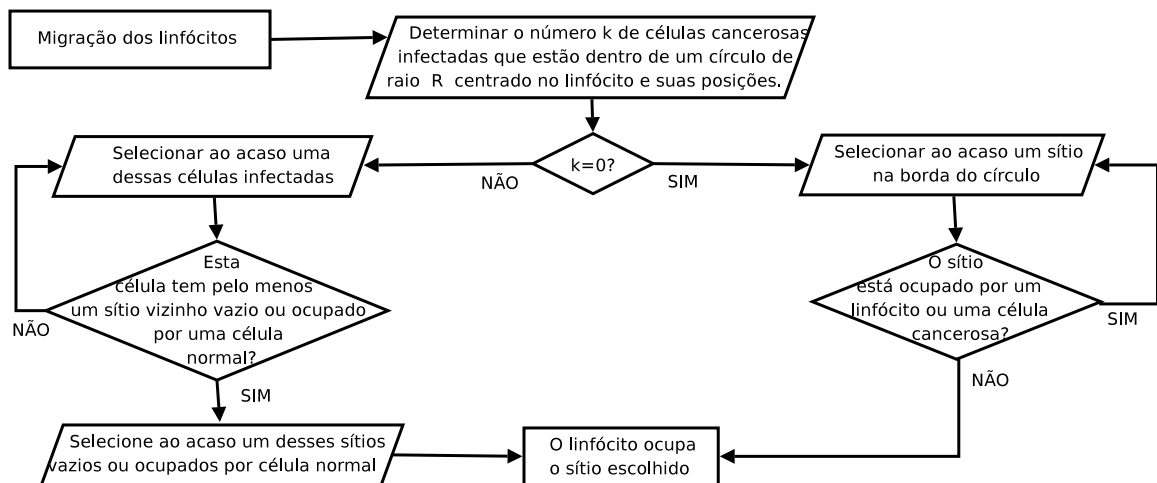


Figura A.8: Algoritmo para a migração dos linfócitos no modelo do capítulo 6.

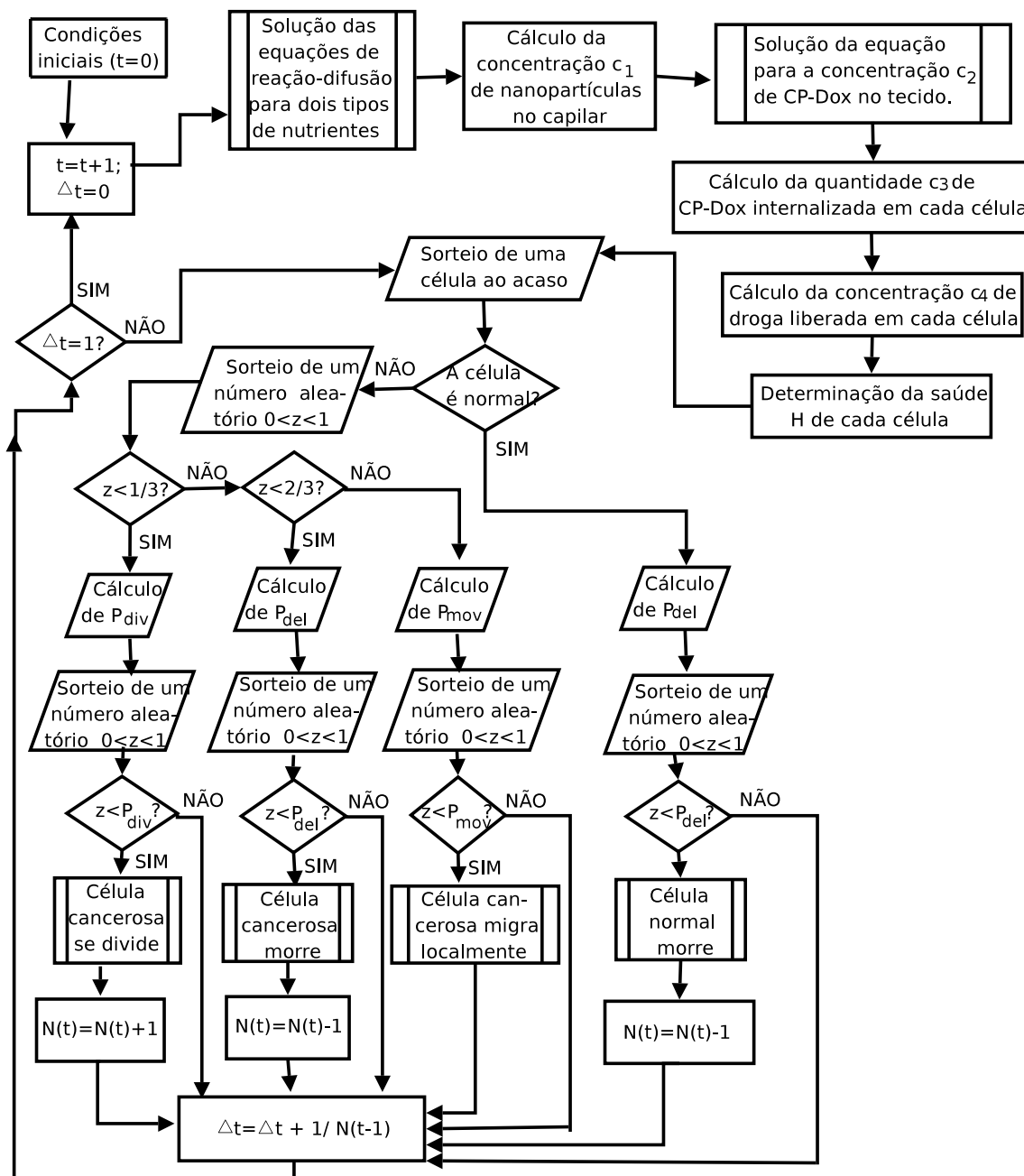


Figura A.9: Algoritmo do modelo do cap. 7 para quimioterapia. As equações de reação-difusão foram resolvidas pelo método de Gauss-Siedel explicado no apêndice A.