

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA



Dissertação

**Título: Acoplamento do fluxo sanguíneo e o crescimento
vascular em três dimensões**

Maurício Moreira Soares

Pelotas, 2015

Maurício Moreira Soares

**Acoplamento do fluxo sanguíneo e o crescimento vascular em
três dimensões**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física e Matemática da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Alexandre Diehl

Coorientador: Rui D. M. Travasso

Pelotas, 2015

Maurício Moreira Soares

Título: Acoplamento do fluxo sanguíneo e o crescimento vascular em três dimensões

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Física, Programa de Pós-Graduação em Física, Instituto de Física e Matemática, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31 de Março de 2015

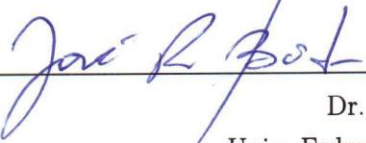
Banca examinadora:

Alexandre Diehl (Orientador)



Doutor em Ciências
Univ. Federal de Pelotas

José Rafael Bordin



Dr. em Ciências
Univ. Federal do Pampa

Eduardo Fontes Henriques



Dr. em Física
Univ. Federal de Pelotas

*“Porque essas honras vãs, esse ouro puro,
Verdadeiro valor não dão à gente:
Melhor é, merecê-los sem os ter,
Que possuí-los sem os merecer”.*

LUÍS DE CAMÕES.

À minha família...

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Alexandre Diehl e Dr. Rui Travasso, pelo apoio e pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À minha família, pelo constante suporte emocional, em especial à minha mãe, Ivonete Moreira, por ter-me conduzido até aqui. O seu apoio constante sempre foi fonte de motivação, desde o meu primeiro dia de escola.

À Irina Dias, pela paciência e apoio nos meus dias de mau humor e frustração. Obrigado por acreditares em mim, mesmo quando eu mesmo duvidava.

Aos meus amigos, colegas e professores, do Departamento de Física da UC . Em especial, ao Pedro Cunha pelo companheirismo e pelas excelentes sugestões no decorrer deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Física da UFPel e aos meus colegas de mestrado. Em especial à Roberta Schmitz, pelos anos de amizade.

Ao Centro de Física Computacional e ao Laboratório de Computação Avançada da Universidade de Coimbra, pelas horas de computação.

Ao Dr. Micael Oliveira pela disponibilidade em extrair o núcleo do código do projeto Octopus para a aplicação em problemas gerais.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundação para Ciência e Tecnologia de Portugal (FCT) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

SOARES., Maurício Moreira, **Acoplamento do fluxo sanguíneo e o crescimento vascular em três dimensões** 2015, 84p. Dissertação (Mestrado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Departamento de Física, Instituto de Física e Matemática, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O crescimento de vasos sanguíneos, ou angiogênese, é um processo com um importante papel na determinação da malignidade em tumores. De forma a melhor entender esse mecanismo, propomos um novo modelo computacional que acopla a angiogênese com o fluxo sanguíneo, utilizando um modelo de interface difusa em três dimensões. Para isso, nós utilizamos um método de processamento de imagens para extrair as linhas médias das redes vasculares. Esse método preserva a morfologia inicial e dá-nos a rede hidráulica equivalente. Nesse modelo, o fluxo sanguíneo regula a desativação das fontes de crescimento devido a uma efetiva entrega de oxigênio e nutrientes, ao invés de considerar apenas a distância entre as fontes e os capilares. Este trabalho fornece um código *open-source*, funcional e eficiente, para a pesquisa acerca do crescimento de vasos sanguíneos e a influência da irrigação nesse mecanismo. Além disso, o algoritmo de *thinning* permite-nos obter dados quantitativos da implementação tridimensional. Nossos resultados estão de acordo com o comportamento biológico esperado para angiogênese e experimentos *in silico* anteriores. Por conseguinte, essa promissora implementação permite-nos explorar uma ampla perspectiva sobre a angiogênese, exigindo assim mais simulações e análise de dados nos próximos tempos.

Palavras-Chave: angiogênese, crescimento tumoral, modelo de interface difusa

ABSTRACT

SOARES., Maurício Moreira, **Coupling blood flow and growing vasculature in three dimensions** 2015, 84p. Dissertation (Master Degree in Physics) - Programa de Pós-Graduação em Física, Departamento de Física, Instituto de Física e Matemática, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

Angiogenesis, or blood vessel growth, is a process which plays an important role in determining the degree of malignancy in tumours. In order to better understand this mechanism we propose a new computational model that couples angiogenesis and hydrodynamics of blood flow, using a hybrid phase-field model in 3D . For this, we use an image processing method to extract the medial lines of the vascular network, preserving the initial morphology and obtaining the equivalent hydraulic circuit. In this model blood flow regulates the deactivation of the growth factor sources due to effective oxygen and nutrient supply, instead of consider this regulation to be based on the distance between the capillary and the sources. This work provides a functional and efficient open-source code to investigate blood vessel growth and the influence of irrigation in this mechanism. Moreover, the thinning algorithm enables us to obtain quantitative data from the three dimensional implementation. Our results are in accordance with the expected biological behaviour for angiogenesis and also *in silico* previous experiments. Furthermore, this promising implementation enables us to explore a wide perspective of angiogenesis, demanding more simulations and data analysis in the near future.

Keywords: angiogenesis, tumor growth, phase-field model

SUMÁRIO

Pág.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	21
2	MECANISMOS BIOLÓGICOS	25
2.1	Angiogênese Tumoral	25
2.2	Via de Sinalização Delta-Notch	28
3	MODELAGEM MATEMÁTICA	29
3.1	Modelos Matemáticos na Literatura	29
3.2	Teoria de Ginzburg-Landau Aplicada à Angiogênese	29
3.2.1	Transições de Fase e Parâmetro de Ordem	29
3.2.2	Modelo Híbrido de Interface Difusa	30
3.3	Hidrodinâmica do Fluxo Sanguíneo	36
3.3.1	Lei de Hagen-Poiseuille	37
3.3.2	Método de <i>Thinning</i>	40
4	MÉTODO COMPUTACIONAL	47
4.1	Condições Iniciais e de Fronteira	47
4.1.1	Conciliando as Pressões e as Condições Periódicas de Contorno	48
4.2	Projeto Octopus	49
4.3	Método das Diferenças Finitas	49
4.4	Implementação da Lei dos Nodos para Circuitos Hidráulicos	50
4.5	Obtenção de Resultados Quantitativos	53
4.6	Fluxograma	54
5	DISCUSSÕES E RESULTADOS	55
5.1	Estudo Qualitativo dos Parâmetros	57
5.1.1	Proliferação Celular α_p	58
5.1.2	Resposta Quimiotática χ	60
5.1.3	Concentração de VEGF nas Fontes T_s	62
5.2	Acoplamento do Fluxo Sanguíneo	64
5.2.1	Desafios Encontrados	65

5.3	Teste de Eficiência Computacional	66
5.3.1	Implementação em Série	66
5.3.2	Implementação em Computação Paralela	67
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
A	- EQUAÇÃO DA INTERFACE E PROLIFERAÇÃO CELULAR . .	71
B	- DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO DOS FATORES ANGIOGÊNICOS . .	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
2.1 Terapias antiangiogênicas e normalização vascular	26
2.2 Via de sinalização Delta-Notch na angiogênese tumoral	28
3.1 Poço de potencial duplo simétrico	31
3.2 Parâmetro de ordem ϕ em função de r	31
3.3 Evolução temporal da equação de Cahn-Hilliard	32
3.4 Taxa de proliferação celular em função da concentração de VEGF	33
3.5 Comportamento da velocidade quimiotática em função do valor absoluto do gradiente de VEGF	35
3.6 Fluxo sanguíneo e pressões em um vaso cilíndrico	38
3.7 Visão parcial de um vaso sanguíneo e o respectivo esqueleto topológico	40
3.8 Definição de pontos adjacentes no algoritmo de <i>thinning</i>	41
3.9 Base de máscaras para remoção de pontos simples utilizadas no algoritmo de <i>thinning</i>	42
3.10 Cilindros em intersecção	43
3.11 Cilindros em intersecção e deslocados da origem	43
3.12 Cilindro rotacionado com erro na topologia final	44
3.13 Cilindro rotacionado em dois planos simultaneamente	45
4.1 Configuração inicial utilizada na simulação	47
4.2 Demonstração da condição de fronteira periódica	48
4.3 Incompatibilidade das condições periódicas com as pressões	48
4.4 Esqueleto de rede vascular obtido pelo método de <i>thinning</i>	51
4.5 Fluxograma da angiogênese	54
5.1 Evolução temporal de VEGF no meio	56
5.2 Curso de desativação das fontes de VEGF em função do tempo	57
5.3 Morfologia obtida para $\alpha_p T_p = 0, 20\text{hr}^{-1}$	58
5.4 Morfologia obtida para $\alpha_p T_p = 1, 03\text{hr}^{-1}$	59
5.5 Esqueleto topológico para $\alpha_p T_p = 0, 20\text{hr}^{-1}$	59
5.6 Esqueleto topológico para $\alpha_p T_p = 1, 03\text{hr}^{-1}$	60
5.7 Morfologia obtida para $\chi G_M = 0, 28\mu\text{m}/\text{min}$	60
5.8 Morfologia obtida para $\chi G_M = 2, 88\mu\text{m}/\text{min}$	61
5.9 Esqueleto topológico para $\chi G_M = 0, 28\mu\text{m}/\text{min}$	61
5.10 Esqueleto topológico para $\chi G_M = 2, 88\mu\text{m}/\text{min}$	62
5.11 Fusão de vasos sanguíneos paralelos	63
5.12 Morgologia obtida para $T_s = 2, 00$	63

5.13	Esqueleto topológico para $T_s = 0,85$	64
5.14	Esqueleto topológico obtido para $T_s = 2,00$	64
5.15	Rede vascular e respectiva irrigação sanguínea	65
5.16	Esqueleto morfológico da angiogênese com uma superfície	65
5.17	Determinação dos recursos computacionais necessários em função do número de pontos utilizados na rede discreta	66
5.18	Tempo computacional em função do número de processadores utilizados	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC	–	<i>Endothelial Cell</i> Célula Endotelial
ECM	–	<i>Extracellular Matrix</i> Matriz Extracelular
ETC	–	<i>Endothelial Tip Cell</i> Célula Endotelial de Ponta
ESC	–	<i>Endothelial Stalk Cell</i> Célula Endotelial do Estame
MMP	–	<i>Matrix Metalloproteinases</i> Metaloproteinase Matriz
PIGF	–	<i>Placental Growth Factor</i> Fator de Crescimento Placentário
SMC	–	<i>Smooth Muscle Cell</i> Células do Músculo Liso
TGF	–	<i>Transforming Growth Factor</i> Fator de Transformação do Crescimento
VEGF	–	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	–	<i>Vascular Endothelial Growth Receptor</i> Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

1 INTRODUÇÃO

A angiogênese, termo cunhado em 1787 por John Hunter para denotar o crescimento de vasos sanguíneos a partir de vasos existentes [1], tem estimulado a curiosidade de cientistas devido à sua complexa fisiologia e a vasta presença em fenômenos biológicos, *e.g.*, processos inflamatórios, cicatrização, morfogênese, entre outros. A angiogênese é particularmente relevante quando os mecanismos reguladores são alterados, ocasionando desordens como a hipervascularização, observado no caso de patologias como a retinopatia diabética, a esclerose múltipla ou o crescimento de tumores sólidos. Noutras patologias uma deficiente angiogênese leva à insuficiência de vascularização, como na doença de Alzheimer [2]. Atualmente existem mais de meia centena de patologias catalogadas onde a angiogênese exerce um papel fundamental [2]. Existe, assim, uma busca incessante pelo desenvolvimento de novos tratamentos baseados na supressão ou promoção da angiogênese, através do uso de proteínas e fármacos pró e antiangiogênicos [3]. No entanto, é necessária cautela na aplicação destes tratamentos em ambiente clínico, pois em muitos casos as consequências a médio e longo prazo ainda não estão compreendidas [4].

A associação do câncer com a angiogênese foi proposta inicialmente por Folkman no começo da década de 1970, baseado em experimentos que mostraram a dependência da malignidade de vários tumores na neo-vascularização [5,6]. Atualmente, esta correlação entre o crescimento tumoral e o aparecimento de novas vasculaturas está bem estabelecida [7]. A angiogênese assume um papel importante na medida em que trabalha para suprir as reservas de oxigênio, nutrientes e de enzimas proteolíticas no tumor, além de promover a disseminação de células tumorais pela corrente sanguínea [7–9]. Estudos mostram que, em geral, tumores alimentados por elevadas densidades de vasos sanguíneos e apresentando uma elevada concentração de fatores pró-angiogênicos, correspondem a um estágio patogênico avançado associado a um mau prognóstico clínico [7,10].

Existe ainda uma classe de patologias oculares que são de interesse para este trabalho. Especificamente, a degeneração macular associada à idade (DMI) e a retinopatia e maculopatia diabéticas. A degeneração macular foi descrita pela primeira vez na literatura médica em 1874, sendo uma doença com incidência em pessoas com idade a partir dos 50 anos que afeta a mácula, uma pequena região da retina responsável pela visão central [11]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que essa seja uma das principais causas de cegueira em idosos nos países desenvolvidos, ficando atrás apenas da catarata e do glaucoma [12]. A retinopatia é, em geral, associada como uma manifestação local de patologias sistêmicas, ocasionada por alterações no fluxo sanguíneo e convergindo em zonas de hipóxia, ou seja, áreas do tecido em que a oxigenação é insuficiente. Agrega uma série de lesões na retina e, em casos avançados da doença, leva também à maculopatia. Os

diabéticos contribuem expressivamente nas estatísticas do número de pessoas acometidas pela retinopatia, nesse caso conhecida como retinopatia diabética. A angiogênese faz parte dos mecanismos fisiopatológicos, tanto da retinopatia como da maculopatia, apresentando elevada concentração de fatores angiogênicos (VEGF e TGF-) no epitélio pigmentar da retina bem como nas novas membranas vasculares [13–16].

O aumento da capacidade de obtenção de dados empíricos através dos avanços em biologia celular e das técnicas modernas para a quantificação de sistemas biológicos, como a microscopia de alta resolução, em conjunto com a evolução tecnológica computacional, possibilita abordar a angiogênese através de modelos computacionais e simulações que proporcionam uma nova perspectiva para a compreensão dos mecanismos por trás desse processo [17]. A imagiologia, apresentando a possibilidade do acompanhamento do crescimento vascular [17], combinada com modelos matemáticos realísticos, tornam-se ferramentas essenciais para previsões e diagnósticos precoces, bem como auxiliares de estratégias terapêuticas que maximizem a entrega correta de fármacos no sistema alvo. Como consequência, abre-se uma nova demanda multidisciplinar no estudo da angiogênese, integrando a física, biologia, química, engenharia biomédica e computação.

Os modelos para angiogênese foram inicialmente desenvolvidos e classificados dentro de duas grandes abordagens: macrocelulares e microcelulares, também conhecidos como contínuos e discretos. A característica dos modelos contínuos está em tratar o tecido endotelial e a matriz extra-celular como densidades de células, tendo seu comportamento regido, em média e em larga escala, por um sistema de equações diferenciais parciais. Um exemplo clássico desse tipo de modelo é apresentado em Balding e McElwain [18], onde se realiza uma descrição da rede vascular tratando células de ponta e as ramificações como densidades de células, obtendo o crescimento da rede devido a respostas quimiotáticas introduzidas no sistema. Por outro lado, os modelos contínuos são restritos por não serem capazes de prever a morfologia das redes vasculares. Assim, faz-se necessária a introdução de modelos discretos, que podem ser classificados em três tipos: automata celular, baseado em agentes (*Agent-based*) e *Cellular Potts* (CP). Um dos modelos pioneiros em descrever a angiogênese como um processo discreto foi introduzido por Stokes *et al.* [19], utilizando um modelo do tipo baseado em agente. Esses modelos são particularmente importantes pois permitem determinar a morfologia vascular como a distribuição de nutrientes, oxigênio e fármacos através dos vasos sanguíneos, preenchendo a lacuna deixada pelos modelos contínuos. No entanto os modelos discretos são exigentes do ponto de vista computacional e incluem uma grande quantidade de parâmetros que descrevem a interação entre diferentes agentes (células).

Pensando na necessidade de um modelo completo que fosse capaz de prever a morfologia

das redes vasculares, bem como os mecanismos fisiológicos das mesmas, criou-se um novo tipo de modelo para angiogênese: os modelos híbridos. O primeiro modelo híbrido foi desenvolvido por Milde *et al.* [20], modelando a angiogênese através de uma série de equações diferenciais que descrevem o comportamento de proteínas específicas presentes nesse fenômeno. As principais proteínas modeladas são a fibronectina, que é tida como o representante químico da matriz extracelular, o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), conhecido como proteína pró-angiogênica e as Metaloproteinasas de Matriz (MMPs), que funcionam na ruptura da matriz extracelular durante o movimento das células de ponta. A descrição microcelular é introduzida tratando as células de ponta individualmente, sendo cada uma delas regida por uma equação de movimento que é escrita em função do gradiente de concentração proteica no meio extracelular, realizando a conexão entre o contínuo e o discreto.

Neste trabalho utiliza-se o modelo híbrido para a angiogênese, proposto por Travasso *et al.* [21], que consiste na utilização da teoria de campo para tratar os problemas de fronteira, encontrados quando trabalha-se com morfologias complexas como as de uma rede vascular. Partindo do funcional de energia livre de Ginzburg-Landau derivamos a equação de Cahn-Hilliard [22] e adicionamos um termo empírico de proliferação celular. Essa equação será responsável pela manutenção das interfaces entre as vasculaturas e a matriz extracelular. Descreve-se ainda a difusão e consumo da concentração de proteínas na matriz extracelular, através de uma equação associada a cada isoforma das diferentes proteínas, como o VEGF e as MMPs. Em relação à componente discreta, utiliza-se um modelo do tipo baseado em agentes, escrevendo as equações de movimento de cada uma das células endoteliais de ponta em função da resposta quimiotática do sistema, sendo a velocidade das células de ponta (agentes) proporcional ao gradiente de concentração de VEGF na matriz extracelular. A conexão entre o contínuo e discreto é realizada através da determinação do parâmetro de ordem no interior das células de ponta, dado pela razão entre o tecido endotelial produzido e a área percorrida pela célula de ponta por unidade de tempo, sendo inversamente proporcional a velocidade de quimiotaxis da mesma.

Por conseguinte, propôs-se melhorias para o modelo e sua implementação computacional. Em particular, a passagem para um sistema tridimensional, a utilização de rotinas otimizadas do projeto Octopus de Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo [23] para o cálculo de laplacianos e gradientes, bem como a discretização em malhas e o gerenciamento multiprocessadores realizado por *Message Passing Interface* (MPI). A nível físico, propôs-se a utilização de um método simplificado para o cálculo do fluxo sanguíneo, em virtude da extrema dificuldade em manusear equações como Navier-Stokes em topologias irregulares. O método consiste na transformação dos vasos sanguíneos obtidos por

simulação em uma rede de traços, de forma a possibilitar o tratamento da rede vascular como um circuito elétrico, aplicando a lei de conservação e calculando as pressões nos nodos através da lei dos nós.

Através da implementação computacional proposta foi possível obter pela primeira vez dados quantitativos para o modelo tridimensional, utilizando-se a técnica de *thinning*. Realizou-se o mapeamento dos parâmetros do modelo, determinando como o número de nodos, ramificações e calibre dos vasos modificam-se em função da taxa de proliferação celular, resposta quimiotática e concentração de VEGF nas fontes. Esse trabalho é a continuação do trabalho de Guerra [24], onde implementou-se pela primeira vez o modelo tridimensional para angiogênese e realizou-se o seu estudo qualitativo. O modelo de Guerra, no entanto não trouxe a implementação do método de processamento de imagem e nem o cálculo de fluxo sanguíneo, sendo essas as nossas principais contribuições neste trabalho.

A estrutura desta dissertação é a seguinte: no capítulo 2 discute-se alguns dos principais mecanismos biológicos presentes na angiogênese. No capítulo 3, é introduzido o formalismo matemático necessários para o desenvolvimento do modelo. O capítulo 4 apresenta a implementação computacional e algoritmos utilizados. No capítulo 5 é feita a discussão e apresentação dos resultados obtidos, fazendo referência a dados da literatura. O capítulo 6 apresenta uma breve retrospectiva do trabalho realizado e as perspectivas do mesmo.

2 MECANISMOS BIOLÓGICOS

Neste capítulo serão apresentados os principais mecanismos biológicos inerentes a angiogênese em tumores. É realizada uma descrição sobre os principais estágios da angiogênese e a introdução de conceitos importantes para o entendimento da simulação desse sistema, tais como: a via de sinalização Delta-Notch, células de ponta, matriz extracelular e os mecanismos reguladores.

2.1 Angiogênese Tumoral

A angiogênese é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos crescem a partir de uma vasculatura existente, sendo considerado um processo essencial na saúde e na doença [25]. Esse processo é primordial em espécies animais complexas, pois as redes vasculares são responsáveis por transportar oxigênio e nutrientes para todas as células desses organismos. Por isso, um dos primeiros mecanismos ativados pela morfogênese durante o desenvolvimento embrionário é a vasculogênese, que é responsável pela formação da nova rede vascular, ao contrário da angiogênese que parte de um vaso ou rede já formada para a criação de uma nova vasculatura [26]. Além disso, a angiogênese apresenta um papel fundamental em muitas doenças devido as alterações nos mecanismos regulatórios desse processo. A Fig. 2.1 mostra uma rede vascular normal como referência e uma rede hipervascolarizada, alimentando um tumor. Após a administração de fármacos antiangiogênicos é alcançada a normalização e posteriormente a destruição quase completa da rede vascular, tornando-a inadequada. Esse experimento mostra que a angiogênese na saúde depende de um ténue equilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos [27].

Há mais de quatro décadas, desde que foi estabelecida a correlação entre o crescimento tumoral e o aumento de vascularização, que os sistemas vasculares são considerados como fundamentais e indispensáveis para a compreensão e acompanhamento do processo de evolução de cânceres [28]. O processo da angiogênese é altamente complexo e envolve uma série de mecanismos regulatórios, integrando inúmeras proteínas promotoras e supressoras da angiogênese, bem como vias de sinalização de processos inerentes ao crescimento endotelial. No entanto, foi demonstrado que existe um fator principal responsável pela angiogênese, assumindo o controle de diversos processos necessários para a formação dos vasos sanguíneos: o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF).

O VEGF também é referido na literatura como uma família de genes da angiogênese e linfangiogênese, compreendendo em sete proteínas: o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e Fator de Crescimento Placentário (PlGF) -1 e -2 (sendo o VEGF-A comumente referido apenas por VEGF). Além disso, cada uma destas proteínas pode as-

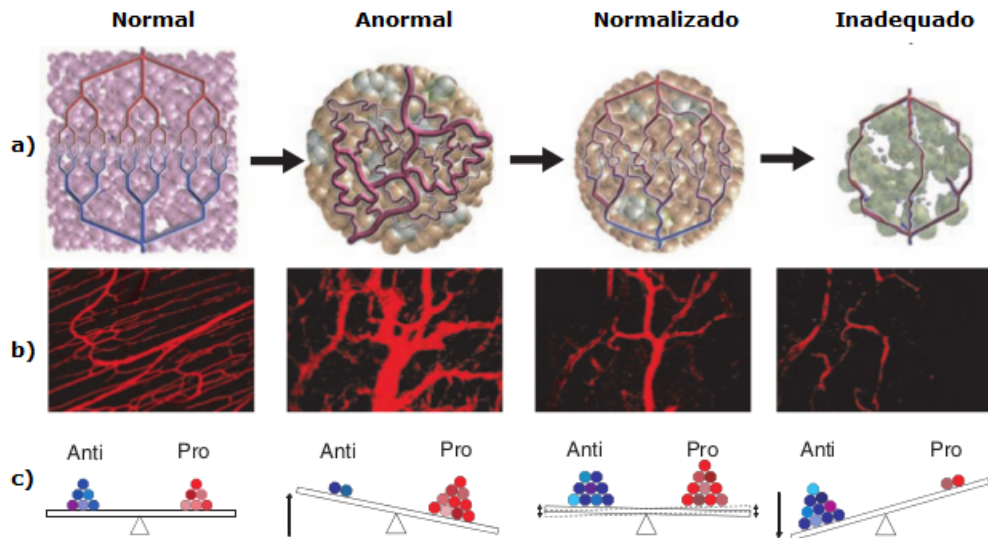


Figura 2.1 - a) Terapias antiangiogênicas agressivas podem destruir demasiados vasos e tornar ineficaz a oxigenação e entrega de medicamentos, reativando a produção de fatores pró-angiogênicos. b) Da esquerda para direita: vasculatura normal, evolução após terapia com bloqueadores VEGFR-2 para carcinoma humano *in vivo*, para 0, 3 e 5 dias. c) Balanço entre proteínas. Adaptado de [27].

sumir diferentes isoformas, formando uma complexa família de fatores [7,29–31]. O VEGF tem a capacidade de promover todos os estágios da angiogênese nas células endoteliais. Embora existam outras proteínas com potencialidades específicas para promover cada um dos processos, devido a essa característica global do VEGF, é natural, em uma primeira abordagem, estudá-lo de forma minuciosa isoladamente de outros fatores presentes na angiogênese.

A angiogênese é iniciada quando as células endoteliais (ECs) ganham o fenótipo de células de ponta (ETCs), sob ação de um conjunto de proteínas produzidas pelo tumor e secretadas para a matriz extracelular e tecidos adjacentes, processo induzido geralmente por mecanismos de hipóxia. As células de ponta difundem pelo tecido através de um mecanismo quimiotático, fazendo com que células endoteliais adjacentes ganhem o fenótipo de células do estame, ao seguirem as células de ponta pelo tecido, formando o novo vaso. A velocidade quimiotática das células de ponta é diretamente proporcional ao gradiente de concentração de fator angiogênico, nesse caso o VEGF. O VEGF age sobre as células endoteliais em vários níveis: primeiramente, aciona um mecanismo de permeabilidade para os vasos capilares e subsequentemente a ativação das células de ponta; também, promove a migração das ETCs em direção ao gradiente químico; promove a proliferação e viabilidade celular das células com fenótipo *stalk*. Os mecanismos acionados pelo VEGF podem ser inibidos e/ou amplificados através de outros fatores existentes no meio extracelular. Na tabela 2.1 pode-se ver um resumo das funções e mecanismos acionados pelo VEGF [21].

Função	Mecanismo
Proliferação	Ativação de proteínas de quinase por meio da mitogênese ativa.
Permeabilidade	Abertura de janelas nos vasos através das junções entre células endoteliais.
Invasão	Indução de Metaloproteinase de Matriz (MMPs).
Migração	Ativação de FAK, p38 e óxido nítrico.
Viabilidade	Inibição de fatores de sinalização de apoptose e inibição da caspase.
Ativação	Regulação da expressão de integrina; alteração no citoesqueleto celular.

Tabela 2.1 - Sumário de funções do VEGF em células endoteliais. Adaptado de [7].

A migração celular é associada com a produção de Metaloproteinases de Matriz (MMPs), responsáveis pela remodelação da matriz extracelular em regiões onde há sua maior concentração. A presença de MMPs altera também a afinidade entre as diferentes isoformas de VEGF e a matriz extracelular, levando a um coeficiente difusivo do VEGF que depende da localização na matriz da concentração de MMPs e da isoforma em questão [21, 32]. As diferentes isoformas de VEGF são distinguidas de acordo com a interação com as moléculas negativamente carregadas da ECM ou da superfície celular [33], com as MMPs apresentando relevante função no balanço dessas espécies de VEGF. A presença de diferentes isoformas é fundamental para a criação de vasos sanguíneos funcionais e para a determinação de morfologias específicas da angiogênese [21, 34, 35].

Em resumo, as MMPs abrem caminho através da matriz extracelular, auxiliando na migração das células de ponta. Conseqüentemente, é ativado o fenótipo *stalk* às células endoteliais da rede pré-existente fazendo com que essas movam-se seguindo a ETC. Essas células formam o lúmen, que posteriormente requer outras células para o amadurecimento do novo vaso sanguíneo, *e.g.*, pericitos, células do músculo liso, entre outras componentes do estroma. A ETC é desativada quando o gradiente quimiotático é abaixo de um mínimo e a densidade de fator angiogênico se torna baixa, devido ao consumo das células endoteliais e a desativação das fontes de VEGF ocasionada pela irrigação do tecido pela nova rede formada. Além disso, outros processos como a anastomose¹ (conexão entre diferentes ramos da rede), a ação das forças de pressão e propriedades mecânicas intrínsecas do tecido, contribuem para a formação da nova rede endotelial e são essenciais para determinar a morfologia final da rede [36].

¹Anastomose consiste na ligação de um ou mais canais, como vasos sanguíneos e veias em uma folha de árvore.

2.2 Via de Sinalização Delta-Notch

Na angiogênese as células endoteliais têm um fenótipo específico que guiam a migração e proliferação celular, levando assim ao crescimento dos novos vasos sanguíneos sob a influência de proteínas como o VEGF. A ativação das ETCs é resultado do mecanismo de sinalização Notch. Esse mecanismo seleciona as células endoteliais que se apresentam como boas candidatas a serem células de ponta. Na Fig. 2.2 são apresentados de forma esquemática alguns detalhes sobre a ativação das células de ponta na angiogênese tumoral.

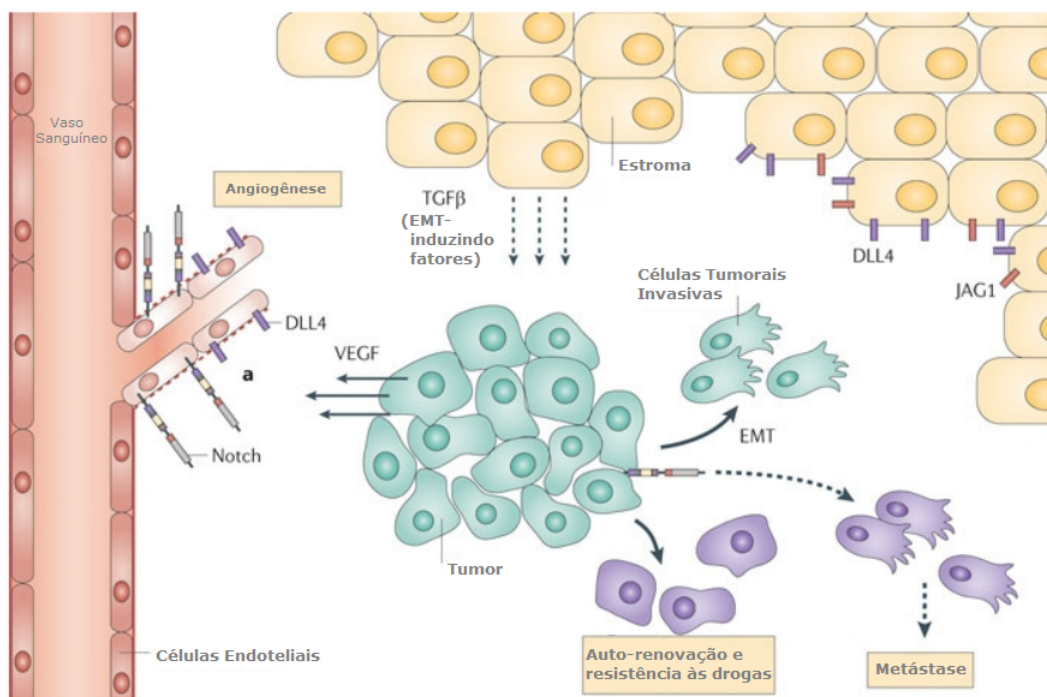


Figura 2.2 - É mostrada a sinalização Notch na angiogênese. O tumor realiza a secreção de VEGF, induzindo a ramificação de novos vasos. As células de ponta aumentam a sua concentração de DLL4 em resposta ao VEGF. Assim, a DLL4 envia sinais Notch para as ECs adjacentes suprimindo a produção de VEGFR-2 e inibindo a angiogênese. Adaptado de [37].

A sinalização Notch funciona de forma a suprimir a ativação de outras células próximas a células já ativas, levando à diminuição da concentração da proteína Receptor 2 de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGFR-2) nas células endoteliais vizinhas à ETC, através de sinalizações da proteína *Delta-like 4* (DLL4) que é expressado na membrana das ETCs [37, 38].

3 MODELAGEM MATEMÁTICA

Neste capítulo iremos apresentar alguns dos conceitos matemáticos que estão por trás do modelo da angiogênese, bem como uma breve revisão sobre os modelos encontrados na literatura. É apresentada também a abordagem hidrodinâmica utilizada para obter o fluxo sanguíneo nos capilares e a técnica de *thinning* necessária para esse cálculo.

3.1 Modelos Matemáticos na Literatura

Os modelos para angiogênese conhecidos atualmente podem ser classificados, de acordo com a forma em que apresentam-se as células endoteliais e redes vasculares, em três tipos: contínuos, discretos e híbridos.

Os métodos contínuos trabalham em escala mesoscópica, descrevendo as redes vasculares como densidades de células endoteliais e modelando fluxos de produtos químicos, baseando-se no princípio da conservação de massa [39,40]. Por outro lado, os modelos discretos utilizam a descrição microscópica do sistema, modelando individualmente células endoteliais com posições espaciais bem definidas, sendo as novas ramificações estabelecidas pelas trajetórias das ETCs, perdendo assim a informação sobre o calibre dos vasos e detalhes da morfologia. Essa abordagem é importante por possibilitar observações ao nível celular de experimentos *in vitro* [41]. No entanto estes modelos apresentam um elevado número de parâmetros e são de difícil aplicação a sistemas maiores do que quatro ou cinco ramificações vasculares.

Os modelos híbridos usam aspectos contínuos, no que diz respeito a morfologia das redes vasculares e da matriz extracelular, e também aspectos discretos, tratando as células endoteliais individualmente, permitindo unir as vantagens dos dois tipos de modelos. Assim, ao pensar-se em um modelo híbrido, faz-se necessário o entendimento das ligações fundamentais entre os eventos macroscópicos e microscópicos envolvidos na angiogênese. Esse tipo de modelo foi proposto recentemente, inicialmente por Milde *et al.* [20], e posteriormente por Travasso *et al.* [21]. Nosso trabalho baseia-se neste último, e será descrito a seguir.

3.2 Teoria de Ginzburg-Landau Aplicada à Angiogênese

3.2.1 Transições de Fase e Parâmetro de Ordem

O modelo utilizado neste trabalho é fundamentado na metodologia de campos de fase, tendo essa recebido importantes contribuições provenientes da teoria de campo médio para transições de primeira e segunda ordem. Transformações de primeira ordem incluem

a solidificação de líquidos e a condensação de vapor. Essas transições são caracterizadas pela existência de calor latente e a descontinuidade na primeira derivada da energia livre. Por outro lado, as transformações de segunda ordem são contínuas e não há troca de calor latente [42].

Ao trabalhar-se com transições de fase um importante conceito aparece: o parâmetro de ordem. O parâmetro de ordem é utilizado em diversos contextos para definir e distinguir os domínios de um dado sistema, em coexistência de fases. Esse parâmetro pode assumir-se como diferentes grandezas, de acordo com o sistema a tratar-se. Em transições de fase do tipo fluido-fluido, por exemplo, é conveniente definir o parâmetro de ordem como sendo a densidade¹ ρ , tornando possível dizer em qual estado da matéria encontra-se determinada região do sistema. Em um sistema magnético escolhe-se a magnetização M [43].

Em outros sistemas, o parâmetro de ordem pode não ter um significado físico *per se*, como é o caso do sistema biológico abordado neste trabalho. Nesse caso, o parâmetro de ordem ϕ descreve dois grandes domínios e a esses domínios atribuem-se significados: um deles ($\phi > 0$) descreve os vasos sanguíneos, enquanto o outro ($\phi < 0$) descreve a matriz extra celular.

3.2.2 Modelo Híbrido de Interface Difusa

O método de interface difusa adequa-se perfeitamente para o estudo da angiogênese. Ao caracterizar o parâmetro de ordem para esse sistema, é feito o primeiro passo para a utilização do formalismo de Ginzburg-Landau para derivação do modelo. Partindo do funcional de energia livre

$$F[\phi] = \int \left[V(\phi) + \frac{\varepsilon^2}{2} |\nabla \phi|^2 \right] dr, \quad (3.1)$$

sendo ε a espessura da interface, ϕ o parâmetro de ordem e a função $V(\phi)$ escolhida como sendo o potencial de poço duplo (similar ao potencial de Higgs)

$$V(\phi) = -\frac{\phi^2}{2} + \frac{\phi^4}{4}, \quad (3.2)$$

e representada pela Fig. 3.1.

¹No estudo de fenômenos críticos, o parâmetro de ordem é definido de forma que anule-se no ponto crítico. Por isso, para o estudo de transições de fase, o parâmetro de ordem é definido como a diferença das densidades. Neste trabalho não há interesse na criticalidade, mas na distinguibilidade das fases longe do ponto crítico, por isso definimos a densidade como parâmetro, não a diferença.

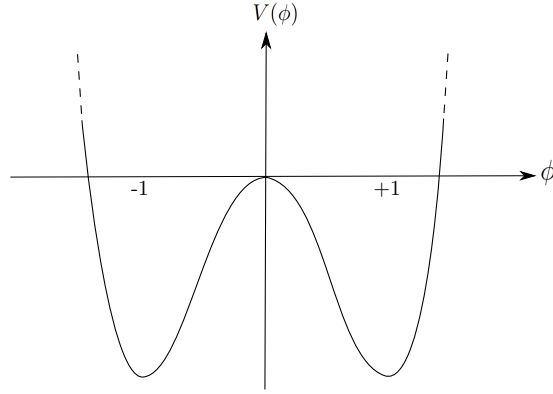


Figura 3.1 - Poço de potencial duplo simétrico.

A escolha da função $V(\phi)$ foi realizada de acordo com o problema a ser abordado, exigindo assim um potencial que permitisse a coexistência de duas fases para simular os vasos sanguíneos e matriz extracelular, como pode-se constatar através da diferenciação de (3.2)

$$\frac{\partial}{\partial \phi} V(\phi) = -\phi + \phi^3. \quad (3.3)$$

Assim,

$$\phi(\phi + 1)(\phi - 1) = 0, \quad (3.4)$$

ou seja, as soluções estáveis para esse potencial são $\phi = \pm 1$ ($\phi = 0$ é instável), identificando assim a fase positiva como tecido endotelial, a fase negativa como estroma e 0 para a interface entre as duas fases. O modelo é chamado de interface difusa devido a característica contínua da transição entre as duas fases, como ilustrado na Fig. 3.2.

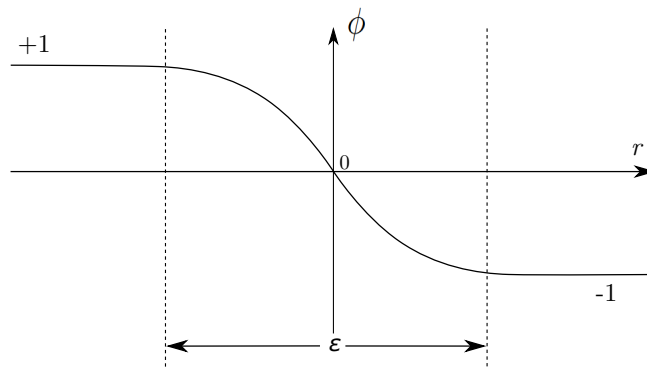


Figura 3.2 - Parâmetro de ordem ϕ em função de r , salientando-se a espessura da interface ε .

A equação de Cahn-Hilliard, Eq. (3.5), é obtida ao introduzir-se a derivada funcional de $F[\phi]$, que representa o potencial químico μ , na Lei de Fick para continuidade (detalhes sobre a derivação no Apêndice A), obtendo-se

$$\partial_t \phi = \nabla^2(-\phi + \phi^3 - \varepsilon^2 \nabla^2 \phi). \quad (3.5)$$

A Fig. 3.3 auxilia o entendimento de como a equação de Cahn-Hilliard apresenta a possibilidade, mesmo sem conter todos os elementos necessários, de ser ponto de partida para modelar o crescimento de vasos sanguíneos. Ilustra ainda a separação das duas fases e a evolução da interface em função do tempo, no momento inicial e final.

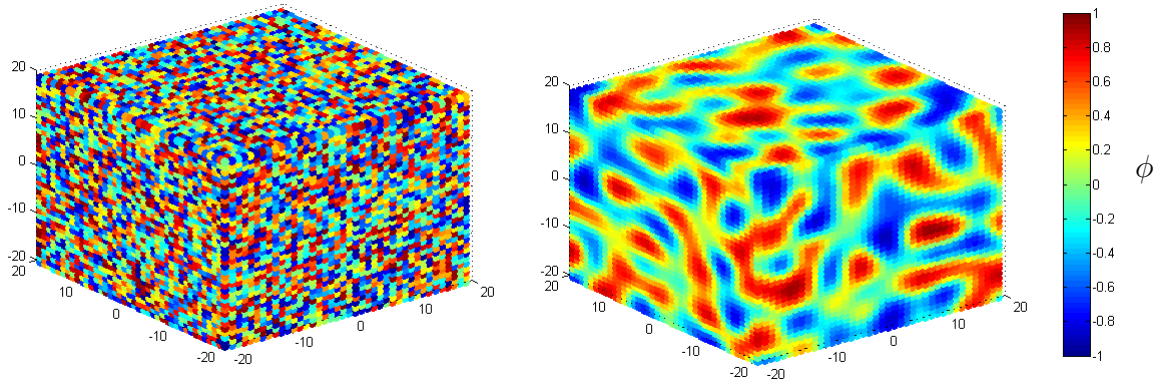


Figura 3.3 - À esquerda, condição inicial do sistema com valores dados por $-1 \leq \phi \leq 1$ escolhidos aleatoriamente. À direita, a representação do sistema durante a simulação: o sistema evolui para a solução estável, dada por dois grandes domínios de $\phi = \pm 1$.

Soma-se ainda um termo proliferativo à Eq. (3.5), com uma taxa de proliferação celular dada por $\alpha_p(T) = \alpha_p T$ para $T < T_p$, sendo T a concentração de fator angiogênico, assumindo-se constante para o valor de concentração de fator angiogênico máximo T_p (ver Fig. 3.4), obtendo-se então

$$\partial_t \phi = M \nabla^2 \mu + \alpha_p(T) \phi \Theta(\phi), \quad (3.6)$$

onde μ é o potencial químico dado pela expressão,

$$\mu = \frac{\delta F}{\delta \phi} = -\phi + \phi^3 - \varepsilon \nabla^2 \phi, \quad (3.7)$$

e M é a constante de mobilidade das células endoteliais (ECs), T é a soma da concentração

de fator angiogênico para todas as isoformas e $\Theta(\phi)$ é a função de Heaviside, dada por

$$\Theta(\phi) = \begin{cases} 0 & \text{se } \phi < 0; \\ 1 & \text{se } \phi \geq 0. \end{cases} \quad (3.8)$$

O termo $\varepsilon^2 \nabla^2 \phi$ da Eq. (3.7) é a consequência no potencial químico da penalização energética para variações topológicas de ϕ , de forma ao sistema convergir para a minimização da quantidade de interfaces (assim ε é também uma medida da tensão superficial).

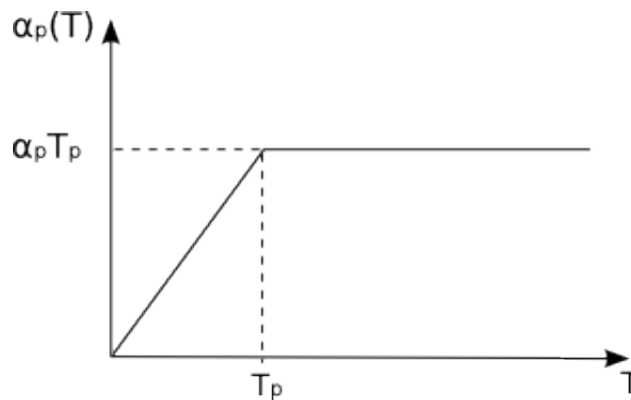


Figura 3.4 - Taxa de proliferação celular em função da concentração de VEGF. A concentração de VEGF para proliferação máxima T_p é apresentada na Seção 4.5

Desta forma, necessita-se ainda descrever a dinâmica da concentração de fator angiogênico, ou seja, uma equação que regule a produção, a difusão e o consumo de proteínas originadas na matriz extracelular por células que requerem oxigênio. Essa equação será uma equação de difusão, como citado acima, com uma constante de difusão que, em geral, irá depender das isoformas proteicas estudadas, dada por $D_i(r)$ (ver detalhes sobre a derivação no Apêndice B). Essas isoformas dividem-se em dois grupos: ligantes de heparina e difusíveis. Proteínas heparinas-ligantes implicam em uma maior aderência à matriz extracelular, devido à capacidade de ligações dos peptídeos com a heparina, refletindo-se em uma constante de difusão que é função da posição no tecido, visto depender tanto da concentração de heparina como de outras proteínas que quebram a ligação entre o fator angiogênico e a heparina. Por outro lado, a isoforma difusível é mais simples, dada por uma constante de difusão definida igual para toda a matriz ($D_i(r) = D$).

Assim, levando em conta as considerações acima, a equação para a dinâmica da concen-

tração de VEGF (T) no tecido é dada por

$$\partial_t T_i = \nabla(D_i(r)\nabla T_i) - \alpha_T T_i \phi \Theta(\phi), \quad (3.9)$$

onde o índice i simboliza o número da isoforma considerada, pois o VEGF subentende uma família de proteínas contendo manifestações diferentes de fatores de crescimento de acordo com o sequenciamento de nucleotídeos. Assim, dependendo do sistema de estudo pode-se utilizar mais de uma equação para a evolução de cada concentração T_i .

Até aqui, definiram-se os mecanismos de manutenção do sistema macroscópico, apresentando-se as características contínuas do modelo híbrido. A partir de agora, faz-se necessário a inserção das características microscópicas e discretas do sistema, para a modelagem relativa à ativação e proliferação das células endoteliais de ponta. Primeiramente, as células endoteliais são definidas por esferas caracterizadas por um raio celular R_c e um parâmetro de ordem ϕ_c . Essas células são ativadas através da via de sinalização Delta-Notch, realizando a comunicação através da produção e inibição de proteínas na vizinhança da célula ativa, evitando assim que outras células endoteliais sejam ativas próximas de uma célula de ponta [38, 44]. A sinalização Notch é traduzida em algumas condições matemáticas: a célula candidata a ser uma ETC deve estar a uma distância mínima de $4R_c$ de outra célula já ativada, deve possuir parâmetro de ordem elevado $\phi > 0,9$, a concentração de fator angiogênico deve ser maior que T_c e, ainda, o valor absoluto do gradiente de VEGF deve atingir um valor mínimo $|\nabla T| > G_m$ (necessário para levar a quimiotaxis da ETC).

As células ativas são deslocadas individualmente sob ação de uma equação de movimento particular, descrita pela velocidade ν , que é proporcional ao gradiente de concentração de fator angiogênico,

$$\nu = \chi \nabla T \left[1 + \left(\frac{G_M}{|\nabla T|} - 1 \right) \Theta(|\nabla T| - G_M) \right], \quad (3.10)$$

sendo χ a constante de resposta quimiotática das ECs e G_M o gradiente de máxima difusão para o qual a ETC atinge velocidade máxima χG_M . Os valores dos parâmetros χ e G_M são apresentados na Seção 4.5.

A partir dessa velocidade pode-se realizar a ponte entre o discreto e o contínuo, calculando o parâmetro de ordem ϕ_c no interior da célula de ponta com um valor inversamente proporcional ao valor absoluto da velocidade da célula ativa. Essa expressão é obtida pela razão entre a variação de material endotelial produzido na região da célula de ponta por unidade de tempo ($\alpha_p(T)\pi R_c^3$) e a área percorrida pela célula por unidade de tempo

$(2R_c^2|\nu|)$,

$$\phi_c = \frac{\alpha_p(T)\pi R_c}{2|\nu|}. \quad (3.11)$$

Uma característica do modelo é apresentar a espessura do novo vaso em função do parâmetro de ordem ϕ_c da ETC. Ou seja, se ϕ_c for menor do que 1, a vasculatura terá uma espessura menor do que $2R_c$, a não ser que as células proliferativas preencham a ramificação. Em contrapartida, se ϕ_c for maior do que 1, a nova vasculatura se torna mais espessa do que $2R_c$. O valor de ϕ_c não descreve a densidade de células na ponta, não tendo significado *per se*, mas a densidade de *stalk cells* na vizinhança. Por conseguinte, ϕ_c pode ser tido como uma condição de fronteira móvel, delimitando a ETC.

A forma como a velocidade quimiotática está escrita tem como consequência o estabelecimento de uma velocidade máxima, pois devido a função de Heaviside o termo $(|\nabla T| - G_m)$ se torna zero quando $|\nabla T| > G_M$, ou seja, a velocidade máxima é dada por χG_M . Esse comportamento está descrito na Fig. 3.5.

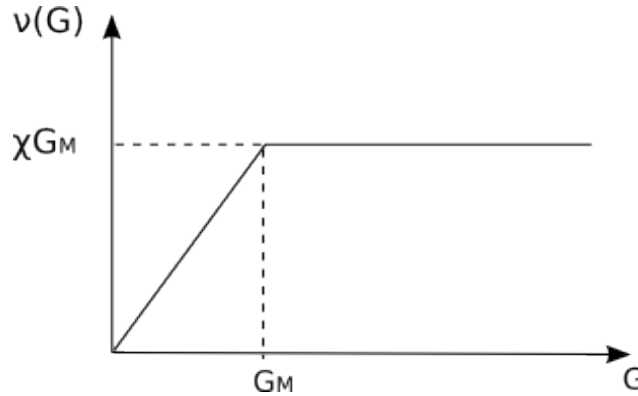


Figura 3.5 - Comportamento da velocidade quimiotática em função do valor absoluto do gradiente de VEGF ($G = |\nabla T|$).

As condições iniciais e de fronteiras do sistema são dadas de acordo com a patologia de interesse. Para realizar uma simulação onde o caso de estudo é a retinopatia diabética, utiliza-se um sistema em que uma das dimensões espaciais seja muito menor que as outras duas, de forma a simular a geometria quase planar da vasculatura na retina humana. Além disso, é utilizado uma rede vascular preexistente como condição inicial, pois no caso da retinopatia, inicialmente os vasos sanguíneos fisiologicamente normais começam a não suprir as demandas de oxigênio e nutrientes para a retina, de forma a ocorrer a produção de fatores pró-angiogênicos e, então, uma nova vasculatura patológica é criada. Para

sistemas como tumores, é exigido um sistema de dimensão espacial muito maior que a estudada na retinopatia, mas as condições iniciais em geral são mais simples, apresentando apenas uma rede vascular tridimensional de baixa densidade envolta por células tumorais a produzirem fator angiogênico. Dessa forma, a rede vascular criada é considerada na totalidade de cunho patológico e gerada para suprir as necessidades de nutrientes das células danificadas.

Em resumo, obteve-se iterativamente a topologia dos vasos resolvendo simultaneamente as equações acopladas (3.6) e (3.9), sendo essas solucionadas sem levar em consideração se as células endoteliais eram ou não células de ponta. Posteriormente, realiza-se a evolução temporal das ETCs através de equações de movimento individuais. Por fim é calculado o valor de ϕ_c , Eq. (3.11), para o parâmetro de ordem no interior das ETCs, levando em consideração a velocidade quimiotática obtida previamente pela integração das respectivas equações de movimento. O termo de consumo de VEGF é armazenado para todo o espaço e posteriormente corrigi-se a concentração nas regiões pertencentes as ETCs, somando-se esse termo, pois não há consumo de VEGF no interior dessas células.

3.3 Hidrodinâmica do Fluxo Sanguíneo

A angiogênese é desencadeada pelas células usualmente em consequência de uma deficiência no recebimento de oxigênio e nutrientes, conhecido como processo de hipóxia. Tratando-se de tumores observa-se que, devido ao tamanho que podem alcançar e à pressão em seu interior, eles recebem uma ineficiente manutenção em fluxo sanguíneo, o que ocasiona a produção descontrolada de fatores pró-angiogênicos. Os vasos sanguíneos criados apresentam uma estrutura fragilizada, não sendo incomum a falta de células do músculo liso em sua constituição, podendo ocasionar a regressão dos vasos, tornando-se assim a presença de fluxo sanguíneo crucial para a estabilização de novas vasculaturas duradouras [2].

Na angiogênese tumoral a determinação da irrigação dos vasos sanguíneos da rede formada é importante para conhecer a eficácia com que um determinado fármaco será absorvido pelo tumor. Em uma rede vascular podem haver ramos que não recebem fluxo sanguíneo apropriadamente de forma que não contribuem para o fornecimento de drogas ou oxigênio. Estudos mostram que fármacos antiangiogênicos podem normalizar a estrutura vascular tumoral, de forma a potencializar o efeito terapêutico da quimioterapia e radioterapia [27]. Somando a isso, é ainda importante determinar a irrigação dos vasos sanguíneos durante a simulação para se ter conhecimento sobre quais células estão efetivamente recebendo oxigenação. Dessa forma, ganha-se um controle mais realista da ativação e desativação das fontes de fator de crescimento endotelial que, *in vivo*, são desativadas somente quando o fluxo sanguíneo é eficaz e não apenas pela presença de um vaso nas proximidades.

Assim, é imprescindível a utilização de um método eficiente para determinar a irrigação e o fluxo sanguíneo das redes vasculares obtidas por simulação. A princípio foi levantada a hipótese de resolver-se a equação de Navier-Stokes. Sabendo que o sangue apresenta-se como um fluido de baixa viscosidade, tipicamente 4×10^{-3} Pa.s, e comportando-se como um fluido Newtoniano, é possível reduzir a equação para um caso de fluxo laminar. Entretanto, mesmo para uma equação simplificada de Navier-Stokes o tratamento das condições de fronteira para uma topologia complexa como a de uma rede vascular torna a sua implementação custosa e problemática. Como abordagem inicial, adotou-se um método conhecido em biofísica que consiste em tratar a rede vascular como um circuito elétrico, escrevendo uma lei de Ohm análoga para o fluxo sanguíneo em função do gradiente de pressão no vaso sanguíneo principal e uma resistência efetiva [45]. Esse método é derivado de uma solução particular da equação de Navier-Stokes, conhecida como Lei de Hagen-Poiseuille, que será descrito na subseção a seguir. É importante ainda salientar que a aplicação dessa aproximação depende do número de Reynolds do sistema, para o fluxo sanguíneo no corpo humano pode variar entre 100 (nas irrigações cerebrais) e 1000 (na aorta), ainda em regime laminar. No entanto, a microfluídica de tumores apresenta um regime ainda menor de número de Reynolds ($R_N \ll 1$), permitindo assim a utilização do método proposto [46].

Embora, em princípio, pelas razões expostas seja desejável retroalimentar nas simulações a condição de existência ou não de fluxo sanguíneo nos vasos, nos limitaremos aqui a uma verificação da presença ou ausência desse fluxo ao final da simulação. A realização das simulações com o fluxo sanguíneo, e as respectivas análises, serão realizadas posteriormente ao encerramento desse trabalho e publicadas em forma de artigo científico.

3.3.1 Lei de Hagen-Poiseuille

Partindo da equação de Navier-Stokes para um fluido Newtoniano e incompressível, o que é razoável quando se descreve o fluxo sanguíneo, não considerando forças externas, encontrar-se-á a solução analítica para um vaso cilíndrico de raio R , sujeito a uma diferença de pressão Δp , com fluxo Q , descrito pela Fig. 3.6. Devido a simetria do problema, o desenvolvimento será realizado em coordenadas cilíndricas (r, θ, z)

$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{u}. \quad (3.12)$$

A equação (3.12) foi obtida a partir da equação completa de Navier-Stokes, tomando-se as premissas supracitadas, onde \mathbf{u} é o vetor velocidade de um segmento de fluido, p é a pressão, ρ a densidade do fluido e η é a viscosidade.

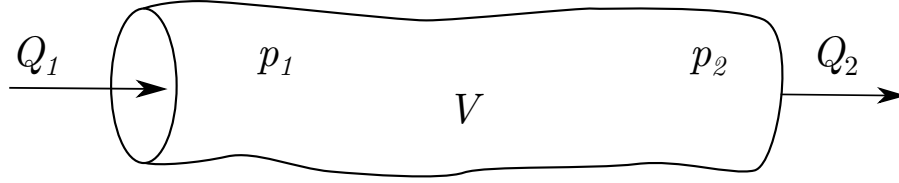


Figura 3.6 - O fluxo sanguíneo é dado por Q_1 e Q_2 , as pressões internas por p_1 e p_2 e o volume V . Baseado em [45].

Assume-se ainda que o fluxo é constante no tempo, ou seja $\partial_t \mathbf{u} = \mathbf{0}$, e como consequência do regime laminar, apenas a componente axial da velocidade será não nula, com simetria azimutal ($\partial_\theta \mathbf{u} = \mathbf{0}$) e constante na direção z . Assim, a equação (3.12) resume-se a

$$0 = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{u}. \quad (3.13)$$

Em coordenadas cilíndricas, sabendo que $\mathbf{u} = (u_z, 0, 0)$, temos

$$0 = -\frac{\partial p}{\partial z} + \frac{\eta}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial}{\partial r} u_z \right). \quad (3.14)$$

Realizando uma dupla integração em r , obtêm-se a solução geral para a equação, dada por

$$u_z = \frac{r^2}{4\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right) + c_1 \ln r + c_2. \quad (3.15)$$

Como u_z deve ser finito em $r = 0$, a primeira constante deve assumir valor nulo. Aplicando a condição de contorno para um tubo cilíndrico, as bordas devem ter velocidade nula, ou seja, $u(r = R) = 0$. Assim:

$$c_2 = -\frac{R^2}{4\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right). \quad (3.16)$$

Substituindo a equação (3.16) na equação geral (3.15), obtêm-se finalmente a solução particular

$$u_z = \frac{1}{4\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right) (r^2 - R^2). \quad (3.17)$$

A equação (3.17) ainda não é útil para o fim desejado, uma vez que ainda é necessário encontrar uma equação que relacione o fluxo com a diferença de pressão no vaso. Para isso, calcula-se a média da velocidade

$$\bar{u} = \frac{1}{\pi R^2} \int_0^R u_z 2\pi r dr = -\frac{1}{8\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right) R^2. \quad (3.18)$$

A velocidade média \bar{u} está relacionada com o fluxo volumétrico médio da área da seção transversal do cilindro, $Q = \pi R^2 \bar{u}$. Assim

$$\frac{Q}{\pi R^2} = -\frac{1}{8\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right) R^2. \quad (3.19)$$

Assumindo que o gradiente de pressão é uniforme ao longo do cilindro, pode-se escrever $\partial_z p = \Delta p/L$, sendo L o comprimento do cilindro, onde finalmente obtêm-se a Lei de Hagen-Poiseuille ²

$$Q = \frac{\pi R^4 |\Delta p|}{8\eta L}. \quad (3.20)$$

Define-se ainda uma resistência hidráulica R_h , como uma constante de proporcionalidade entre o fluxo através do canal e a diferença de pressão. Essa resistência é dada por

$$R_h = \frac{8\eta L}{\pi R^4}. \quad (3.21)$$

Logo, a Lei de Hagen-Poiseuille assume uma relação análoga a Lei de Ohm para circuitos elétricos, onde a diferença de pressão assume o papel da diferença de potencial e o fluxo hidrodinâmico como o correspondente à corrente elétrica. Do mesmo modo que na corrente elétrica, o fluxo do líquido tem o sentido das pressões mais elevadas para as pressões mais baixas.

$$\Delta p = R_h Q. \quad (3.22)$$

Com essa descrição é possível utilizar as leis dos nodos e de Kirchoff para determinar

²É possível encontrar na literatura a equação de Hagen-Poiseuille de duas formas: com ou sem o sinal negativo. As duas formas estão corretas, pois utilizamos a diferença de pressão, que pode ser negativa ou positiva. Neste trabalho o sinal negativo é absorvido pela utilização do módulo de Δp .

a pressão e fluxo sanguíneo em cada ponto de bifurcação do sistema hidráulico obtido. Entretanto, existe ainda um desafio na determinação dessas regiões: identificar exatamente onde começa um segmento de vaso sanguíneo e onde termina não é uma tarefa trivial em um espaço tridimensional. Assim esse problema será contornado utilizando-se um método para a extração das linhas médias, mantendo a topologia da rede.

3.3.2 Método de *Thinning*

Os métodos de *thinning* consistem em algoritmos de processamento de imagem, utilizados para reduzir uma determinada imagem à sua representação minimalista, através das linhas médias de cada segmento da topologia apresentada inicialmente. Esse processo é também conhecido por esqueletização e surgiu na década de 60. Existem dois tipos de métodos de *thinning*: os que conservam a topologia inicial e os que não conservam. Para esse trabalho interessam apenas os métodos conservativos [47]. A Fig.3.7 é um exemplo da aplicação de algoritmos de *thinning* em biomedicina.

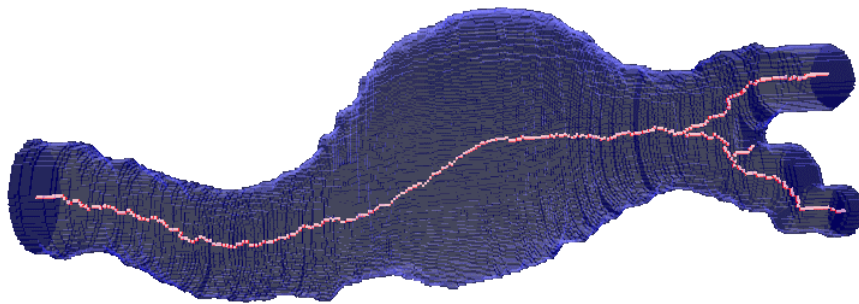


Figura 3.7 - Visão parcial de um vaso sanguíneo e o esqueleto topológico equivalente em vermelho. Adaptado de [48].

Na literatura é possível encontrar muitos algoritmos para a extração das linhas médias de uma imagem. O método escolhido aqui foi apresentado por Palágyi *et al.* [49], consistindo em um método paralelo de 6-subiterações. Primeiramente, são definidos dois tipos de pontos, os pontos de fronteira que não fazem parte da imagem, mas servem para definir onde a mesma termina e são definidos matematicamente pelo parâmetro de ordem sendo $\phi < 0$. Os outros pontos são conhecidos simplesmente por pontos objeto, definidos por um parâmetro de ordem com $\phi > 0$. Os pontos objetos são ainda distinguidos em duas classificações: pontos essenciais topologicamente ou pontos simples. Os pontos simples serão identificados através de uma série de regras topológicas e removidos a cada iteração. Sucessivas varreduras da rede, com a eliminação dos pontos objetos simples restantes em

cada varredura, são necessárias até que, na etapa final, não apareçam mais pontos simples, de forma a restar apenas o esqueleto topológico procurado.

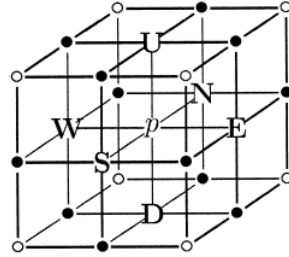


Figura 3.8 - As adjacências frequentemente utilizadas. Os pontos 6-adjacentes são marcados pelas direções **U**, **N**, **E**, **S**, **W** e **D**; os pontos 18-adjacentes são marcados pelos pontos com preenchimento; os pontos 26-adjacentes são definidos pelos círculos não preenchidos. Adaptado de [49].

Para determinar se um ponto p é simples ele deverá satisfazer a duas condições matemáticas, definidas em função dos pontos vizinhos contidos em um cubo ($3 \times 3 \times 3$), como representado na Fig. 3.8, ou seja, os 26 vizinhos mais próximos. É utilizado um sistema de camadas para distinguir os vizinhos, utilizando o módulo da distância entre o ponto p , situado em $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$, e cada um dos pontos adjacentes $\mathbf{y} = (y_1, y_2, y_3)$. Os vizinhos 6-adjacentes são definidos por $|\mathbf{x} - \mathbf{y}| \leq 1$, o 18-adjacentes por $1 \leq |\mathbf{x} - \mathbf{y}| \leq \sqrt{2}$ e os 26-adjacentes por $\sqrt{2} \leq |\mathbf{x} - \mathbf{y}| \leq \sqrt{3}$ [49, 50].

Definição: Um ponto p será simples se e somente se as seguintes condições forem satisfeitas [47]:

- p é 26-adjacente somente a um ponto objeto e ;
- p é 6-adjacente somente a um ponto de fronteira, não havendo outros pontos de fronteira nos 18 pontos mais próximos.

De forma a otimizar a verificação dos pontos, Palágyi *et al.* [49] propôs um algoritmo baseado em 6 máscaras de verificação topológica, apresentadas na Fig. 3.9. Verifica-se para cada ponto da imagem cada uma das 6 máscaras e suas rotações em cada uma das 6 direções principais (**U**, **N**, **E**, **S**, **W** e **D**). Se o ponto satisfizer pelo menos uma das máscaras, ele é definido como ponto simples e poderá ser removido. O procedimento resumido está descrito no Algoritmo 1, onde $\mathcal{T}(Y, \mathbf{x})$ é a subrotina que verifica os pontos simples da imagem de entrada Y na direção dada \mathbf{x} .

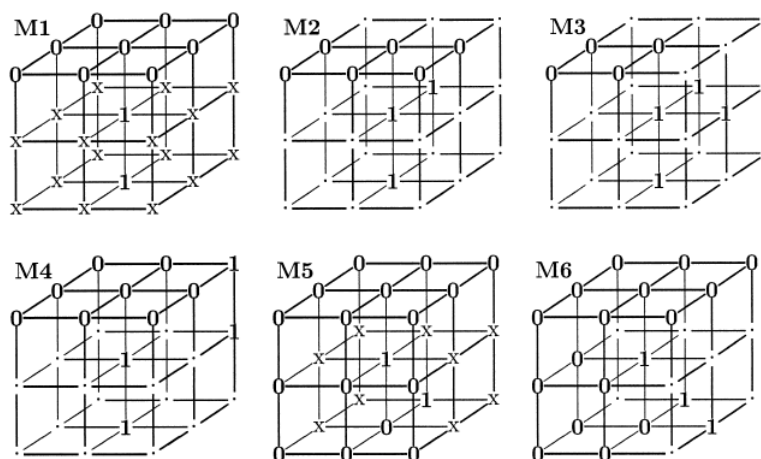


Figura 3.9 - A base de máscaras **M1-M6** e suas rotações em torno do eixo vertical formam o conjunto de máscaras \mathcal{M} na direção \mathbf{U} . Os pontos marcados com 0 são pontos de fronteira, os marcados com 1 são pontos objetos, os pontos "." podem ser tanto pontos objetos como pontos de fronteira. As máscaras **M1** e **M5** devem ter pelo menos um dos pontos marcados com x como ponto objeto. Adaptado de [49].

Algoritmo 1: Algoritmo de *Thinning*

Entrada: matriz topológica X

Saída: matriz contendo o esqueleto topológico Y

Início

inicializa as matrizes $M1 - M6$;

obtêm as matrizes nas restantes direções e reflexões;

copia a matriz de entrada $Y = X$;

repita

$Y = \mathcal{T}(Y, U)$;

$Y = \mathcal{T}(Y, D)$;

$Y = \mathcal{T}(Y, N)$;

$Y = \mathcal{T}(Y, S)$;

$Y = \mathcal{T}(Y, E)$;

$Y = \mathcal{T}(Y, W)$.

até que nenhum ponto seja removido;

Fim

Para assegurar a funcionalidade da implementação foram realizados diversos testes com topologias variadas. Primeiramente, partiu-se de imagens simples e altamente simétricas, de forma que poucas máscaras foram utilizadas e em apenas algumas direções. A seguir foram realizadas transformações como rotações, reflexões e deslocamentos, de forma a diminuir a simetria da imagem. Além disso, testamos o algoritmo para formas geométricas

variadas (esferas, paraboloides cilíndricos, entre outras).

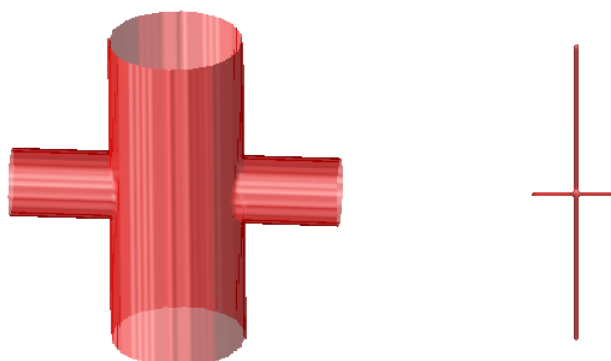


Figura 3.10 - Cilindros em intersecção como topologia de teste. À esquerda, a topologia inicial e, à direita, o resultado após passar pelo algoritmo de *thinning*.

A Fig. 3.10 mostra a dois cilindros intersectados em forma de cruz e o esqueleto topológico obtido pela nossa implementação. A imagem obtida foi a esperada, apenas duas linhas médias cruzadas.

Como era suposto aplicar o algoritmo em estruturas altamente vascularizadas, resolveu-se aumentar o nível de complexidade da topologia adicionando vários cilindros e deslocando-os da posição central, mantendo ainda simetria com os eixos principais. Os resultados continuaram consistentes, como visto na Fig. 3.11.

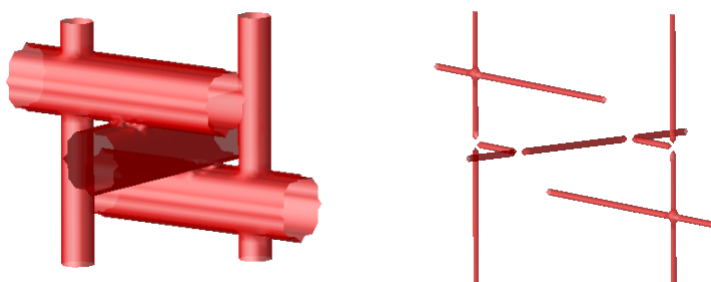


Figura 3.11 - Cilindros em intersecção e deslocados da origem como topologia de teste. Foram introduzidos dois cilindros fora do eixo principal, cada um intersectado por cilindros horizontais (além de conexões tangenciais com o cilindro do centro). À esquerda, a topologia inicial e, à direita, o resultado após passar pelo algoritmo de *thinning*.

Assim, passou-se para outro nível de teste, quebrando a simetria com os eixos principais através de rotações. Assim começaram a ser solicitadas mais máscaras e em outras direções, pelo algoritmo. Dessa forma pode-se diagnosticar problemas, pois resultados como o da Fig. 3.12 apareceram, o que indicava problemas com a definição das máscaras. O resultado correto dessa topologia é mostrado na Fig. 3.13.

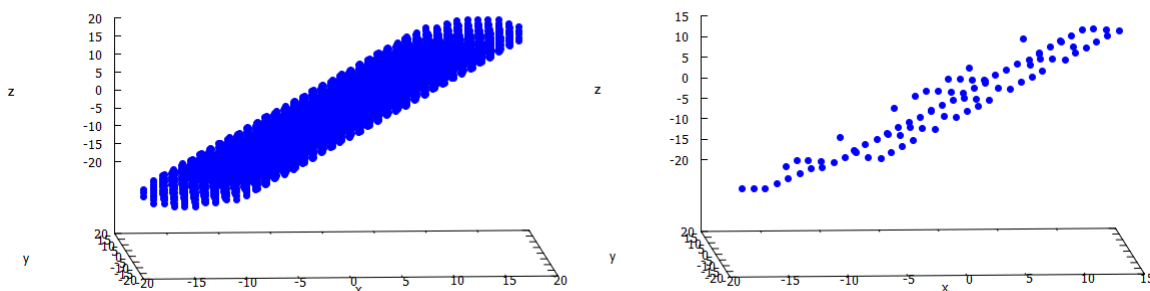


Figura 3.12 - Cilindro rotacionado para testes fora de simetria. O gráfico apresentado à direita é típico de quando alguma das máscaras está mal definida, não apresentando o resultado esperado.

Foram criados algoritmos de diagnóstico para identificar a origem do problema, uma das técnicas consistiu em criar um histograma com a frequência com que cada máscara era utilizada. Dessa forma pode-se comparar diretamente os casos em que o algoritmo falhava com os que eram bem sucedidos, restringindo assim a procura.

Também foi utilizado um programa para visualização de estruturas atômicas (PyMol), definindo-se cada tipo de ponto das máscaras como um tipo de átomo, ajudando assim a visualizar se alguma delas estava mal definida. Descobriu-se assim que haviam algumas falhas sutis na definição das matrizes principais, corrigindo esse problema os resultados melhoraram, mas ainda não foi suficiente para obter a topologia completamente correta.

Por conseguinte, investigando cuidadosamente o algoritmo percebeu-se que a ordem com que as direções são aplicadas é imprescindível para que o método funcione corretamente. Chegou-se a essa conclusão pois foi identificado que o problema estava quando aplicá-va-se as máscaras no espaço das reflexões. Dependendo da matriz de transformação escolhida para passar para o espaço das reflexões essa também muda a direção da máscara, levando a um erro no algoritmo. É importante que, quando se aplique a transformação de reflexão nas máscaras, essa seja feita com a matriz adequada, de forma a não mudar a direção da mesma. Ou seja, se deseja-se transformar a máscara $M1$ na direção \mathbf{U} , deve-se utilizar a

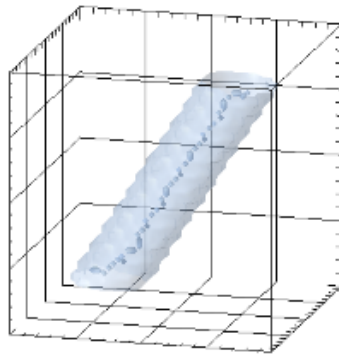


Figura 3.13 - Cilindro rotacionado em dois planos simultaneamente. Nesse gráfico apresenta-se o resultado correto para o um cilindro rotacionado em dois eixos. No interior do cilindro está a topologia final, após o algoritmo de *thinning*

matriz de reflexão na direção ortogonal a essa (E, W, N ou S).

Resolvendo esse problema passou-se a obter resultados consistentes, como o da Fig. 3.13. Os pontos pertencentes à linha média obtida estão no interior do cilindro. Após esses testes, o algoritmo também foi aplicado à morfologia de redes vasculares complexas, sendo também bem sucedido na obtenção das linhas médias.

4 MÉTODO COMPUTACIONAL

Neste capítulo irá apresentar-se a descrição do método computacional utilizado. As condições iniciais e de fronteira, o projeto Octopus, os métodos de integração e diferenciação, a implementação da lei dos nodos para circuitos hidráulicos, bem como a parametrização do modelo.

4.1 Condições Iniciais e de Fronteira

As condições iniciais utilizadas para realizar as simulações consistem em um vaso ou uma rede sanguínea pré-estabelecida rodeada por fontes de VEGF (Fig. 4.1), inseridas aleatoriamente com o auxílio de um gerador de números pseudoaleatórios (implementação **ran2** [51]).

O vaso sanguíneo foi definido através do parâmetro de ordem ϕ , sendo $\phi = 1$ em seu interior e $\phi = -1$ para a matriz extracelular. As fontes de VEGF mantêm valor constante de concentração $T = 1$, não sendo integradas pela equação (3.9). Quando os vasos sanguíneos estiverem a uma distância da fonte menor que o raio de difusão de oxigênio a fonte será desativada.

Existe ainda uma série de parâmetros que devem ser definidos para a realização da simulação. Esses valores são descritos derivados na seção 4.5.

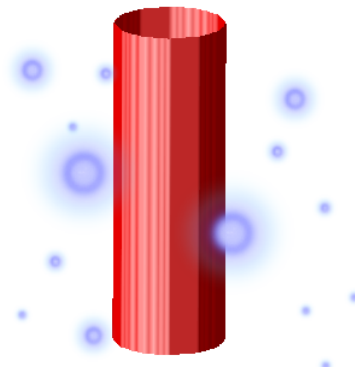


Figura 4.1 - Configuração inicial utilizada nas simulações. No centro vê-se o vaso sanguíneo inicial, em vermelho, rodeado por fontes de fator angiogênico (azul). Cada fonte é inicializada com $T = 1$, mantendo esse valor até que uma ramificação aproxime-se desativando-a e consumindo o fator produzido.

As condições de fronteira utilizadas são periódicas nas três dimensões espaciais, consistindo na replicação da caixa de simulação em todas as direções. Ou seja, se um vaso sanguíneo

atravessar o limite da caixa principal ele continuará seu percursos através da outra face do cubo, como pode ser observado na figura 4.2.

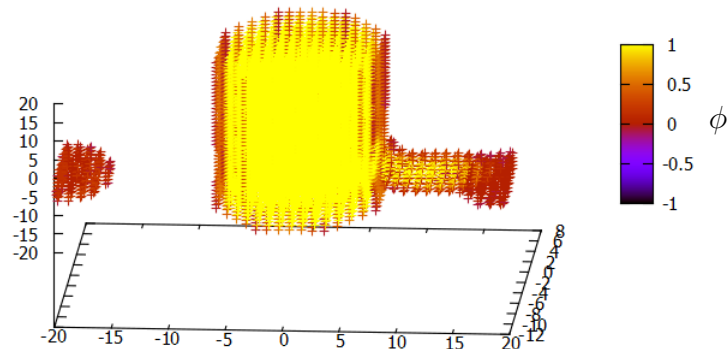


Figura 4.2 - Condição de fronteira periódica. O vaso sanguíneo atravessa para a outra face da caixa de simulação quando o limite da caixa principal é extrapolado.

4.1.1 Conciliando as Pressões e as Condições Periódicas de Contorno

O método utilizado para o cálculo do fluxo sanguíneo apresenta uma incompatibilidade com as condições de fronteira periódicas utilizadas para o sistema. Há uma situação em que o método falha, quando uma ramificação proveniente do vaso sanguíneo principal cresce paralelo a ele, atravessa os limites da caixa de simulação e torna a ser absorvido pelo vaso principal (anastomose). Essa situação está representada na Fig 4.3.

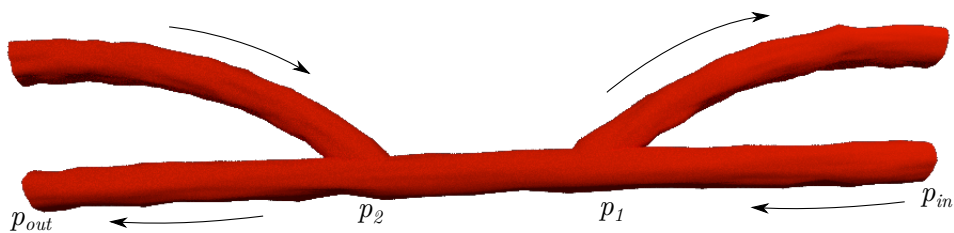


Figura 4.3 - Incompatibilidade das condições periódicas com as pressões. Quando uma ramificação cresce paralela ao vaso principal, extrapolando as fronteiras e realizando a ligação com o vaso principal, ocorre um paradoxo no cálculo do fluxo nesse ramo (o sangue tem fluxo inverso ao do vaso principal).

A incompatibilidade está em não utilizarmos as mesmas condições para a pressão, como

é necessário um gradiente, fixam-se as pressões de entrada e saída. Quando ocorre situações semelhantes a descrita acima, o nodo com pressão p_1 está conectado a outro com pressão mais baixa p_2 , ocasionando um fluxo contrário ao do vaso sanguíneo principal. Uma possível solução é impor que todos os vasos sanguíneos da fronteira estão sob a mesma pressão. No entanto, mesmo essa traz problemas, pois pode ocasionar a presença de vasos com ausência de fluxo devido a alta pressão imposta na fronteira para todos os vasos. Outra solução é desligar as condições de contorno periódicas para as ETCs na direção paralela ao vaso principal, não permitindo situações como as descritas acima. Neste trabalho utilizar-se-á este último método.

4.2 Projeto Octopus

O projeto Octopus consiste em um *software* livre para simulações *ab initio* utilizando métodos de DFT (Teoria do Funcional da Densidade) e TDDFT (Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo), com código *open-source*, distribuído sob licença GPL. O Octopus é mantido por um grupo de desenvolvedores localizados em várias universidades e países diferentes, como Espanha, Estados Unidos, Portugal, Bélgica, entre outros.

A ideia de utilizar o Octopus como base para o projeto angiogênese surgiu da necessidade de otimizar o processamento, pois quando estuda-se sistemas da ordem de grandeza de tumores, tipicamente podendo alcançar os milímetros, o custo computacional torna-se elevado. As rotinas de cálculo de laplaciano, gradiente e da obtenção da discretização espacial estão bem concebidas e os resultados de eficiência já são conhecidos na literatura. Primeiramente, implementou-se o código da angiogênese para utilizar essas rotinas de cálculo vetorial, o que já demonstrou uma melhora no tempo de processamento relativamente a versões anteriores do código, e depois implementou-se um versão do código utilizando MPI, aproveitando o suporte do Octopus a essa ferramenta. [52]

O código em paralelo ainda está instável, necessitando alguns ajustes. Assim, nesse trabalho apresentar-se-á apenas as simulações realizadas com o programa em série. Pode ser realizado o *download* do código da angiogênese através do repositório SVN: <http://www.tddft.org/svn/angio3d/>.

4.3 Método das Diferenças Finitas

As equações diferenciais parciais descritas neste trabalho são lineares no tempo e têm as mesmas características de equações do tipo difusão, permitindo a utilização do método das diferenças finitas. O método consiste em discretizar o espaço formando uma rede, descrita por um parâmetro que dá a mínima unidade entre dois pontos do espaço discreto,

permitindo a avaliação das funções em cada ponto da rede. Desse modo, utilizam-se os pontos posteriores e anteriores a um determinado ponto p , nas três direções espaciais, para a obtenção do laplaciano e gradiente. O operador laplaciano discreto, em duas dimensões, é dado por

$$\nabla^2 f(x, y) \approx \frac{f(x - h, y) + f(x + h, y) + f(x, y - h) + f(x, y + h) - 4f(x, y)}{h^2}, \quad (4.1)$$

sendo $f(x, y)$ a função a ser aplicada o operador laplaciano ∇^2 e h o parâmetro de rede.

As duas maiores fontes de erro neste método estão no erro de arredondamento, ou seja, as casas decimais desconsideradas pelo computador durante o cálculo, e o erro de truncamento pela discretização, dado pela diferença entre a solução contínua exata e a com aproximação discreta. No entanto, o método das diferenças finitas é ao mesmo tempo versátil, sendo possível melhorar a precisão adicionando mais pontos ao cálculo e variando os coeficientes, tanto para o cálculo do laplaciano como para o gradiente. [53]

O Octopus possui rotinas com equações mais complexas do que a expressa na Eq. (4.1), inserindo mais pontos em seu cálculo e otimizando os coeficientes de forma a minimizar o erro de arredondamento. Dessa forma, a equação mencionada é apenas ilustrativa, para expor a lógica utilizada na construção do método. Mais detalhes sobre os métodos utilizados no Octopus podem ser obtidos através da documentação do mesmo.

Além disso, é necessário realizar uma integração temporal para evoluir o sistema, tanto para T , Eq. (3.9), como para ϕ , Eq.(3.6), e para a velocidade das ETCs. Para esse fim, foi utilizado o método de Euler, verificando-se estabilidade e alta convergência para o sistema utilizado.

Por conseguinte, esse método está bem estabelecido, conhecendo-se sua alta convergência e estabilidade para equações do tipo difusão [54]. Frisa-se ainda, que o método possui maleabilidade, ao permitir aumentar a precisão dos resultados apenas adicionando-se mais pontos da rede ao cálculo. Assim, o método das diferenças finitas é simples e eficiente, sendo o método eleito para este trabalho.

4.4 Implementação da Lei dos Nodos para Circuitos Hidráulicos

A Lei dos Nodos permite a obtenção das pressões em cada nodo da rede vascular e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo para os respectivos segmentos. Após a aplicação do algoritmo de *thinning*, varreu-se a rede para identificar cada um dos nodos (pontos com mais de dois vizinhos pertencentes ao circuito). Em seguida, percorreu-se a rede a partir de cada um dos nós, de forma a identificar as ligações entre cada nodo. A Fig. 4.4 apresenta

uma rede obtida pelo método e os respectivos nodos.

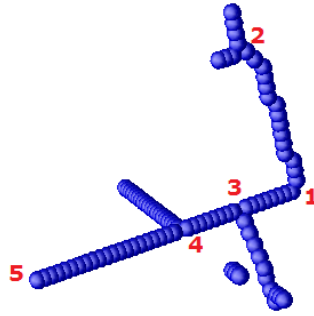


Figura 4.4 - Esqueleto de rede vascular obtido pelo método de *thinning*. Os nodos foram identificados e numerados, as respectivas distâncias entre os nodos foram armazenadas na matriz A .

A distância entre os nodos foi adicionada em uma matriz quadrada, de tamanho igual ao número de nodos,

$$L = \begin{pmatrix} 0 & 14 & 8 & 0 & 0 \\ 14 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 8 & 0 & 0 & 8 & 0 \\ 0 & 0 & 8 & 0 & 20 \\ 0 & 0 & 0 & 20 & 0 \end{pmatrix}. \quad (4.2)$$

Ou seja, a distância entre os nodos i e j é dada pelo elemento L_{ij} da matriz L , sendo assim também uma matriz simétrica ($L_{ij} = L_{ji}$) e de diagonal nula ($\text{Tr}(L) = 0$).

A partir dessa matriz pode-se obter um sistema de equações lineares que permite determinar as pressões em cada nodo da rede. De forma condensada,

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & \cdots & \cdots & 0 \\ \chi_{21} & \sum_{j=1}^n \chi_{2j} & \chi_{23} & \cdots & \cdots & \chi_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & 1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_{m1} & \chi_{m2} & \chi_{m3} & \cdots & \cdots & \sum_{j=1}^n \chi_{mj} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_{in} \\ P_2 \\ \vdots \\ P_{out} \\ \vdots \\ P_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix}, \quad (4.3)$$

sendo χ_{ij} a condutividade hidráulica, dada pelo inverso do número de pontos entre os nodos ($\chi_{ij} = L_{ij}^{-1}$). O lado direito da equação é escrito de acordo com as condições de fronteira do sistema. Escolhe-se dois pontos da rede para assumirem as pressões P_{in} e

P_{out} , que em unidades reduzidas serão 1 e 0, respectivamente. A matriz da condutividade hidráulica é obtida através da aplicação da Lei dos Nodos e da Lei de Kirchhoff, cujos detalhes podem ser encontrados em Neiva [40]. Ressalta-se ainda que o cálculo das pressões é realizado independente da Lei de Hagen-Poiseuille, sendo posteriormente utilizadas para o cálculo do fluxo Q pela respectiva lei.

Para a resolução do sistema (4.3), do tipo $Ax = B$, utilizou-se o método numérico de decomposição PLU com pivotagem parcial e troca de linhas matriciais [55], consistindo em separar a matriz em duas matrizes triangulares, inferior (L) e superior (U), e uma matriz de permutação (P). A forma fatorada da matriz A é utilizada para resolver o sistema,

$$A = PLU . \quad (4.4)$$

Para o caso particular apresentado na Fig. 4.4, obtivemos o seguinte sistema

$$\begin{pmatrix} 1.00 & 0.00 & 0.00 & 0.00 & 0.00 \\ 0.07 & -0.07 & 0.00 & 0.00 & 0.00 \\ 0.12 & 0.00 & -0.25 & 0.12 & 0.00 \\ 0.00 & 0.00 & 0.12 & -0.17 & 0.05 \\ 0.00 & 0.00 & 0.00 & 0.00 & 1.00 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_1 \\ P_2 \\ P_3 \\ P_4 \\ P_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} . \quad (4.5)$$

Após a aplicação do método PLU, obtivemos a solução para as pressões

$$\begin{pmatrix} P_1 \\ P_2 \\ P_3 \\ P_4 \\ P_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1.00 \\ 1.00 \\ 0.77 \\ 0.55 \\ 0.00 \end{pmatrix} . \quad (4.6)$$

Em uma rápida análise, verifica-se que o resultado é coerente com o esperado, pois sabe-se *a priori* que o nodo 1 e 2 estão sob o mesmo potencial, não havendo assim gradiente de pressão ($P_1 = P_2$). Para os nodos subsequentes observa-se uma queda gradativa de pressão, imposta pelos valores escolhidos para P_{in} e P_{out} . Finalmente, obtém-se o fluxo sanguíneo aplicando a equação (3.22).

4.5 Obtenção de Resultados Quantitativos

Nesta simulação computacional trabalhamos com grandezas adimensionais. A tabela 4.1 apresenta a relação entre os valores *in vivo* e os valores adimensionais da simulação. Assim pode-se traduzir os resultados gerados computacionalmente de forma a utilizá-los em comparações com valores experimentais.

As células endoteliais podem apresentar-se de diversas maneiras, assumindo funções e formas diferentes em razão de diferentes contextos. Por essa razão, é importante a utilização de valores apropriados para os parâmetros de simulação, ajustando-os de acordo com o sistema de estudo. É possível encontrar alguns dos parâmetros na literatura, como por exemplo, o raio celular, a constante de difusão de VEGF, a mobilidade das células endoteliais e o coeficiente de resposta quimiotática. No entanto, neste trabalho realiza-se a variação de cada um desses parâmetros individualmente, de forma a entender a influência de cada um deles na morfologia vascular.

Por outro lado, coeficientes como T_c , valor mínimo de concentração de fator angiogênico para ramificação, e o α_T , a taxa de consumo de VEGF, são obtidos através cálculos teóricos analíticos. Para isso, resolve-se uma versão simplificada da equação diferencial (3.9), utilizando apenas uma dimensão e avaliando condições de contorno específicas.

Parâmetro	Significado	<i>in silico</i>	<i>in vivo</i>
	Unidade de rede	1	1,25 μm
	Unidade de tempo	1	26min
R_c	Raio celular	4	5 μm [56]
D	Constante de difusão de VEGF	100	10 ⁻¹³ m ² /s [57]
M	Mobilidade de células endoteliais	1	10 ⁻¹⁵ m ² /s [57]
d	Distância de difusão de oxigênio	20	25 μm
$\alpha_T = D/R_c^2$	Taxa de consumo de fator ang.	6,25	0,004s ⁻¹
ε	Espessura da interface	1	1,25 μm
χ	Constante de Resposta Quimiotática	200 ~ 2000	
T_s	Conc. de VEGF na fonte	0,82 ~ 2,0	
T_p	Conc. de VEGF para proliferação máxima	0,3	
T_c	Conc. de VEGF para ramificação	0,15 ~ 0,32	
G_M	Grad. de VEGF para velocidade máxima	0,03	0,0375a.u./ μm
G_m	Grad. de VEGF para ramificação	0,01	0,0125a.u./ μm

Tabela 4.1 - Valores dos parâmetros utilizados na simulação, em unidades reduzidas e reais. Os parâmetros χ , T_s e T_c foram definidos dentro dos intervalos indicados acima, para cada simulação.

4.6 Fluxograma

Apresenta-se abaixo, na Fig 4.5, o fluxograma resumido do programa implementado para a simulação da angiogênese.

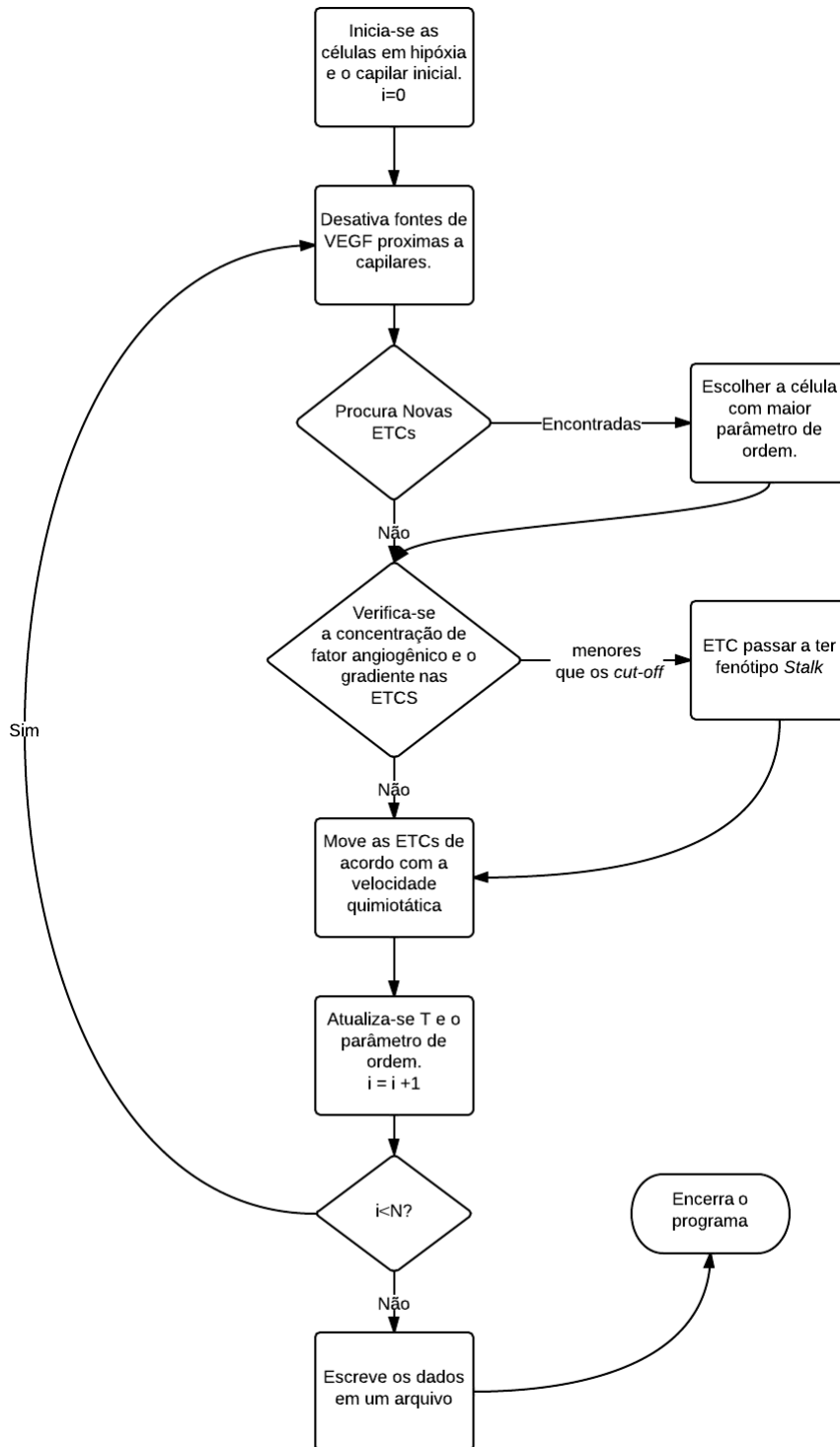


Figura 4.5 - Fluxograma mínimo utilizado para o código da angiogênese.

5 DISCUSSÕES E RESULTADOS

Neste capítulo apresentar-se-á os resultados obtidos e as respectivas discussões. Para obter os resultados aqui expostos, utilizou-se a configuração inicial descrita na Seção 4.1, ou seja, um vaso sanguíneo inicial rodeado por fontes de VEGF. As condições de fronteira são periódicas em todas as direções e a parametrização padrão utilizada foi a descrita na Tabela 4.1, com exceção da concentração crítica de VEGF para ramificação que foi alterada para $T_c = 0,15$, de modo a observarem-se vários eventos de ramificação. Para estudar o comportamento do sistema em função dos parâmetros, apenas um parâmetro é variado em cada simulação, mantendo-se os outros fixos. As simulações tiveram uma duração *in vivo* de aproximadamente 11h, o que é razoável pois em experimentos com culturas há o aparecimento de estruturas com elevada densidade de ramificação em apenas 24h. Com 11h já observa-se o crescimento de vasculaturas, sendo recomendado simulações entre 8h e 48h. Valores acima de 48h apresentam saturação de vasos sanguíneos [58].

Na simulação, é observado que as células em hipóxia produzem VEGF e esse difunde pelo tecido, aumentando a concentração ao redor do vaso inicial. Em um determinado ponto, o VEGF consegue atingir as primeiras camadas no interior do vaso sanguíneo, alcançando a concentração crítica para ramificação T_c . Neste momento, as células endoteliais atingem um dos critérios para ativação do fenótipo ETC, sendo preciso ainda haver um gradiente mínimo para ramificação G_m . Ao atingirem esses valores, células do tecido são ativadas e migram pela ECM em resposta quimiotática. Simultaneamente à migração, as células endoteliais próximas à célula ativa proliferam e seguem a ETC pelo tecido, assumindo assim o fenótipo ESC. Os novos ramos estabelecidos consomem o VEGF, diminuindo assim a sua concentração na ECM (Fig. 5.1). Após o estabelecimento de fluxo sanguíneo nas novas vasculaturas, são desativadas as fontes de VEGF. A curva de desativação das fontes em função do tempo está relacionada com a taxa de invasão das ramificações no tecido (Fig. 5.2).

Para uma determinada combinação de parâmetros, há a promoção de morfologias fractais, com vasculaturas cada vez mais finas partindo de vasos de maior calibre. Além disso, anastomoses são recorrentes, quando duas ou mais ETCs migram em direção a mesma fonte de VEGF proporcionando a união dos ramos formados. Por outro lado, quando a velocidade quimiotática é elevada, ou quando a taxa de proliferação celular é baixa, estenoses¹ são comuns conduzindo ao rompimento de ramificações (Fig. 5.3).

O comportamento descrito acima, sugere que as morfologias resultantes da angiogênese

¹Estenose pode ser a constrição de um vaso sanguíneo, de um órgão ou de uma estrutura tubular do corpo.

são consequência de um delicado balanço entre a taxa de proliferação celular e resposta quimiotática das ETCs, sendo esses parâmetros complementares um ao outro. Os dois parâmetros agem diretamente sobre a espessura dos vasos e na densidade de ramificações, bem como na manutenção de redes vasculares funcionais. Esses resultados estão de acordo com dados experimentais [59, 60] e com anteriores estudos sobre o modelo [21, 24, 40].

A concentração de VEGF nas fontes (T_s) também tem um importante papel: o seu valor está diretamente relacionado com o número de ramificações da rede. Valores elevados de T_s conduzem a uma maior densidade de ramificações. Apesar desse parâmetro não contribuir diretamente para o calibre dos vasos, a alta densidade de vasos proporcionada por concentrações elevadas de VEGF favorece a fusão de ramos paralelos próximos, criando assim alguns vasos de maior calibre que a média (fenômeno observado em experiências *in vivo* com alta concentração de VEGF [61, 62]). Todavia, para baixa concentração de VEGF não é observada a ativação de células de ponta e nenhum ramo é formado. Nesse trabalho determinou-se esse valor como sendo $T_s < 0,84$ para o modelo tridimensional, sendo que Travasso *et al.* [21] determinou $T_s < 0,7$ para a implementação bidimensional. Para valores baixos de T_s , mas suficientes para ativar ETCs, verifica-se ramos esparsos e poucas ativações. Esses comportamentos também foram reportados por Haigh *et al.* [59], em seu trabalho experimental *in vivo*.

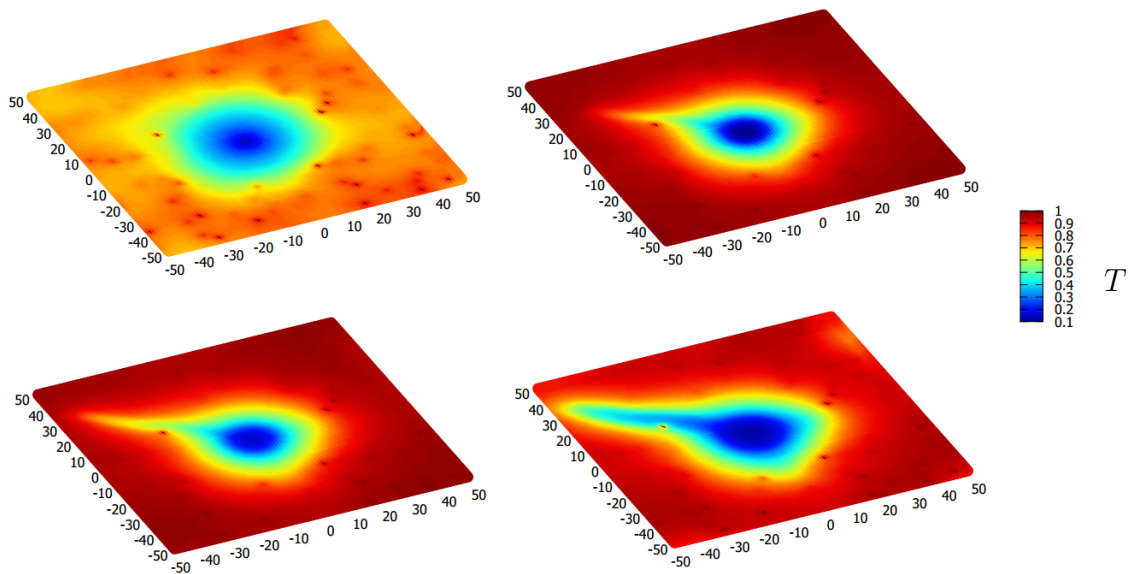


Figura 5.1 - Da esquerda para a direita, de cima para baixo, o gráfico mostra a evolução da concentração de VEGF no meio para um plano do sistema tridimensional. A região de mais baixa concentração de VEGF coincide com a presença de vasos sanguíneos.

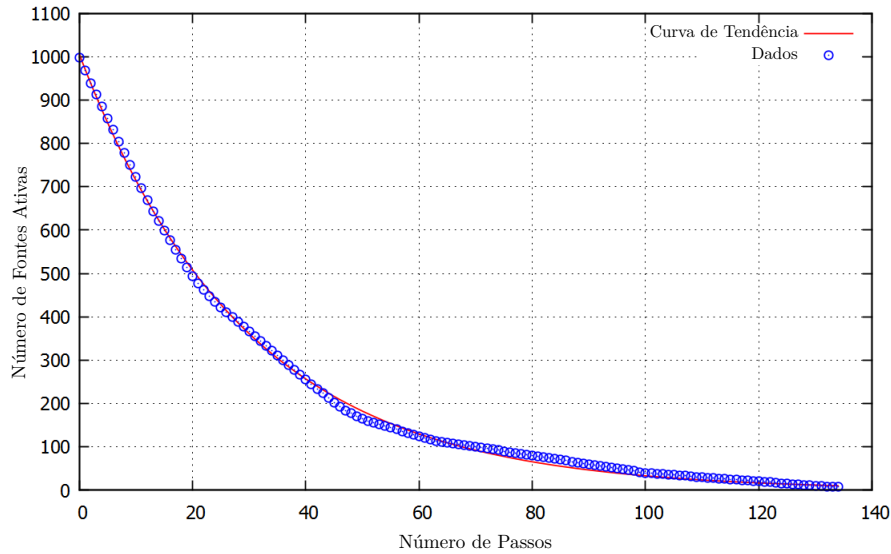


Figura 5.2 - A curva de desativação de VEGF em função do tempo dá a taxa de invasão da nova vasculatura na ECM. Os dados apresentam um bom ajuste para uma curva de decaimento exponencial. Variações na velocidade do decaimento dão-se devido a novas ativações de ETCs, que fazem com que mais fontes sejam desativadas em um curto espaço de tempo.

5.1 Estudo Qualitativo dos Parâmetros

Foi observado que para um valor baixo de proliferação celular ($\alpha_p T_p = 0, 20\text{hr}^{-1}$) as novas ramificações são mais finas (Fig. 5.3) e menos ramificadas, enquanto que para valores mais elevados ($\alpha_p T_p = 1, 03\text{hr}^{-1}$) há um aumento de calibre (Fig. 5.4) e ocorrência de mais ramificações (comparar Fig. 5.5 e Fig. 5.6). Além disso, os resultados sugerem um valor mínimo crítico para α_p , em que os novos vasos deixam de ser funcionais ao romperem a sua ligação com o vaso principal.

Além de α_p , os resultados também mostram uma dependência entre a espessura dos vasos sanguíneos e a resposta quimiotática χ . Quanto menor o valor de χ , ou seja, quanto menor a velocidade das ETCs, mais espessas são as ramificações resultantes da migração celular. Para $\chi G_M = 0, 28\mu\text{m}/\text{min}$, um valor considerado baixo, as ETCs quase não migram pela ECM e geram vasos com uma espessura mais elevada (Fig. 5.7). Em contrapartida, para $\chi G_M = 2, 88\mu\text{m}/\text{min}$ as ETCs migram mais rapidamente pelo tecido e produzem vasos mais estreitos (Fig. 5.8).

Existe um balanço entre χ e α_p para a produção de vasos sanguíneos funcionais, pois se a velocidade quimiotática for muito elevada e a taxa de proliferação for baixa, pode não ocorrer o estabelecimento do vaso. A célula pode difundir com uma velocidade em que o volume percorrido é muito maior do que o volume de material endotelial produzido. Além disso, as figuras 5.9 e 5.10 sugerem que com valores de χ mais altos observam-se mais

ramificações e bifurcações do que com valores mais baixos.

A análise realizada para a concentração de VEGF nas fontes (T_s) mostra que a variação desse parâmetro não influencia no calibre das novas ramificações. No entanto, o seu valor está relacionado com o número de ETCs ativas e, conseqüentemente, com o número de ramificações originadas dessa migração. Valores elevados de VEGF são responsáveis por produzirem redes sanguíneas funcionais, sendo recorrente o aparecimento de anastomoses. Como pode-se observar comparando a Fig. 5.11 e a Fig. 5.12. O número de ramificações é diretamente proporcional a T_s , para $T_s = 2,0$ observa-se uma rede de grande complexidade, enquanto que para $T_s = 0,85$ o número de ramificações é ínfimo e não funcional (comparar Fig. 5.13 e Fig. 5.14).

5.1.1 Proliferação Celular α_p

Os resultados desta seção foram obtidos para os parâmetros $T_s = 1,0$, $\chi = 1000$ e foram feitas duas realizações para $\alpha_p = \{0,3; 1,5\}$.

A Fig. 5.3, relativa à $\alpha_p = 0,3$, apresenta poucas ramificações e muitos vasos defeituosos. É possível notar o estreitamento e conseqüente rompimento de várias vasculaturas, demonstrando que a taxa de proliferação celular tem uma relação direta com o calibre dos vasos e a sua funcionalidade.

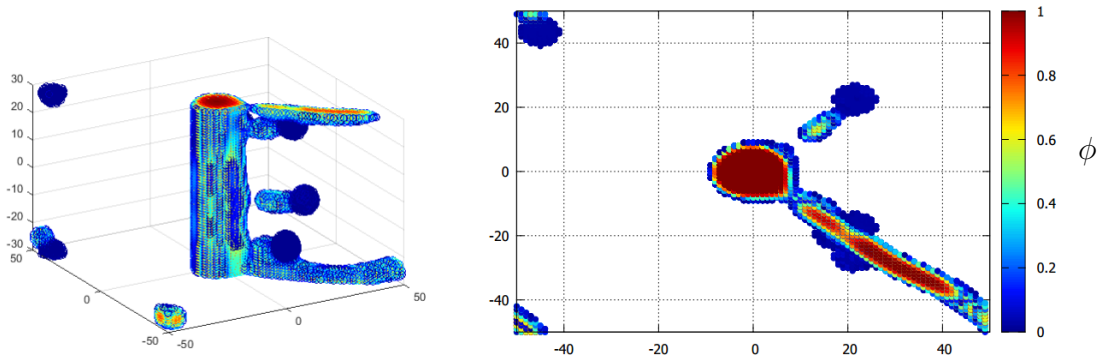


Figura 5.3 - Morfologia obtida para $\alpha_p T_p = 0,20\text{hr}^{-1}$. Para um valor baixo de proliferação celular é recorrente o estreitamento e conseqüente rompimento dos vasos sanguíneos. Isso ocorre pois as ETCs migram com uma certa velocidade e não há tempo suficiente para a produção de tecido endotelial necessário para o amadurecimento do vaso, devido a baixa taxa de proliferação. À esquerda, a rede vascular está em perspectiva e à direita utilizou-se a vista superior para facilitar a medida do calibre dos vasos.

Por outro lado, verifica-se que o aumento da taxa de proliferação celular para $\alpha_p = 1,5$,

conduz também ao aumento do calibre das novas vasculaturas (ver Fig. 5.4). No entanto, não verifica-se a presença de vasos sanguíneos funcionais, indicando que a proliferação celular não age sozinha no amadurecimento dos vasos.

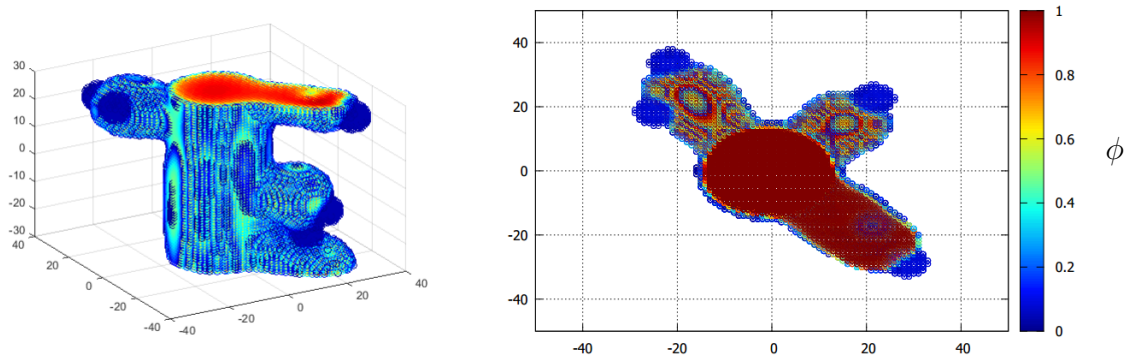


Figura 5.4 - Morfologia obtida para $\alpha_p T_p = 1,03\text{hr}^{-1}$. O aumento de calibre dos vasos sanguíneos é característico de valores elevados de taxa de proliferação celular. Taxas elevadas favorecem também a fusão de ramificações, como as observadas na figura.

Os gráficos obtidos pelo método de *thinning*, Fig. 5.5 e Fig. 5.6, ressaltam os efeitos observados nos gráficos anteriores. A variação no número de vasos sanguíneos gerados não é significativa, bem como a maturidade dos mesmos.

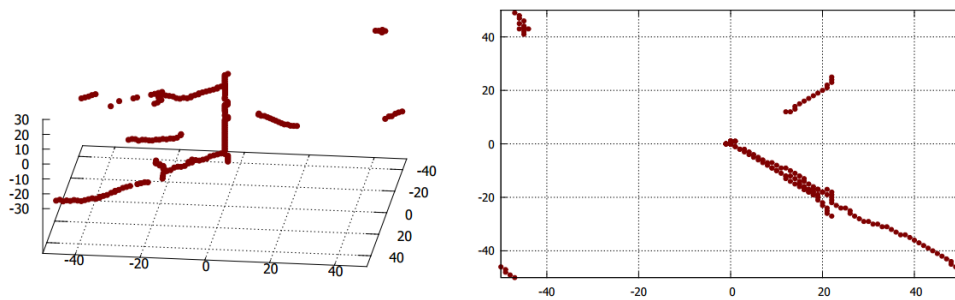


Figura 5.5 - Morfologia obtida para $\alpha_p T_p = 0,20\text{hr}^{-1}$. O esqueleto topológico para baixos valores da taxa de proliferação salienta a falta de funcionalidade da rede. Foram formadas poucas ramificações e as poucas formadas sofreram o rompimento do vaso sanguíneo principal.

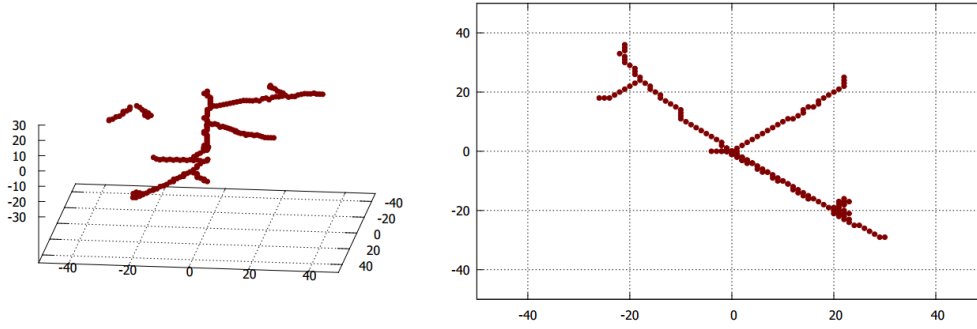


Figura 5.6 - Morfologia obtida para $\alpha_p T_p = 1,03 \text{hr}^{-1}$. O número de ramificações para valores mais elevados de proliferação celular aumenta, podendo-se observar ainda a formação de ramificações partindo das novas ramificações. Isso indica que a taxa de proliferação é essencial para a criação de redes funcionais.

5.1.2 Resposta Quimiotática χ

Os resultados desta seção foram obtidos para os parâmetros $T_s = 1,0$, $\alpha_p = 0,3$ e foram feitas duas realizações para $\chi = \{200, 1000\}$.

A Fig. 5.7 apresenta a morfologia obtida para uma resposta quimiotática de $\chi = 200$, demonstrando resultados semelhantes aos obtidos para uma taxa de proliferação celular de $\alpha_p = 1,5$. Ou seja, os vasos sanguíneos são de elevado calibre e não recebem fluxo sanguíneo.

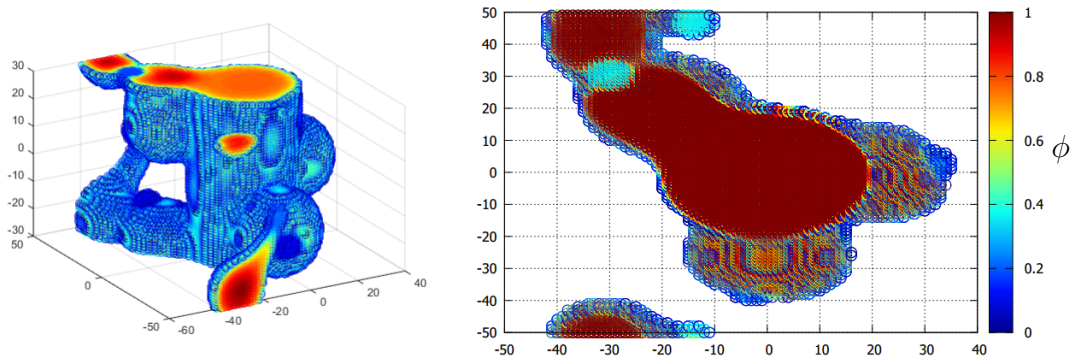


Figura 5.7 - Morfologia obtida para $\chi G_M = 0,28 \mu\text{m}/\text{min}$. É notório o aumento do calibre dos vasos com a diminuição de χ , alcançando em torno de $27 \mu\text{m}$ de diâmetro.

Em contraste, a rede vascular obtida para $\chi = 2000$ (Fig. 5.8) é semelhante a rede obtida

para $\alpha_p = 0,3$, com vasos sanguíneos de menor calibre e mais longos. No entanto, para esse caso as ramificações obtidas são mais maduras e, inclusive, apresentam fluxo sanguíneo não nulo devido a ocorrência de anastomose. Esse comportamento indica que a qualidade das novas vasculaturas é consequência de um equilíbrio entre os dois parâmetros α_p e χ , sendo esses complementares um ao outro.

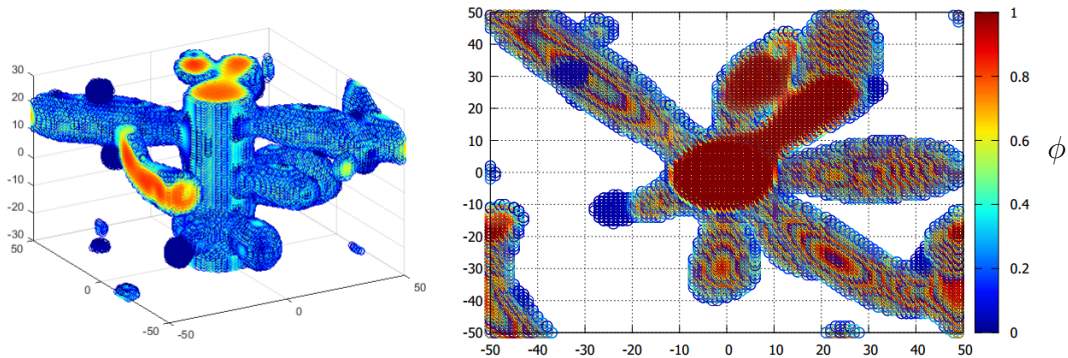


Figura 5.8 - Morfologia obtida para $\chi G_M = 2,88\mu\text{m}/\text{min}$. É possível observar que para χ elevado o calibre dos vasos sanguíneos diminui consideravelmente, apresentando ramificações com diâmetros em torno de $17\mu\text{m}$. Esse comportamento está relacionado com a redução do tempo para proliferação celular enquanto a ETC migra a uma velocidade elevada.

Ao comparar as figuras 5.9 e 5.10, pode-se constatar um maior número de ramificações, para um maior valor de χ . Isso deve-se pois, para uma velocidade quimiotática maior, há o estabelecimento de mais ramos em um menor intervalo de tempo. Ressalta-se ainda que para $\chi = 200$ não há anastomose, enquanto que para $\chi = 2000$ ocorre uma anastomose, permitindo assim irrigação sanguínea no tecido.

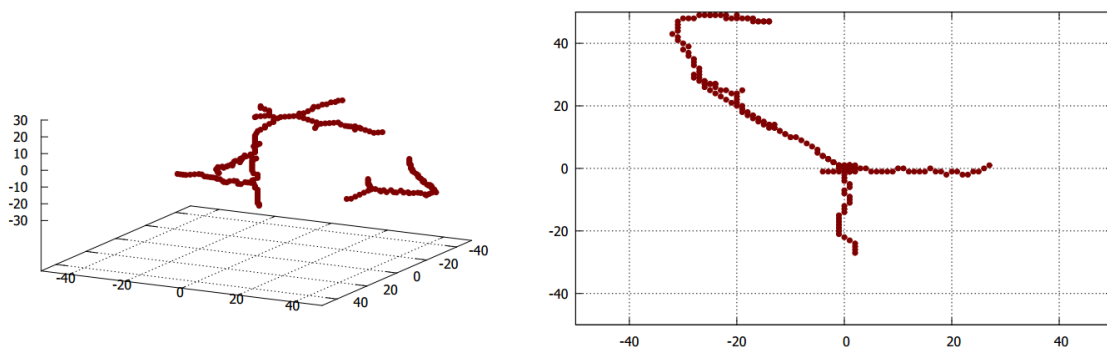


Figura 5.9 - Esqueleto topológico para $\chi = 0,28\mu\text{m}/\text{min}$. Apresenta baixa taxa de ramificação (7 novos vasos) devido às ETCs não migrarem com velocidade suficiente.

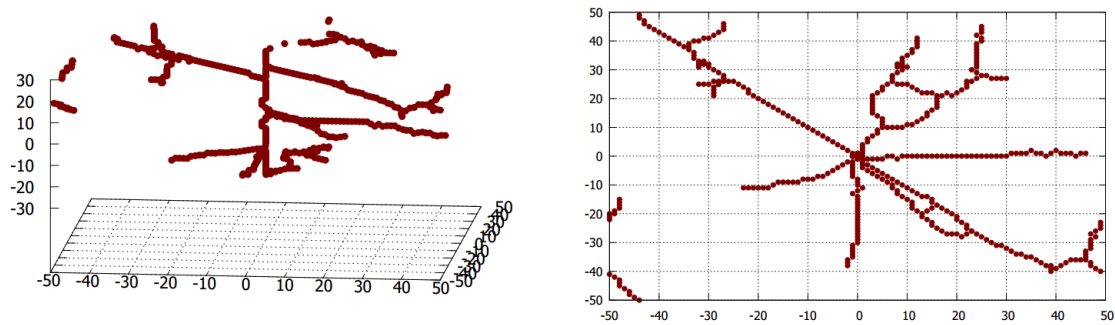


Figura 5.10 - Esqueleto topológico para $\chi G_M = 2, 8 \mu\text{m}/\text{min}$. O número de ramificações aumenta consideravelmente com χ (13 novos vasos).

5.1.3 Concentração de VEGF nas Fontes T_s

Os resultados desta seção foram obtidos para os parâmetros $\chi = 1000$ e $\alpha_p = 1$, apresentando-se duas simulações para $T_s = \{0, 85; 2, 00\}$ (mais simulações foram realizadas para determinar o valor mínimo de T_s que ainda permite ativações de ETCs).

As morfologias obtidas para as variações de α_p e χ mostraram que esses dois parâmetros não são decisivos no número de ramificações, mas agem na determinação da funcionalidade dos vasos, *i.e.*, no comprimento e largura dos mesmos. Contudo, deve haver um parâmetro responsável pelo número de ETCs ativas e, conseqüentemente, na densidade de vasos sanguíneos.

Assim, ao realizar a variação de T_s verificou-se que esse mantém um importante papel na ativação das células endoteliais, requerendo um valor mínimo de VEGF nas fontes para a ocorrência de ETCs ativas (aqui determinado por $T_s = 0, 84$). A Fig. 5.11 corrobora com o observado experimentalmente: para um baixo valor de VEGF nas fontes, há pouca densidade de ramificações.

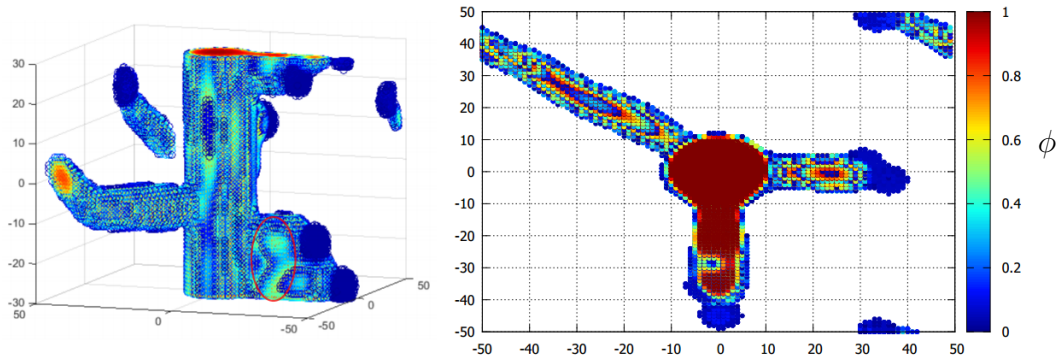


Figura 5.11 - A rede foi obtida para $T_s = 0,85$, próximo ao mínimo de concentração nas fontes para que ainda haja ramificações. Com baixa concentração o número de ETCs ativos diminui, pois o VEGF é o principal catalisador da angiogênese. Em destaque, a fusão de dois vasos sanguíneos paralelos, fenômeno ocorre também *in vivo* e *in vitro*.

De uma outra forma, ao aumentar-se o valor para a concentração de VEGF nas fontes, o número de ativações de ETCs aumenta, concomitante ao número de vasos sanguíneos formados. Todavia, não se verifica a alteração do calibre dos vasos, nem no comprimento médio dos mesmos. Ou seja, o parâmetro T_s é responsável por outra parte da dinâmica da angiogênese, diferente do observado para α_p e χ .

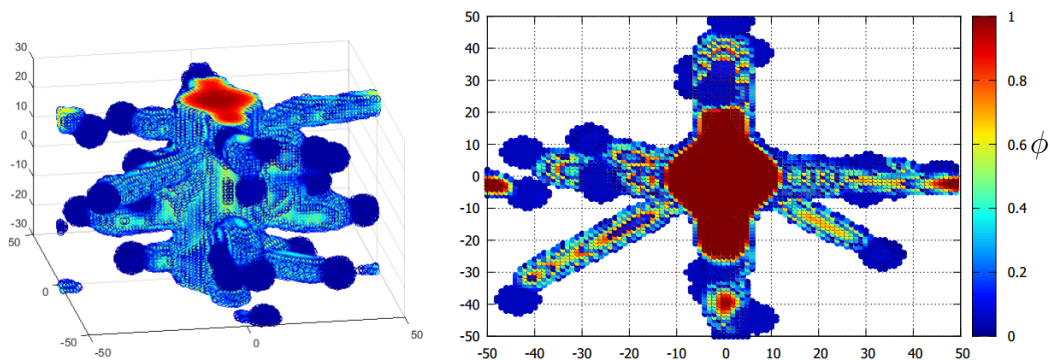


Figura 5.12 - Valores elevados de concentração de VEGF ($T_s = 2,00$) nas células em hipóxia conduzem à muitas ativações de ETCs. A migração das células ativas leva a criação de um elevado número de vasos sanguíneos.

As topologias obtidas por *thinning* auxiliam na contabilização de vasos sanguíneos e na observação de anastomoses. A Fig. 5.13 apresenta poucos vasos e nenhuma anastomose, enquanto que a Fig. 5.14 apresenta uma elevada densidade de vasos e também uma anastomose, indicando a presença de fluxo sanguíneo.

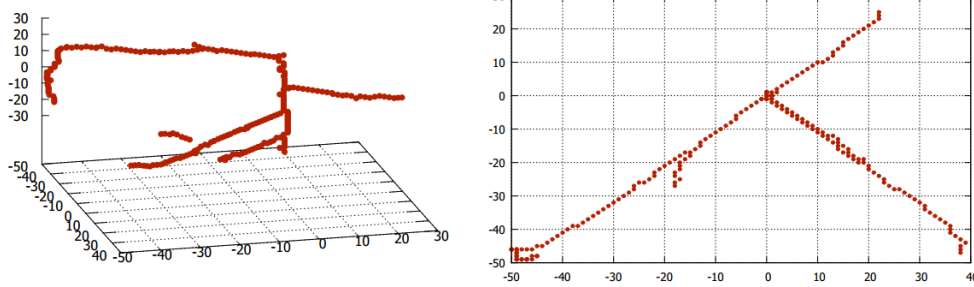


Figura 5.13 - Valores baixos de concentração de VEGF ($T_s = 0,85$) nas células em hipóxia conduzem à poucas ativações de ETCs, conseqüentemente poucos ramos são estabelecidos. No entanto, variações nesse parâmetro não remetem à alteração no calibre dos vasos.

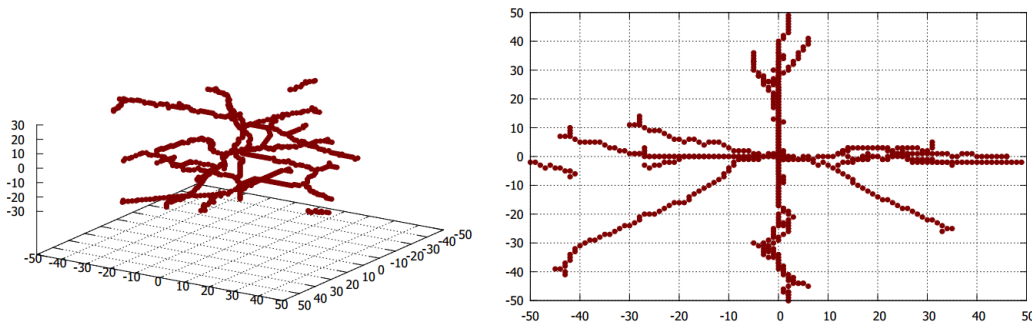


Figura 5.14 - Através das linhas médias é possível uma melhor visualização da morfologia na presença de muitos vasos. Nesse gráfico, obtido para $T_s = 2$, há a presença de anastomoses, de difícil constatação na imagem completa.

5.2 Acoplamento do Fluxo Sanguíneo

O acoplamento do fluxo sanguíneo foi realizado, apresentando resultados preliminares promissores. A Fig. 5.15 mostra a irrigação em duas redes vasculares, uma simples e outra mais complexa. Na primeira, o fluxo sanguíneo Q mantém-se apenas no ramo principal, não sendo o novo ramo funcional. É possível realizar os cálculos analíticas para verificar esse resultado, sendo essas consistentes com o resultado numérico apresentado. A segunda rede tem um nível de complexidade elevado, mesmo assim o algoritmo foi capaz de determinar o fluxo no ramo principal e em um vaso secundário que atravessa a caixa de simulação de um lado ao outro. Os outros ramos aparentemente não recebem fluxo sanguíneo.

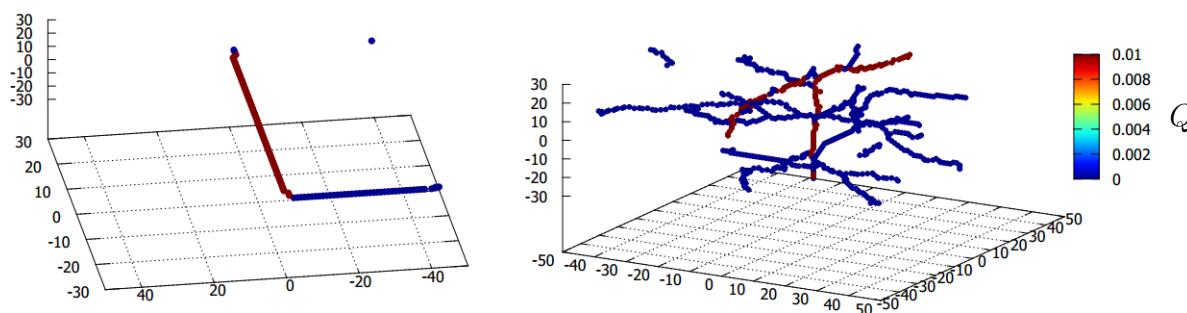


Figura 5.15 - Duas redes vasculares e suas respectivas irrigações sanguíneas, representadas pelo fluxo Q na barra de cores. À esquerda, uma rede simples apenas com o vaso sanguíneo principal com fluxo sanguíneo. À direita, uma rede complexa com mais ramificações, há fluxo no vaso principal e em uma ramificação que completou a anastomose.

5.2.1 Desafios Encontrados

O método para extrair as linhas médias apresentou um problema para a sua aplicação neste trabalho. Como o método utilizado preserva a topologia tridimensional, ele está preparado para extrair não apenas linhas médias, mas também superfícies. Isso torna-se um problema quando combinado com a angiogênese, pois nas simulações podem ocorrer flutuações do parâmetro de ordem no interior dos vasos sanguíneos, as vezes ocasionadas pela ativação de ETCs ou a formação de anastomose entre dois ou mais vasos. Essas flutuações fazem com que hajam “buracos” dentro dos vasos, o que faz com que o algoritmo de *thinning* crie superfícies em torno deles. Quando isso acontece o programa identifica esses pontos com muitos vizinhos como nodos, fazendo um cálculo errôneo do fluxo sanguíneo naquela região. A Fig. 5.16 ilustra uma dessas situações.

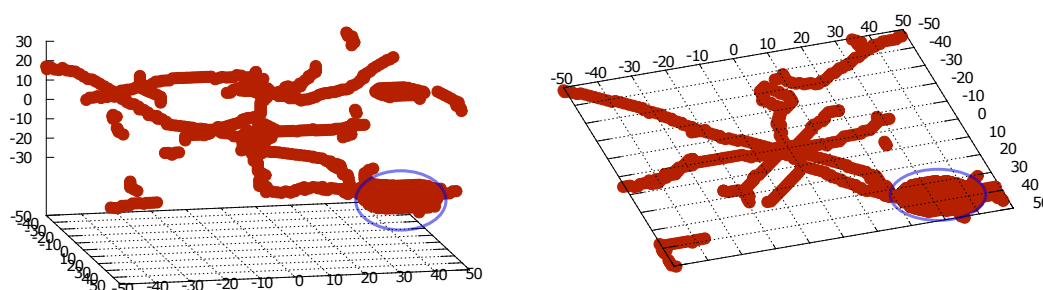


Figura 5.16 - Os gráficos mostram o esqueleto morfológico, resultado de uma simulação, a partir de duas perspectivas. Os círculos salientam a superfície indesejada extraída pelo algoritmo de esqueletização.

Esse problema pode ser contornado identificando quando essa situação ocorre e fazendo com que a simulação continue por mais passos de tempo, suficientes para que essa flutuação seja eliminada pela proliferação celular. Vale lembrar ainda que a ocorrência desse tipo de estrutura é rara, portanto não traz muitos transtornos na obtenção de dados.

5.3 Teste de Eficiência Computacional

Ao implementar-se a angiogênese sobre o projeto Octopus, proporcionou-se um ganho de desempenho extraordinário. Realizando a implementação sem o Octopus, o tempo computacional de uma simulação para um sistema 100x100x60 para 11h *in vivo* demora em torno de 1h reais. Na atual implementação, em série, conseguiu-se diminuir esse tempo para apenas 26min. Ambas as implementações comparadas foram testadas em um Intel Core i7-2600 CPU 3.40GHz. Além disso, com a implementação em paralelo pode-se reduzir ainda mais esse tempo.

5.3.1 Implementação em Série

É importante determinar a curva que relaciona o tempo computacional com o tamanho do sistema (Fig. 5.17), pois busca-se alcançar sistemas de ordens de grandeza elevadas, assim é imprescindível uma estimativa prévia acerca do recurso computacional necessário. Os dados foram obtidos em um computador Intel Core i5 M480 CPU 2.67 GHz com 4 núcleos de processamento, memória RAM de 4Gb e sistema operacional Debian.

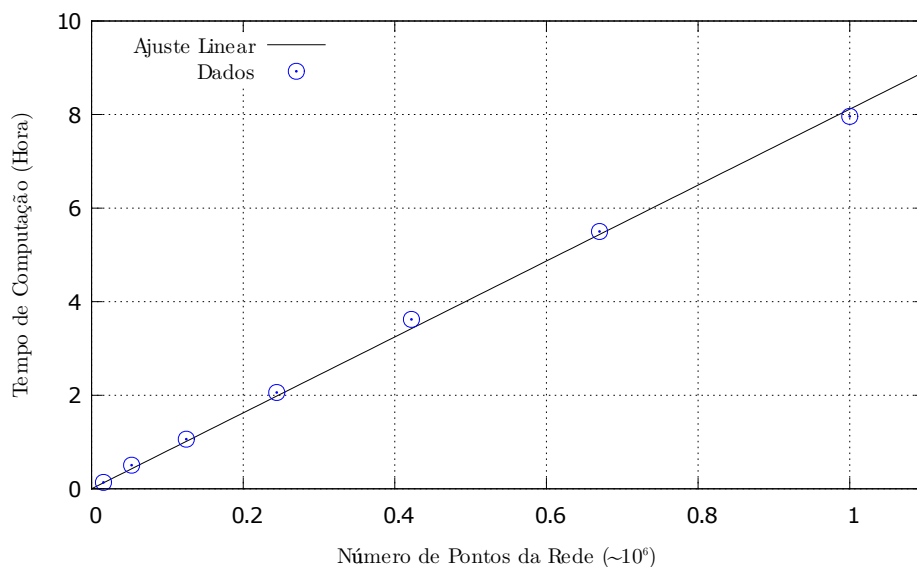


Figura 5.17 - Determinação dos recursos computacionais necessários em função do número de pontos utilizados na rede discreta. O número de pontos está normalizado pelo máximo utilizado no gráfico (4096000 pontos). Foram realizadas um milhão de iterações para cada simulação.

5.3.2 Implementação em Computação Paralela

A implementação em paralelo traz um notável ganho computacional utilizando MPI, podendo-se diminuir para a metade do tempo o custo computacional exigido para efetuar os cálculos.

A Fig. 5.18 apresenta um padrão do tipo dente de serra, com uma periodicidade no número de processadores. Isso ocorre pois a topologia utilizada no sistema é cúbica, logo a forma mais eficiente para dividir o sistema é em pequenos cubos, minimizando as interfaces e o tempo de *overhead*².

A implementação realizada em paralelo apresentou problemas relativos a alocação de memória para sistemas com uma ordem de grandeza elevada. Esse problema pode ser em virtude da replicação de matrizes globais em todos os processadores. Atualmente, os desenvolvedores do projeto Octopus estão removendo todas as matrizes replicadas do código, de forma a evitar esse tipo de problemas. Com base nestes resultados, a finalização do código em paralelo em um futuro próximo se torna altamente recomendada.

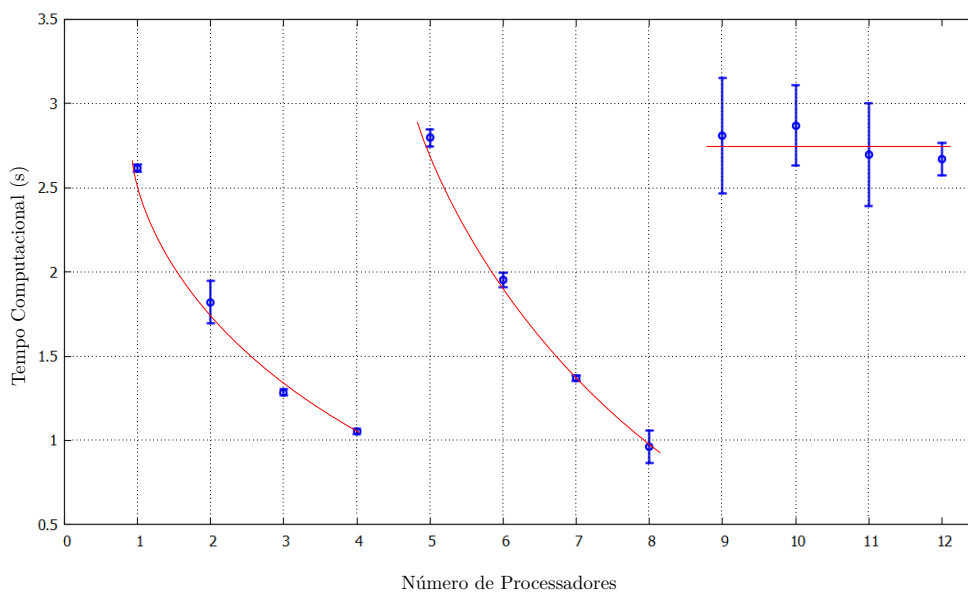


Figura 5.18 - Tempo computacional em função do número de processadores utilizados em paralelo. As curvas em vermelho são apenas linhas auxiliares.

²*Overhead* é o termo cunhado para referenciar o tempo de comunicação entre os processadores.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho realizou-se um estudo multidisciplinar acerca da angiogênese. Foi realizada uma breve revisão sobre os aspectos biológicos do processo em estudo, assim como a sua contextualização no meio clínico e científico. Discutiu-se ainda uma abordagem física do problema, utilizando um modelo de interface difusa para modelar o crescimento dos vasos sanguíneos.

Foram propostas melhorias ao modelo e também a nível de otimização computacional. Uma delas foi a implementação do programa para angiogênese sobre o projeto Octopus, tendo como motivação o aumento de eficiência computacional para o estudo de sistemas com a ordem de grandeza de tumores. Essa implementação demonstrou resultados promissores, diminuindo em até 50% o tempo computacional de cada simulação em relação a códigos anteriores. As melhorias a nível do modelo consistiram na implementação de um método para extração das linhas médias, permitindo melhores análises das morfologias obtidas e a quantificação de parâmetros como a densidade de ramificação. Além disso, utilizou-se esse método para a determinação do fluxo sanguíneo na rede, acoplando essa informação com a desativação das fontes de VEGF.

Foram realizadas análises qualitativas e verificadas as dependências morfológicas da angiogênese em função dos parâmetros do modelo, tais como: a taxa de proliferação celular α_p , a velocidade quimiotática χ e a concentração de VEGF nas fontes T_s . Mostrou-se que os parâmetros χ e α_p funcionam de forma a complementarem-se, agindo em conjunto na determinação do calibre e densidade das novas vasculaturas. Por outro lado, a disponibilidade de VEGF no tecido através da concentração T_s age diretamente sobre o número de ativações de ETCs e na densidade de ramificação. Maiores concentrações de VEGF levam a redes mais vascularizadas e funcionais. Esses resultados estão de acordo com os dados experimentais da literatura e também com implementações anteriores do modelo. Além disso, demonstrou-se a funcionalidade do algoritmo na determinação do fluxo sanguíneo.

Por conseguinte, este trabalho apresenta um vasto horizonte de novas perspectivas para o estudo da angiogênese patológica, permitindo explorar análises quantitativas e a influência do fluxo sanguíneo nesse fenômeno. Os resultados obtidos estão em concordância com dados experimentais e demonstram uma descrição mais precisa do sistema de estudo, indicando que a abordagem utilizada é promissora.

A - EQUAÇÃO DA INTERFACE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Neste apêndice realizar-se-á a dedução da Eq. (3.6), que modela a dinâmica da interface entre os vasos sanguíneos e a matriz extracelular, através da evolução temporal do parâmetro ϕ que caracteriza a fase do sistema. Além disso, a proliferação celular está descrita pelo segundo termo da equação. O primeiro termo dessa equação é escrito através de uma lei de conservação

$$\partial_t \phi = -\nabla \cdot \mathbf{j}, \quad (\text{A.1})$$

com

$$\mathbf{j} = -\nabla \mu, \quad \mu = \frac{\delta F[\phi]}{\delta \phi} \quad (\text{A.2})$$

onde μ é o potencial químico proveniente de $F[\phi]$, o funcional de energia livre do parâmetro de ordem ϕ .

A energia funcional de Ginzburg-Landau é dada por

$$F[\phi] = \int \left[V(\phi) + \frac{\varepsilon^2}{2} |\nabla \phi|^2 \right] dr, \quad (\text{A.3})$$

sendo a função $V(\phi)$ dada pelo potencial

$$V(\phi) = -\frac{\phi^2}{2} + \frac{\phi^4}{4}. \quad (\text{A.4})$$

As soluções estáveis do potencial são obtidas realizando a diferenciação,

$$\partial_\phi V = -\phi + \phi^3 = 0, \quad (\text{A.5})$$

ou seja, os extremos do potencial são dados para $\phi = \{\pm 1, 0\}$.

Para obter o potencial químico μ será necessário realizar a derivada funcional da energia livre, substituindo o potencial V na Eq. (A.3)

$$F[\phi] = \int \left[-\frac{\phi^2}{2} + \frac{\phi^4}{4} + \frac{\varepsilon^2}{2} |\nabla \phi|^2 \right] dr, \quad (\text{A.6})$$

assim, a derivada funcional será obtida fazendo

$$\int \frac{\delta F}{\delta \phi} \delta \phi dr = F[\phi + \delta \phi] - F[\phi] \quad (\text{A.7})$$

onde $F[\phi + \delta\phi]$ é dado por

$$\int \left[-\frac{(\phi + \delta\phi)^2}{2} + \frac{(\phi + \delta\phi)^4}{4} + \frac{\varepsilon^2}{2} |\nabla(\phi + \delta\phi)|^2 \right] dr, \quad (\text{A.8})$$

desenvolvendo os expoentes

$$\int \left[-\frac{\phi^2 + 2\phi\delta\phi + \delta\phi^2}{2} + \frac{\phi^4 + \delta\phi^4 + 4\phi^3\delta\phi + 6\phi^2\delta\phi^2 + 4\phi\delta\phi^3}{4} + \frac{\varepsilon^2}{2} [(\nabla\phi)^2 + 2\nabla\phi \cdot \nabla\delta\phi + (\nabla\delta\phi)^2] \right] dr, \quad (\text{A.9})$$

considerando que $\delta\phi$ é muito pequeno, pode-se considerar apenas expoentes de primeira ordem, assim

$$\int \left[-\frac{\phi^2 + 2\phi\delta\phi}{2} + \frac{\phi^4 + 4\phi^3\delta\phi}{4} + \frac{\varepsilon^2}{2} [(\nabla\phi)^2 + 2\nabla\phi \nabla\delta\phi] \right] dr, \quad (\text{A.10})$$

Deste modo,

$$F[\phi + \delta\phi] - F[\phi] = \int \left[-\frac{\phi^2 + 2\phi\delta\phi - \phi^2}{2} + \frac{\phi^4 + 4\phi^3\delta\phi - \phi^4}{4} + \frac{\varepsilon^2}{2} [(\nabla\phi)^2 + 2\nabla\phi \nabla\delta\phi - (\nabla\phi)^2] \right] dr, \quad (\text{A.11})$$

$$F[\phi + \delta\phi] - F[\phi] = \int [\phi\delta\phi + \phi^3\delta\phi + \varepsilon^2\nabla\phi \nabla\delta\phi] dr, \quad (\text{A.12})$$

Integrando o termo $\varepsilon^2\nabla\phi \nabla\delta\phi$ por partes e considerando que o primeiro termo dessa integração $\delta\phi \nabla\phi$ é nulo, devido as condições de fronteira periódicas, temos

$$F[\phi + \delta\phi] - F[\phi] = \int [(-\phi + \phi^3 - \varepsilon^2\nabla^2\phi)\delta\phi] dr, \quad (\text{A.13})$$

retomando a Eq. (A.7), a derivada funcional será então

$$\mu = \frac{\delta F}{\delta\phi} = -\phi + \phi^3 - \varepsilon^2\nabla^2\phi. \quad (\text{A.14})$$

Inserindo a Eq. (A.14) na Eq. (A.1), obtemos a equação de Cahn-Hilliard

$$\partial_t\phi = \nabla^2(-\phi + \phi^3 - \varepsilon^2\nabla^2\phi). \quad (\text{A.15})$$

O termo proliferativo foi elaborado de acordo com um modelo logístico [63] considerando duas populações: a concentração proteica T e as células endoteliais representadas por $\phi > 0$. Para garantir que a proliferação será apenas das ECs, não permitindo proliferar a ECM ($\phi < 0$), foi introduzida a função de Heaviside $\Theta(\phi)$. Assim, a equação completa é dada por

$$\partial_t \phi = M \nabla(-\phi + \phi^3 - \varepsilon^2 \nabla^2 \phi) + \alpha_p(T) \phi \Theta(\phi). \quad (\text{A.16})$$

onde $\alpha_p(T) = \alpha_p T$, com um máximo em $\alpha_p T_p$.

B - DEDUÇÃO DA EQUAÇÃO DOS FATORES ANGIOGÊNICOS

Neste apêndice vamos demonstrar a obtenção da Eq. (3.9) que descreve a evolução temporal da concentração de fatores angiogênicos na matriz extracelular. Para isso, parte-se da segunda Lei de Fick para a continuidade, que relaciona a difusão de concentração no meio com a variação temporal da mesma, dada pela equação diferencial parcial

$$\partial_t T + \nabla \cdot \mathbf{J} = 0. \quad (\text{B.1})$$

Lembrando ainda, da primeira Lei de Fick, o fluxo \mathbf{J} é dado por

$$\mathbf{J} = -D\nabla T, \quad (\text{B.2})$$

podendo-se substituir (B.2) em (B.1) e obtêm-se assim

$$\partial_t T - \nabla \cdot (D\nabla T) = 0, \quad (\text{B.3})$$

ou seja

$$\partial_t T - D\nabla^2 T = 0, \quad (\text{B.4})$$

$$\partial_t T = D\nabla^2 T, \quad (\text{B.5})$$

onde T é a concentração de fator angiogênico, D é a constante de difusão e ∇^2 é o operador laplaciano.

O segundo termo da Eq. (3.9) é inserido *a posteriori* na Eq. (B.5), modelando o consumo de fator angiogênico pelas células endoteliais. Esse termo é dado por

$$- \alpha_T T \phi \Theta(\phi), \quad (\text{B.6})$$

sendo $\Theta(\phi)$ a função de Heaviside, que garante que o consumo é dado apenas no interior dos vasos sanguíneos, e os termos lineares T e ϕ provenientes de uma aproximação logística [63].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HUNTER, J. **Lectures on the Principles of Surgery, Vol. 1.** [S.l.]: London, 1787. 21
- [2] CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 653–660, 2003. 21, 36
- [3] RAFII, S.; LYDEN, D.; BENEZRA, R.; HATTORI, K.; HEISSIG, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? **Nature Reviews Cancer**, Nature Publishing Group, v. 2, n. 11, p. 826–835, 2002. 21
- [4] CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 407, n. 6801, p. 249–257, 2000. 21
- [5] FOLKMAN, J.; MERLER, E.; ABERNATHY, C.; WILLIAMS, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **The Journal of experimental medicine**, Rockefeller Univ Press, v. 133, n. 2, p. 275–288, 1971. 21
- [6] GREENE, H. S. Heterologous transplantation of mammalian tumors i. the transfer of rabbit tumors to alien species. **The Journal of experimental medicine**, Rockefeller Univ Press, v. 73, n. 4, p. 461–474, 1941. 21
- [7] HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, American Society of Clinical Oncology, v. 23, n. 5, p. 1011–1027, 2005. 21, 26, 27
- [8] FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford University Press, v. 82, n. 1, p. 4–7, 1990. 21
- [9] FIDLER, I. J.; ELLIS, L. M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. **Cell**, Cell Press, v. 79, n. 2, p. 185–188, 1994. 21
- [10] BROWN, L.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.; NAGY, J.; FENG, D.; DVORAK, A.; DVORAK, H. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. In: **Regulation of angiogenesis**. [S.l.]: Springer, 1997. p. 233–269. 21
- [11] JONG, P. T. D. Age-related macular degeneration. **New England Journal of Medicine**, Mass Medical Soc, v. 355, n. 14, p. 1474–1485, 2006. 21

- [12] ORGANIZATION, W. H. **Age-related macular degeneration**.
[Http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index7.html](http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index7.html). Acessado: 2014-05-20.
 21
- [13] KLIFFEN, M.; SHARMA, H. S.; MOOY, C. M.; KERKVLIT, S.; JONG, P. T. de. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. **British journal of ophthalmology**, BMJ Publishing Group Ltd., v. 81, n. 2, p. 154–162, 1997. 22
- [14] AMIN, R.; PUKLIN, J. E.; FRANK, R. N. Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. **Investigative ophthalmology & visual science**, ARVO, v. 35, n. 8, p. 3178–3188, 1994. 22
- [15] SIVALINGAM, A.; KENNEY, J.; BROWN, G. C.; BENSON, W. E.; DONOSO, L. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. **Archives of ophthalmology**, American Medical Association, v. 108, n. 6, p. 869–872, 1990. 22
- [16] GROSSNIKLAUS, H. E.; LING, J. X.; WALLACE, T. M.; DITHMAR, S.; LAWSON, D. H.; COHEN, C.; ELNER, V. M.; ELNER, S. G.; JR, P. S. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. **Mol Vis**, v. 8, n. 8, p. 119–126, 2002. 22
- [17] VAKOC, B. J.; LANNING, R. M.; TYRRELL, J. A.; PADERA, T. P.; BARTLETT, L. A.; STYLIANOPOULOS, T.; MUNN, L. L.; TEARNEY, G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. et al. Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging. **Nature medicine**, Nature Publishing Group, v. 15, n. 10, p. 1219–1223, 2009. 22
- [18] BALDING, D.; MCELWAIN, D. A mathematical model of tumour-induced capillary growth. **Journal of theoretical biology**, Elsevier, v. 114, n. 1, p. 53–73, 1985. 22
- [19] STOKES, C. L.; LAUFFENBURGER, D. A. Analysis of the roles of microvessel endothelial cell random motility and chemotaxis in angiogenesis. **Journal of theoretical biology**, Elsevier, v. 152, n. 3, p. 377–403, 1991. 22
- [20] MILDE, F.; BERGDORF, M.; KOUMOUTSAKOS, P. A hybrid model for three-dimensional simulations of sprouting angiogenesis. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 95, n. 7, p. 3146–3160, 2008. 23, 29
- [21] TRAVASSO, R. D. M.; POIRÉ, E. C.; CASTRO, M.; RODRIGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; HERNÁNDEZ-MACHADO, A. Tumor

- angiogenesis and vascular patterning: A mathematical model. **PLoS ONE**, Public Library of Science, v. 6, n. 5, p. e19989, 05 2011. 23, 26, 27, 29, 56
- [22] BRAY, A. Theory of phase-ordering kinetics. **Advances in Physics**, Taylor & Francis, v. 43, n. 3, p. 357–459, 1994. 23
- [23] TDDFT.ORG. **Time-dependent density functional theory**. Wwww.tddft.org. Acessado: 28-07-2014. 23
- [24] GUERRA, M. **Novel Approach to vascular network modeling in 3D**. Dissertação (Mestrado) — FCTUC, Universidade de Coimbra, 2012. 24, 56
- [25] FIGG, W.; FOLKMAN, J. **Angiogenesis: an integrative approach from science to medicine**. [S.l.]: Springer, 2008. 25
- [26] QUINAS-GUERRA, M.; RIBEIRO-RODRIGUES, T.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; TRAVASSO, R. D. Understanding the dynamics of tumor angiogenesis: A systems biology approach. In: AZMI, A. S. (Ed.). **Systems Biology in Cancer Research and Drug Discovery**. [S.l.]: Springer, 2012. p. 197–227. 25
- [27] JAIN, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 307, n. 5706, p. 58–62, 2005. 25, 26, 36
- [28] FERRARA, N. Vegf and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews Cancer**, Nature Publishing Group, v. 2, n. 10, p. 795–803, 2002. 25
- [29] FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOATER, J. The biology of vegf and its receptors. **Nature medicine**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 6, p. 669–676, 2003. 26
- [30] HOUCK, K. A.; FERRARA, N.; WINER, J.; CACHIANES, G.; LI, B.; LEUNG, D. W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of rna. **Molecular Endocrinology**, The Endocrine Society, v. 5, n. 12, p. 1806–1814, 1991. 26
- [31] TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T.; SILVA, M.; GOSPODAROWICZ, D.; FIDDES, J.; ABRAHAM, J. The human gene for vascular endothelial growth factor. multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 266, n. 18, p. 11947–11954, 1991. 26
- [32] BERGERS, G.; BREKKEN, R.; MCMAHON, G.; VU, T. H.; ITOH, T.; TAMAKI, K.; TANZAWA, K.; THORPE, P.; ITOHARA, S.; WERB, Z. et al. Matrix

- metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature cell biology**, Nature Publishing Group, v. 2, n. 10, p. 737–744, 2000. 27
- [33] FERRARA, N. Overview and clinical applications of vegf-a. In: **Angiogenesis**. [S.l.]: Springer, 2008. p. 345–352. 27
- [34] GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. How do endothelial cells orientate? In: **Mechanisms of angiogenesis**. [S.l.]: Springer, 2005. p. 3–15. 27
- [35] LEE, S.; JILANI, S. M.; NIKOLOVA, G. V.; CARPIZO, D.; IRUELA-ARISPE, M. L. Processing of vegf-a by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. **The Journal of cell biology**, Rockefeller Univ Press, v. 169, n. 4, p. 681–691, 2005. 27
- [36] JONES, E. A.; NOBLE, F. le; EICHMANN, A. What determines blood vessel structure? genetic prespecification vs. hemodynamics. **Physiology**, Am Physiological Soc, v. 21, n. 6, p. 388–395, 2006. 27
- [37] RANGANATHAN, P.; WEAVER, K. L.; CAPOBIANCO, A. J. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. **Nature Reviews Cancer**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 5, p. 338–351, 2011. 28
- [38] HELLSTRÖM, M.; PHNG, L.-K.; HOFMANN, J. J.; WALLGARD, E.; COULTAS, L.; LINDBLOM, P.; ALVA, J.; NILSSON, A.-K.; KARLSSON, L.; GAIANO, N. et al. Dll4 signalling through notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 445, n. 7129, p. 776–780, 2007. 28, 34
- [39] LEVINE, H. A.; PAMUK, S.; SLEEMAN, B. D.; NILSEN-HAMILTON, M. Mathematical modelling of tumour angiogenesis and the action of angiostatin as a protease inhibitor. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, Hindawi Publishing Corporation, v. 4, n. 2, p. 133–145, 2002. 29
- [40] NEIVA, S. **Morfologia de Redes Vasculares - Estudo Computacional**. Dissertação (Mestrado) — FCTUC, Universidade de Coimbra, 2012. 29, 52, 56
- [41] EDGAR, L. T.; SIBOLE, S. C.; UNDERWOOD, C. J.; GUILKEY, J. E.; WEISS, J. A. A computational model of in vitro angiogenesis based on extracellular matrix fibre orientation. **Computer methods in biomechanics and biomedical engineering**, Taylor & Francis, v. 16, n. 7, p. 790–801, 2013. 29
- [42] HUANG, F. F. **Engineering thermodynamics: Fundamentals and applications**. [S.l.]: Macmillan College, 1988. 30

- [43] PROVATAS, N.; ELDER, K. **Phase-field methods in materials science and engineering**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010. 30
- [44] SIEKMANN, A. F.; LAWSON, N. D. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 445, n. 7129, p. 781–784, 2007. 34
- [45] HOPPENSTEADT, F. C.; PESKIN, C. S. **Modeling and simulation in medicine and the life sciences**. [S.l.]: Springer New York, 2002. 37, 38
- [46] SOLTANI, M.; CHEN, P. Numerical modeling of interstitial fluid flow coupled with blood flow through a remodeled solid tumor microvascular network. **PloS one**, Public Library of Science, v. 8, n. 6, p. e67025, 2013. 37
- [47] KONG, T. Y.; ROSENFELD, A. Digital topology: Introduction and survey. **Computer Vision, Graphics, and Image Processing**, Elsevier, v. 48, n. 3, p. 357–393, 1989. 40, 41
- [48] PALÁGYI, K.; BALOGH, E.; KUBA, A.; HALMAI, C.; ERDŐHELYI, B.; SORANTIN, E.; HAUSEGGER, K. A sequential 3d thinning algorithm and its medical applications. In: SPRINGER. **Information Processing in Medical Imaging**. [S.l.], 2001. p. 409–415. 40
- [49] PALÁGYI, K.; KUBA, A. A 3d 6-subiteration thinning algorithm for extracting medial lines. **Pattern Recognition Letters**, Elsevier, v. 19, n. 7, p. 613–627, 1998. 40, 41, 42
- [50] MA, C. M.; SONKA, M. A fully parallel 3d thinning algorithm and its applications. **Computer vision and image understanding**, Elsevier, v. 64, n. 3, p. 420–433, 1996. 41
- [51] PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P.; METCALF, M. Numerical recipes in fortran 90, vol. 2. **Cambridge, ISBN**, v. 521574390, 1996. 47
- [52] ANDRADE, X.; ALBERDI-RODRIGUEZ, J.; STRUBBE, D. A.; OLIVEIRA, M. J.; NOGUEIRA, F.; CASTRO, A.; MUGUERZA, J.; ARRUABARRENA, A.; LOUIE, S. G.; ASPURU-GUZI, A. et al. Time-dependent density-functional theory in massively parallel computer architectures: the octopus project. **Journal of Physics: Condensed Matter**, IOP Publishing, v. 24, n. 23, p. 233202, 2012. 49
- [53] MORTON, K. W.; MAYERS, D. F. **Numerical solution of partial differential equations: an introduction**. [S.l.]: Cambridge university press, 2005. 50

- [54] CRANK, J. et al. **The mathematics of diffusion**. [S.l.]: Clarendon press Oxford, 1975. 50
- [55] ANDERSON, E.; BAI, Z.; BISCHOF, C.; BLACKFORD, S.; DEMMEL, J.; DONGARRA, J.; CROZ, J. D.; GREENBAUM, A.; HAMMARLING, S.; MCKENNEY, A.; SORENSEN, D. **LAPACK Users' Guide**. Third. Philadelphia, PA: Society for Industrial and Applied Mathematics, 1999. ISBN 0-89871-447-8 (paperback). 52
- [56] HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353 – 364, 1996. ISSN 0092-8674. 53
- [57] KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. **Carcinogenesis**, Oxford Univ Press, v. 21, n. 3, p. 505–515, 2000. 53
- [58] BAKER, M.; ROBINSON, S. D.; LECHERTIER, T.; BARBER, P. R.; TAVORA, B.; D'AMICO, G.; JONES, D. T.; VOJNOVIC, B.; HODIVALA-DILKE, K. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. **Nature protocols**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 89–104, 2012. 55
- [59] HAIGH, J. J.; MORELLI, P. I.; GERHARDT, H.; HAIGH, K.; TSIEN, J.; DAMERT, A.; MIQUEROL, L.; MUHLNER, U.; KLEIN, R.; FERRARA, N. et al. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in vegf-a paracrine signaling. **Developmental biology**, Elsevier, v. 262, n. 2, p. 225–241, 2003. 56
- [60] GERHARDT, H.; GOLDING, M.; FRUTTIGER, M.; RUHRBERG, C.; LUNDKVIST, A.; ABRAMSSON, A.; JELTSCH, M.; MITCHELL, C.; ALITALO, K.; SHIMA, D. et al. Vegf guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. **The Journal of cell biology**, Rockefeller Univ Press, v. 161, n. 6, p. 1163–1177, 2003. 56
- [61] DRAKE, C. J.; LITTLE, C. D. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 92, n. 17, p. 7657–7661, 1995. 56
- [62] RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; LANE, T. F.; ORTEGA, M. A.; HYNES, R. O.; LAWLER, J.; IRUELA-ARISPE, M. L. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 98, n. 22, p. 12485–12490, 2001. 56

- [63] HIRSCH, M. W.; SMALE, S.; DEVANEY, R. L. **Differential equations, dynamical systems, and an introduction to chaos.** [S.l.]: Academic press, 2004.
73, 75

