



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM MATEMÁTICA E COMPUTACIONAL

MODELO MATEMÁTICO PARA A ANGIOGÊNESE BASEADO NA DINÂMICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO NOTCH E VEGF

DANDARA LORRAYNE DO NASCIMENTO

Orientador: Allbens Atman Picardi Faria
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Coorientadora: Ana Paula Alves
Universidade do Estado de Minas Gerais

BELO HORIZONTE
MAIO DE 2021

DANDARA LORRAYNE DO NASCIMENTO

**MODELO MATEMÁTICO PARA A ANGIOGÊNESE
BASEADO NA DINÂMICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO
NOTCH E VEGF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Modelagem Matemática e Computacional do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Modelagem Matemática e Computacional.

Área de concentração: Modelagem Matemática e Computacional

Linha de pesquisa: Métodos Matemáticos

Orientador: Allbens Atman Picardi Faria
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Coorientadora: Ana Paula Alves
Universidade do Estado de Minas Gerais

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM MATEMÁTICA E COMPUTACIONAL
BELO HORIZONTE
MAIO DE 2021

Nascimento, Dandara Lorrayne do
N244m Modelo matemático para a angiogênese baseado na dinâmica das vias de
sinalização Notch e VEGF / Dandara Lorrayne do Nascimento. – 2021.
71 f.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Modelagem Matemática e Computacional.
Orientador: Allbens Atman Picardi Faria.
Coorientadora: Ana Paula Alves.
Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas
Gerais.

1. Neovascularização – Modelos matemáticos – Teses. 2. Neovascularização
– Fisiologia – Teses. 3. Fisiopatologia – Modelos matemáticos – Teses. I. Faria,
Allbens Atman Picardi. II. Alves, Ana Paula. III. Centro Federal de Educação
Tecnológica de Minas Gerais. IV. Título.

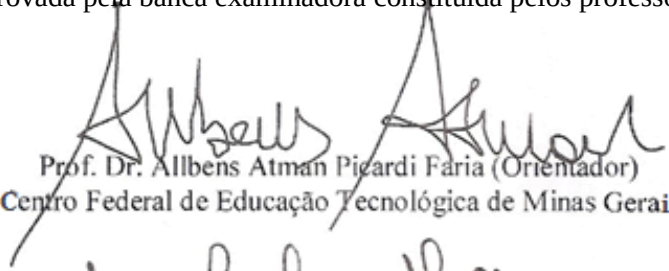
CDD 511.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MESTRADO EM MODELAGEM MATEMÁTICA E COMPUTACIONAL

**"MODELO MATEMÁTICO PARA A ANGIOGÊNESE BASEADO NA
DINÂMICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO NOTCH E VEGF"**

Dissertação de Mestrado apresentada por **Dandara Lorryne do Nascimento**, em 18 de maio de 2021, ao Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional do CEFET-MG, e aprovada pela banca examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dr. Allbens Atman Picardi Faria (Orientador)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

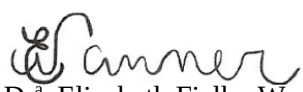

Profª. Drª. Ana Paula Alves (Coorientadora)
Universidade do Estado de Minas Gerais


Profª. Drª. Maria Elizabeth de Gouvêa
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Dr. José Luiz Acebal Fernandes
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais


Prof. Dr. Arthur Rodrigo Bosco de Magalhães
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Visto e permitida a impressão,


Profª. Drª. Elizabeth Fialho Wanner
Presidenta do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Modelagem Matemática e Computacional

Dedico este trabalho a todos aqueles a quem
esta pesquisa possa ajudar de alguma forma.

Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio, os conselhos e a dedicação de várias pessoas que estiveram comigo ao longo desta jornada.

Agradeço ao Professor Allbens Atman Picardi Faria, meu orientador, pelo voto de confiança ao aceitar a condução deste trabalho e pelos ensinamentos proporcionados durante o curso.

Agradeço a Professora Ana Paula Alves, minha coorientadora, por aceitar este desafio e por me auxiliar neste percurso.

Agradeço a Professora Maria Elizabeth de Gouvêa, minha "madrinha", minha orientadora de iniciação científica, por ter me apoiado e auxiliado em diversos momentos deste estudo.

Agradeço a todos os professores e funcionários do CEFETMG por, de alguma forma, terem me acolhido e contribuído com minha formação.

Agradeço aos colegas de curso pelas trocas de experiências, pelos incentivos e pelas amizades como as de Maisa, Michely, Ariane, Moisés, Gabriel, Edgar, Frias e Nildo.

Agradeço ao meu amado, Niltom Vieira Junior, pela confiança, incentivo e amor sempre dedicados a mim.

Por fim, agradeço a Deus por conceder-me sabedoria e forças necessárias para realização de mais esta etapa.

Obrigada a todos!

Resumo

A angiogênese é o processo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos já existentes. Em condições normais, os novos vasos são robustos e organizados. Em condições anormais, como ocorre no surgimento de um tumor, os vasos formados são raquíticos e emaranhados. Na angiogênese patológica os vasos sanguíneos são estimulados a crescerem rapidamente para alimentar o tumor que carece de oxigênio e nutrientes. A tentativa de inibição da angiogênese pode ocasionar diversos efeitos colaterais como hipertensão, trombose, fadiga, entre outros. Portanto, estudos que se concentram na caracterização das vias de sinalização atuantes neste processo contribuem com pesquisas direcionadas ao uso de novos medicamentos para diversas doenças, entre elas o câncer. O principal objetivo deste estudo é apresentar um modelo matemático para a angiogênese e aplicá-lo à pesquisa experimental de [Alves \(2018\)](#). O modelo adaptado é descrito por equações diferenciais ordinárias traduzidas em equações de diferenças no *software MatLab* e para validação seguiu-se os passos destacados por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#). Além disso, o modelo foi aplicado à pesquisa experimental de [Alves \(2018\)](#) e em ambos estudos percebeu-se que o equilíbrio do sistema é perturbado quando VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) externo é alterado, promovendo mudanças no processo de angiogênese.

Palavras-chave: Angiogênese. Angiogênese fisiológica e patológica. Modelagem Matemática.

Abstract

Angiogenesis is the process of growing new blood vessels from existing vessels. Under normal conditions, the new vessels are robust and organized. In abnormal conditions, as occurs in the appearance of a tumor, the vessels formed are stunted and entangled. In pathological angiogenesis, blood vessels are stimulated to grow quickly to feed the tumor that lacks oxygen and nutrients. The attempt to inhibit angiogenesis can cause several side effects such as hypertension, thrombosis, fatigue, among others. Therefore, studies that focus on the characterization of the signaling pathways that work in this process contribute to research directed to the use of new drugs for various diseases, including cancer. the main aim of this study is to present a mathematical model for angiogenesis and apply it to [Alves \(2018\)](#) experimental research. The adapted model is described by ordinary differential equations translated into equations of differences in the MatLab software and for validation, followed by the steps outlined by [Boareto et al. \(2015a\)](#) and [Boareto et al. \(2015b\)](#). Moreover, the model was applied to [Alves \(2018\)](#) experimental research and in both studies was noticed that the balance of the system is disturbed when external VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is altered, promoting changes in the angiogenesis process.

Keywords: Angiogenesis. Physiological and pathological angiogenesis. Mathematical Modeling.

Lista de Figuras

Figura 1 – Ativação <i>trans</i> diante da ligação entre o receptor <i>Notch</i> e o ligante <i>Delta</i> .	6
Figura 2 – Ativação <i>trans</i> diante da ligação entre o receptor <i>Notch</i> e o ligante <i>Jagged</i> .	7
Figura 3 – Dinâmica completa da angiogênese.	9
Figura 4 – Inibição lateral e indução lateral.	10
Figura 5 – Introdução do Avastin no sistema.	12
Figura 6 – Topologia de redes.	13
Figura 7 – Modelo Parácrino.	14
Figura 8 – Análise da função de Hill deslocada e influência de λ .	19
Figura 9 – Análise da função de Hill deslocada e influência do expoente.	20
Figura 10 – Influência da função de Hill deslocada no modelo NDI.	31
Figura 11 – Dinâmica do modelo NDI.	32
Figura 12 – Equilíbrio do modelo NDI.	34
Figura 13 – Influência da função de Hill deslocada no modelo NDJI.	39
Figura 14 – Dinâmica do modelo NDJI.	40
Figura 15 – Equilíbrio do modelo NDJI.	42
Figura 16 – Influência da função de Hill deslocada no modelo NDJVI.	47
Figura 17 – Dinâmica do modelo NDJVI.	48
Figura 18 – Equilíbrio do modelo NDJVI.	50
Figura 19 – Variação de V_{ext} (VEGF-A) no modelo NDJVI.	53
Figura 20 – Análise da topologia de redes.	55
Figura 21 – Rede vascular em 3D.	55
Figura 22 – Comprimento médio entre as bifurcações.	56
Figura 23 – <i>Boxplot</i> do comprimento médio entre as bifurcações.	57
Figura 24 – Grau médio dos vértices em função do tempo.	59
Figura 25 – <i>Boxplot</i> do grau médio dos vértices.	60

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros do modelo NDI.	31
Tabela 2 – Parâmetros do modelo NDJI.	38
Tabela 3 – Parâmetros do modelo NDJVI.	46
Tabela 4 – Variação de VEGF-A (V_{ext}) e novos valores de equilíbrio para as proteínas.	71

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

D	Concentração de proteína <i>Delta</i>
D_{ext}	Concentração externa de <i>Delta</i>
D_0	Taxa de produção de <i>Delta</i>
D_*	Estado estacionário de <i>Delta</i>
H^{S+}	Função de Hill deslocada de ativação
H^{S-}	Função de Hill deslocada de restrição
I	Concentração de proteína NICD
I_0	Taxa de produção de NICD
I_*	Estado estacionário de NICD
J	Concentração de proteína <i>Jagged</i>
J_{ext}	Concentração externa de <i>Jagged</i>
J_0	Taxa de produção de <i>Jagged</i>
J_*	Estado estacionário de <i>Jagged</i>
k_c	Inibição <i>cis</i>
k_t	Interação <i>trans</i>
n	Expoente da função de Hill deslocada
N	Concentração de proteína <i>Notch</i>
N_{ext}	Concentração externa de <i>Notch</i>
N_0	Taxa de produção de <i>Notch</i>
N_*	Estado estacionário de <i>Notch</i>
NICD	<i>Intracellular Domain of the Notch</i>
V	Concentração de proteína VEGF
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

V_0	Taxa de produção de VEGF
V_{ext}	Concentração externa de VEGF
V_*	Estado estacionário de VEGF
VR	Concentração de proteína VEGFR2
V_{R0}	Taxa de produção de VEGFR2
VR_*	Estado estacionário de VEGFR2
γ	Taxa de degradação natural de <i>Notch</i> , <i>Delta</i> , <i>Jagged</i> e VEGFR2
γ_I	Taxa de degradação natural de NICD e VEGF
λ	Constante para definir a função de Hill deslocada de restrição ou ativação

Sumário

1 – Introdução	1
1.1 Justificativa	3
1.2 Motivação	3
1.3 Organização do trabalho	4
2 – Fatores de influência na angiogênese	5
2.1 A via de sinalização <i>Notch</i>	5
2.2 A via de sinalização VEGF	7
2.3 A via de sinalização <i>Notch</i> e <i>VEGF</i> no surgimento e manutenção de tumores	10
2.4 A influência do VEGF no desenvolvimento da rede vascular	11
3 – Modelo matemático de Boareto et al. (2015a) para a angiogênese	15
4 – Metodologia	22
4.1 Delineamento da pesquisa	22
4.2 Coleta e tratamento de dados	23
5 – Análise e Discussão dos Resultados	24
5.1 O modelo NDI	25
5.1.1 Construção da equação de <i>Notch</i>	25
5.1.2 Construção da equação de <i>Delta</i>	28
5.1.3 Construção da equação do NICD	30
5.1.4 A influência da função de Hill deslocada no modelo NDI	31
5.1.5 A dinâmica do modelo NDI	32
5.1.6 Análise das populações de equilíbrio do modelo NDI	33
5.2 O modelo NDJI	35
5.2.1 Construção da equação de <i>Notch</i>	35
5.2.2 Construção da equação de <i>Delta</i>	35
5.2.3 Construção da equação do NICD	36
5.2.4 Construção da equação de <i>Jagged</i>	36
5.2.5 A influência da função de Hill deslocada no modelo NDJI	38
5.2.6 A dinâmica do modelo NDJI	40
5.2.7 Análise das populações de equilíbrio do modelo NDJI	41
5.3 O modelo NDJVI	43
5.3.1 Construção da equação de <i>Notch</i>	43
5.3.2 Construção da equação de <i>Delta</i>	44

5.3.3	Construção da equação do NICD	44
5.3.4	Construção da equação de <i>Jagged</i>	44
5.3.5	Construção da equação do VEGF	44
5.3.6	Construção da equação do receptor VEGFR2	45
5.3.7	A influência da função de Hill deslocada no modelo NDJVI	46
5.3.8	A dinâmica do modelo NDJVI	48
5.3.9	Análise das populações de equilíbrio do modelo NDJVI	49
5.4	A influência de VEGF-A no modelo NDJVI	52
5.4.1	Relação entre a influência de VEGF na angiogênese e o estudo quantitativo de Alves (2018)	54
6	– Conclusões	62
	Referências	64
	 Apêndices	 68
	APÊNDICE A – Variação de VEGF-A e valores de equilíbrio	69

Capítulo 1

Introdução

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos já existentes ([BOARETO et al., 2015a](#)). Esse mecanismo é importante para a cicatrização de ferimentos, formação de embriões, para direcionar oxigênio e nutrientes para as células, entre outros processos, e está associado a diversos fatores de crescimento ([BHADADA; GOYAL; PATEL, 2011](#); [NUNES et al., 2015](#)).

Durante a angiogênese as células endoteliais, que são as células que cobrem a parte interna dos vasos sanguíneos, lideram o crescimento das novas ramificações ([BOARETO et al., 2015a](#)). Essas células são guiadas através da matriz extracelular (substância entre células) por substâncias químicas que são liberadas em resposta a carência de nutrientes em tecidos ([BOARETO et al., 2015a](#); [KARGOZAR et al., 2020](#)).

Em condições normais, os novos vasos sanguíneos são formados de maneira robusta e organizada. E em condições anormais, como ocorre no surgimento de um tumor, os vasos formados são excessivos, raquíticos e emaranhados. Essas condições anormais levam à criação de uma rede de vasos com junções estreitas e comprometidas, pois eles são estimulados a crescerem rapidamente para alimentar o tumor que carece de oxigênio e nutrientes ([DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017](#); [APTE; CHEN; FERRARA, 2019](#)). Para entender esta alteração, é preciso analisar cuidadosamente as condições que contribuem para o crescimento acelerado desses vasos, neste sentido, torna-se importante estudar os fatores estimulantes da angiogênese.

O principal objetivo deste estudo é apresentar um modelo matemático para a regulação da angiogênese, baseado nos modelos de [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#), e aplicá-lo ao estudo experimental feito por [Alves \(2018\)](#) com a finalidade de entender como inibir a formação dos vasos sanguíneos. Para isso, serão analisadas as concentrações das proteínas atuantes neste processo a fim de avaliar a possível influência dos fatores de crescimento angiogênico.

Serão abordadas as duas vias de sinalização atuantes na angiogênese, que são os processos de comunicação celular e extracelular: a via de sinalização *Notch* e a via de sinalização VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). A via de sinalização *Notch*, que leva o nome da proteína receptora *Notch*, atua no destino celular para a escolha da célula que irá liderar o novo ramo do vaso sanguíneo e células que irão compor as paredes do novo vaso. A via de sinalização VEGF, que leva o nome do fator de sinalização liberado pelas células que carecem de oxigênio e nutrientes, emite fatores pró angiogênicos para o crescimento desses novos vasos sanguíneos.

Na sinalização *Notch*, a proteína receptora *Notch* é ativada pelas proteínas ligantes *Delta* e *Jagged*. Essa dinâmica entre os ligantes e receptores cria uma "chave" que gera uma resposta na célula. Neste processo, o NICD (*Intracellular Domain of the Notch*), proteína disposta na parede interna da membrana celular, é acionado fazendo com que a concentração de *Delta* seja restringida no núcleo da célula que contém *Notch* e aumentando a concentração de *Notch* e *Jagged* no núcleo (BOARETO et al., 2015b).

Na sinalização VEGF, o ligante VEGF-A, disposto na parte externa da célula, ativa o receptor VEGFR2 estimulando a angiogênese. Embora o VEGF seja essencial para manter a condição relativa de estabilidade em células e tecidos, demonstrou-se a importância desse fator para o crescimento de tumores e disseminação de metástases (APTE; CHEN; FERRARA, 2019). Além disso, os estudos de Boareto et al. (2015a) e Boareto et al. (2015b) mostraram grande influência da proteína *Jagged* na sinalização *Notch* para surgimento de tumores.

Mediante um mecanismo completo, diversos fatores influenciam na a promoção ou inibição da angiogênese (HUANG; NAN, 2019). Logo, trabalhos teóricos buscam entender como ocorre a dinâmica da formação dos vasos sanguíneos. Estudos teóricos como os de Boareto et al. (2015a) e Boareto et al. (2015b) investigam os mecanismos microscópicos da química celular envolvida no crescimento de vasos que alimentam um tumor. Estas pesquisas podem contribuir com a procura por medicamentos menos invasivos que se concentrem na restrição aos processos que, em tumores, levam à proliferação desenfreada de vasos sanguíneos (KARGOZAR et al., 2020).

Diante disso, será apresentado um modelo matemático para a angiogênese, baseado em equações diferenciais de primeira ordem, que descreve a dinâmica das proteínas considerando uma única célula no meio de um ambiente externo em que são simuladas as diversas concentrações presentes.

1.1 Justificativa

A compreensão sobre como os novos vasos sanguíneos crescem de acordo com sinais emitidos pelas vias de sinalização é um dos fatores essenciais para entender a angiogênese e o desenvolvimento de tumores, sendo este campo intenso alvo de pesquisas (PHNG; GERHARDT, 2009).

Diversos estudos, como Leite (2009), Domingues (2010) e Silva (2012), descrevem a dinâmica de atuação da angiogênese no surgimento de células-tronco cancerosas por meio de modelagem matemática e computacional, possibilitando a compreensão e caracterização dos sistemas biológicos de forma efetiva.

De acordo com Liu, Heiner e Gilbert (2018), modelos matemáticos computacionais relacionados à biologia contribuem com a assimilação de detalhes e permitem a melhor previsão do sistema em análise.

Dessa forma, a modelagem matemática e computacional mostra-se eficaz para caracterizar a dinâmica de atuação das proteínas em células envolvidas no processo da angiogênese. Essa dinâmica, descrita através de equações diferenciais de primeira ordem, possibilita a compreensão do sistema ao manipular as concentrações de proteínas receptoras e proteínas ligantes na simulação de células e tecidos virtuais. Este processo proporciona análises, conjecturas, inferências e conclusões sobre o funcionamento biológico.

1.2 Motivação

Quando há um crescimento desenfreado de vasos sanguíneos direcionados ao fornecimento de oxigênio e nutrientes para um tumor, cria-se um ambiente favorável para o crescimento do tumor e desenvolvimento de metástases (SIVEEN et al., 2017).

O direcionamento das vias de sinalização responsáveis pela angiogênese, *Notch* e VEGF, é uma estratégia para inibir o crescimento de tumores e progressão de metástases (SIVEEN et al., 2017). Entretanto, estudos mostram que a tentativa de inibição da angiogênese pode ocasionar diversos efeitos colaterais.

Segundo Zarbin (2018), a introdução de fármacos bloqueadores da sinalização VEGF, para o tratamento do câncer, por exemplo, pode ocasionar complicações, como hipertensão e trombose. Neste sentido, um estudo feito por Rosen et al. (2020) para inibir a sinalização de *Notch* mostrou que o fármaco utilizado ocasionou outros diversos efeitos colaterais nos pacientes, sendo os mais comuns a fadiga, diminuição do apetite, náuseas, alopecia, dor abdominal e vômitos.

Portanto, estudos que se concentram na caracterização das vias de sinalização atuantes

durante o processo de angiogênese auxiliam pesquisas direcionadas ao uso de novos medicamentos para diversas doenças, entre elas o câncer. Dessa forma, este estudo mostra-se necessário, pois fornecerá dados quantitativos que descreverá a dinâmica celular envolvida na angiogênese. Além disso, estes dados poderão contribuir futuramente com pesquisas que investiguem novas terapias que minimizam os riscos e efeitos colaterais no tratamento do câncer e de outras doenças.

1.3 Organização do trabalho

Neste capítulo foi feita a introdução do tema e apresentada uma breve revisão bibliográfica. No capítulo 2 serão detalhadas as características dos fatores de influência na angiogênese, bem como o estudo experimental de [Alves \(2018\)](#), aprofundando a discussão do tema. No capítulo 3 será caracterizado o modelo de [Boareto et al. \(2015a\)](#), que é a principal referência para o modelo proposto neste estudo. A metodologia da pesquisa, composta pelo delineamento, coleta e tratamento de dados, é apresentada no capítulo 4. No capítulo 5 os resultados são analisados e discutidos. Por fim, as conclusões deste estudo são apresentadas no capítulo 6.

Capítulo 2

Fatores de influência na angiogênese

Neste capítulo serão caracterizadas as vias de sinalização *Notch* e VEGF, indispensáveis para o processo de angiogênese. Também será abordada a influência dessas vias de sinalização para o surgimento e manutenção de tumores. Por fim, a influência do VEGF no desenvolvimento da rede vascular será apresentada por meio das definições do estudo de [Alves \(2018\)](#).

2.1 A via de sinalização *Notch*

Notch é uma proteína receptora transmembranar (que cobre a membrana celular de um lado a outro) que possui papel importante no destino celular. Sua via de sinalização é uma das mais investigadas devido sua versatilidade no processo de comunicação celular ([JARRIAULT et al., 1995](#); [LIAO; OATES, 2017](#); [ANDERSSON; SANDBERG; LENDAHL, 2011](#)).

A via de sinalização *Notch*, que possui uma rota direta entre a membrana e o núcleo da célula, apresenta uma comunicação célula - célula. Neste processo, as proteínas ligantes transmembranares de um ambiente externo ativam as proteínas receptoras da célula ([SIEBEL; LENDAHL, 2017](#)).

Uma das proteínas ligantes transmembranares que interagem com o receptor *Notch* é a proteína *Delta*. Quando *Delta* de um ambiente externo liga-se à *Notch* de uma célula, tem-se a chamada "ativação *trans*". Neste processo, é desencadeado o domínio intracelular de *Notch*, isto é, o NICD, que é uma proteína fixada à membrana da célula, liberada durante a ligação entre *Notch* e seus ligantes. Nessa circunstância, o NICD migra ao núcleo da célula que contém *Notch* para restringir a produção de *Delta* e ativar a produção de proteínas *Notch*, como representado pela [Figura 1 \(NANDAGOPAL et al., 2018\)](#). Entretanto, se a ligação ocorre na mesma célula, pelo processo chamado "inibição *cis*", ambas as proteínas presentes são degradadas e o NICD não é acionado.

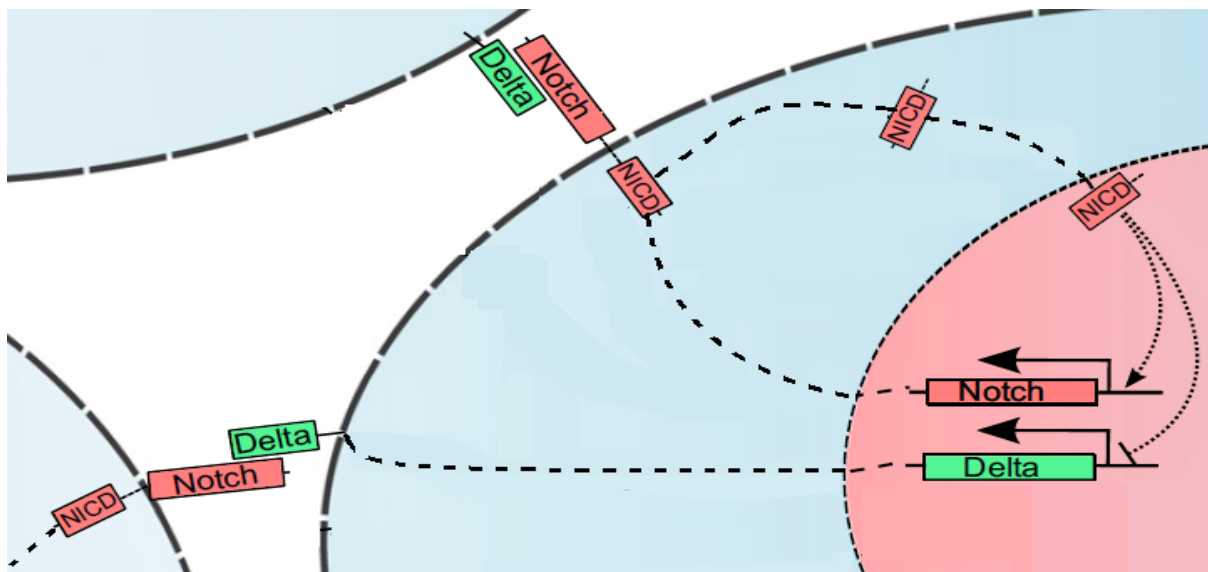


Figura 1 – Quando *Notch* recebe *Delta*, o NICD é ativado e levado ao núcleo da célula que contém *Notch* para restringir a produção de proteínas *Delta* e aumentar a produção de proteínas *Notch*. Fonte: Adaptado de [Boareto et al. \(2015b\)](#).

Há também a proteína transmembranar ligante *Jagged*, que foi reconhecida como uma proteína ligante ativadora da via de sinalização *Notch* em 1995 ([LINDSELL et al., 1995](#)). A ligação entre *Jagged* de um ambiente externo à *Notch* de uma célula, que ocorre diante da ativação *trans*, induz a migração do NICD ao núcleo da célula que contém *Notch*. Nesta ocasião, ambas as proteínas têm suas taxas de produção aumentadas, como representado pela [Figura 2](#). Entretanto, se a ligação ocorre na mesma célula, pelo processo de inibição *cis*, ambas as proteínas presentes no processo são degradadas e o NICD não é acionado.

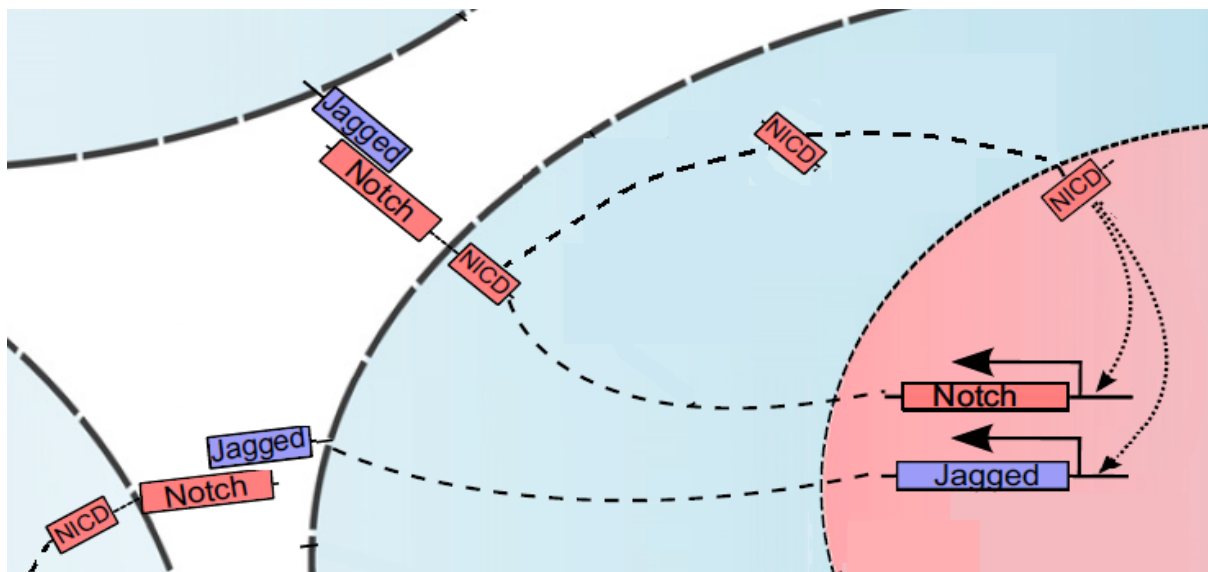


Figura 2 – Quando *Notch* recebe *Jagged*, o NICD é ativado e levado ao núcleo da célula que contém *Notch* para acionar a produção de proteínas *Jagged* e de proteínas *Notch*. Fonte: Adaptado de Boareto et al. (2015b).

Um outro composto atuante na via de sinalização *Notch* é a *glicosiltransferase fringe*, que é uma proteína glicosídica ativada pelo NICD que modula a ação de *Notch* pelo chamado "efeito *fringe*". Quando o efeito *fringe* é ativado, parte da produção de *Notch* é modificada, fazendo com que *Notch* tenha maior afinidade em receber *Delta* e menor afinidade em receber *Jagged* (BOARETO et al., 2015a; SCHNEIDER et al., 2018).

Diversos estudos buscam compreender as características detalhadas e funcionalidades da via de sinalização *Notch*. Sabe-se que esta via está relacionada com vários fatores, entre eles a angiogênese, inflamações respiratórias, proteção contra o diabetes e, principalmente, a supressão ou surgimento de tumores e metástases (BOARETO et al., 2015b; BILLIARD et al., 2018; TINDEMANS et al., 2017; BRAY, 2016; MEURETTE; MEHLEN, 2018; PUCA et al., 2019). Logo, estudos sobre a via de sinalização *Notch* também possuem grande importância para a descrição de agentes terapêuticos que possam tratar o câncer (NOWELL; RADTKE, 2017).

2.2 A via de sinalização VEGF

De acordo com Apte, Chen e Ferrara (2019), a compreensão sobre as características da via de sinalização de VEGF possibilitou grandes descobertas relacionadas à angiogênese e à vasculogênese (formação de vasos sanguíneos em embriões).

O VEGF é um fator de crescimento angiogênico liberado pelas células que carecem de

oxigênio e/ou nutrientes. Esse fator guia o crescimento dos novos vasos sanguíneos. Da mesma família de VEGF, tem-se o VEGF-A, que é o principal ligante da família de VEGF, e tem-se o VEGFR2, que é principal receptor da sinalização via VEGF durante a angiogênese. O VEGF-A se liga ao receptor VEGFR2 e regula o aumento da produção de *Delta*, como representado na [Figura 3\(a\)](#). Dessa forma, quando ocorre a sinalização entre *Notch* e *Delta*, o NICD acionado inibe o VEGFR2 na célula que contém *Notch* e faz com que essa célula se torne menos sensível ao sinal VEGF-A.

No processo de crescimento dos novos vasos sanguíneos, a célula endotelial que lidera o crescimento do novo vaso é denominada célula “de ponta” e novas extensões finas (filópodes) são criadas nessa célula a fim de seguir a sinalização emitida por VEGF-A. As demais células que seguem a célula de ponta se proliferam e formam o caule do novo vaso sanguíneo, como representado na [Figura 3\(b\)](#) ([BOARETO et al., 2015a](#)).

As células “de ponta” serão denominadas como células “*tip*” e as células que formam o caule dos vasos serão denominadas como células “*stalk*”. Tecidos ricos em proteínas *Delta* e VEGFR2 dão origem às células *tip* e, em contrapartida, tecidos ricos em proteínas *Jagged*, NICD e, consequentemente, *Notch*, dão origem às células *stalk*, como representado na [Figura 3\(b\)](#).

A alta concentração de *Delta* e VEGFR2 na célula *tip* faz com que suas vizinhas adquiram um padrão contrário (com baixo *Delta* e VEGFR2) chamado inibição lateral. Em contrapartida, a alta concentração de *Jagged*, NICD e *Notch* na célula *stalk* faz com que suas vizinhas adquiram um padrão semelhante, chamado indução lateral, que propiciará o alongamento do vaso ([Figura 3\(b\)](#)).

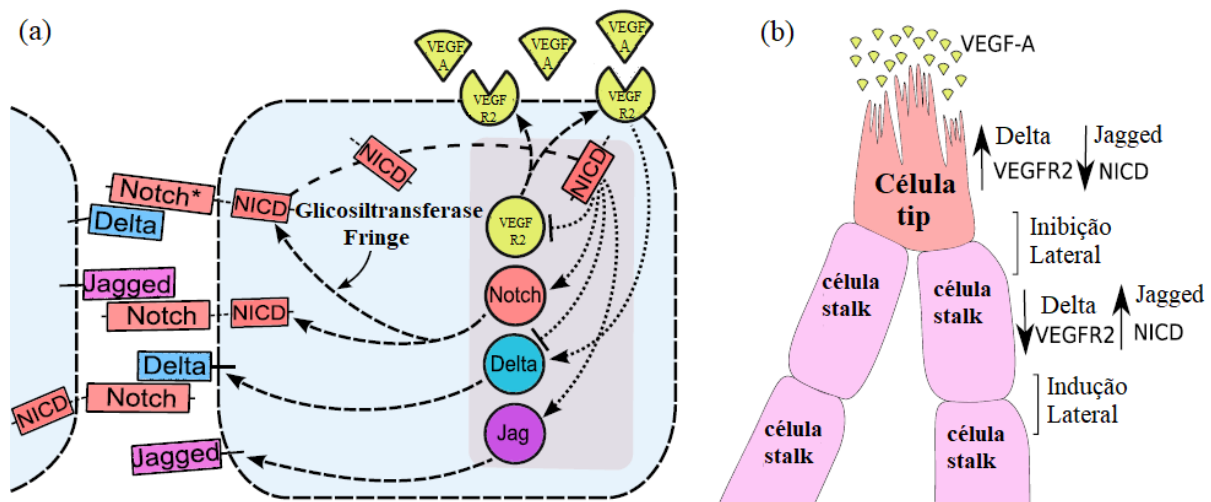


Figura 3 – Dinâmica completa do processo de angiogênese. Em (a) tem-se a ativação *trans* via sinalização *Notch* e via sinalização de VEGF. Observa-se que o receptor *Notch* recebe as proteínas ligantes *Delta* e *Jagged*, fazendo com que o NICD migre para o núcleo da célula. Dessa forma, pela sinalização de *Notch* o NICD inibe a produção de *Delta* e aumenta as produções de *Notch* e *Jagged*. O símbolo * em *Notch* representa a ação do efeito *fringe* no sistema. Pela sinalização de VEGF, o VEGFR2 recebe o VEGF-A e o NICD restringe a produção de VEGFR2 e aumenta a produção de *Delta* no núcleo da célula. Em (b) tem-se a formação dos novos vasos sanguíneos. A célula *tip* possui altas concentrações de *Delta* e VEGFR2 e baixas concentrações de *Jagged* e NICD. Essas células criam finas extensões que vão em direção ao VEGF-A. O caule dos vasos é formado por células *stalk* que possuem altas concentrações de *Jagged* e NICD e baixas concentrações de *Delta* e VEGFR2. De acordo com essa dinâmica, pode-se caracterizar as áreas de inibição e indução lateral. Fonte: Adaptado de Boareto et al. (2015a).

A interação entre as vias de sinalização de VEGF e *Notch* é importante para definir o destino das células *tip* e *stalk*, representadas na Figura 3(b) (BOARETO et al., 2015a).

No processo de inibição lateral, as células adquirem um padrão de “tabuleiro de xadrez”, ou padrão de “sal e pimenta”, sendo uma com alto *Notch* e outra com alto *Delta* em suas superfícies, como ilustra a Figura 4(a). Entretanto, no processo de indução lateral as células adotam um formato híbrido, com alta concentração de proteínas ligantes *Jagged* e proteínas receptoras *Notch*, dispondo de alta concentração de *Notch* e *Jagged* em suas superfícies, como ilustra a Figura 4(b).

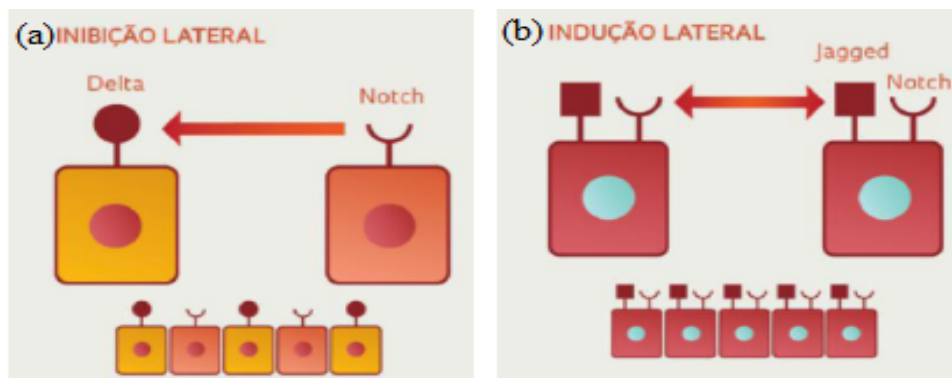


Figura 4 – Em (a) tem-se a representação da inibição lateral. Observa-se células intercaladas com *Delta* ou *Notch* em suas superfícies. Em (b) tem-se a indução lateral. Observa-se células híbridas com *Jagged* e *Notch*, simultaneamente, em suas superfícies. Fonte: [Zolnerkevic \(2016\)](#).

Em condições favoráveis e de equilíbrio, a indução e a inibição lateral contribuem na formação de vasos sanguíneos robustos. Porém, em um sistema desequilibrado como ocorre na formação de um tumor, são criados vasos sanguíneos raquíticos e emaranhados para alimentar de nutrientes e oxigênio uma população de células tumorais. ([BOARETO et al., 2015a](#)).

Além da angiogênese e da vasculogênese (formação de novos vasos sanguíneos em regiões não vascularizadas), a via de sinalização VEGF também tem influência em tratamentos com fármacos antidepressivos e de doenças oculares. Entretanto, assim como a via de sinalização *Notch*, o VEGF pode estar relacionado com o surgimento e manutenção de tumores. Logo, estudos que analisam as ações dos fatores associados ao VEGF podem contribuir com pesquisas que buscam novas terapias contra o câncer ([DEYAMA et al., 2019](#); [MERCURIO, 2019](#); [SALABARRIA et al., 2019](#)).

2.3 A via de sinalização *Notch* e *VEGF* no surgimento e manutenção de tumores

A sinalização de *Notch* desregulada é capaz de facilitar o surgimento e a proliferação de células-tronco cancerosas ao ativar fatores que promovem a sobrevivência celular e a angiogênese patológica ([BOARETO et al., 2015b](#)). Essa via de sinalização tem influência em alguns tipos de câncer, como o de mama e de próstata ([XIU; LIU, 2019](#); [WANG et al., 2009](#)).

De forma semelhante, a sinalização de VEGF contribui com a auto-renovação e a sobrevivência de células-tronco cancerosas, estando também relacionada a diversos tipos de câncer, como o câncer de osso ([CHEN et al., 2019](#); [MERCURIO, 2019](#)).

As células-tronco cancerosas surgem através de mutações em células-tronco normais. Essas mutações fazem com que os progenitores adquiram propriedades de células-tronco cancerosas, como por exemplo a capacidade de auto-renovação ilimitada, levando à proliferação de crescimento celular agressivo. Ou seja, se os progenitores, que neste caso são as células-tronco mães, apresentam propriedades de células-tronco cancerosas, devido às mutações adquiridas, ao se dividirem, as células-tronco filhas também terão essas propriedades levando à proliferação de células cancerosas e metástases de células cancerosas (ZARRINTAJ et al., 2019).

Assim como as células saudáveis, as células malignas necessitam de oxigênio e nutrientes para sobreviver e proliferar. Essas células malignas residem próximas aos vasos sanguíneos para acessar de forma mais facilitada a corrente sanguínea (LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2020). Nesta ocasião, *Notch*, *Delta*, *Jagged* e VEGF-A possuem papéis importantes no desenvolvimento e progressão do câncer e análises para inibir, direcionar e manipular as vias de sinalização *Notch* e VEGF são importantes para gerar novos tipos de tratamento contra o câncer (XIU; LIU, 2019).

Alguns estudos como os de Boareto et al. (2015a), Kumar et al. (2019) e Wang et al. (2009) indicam que altos níveis de proteínas *Jagged* demonstram características associadas ao surgimento e manutenção de tumores. A superexpressão de *Jagged* dá origem a um fenótipo híbrido *tip/stalk* fazendo com que os destinos das células *tip* e *stalk* sejam desestabilizados, tornando a angiogênese caótica e gerando excessivos vasos mal perfundidos, sendo essa uma das principais características do câncer. Além disso, outros estudos, como o de Chen et al. (2019), sugerem que o VEGF-A também possui grande influência no desenvolvimento de metástases de células cancerosas. Logo, considera-se a importância de pesquisas que discutem a influência das proteínas ligantes e receptoras durante a angiogênese.

2.4 A influência do VEGF no desenvolvimento da rede vascular

O estudo de Alves (2018) analisa a formação da rede vascular em seis embriões de galinha da espécie *gallus gallus domesticus*. Os embriões foram divididos igualmente em dois grupos distintos: o grupo controle (utilizado para extrair parâmetros quantitativos) e o grupo tratado com 30 μ L de Avastin (*Bevacizumab* ou *bevacizumabe*) à uma concentração de 6 μ g/ μ L (utilizado para verificar a influência do VEGF no desenvolvimento da rede vascular).

O Avastin é um anticorpo utilizado em tratamentos de quimioterapia e inibe a ação do VEGF. De acordo com Mukherji (2010), o Avastin é aplicado para inibir a angiogênese e seu uso em tumores em fase inicial vem sendo estudado ao longo dos anos. Antes disso, o Avastin é amplamente utilizado no tratamento de metástases.

Quando o Avastin é adicionado no sistema, ele recebe o ligante VEGF-A contribuindo para que a sinalização entre VEGFR2 e VEGF-A não seja ativada e, consequentemente, a angiogênese é desacelerada (Figura 5(b)). Quando não há influência do fármaco no sistema, a ligação entre VEGFR2 e o VEGF-A forma o conjunto VEGFR + VEGF-A que possibilita ativar a angiogênese (Figura 5(a)) (ABOUTAVASTIN, 201-).

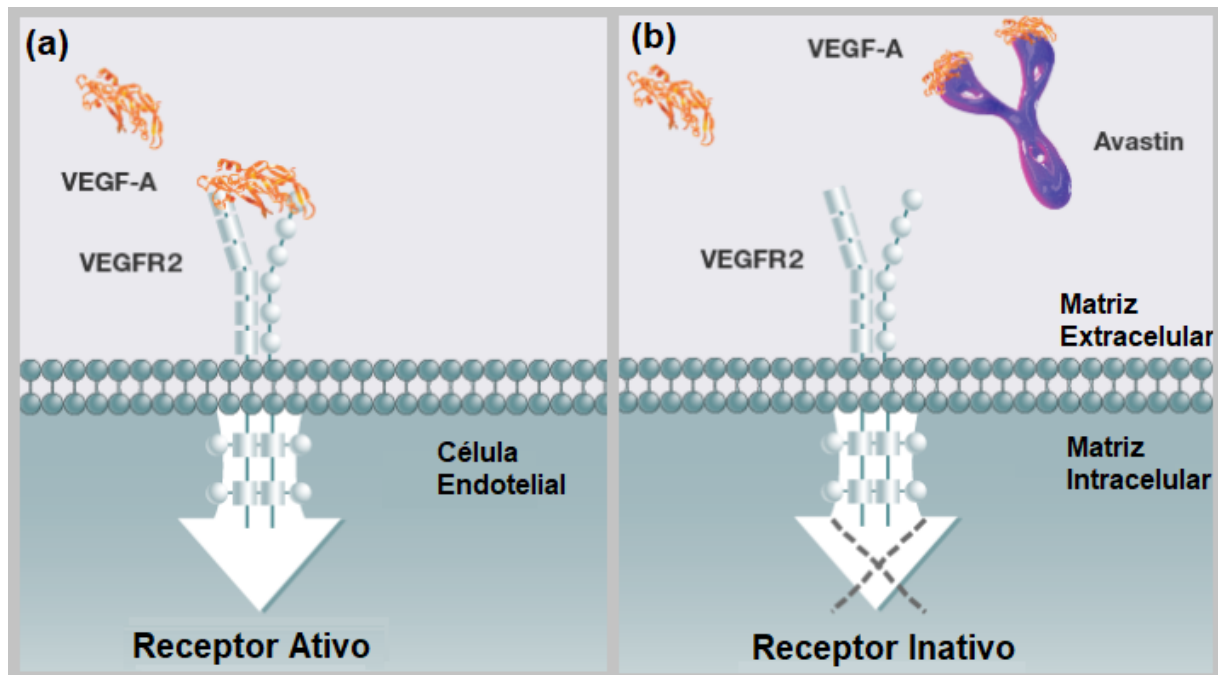


Figura 5 – (a) O receptor VEGFR2 recebe VEGF-A e torna-se ativo para a angiogênese. (b) O Avastin recebe VEGF-A e essa dinâmica faz com que o receptor VEGFR2 fique inativo. Fonte: Adaptado de AboutAvastin (201-)

Para melhor compreender a dinâmica desse sistema, de acordo com Alves (2018), pode-se aplicar a Teoria dos Grafos para estudar a topologia dos vasos ao considerar o alongamento dos vasos como os vértices e os pontos de bifurcações como os nós da rede vascular em formação. Essa representação da topologia permite analisar o crescimento dos vasos sanguíneos.

O principal resultado obtido com o estudo de Alves (2018) é que as topologias de redes obtidas para os dois grupos apresentaram diferenças. No grupo controle, no estágio final da vasculogênese, obteve-se uma topologia do tipo árvore, como ilustra a Figura 6(a), e no grupo tratado obteve-se uma topologia do tipo grade como ilustra a Figura 6(b).

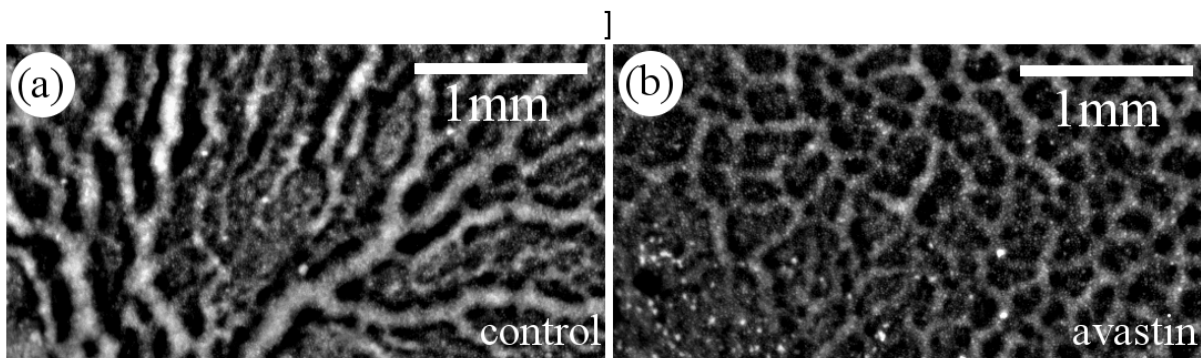


Figura 6 – (a) No grupo controle observa-se a topologia do tipo árvore. (b) No grupo tratado observa-se uma topologia do tipo grade. Fonte: [Alves \(2018\)](#).

Para explicar essas diferenças, segundo [Alves \(2018\)](#), no grupo controle o VEGF se liga às moléculas presentes na matriz extracelular e possibilita a formação de caminhos estimulam a migração das células endoteliais formando assim vascularização do tipo árvore. Nas amostras tratadas com Avastin observa-se que ocorre uma quebra de simetria das ligações. Isso é um indício que o VEGF-A, presente na matriz extracelular, se liga ao Avastin e as ligações nesse tipo de amostra não seguem os mesmos caminhos que no grupo controle. Esta afirmação corrobora o que foi visto nas descrições de [Boareto et al. \(2015a\)](#), pois o VEGF induz a formação de novos brotos e a célula *tip* migra em direção ao sinal emitido por VEGF conduzindo um novo ramo angiogênico. Além disso, de acordo com [Jain \(2005\)](#), tumores tratados com fármacos anti angiogênicos têm sua rede vascular reorganizada a fim de melhorar a oxigenação e penetração do fármaco no sistema.

Como referência, o modelo parácrino proposto por [Köhn-Luque et al. \(2011\)](#) foi considerado na pesquisa de [Alves \(2018\)](#). Neste modelo, considera-se que a principal fonte de VEGF está na vizinhança das células endoteliais, como ilustra a [Figura 7](#).

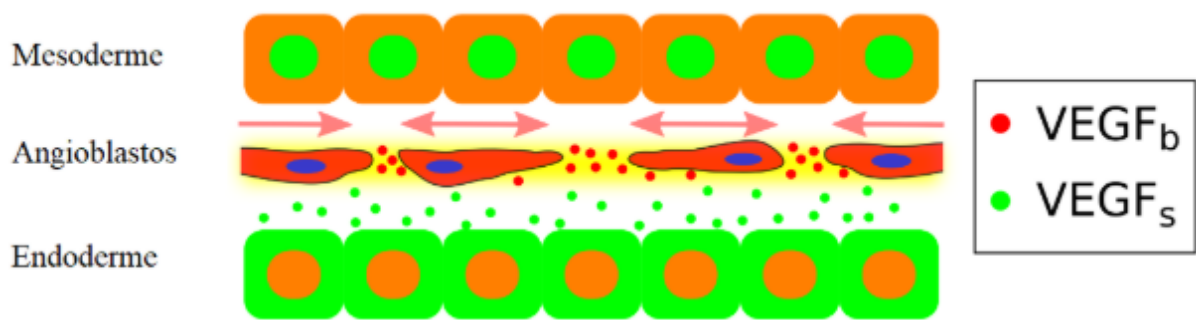


Figura 7 – A mesoderme é a camada de células situada entre a ectoderme (camada externa do embrião) e a endoderme. Os angioblastos são as precursoras das células endoteliais, de onde surgem os vasos sanguíneos. No modelo parácrino proposto por Köhn-Luque et al. (2011) considera-se que as células da endoderme liberam fatores de crescimento, isto é, a principal fonte de fatores de crescimento é produzida na vizinhança da célula endotelial. Este fator é denominado "VEGFs". Além disso, os angioblastos produzem moléculas na matriz extracelular com afinidade ao VEGF, representadas como "VEGFb". Fonte: Köhn-Luque et al. (2011).

Nos estágios iniciais da vasculogênese, os angioblastos (células precursoras das células endoteliais) migram por meio da sinalização da matriz extracelular. Na matriz extracelular há microdomínios de VEGF que sinalizam a migração celular, ou seja, os microdomínios de VEGF criam caminhos que orientam a migração celular (KÖHN-LUQUE et al., 2011). Este processo descreve a sinalização de VEGF para a indução do crescimento dos novos vasos que são guiados pela célula *tip*. Quando se adiciona um fármaco que se liga a estes microdomínios, a migração dos aglomerados celulares torna-se aleatória (ALVES, 2018). Sendo assim, aqui tem-se o primeiro indício que a diferença entre as topologias de rede está diretamente relacionada com o processo de migração dos aglomerados celulares, que é conduzido pela fração de VEGF livre na matriz extracelular, isto é, o VEGF-A.

Capítulo 3

Modelo matemático de Boareto et al. (2015a) para a angiogênese

O objetivo deste capítulo é apresentar um modelo matemático representado por equações diferenciais de primeira ordem que descrevem o processo de angiogênese. Logo, utilizando este conceito, será estudada a dinâmica das vias de sinalização *Notch* e VEGF.

No modelo de Boareto et al. (2015a) são consideradas as dinâmicas das proteínas *Notch*, *Delta* e *Jagged* e os fatores NICD, VEGF, VEGF-A e VEGFR2.

Ao levar em conta os processos apresentados na Seção 2.1 e Seção 2.2, Boareto et al. (2015a) propõem um modelo matemático determinístico descrito por seis equações diferenciais de primeira ordem para descrever a dinâmica de cada um dos fatores e proteínas que atuam na angiogênese, em relação ao tempo.

Segundo Bassanezi (2002), os modelos determinísticos utilizam as informações disponíveis para um estágio do processo e, com isso, o futuro do sistema pode ser previsto.

A seguir, tem-se as equações desenvolvidas para descrever a angiogênese, segundo o modelo de Boareto et al. (2015a). Ressalta-se que as equações seguintes modelam as concentrações presentes em uma única célula imersa em um ambiente externo.

- Para a proteína receptora *Notch*:

Deve-se considerar que a taxa de produção N_0 de *Notch* é aumentada no núcleo da célula pela ação do NICD, que será representado pelo termo $H^{S+}(I, \lambda_{I,N})$. Além disso, considera-se a atuação do efeito *fringe*, representado por $H^S(I, \lambda_{F,D})$, em proporcionar maior afinidade da proteína *Notch* da célula (N) em receber *Delta* (D) da mesma célula pela inibição *cis*, representada por k_c . Além disso, o termo que determina o efeito *fringe* também representa a afinidade de *Notch* em receber *Delta*

do ambiente externo (D_{ext}) pela interação *trans*, representada por k_t . Também deve-se considerar a atuação do efeito *fringe* ($H^S(I, \lambda_{F,J})$) em tornar a concentração de *Notch* na célula menos sensível em receber *Jagged* (J) da mesma célula pela inibição *cis* (k_c) ou em receber *Jagged* do ambiente externo (J_{ext}) pela interação *trans* (k_t). Por fim, considera-se uma taxa de degradação natural γ da proteína *Notch*. Ao considerar essa dinâmica, tem-se a [Equação 1](#) que modela a taxa de variação de *Notch* em relação ao tempo:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,N}) - N[(k_c D + k_t D_{ext}) H^S(I, \lambda_{F,D}) + (K_c J + k_t J_{ext}) H^S(I, \lambda_{F,J})] - \gamma N \quad (1)$$

- Para a proteína ligante *Delta*:

Deve-se considerar que a taxa de produção D_0 de *Delta* é diminuída pela via de sinalização *Notch* e aumentada pela via de sinalização VEGF. Logo, os termos que representam essa dinâmica do NICD são dados por $H^{S-}(I, \lambda_{I,D})$ e $H^{S+}(V, \lambda_{V,D})$. Além disso, a concentração de proteínas *Delta* (D) depende da ligação com a concentração de *Notch* (N) modulado pela ação do efeito *fringe*, representado por $H^S(I, \lambda_{F,D})$, diante da inibição *cis* (k_c). Também, deve-se considerar que a concentração de *Delta* depende da interação *trans* (k_t) que ocorre entre *Delta* da célula analisada e *Notch* presente no ambiente externo (N_{ext}). Por fim, considera-se uma taxa de degradação natural γ da proteína *Delta*. Ao levar em conta essa dinâmica, tem-se a [Equação 2](#) que modela a taxa de variação de *Delta* em relação ao tempo:

$$\frac{dD}{dt} = D_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,D}) H^{S+}(V, \lambda_{V,D}) - D[k_c H^S(I, \lambda_{F,D}) N + k_t N_{ext}] - \gamma D \quad (2)$$

- Para a proteína ligante *Jagged*:

Para a equação de *Jagged*, deve-se considerar que a taxa de produção J_0 de *Jagged* é aumentada no núcleo da célula pela ação do NICD, que será representado por $H^{S+}(I, \lambda_{I,J})$. Além disso, a concentração de proteínas *Jagged* (J) depende da ligação com a concentração de *Notch* (N) modulado pela ação do efeito *fringe*, representado por $H^S(I, \lambda_{F,J})$, diante da inibição *cis* (k_c). Também, deve-se considerar que a concentração de *Jagged* depende da interação *trans* (k_t) que ocorre entre *Jagged* da célula analisada e *Notch* presente no ambiente externo (N_{ext}). Por fim, considera-se uma taxa de degradação natural γ da proteína *Jagged*. Ao levar em conta essa dinâmica, tem-se a [Equação 3](#) que modela a taxa de variação de *Jagged* em relação ao tempo:

$$\frac{dJ}{dt} = J_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,J}) - J[k_c H^S(I, \lambda_{F,J})N + k_t N_{ext}] - \gamma J \quad (3)$$

- Para o NICD:

Sabe-se que o NICD não é acionado pela inibição *cis*, logo, tem-se apenas os termos que representam a interação *trans* no sistema para compor a equação do NICD. Portanto, considera-se a interação *trans* k_t que ocorre quando *Notch* (N) da célula analisada é modulado pelo efeito *fringe* dado por $H^S(I, \lambda_{F,D})$, que o torna mais sensível em receber *Delta* do ambiente externo (D_{ext}). Além disso, deve-se considerar a atuação do efeito *fringe* dado por $H^S(I, \lambda_{F,J})$, que torna *Notch* menos sensível em receber *Jagged* de um ambiente externo (J_{ext}). Por fim, considera-se uma taxa de degradação natural γ_I do NICD. Ao levar em conta essa dinâmica, tem-se a [Equação 4](#) que modela a taxa de variação de NICD em relação ao tempo:

$$\frac{dI}{dt} = k_t N [D_{ext} H^S(I, \lambda_{F,D}) + J_{ext} H^S(I, \lambda_{F,J})] - \gamma_I I \quad (4)$$

- Para o receptor VEGFR2:

Como já visto, a taxa de produção de VEGFR2 (VR_0) é restringida pela ação do NICD, que será representado por $H^{S-}(I, \lambda_{I,VR})$. Além disso, considera-se a interação *trans* (k_t) que ocorre quando a concentração de VEGFR2 (VR) recebe a concentração externa de VEGF (V_{ext}), que é o ligante VEGF-A. Por fim, considera-se uma taxa de degradação natural γ do receptor VEGFR2. Ao levar em conta essa dinâmica, tem-se a [Equação 5](#) que modela a taxa de variação de VEGFR2 em relação ao tempo:

$$\frac{dVR}{dt} = VR_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,VR}) - k_t VR V_{ext} - \gamma VR \quad (5)$$

- Para o VEGF:

Para determinar a taxa de variação de VEGF em relação ao tempo, considera-se a interação *trans* (k_t) que ocorre quando a concentração de VEGFR2 (VR) recebe a concentração externa de VEGF (V_{ext}). Além disso, tem-se uma taxa de degradação natural γ_I do VEGF. Ao levar em conta essa dinâmica, tem-se a [Equação 6](#):

$$\frac{dV}{dt} = k_t V_R V_{ext} - \gamma_I V \quad (6)$$

Na [Equação 1](#), [Equação 2](#), [Equação 3](#), [Equação 4](#), [Equação 5](#) e [Equação 6](#) os termos $H^{S+}(I, \lambda_{I,N})$, $H^{S+}(I, \lambda_{I,J})$, $H^{S-}(I, \lambda_{I,D})$, $H^{S+}(V, \lambda_{V,D})$ e $H^{S-}(I, \lambda_{I,VR})$ representam a ação do NICD em restringir ou ativar as taxas de produção das proteínas no núcleo das células. O termo H^{S+} representa essa ativação e o termo H^{S-} representa a restrição. De acordo com ([BOARETO et al., 2015a](#)), o termo H está relacionado com a função deslocada de Hill, definida como:

$$H^S(X, \lambda_{X,Y}) = H^-(X) + \lambda_{X,Y} H^+(X) \quad (7)$$

em que $H^-(X)$ é uma função de restrição, $H^+(X)$ é uma função de ativação e $\lambda_{X,Y}$ denota a alteração na produção de Y de acordo com o X . A função de restrição e a função de ativação na função deslocada de Hill estão relacionadas com os parâmetros a serem utilizados no modelo. Para a função de ativação (H^{S+}) utiliza-se $\lambda > 1$ e para a função de restrição (H^{S-}) tem-se $\lambda = 0$.

O efeito *fringe* é representado por $H^S(I, \lambda_{F,J})$ e $H^S(I, \lambda_{F,D})$ e para representar a afinidade de *Notch* receber *Delta*, utiliza-se $\lambda > 1$ e, conseqüentemente, para representar a rejeição de *Notch* na ligação com *Jagged*, utiliza-se $\lambda < 1$.

A função de Hill deslocada referente à sinalização de NICD é dada pela [Equação 8](#) a seguir.

$$H^S(I, \lambda) = \frac{1}{1 + \left(\frac{I}{I_0}\right)^n} + \lambda \frac{\left(\frac{I}{I_0}\right)^n}{1 + \left(\frac{I}{I_0}\right)^n} \quad (8)$$

em que n é o expoente de Hill, que assume valores diferentes para cada proteína dependendo da ativação ou restrição devido a atuação do NICD. O parâmetro λ também é uma constante que depende da função deslocada de Hill ser positiva (H^{S+} = função de ativação $\lambda > 0$) ou negativa (H^{S-} = função de restrição $\lambda = 0$).

Para avaliar o comportamento da função de Hill deslocada, tem-se a [Figura 8](#) que representa a fração de efeito *versus* a concentração de NICD.

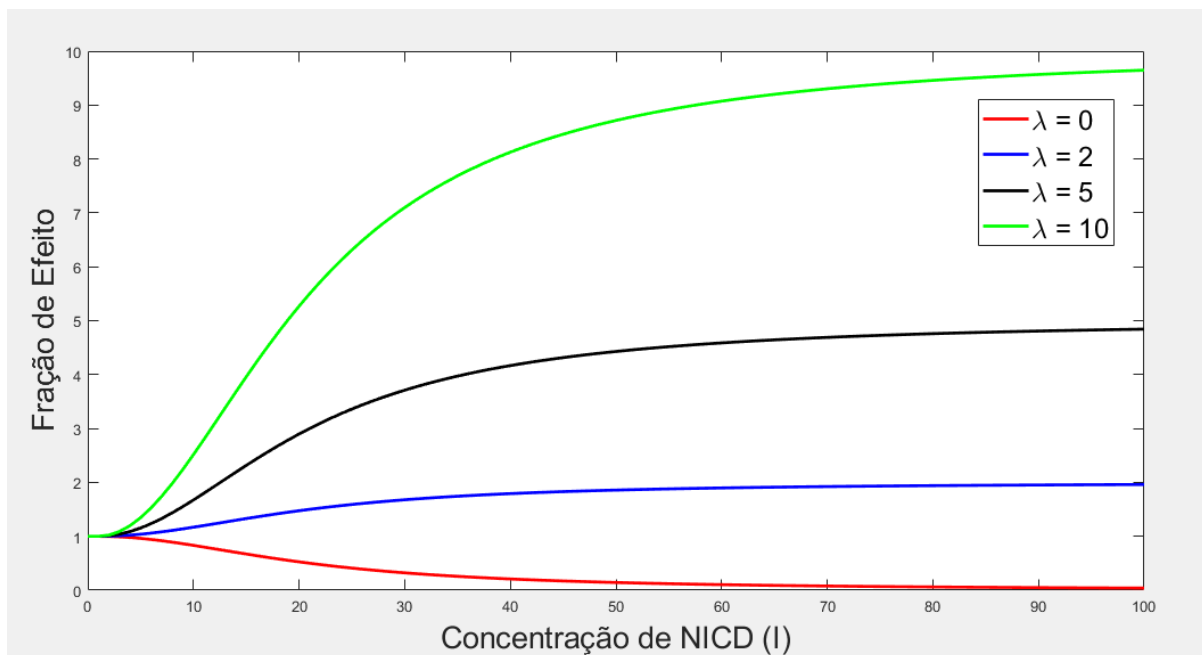


Figura 8 – Análise da função de Hill deslocada e influência de λ . A curva vermelha representa a função ao considerar $\lambda = 0$. Para a curva azul considera-se $\lambda = 2$. A curva preta considera a função de Hill deslocada com $\lambda = 5$. Por fim, a curva verde representa a função com $\lambda = 10$. Para essa simulação considerou-se $I_0 = 20$ e a concentração de NICD variando de 1 a 100.

Na [Figura 8](#) foi avaliado a Fração de Efeito em função da concentração NICD para diferentes valores de λ . Observa-se que, de fato, ao tomar o parâmetro $\lambda = 0$, tem-se uma função de Hill deslocada de restrição. Isso é exemplificado pela análise da curva vermelha que possui uma fração de efeito menor que 1. Portanto, nesta ocasião a função de Hill deslocada simula o efeito do NICD em restringir as taxas de produção das proteínas no núcleo da célula.

Além disso, pode ser observado que quanto maior o valor de λ , maior será a fração de efeito da função de Hill deslocada. Logo, com $\lambda > 0$ a função de Hill deslocada simula a ação do NICD em aumentar as taxas de produção das proteínas no núcleo da célula.

Um outro parâmetro interessante a ser analisado é o expoente da função de Hill deslocada. Os valores utilizados por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#) para os expoentes de Hill são sempre maiores que um. Com $n > 1$ tem-se um sistema cooperativo, com isso, quando uma proteína se liga a um determinado sítio ela facilita a ligação de outras proteínas ([DI BIASIO et al., 2012](#)). Logo, tomando diferentes valores com $n > 1$, tem-se a [Figura 9](#) que representa a influência da variação deste parâmetro.

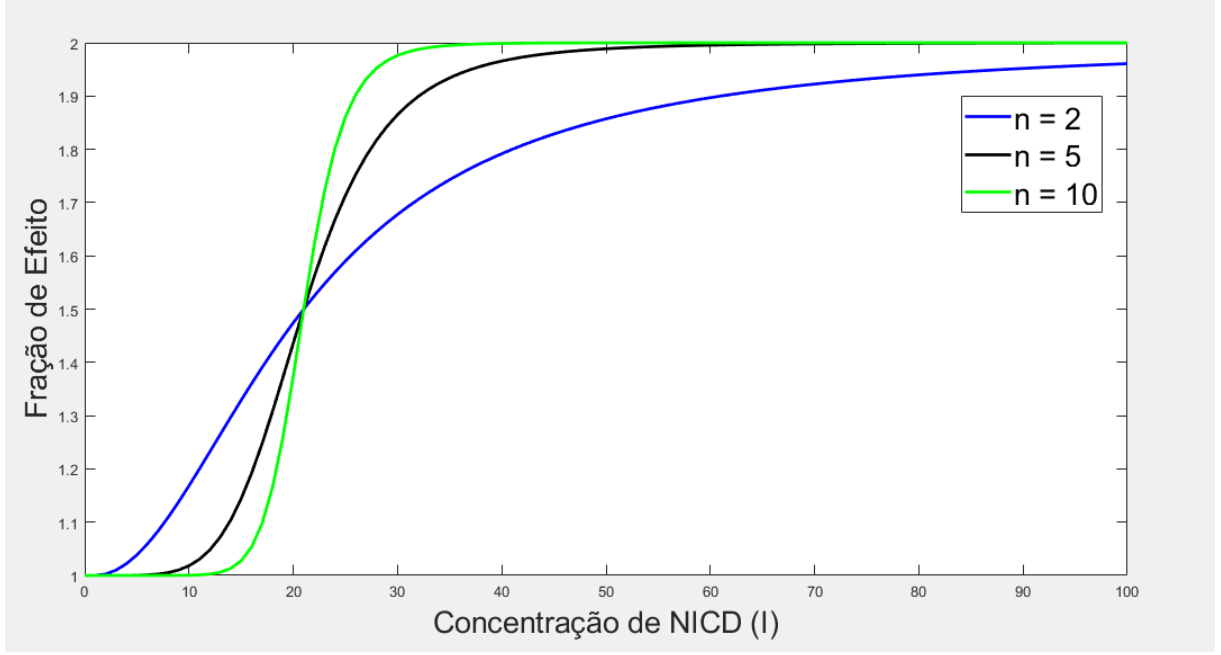


Figura 9 – Análise da função de Hill deslocada e influência do expoente. A curva azul representa a função de Hill deslocada com $n = 2$. A curva preta considera a função de Hill deslocada com $n = 5$. Por fim, a curva verde representa a função com $n = 10$. Para essa simulação considerou-se $I_0 = 20$ e a concentração de NICD variando de 1 a 100.

De acordo com a [Figura 9](#), observa-se que as curvas tendem a estabilizar com uma fração de efeito próxima a 2. Além disso, nota-se que quanto menor o expoente da função de Hill deslocada, mais lenta é a estabilização.

Ao considerar a inclusão do VEGF no sistema, tem-se uma contribuição na taxa de produção de proteínas *Delta*. *Delta* é restringido pela sinalização do receptor *Notch*, mas é ativado pela sinalização de VEGF.

Para incluir esta ativação de *Delta*, que também ocorre pela ação do NICD, a função de Hill deslocada é análoga à [Equação 8](#). Logo, a função de Hill deslocada em função de VEGF é descrita a seguir pela [Equação 9](#).

$$H^S(V, \lambda) = \frac{1}{1 + \left(\frac{V}{V_0}\right)^n} + \lambda \frac{\left(\frac{V}{V_0}\right)^n}{1 + \left(\frac{V}{V_0}\right)^n} \quad (9)$$

Ao considerar a [Equação 8](#) para *Notch* e *Jagged*, o modelo assume a função de Hill deslocada positiva ($\lambda > 0$) e ao considerar a [Equação 8](#) para *Delta* e VEGFR2 a função de

Hill deslocada é negativa ($\lambda = 0$). Entretanto, ao considerar a [Equação 9](#), a função de Hill deslocada torna-se positiva para *Delta* ($\lambda > 0$), visto que a sinalização via VEGF regula o aumento dessa proteína ([BOARETO et al., 2015a](#)).

As funções de Hill deslocadas, representadas pelas [Equação 8](#) e [Equação 9](#), são eficientes para descrever variações de estado, sendo úteis também para modelar a produção de substâncias quando suas origens estão sendo reguladas por outras ([FRAGOSO; FERREIRA; MARQUES, 2009](#)).

Neste sentido, no modelo proposto por [Boareto et al. \(2015a\)](#), a função deslocada de Hill é eficiente para modelar a atuação do NICD em restringir ou aumentar as taxas de produção de proteínas no núcleo da célula. Além disso, ela é utilizada para modelar o efeito *fringe* no sistema.

A partir do modelo matemático de [Boareto et al. \(2015a\)](#), é possível analisar computacionalmente a dinâmica das populações, o ponto de saturação de cada proteína e os pontos de equilíbrio do sistema. Essas análises são importantes para compreender a interação entre as proteínas e conhecer os processos que podem levar ao surgimento e/ou crescimento de um possível tumor.

Capítulo 4

Metodologia

Neste capítulo a metodologia de pesquisa será exibida. Serão apresentados o delineamento, a coleta e o tratamento dos dados obtidos.

4.1 Delineamento da pesquisa

Inicialmente realizou-se um estudo detalhado sobre os modelos matemáticos, que correspondem à angiogênese, desenvolvidos por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#). Diferente do que foi feito por esses autores, no modelo matemático desenvolvido nessa pesquisa não será considerado o efeito *fringe*, pois pressupõe-se que este efeito possa ser modulado considerando a concentração inicial de *Notch* maior que zero, visto que o efeito *fringe* age diretamente na concentração disponível de *Notch*. Além disso, a exclusão do efeito *fringe*, que, considerando os valores dos parâmetros utilizados nos estudos de [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#), é um parâmetro entre 0 e 1, não mostrou diferenças qualitativas relacionadas aos modelos apresentados na literatura.

Dessa forma, ao considerar as equações diferenciais que compõe o modelo de [Boareto et al. \(2015a\)](#), tem-se:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,N}) - N[(k_c D + k_t D_{ext}) H^S(I, \lambda_{F,D}) + (K_c J + k_t J_{ext}) H^S(I, \lambda_{F,J})] - \gamma N \quad (10)$$

$$\frac{dD}{dt} = D_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,D}) H^{S+}(V, \lambda_{V,D}) - D[k_c H^S(I, \lambda_{F,D}) N + k_t N_{ext}] - \gamma D \quad (11)$$

$$\frac{dJ}{dt} = J_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,J}) - J[k_c H^S(I, \lambda_{F,J}) N + k_t N_{ext}] - \gamma J \quad (12)$$

$$\frac{dI}{dt} = k_t N [D_{ext} \textcolor{red}{H^S(I, \lambda_{F,D})} + J_{ext} \textcolor{red}{H^S(I, \lambda_{F,J})}] - \gamma_I I \quad (13)$$

$$\frac{dVR}{dt} = VR_0 \textcolor{blue}{H^{S-}(I, \lambda_{I,VR})} - k_t VR V_{ext} - \gamma VR \quad (14)$$

$$\frac{dV}{dt} = k_t V_R V_{ext} - \gamma_I V \quad (15)$$

em que os termos destacados em vermelho representam os parâmetros a serem desconsiderados, que modelam a atuação do efeito *fringe* pela função de Hill deslocada. Entretanto, os termos destacados em cor azul serão mantidos, pois representam a função de Hill deslocada que modela a atuação do NICD no núcleo da célula.

Assim como feito por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#), foi realizada uma análise incremental em que primeiramente foi analisada a interação entre as proteínas *Notch* e *Delta* diante da atuação do NICD. Este primeiro modelo foi chamado de NDI. Na segunda etapa, avaliou-se o sistema ao considerar a introdução da proteína *Jagged*, compondo o que foi chamado de modelo NDJI. Por fim, incluiu-se a sinalização de VEGF e seus respectivos receptores e ligantes, caracterizando o modelo NDJVI.

Além disso, o modelo matemático obtido foi aplicado ao estudo experimental de [Alves \(2018\)](#). Através da influência de VEGF no modelo NDJVI, foi feita a associação com os resultados referentes à topologia da rede vascular obtidos por [Alves \(2018\)](#).

4.2 Coleta e tratamento de dados

Todos os modelos matemáticos foram construídos por meio de equações diferenciais de primeira ordem ao considerar a dinâmica das vias de sinalização *Notch* e VEGF.

Para realizar as análises computacionais, o tratamento dos dados foi feito por meio do *software MatLab* perante a tradução das equações diferenciais em equações de diferenças, compondo um modelo determinístico. Para a implementação de todas as análises, após a declaração das variáveis e das condições iniciais, foi utilizado um laço de repetição que permitiu prever o passo futuro ($P(n+1)$) de acordo com o passo anterior ($P(n)$).

Para validar o modelo, as análises realizadas foram comparadas com as investigações feitas por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#) e reproduziram o mesmo comportamento qualitativo, mesmo não sendo considerado o efeito *fringe* no modelo aqui proposto.

Capítulo 5

Análise e Discussão dos Resultados

O objetivo deste capítulo é analisar e discutir qualitativamente e quantitativamente os resultados obtidos neste estudo.

Diferente do que é feito por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#), neste estudo não será considerada a atuação do efeito *fringe*. Esta não inclusão do efeito *fringe* dá-se pelos resultados obtidos, que indicam que as condições iniciais da proteína *Notch* são capazes de modular este efeito e que a inclusão deste efeito não é determinante para os resultados obtidos por [Boareto et al. \(2015a\)](#). Dessa forma, este capítulo está organizado da seguinte maneira:

Na [Seção 5.1](#) será analisada a interação entre as proteínas *Notch*, *Delta* e NICD, assim como foi feito por [Boareto et al. \(2015b\)](#). Este modelo será chamado de NDI. A influência da [Equação 8](#) em simular a dinâmica do NICD será avaliada e discutida, bem como a dinâmica e o estado estacionário do sistema.

Na [Seção 5.2](#) a proteína *Jagged* será acrescentada ao modelo NDI, do mesmo modo como foi feito por [Boareto et al. \(2015b\)](#). Este modelo será chamado de NDJI. Assim como para o modelo NDI, a influência da [Equação 8](#), a dinâmica e o estado estacionário do sistema serão simulados e discutidos.

Na [Seção 5.3](#) serão acrescentadas as proteínas VEGF, VEGFR2 e VEGF-A ao modelo NDJI, resultando no modelo completo da angiogênese, que será chamado de modelo NDJVI. Além disso, será analisada a influência da [Equação 8](#) e da [Equação 9](#) no sistema. A dinâmica e o estado estacionário do modelo NDJVI serão simulados e discutidos.

Na [Seção 5.4](#) o VEGF-A do modelo NDJVI será alterado a fim de analisar sua influência na angiogênese. Os resultados dessa análise serão aplicados ao estudo experimental de [Alves \(2018\)](#), introduzido na [Seção 2.4](#).

5.1 O modelo NDI

Aqui será apresentado o modelo matemático mais simples: o NDI. Este modelo envolve somente a interação entre as proteínas *Notch*, *Delta* e o NICD.

A seguir, serão apresentados os processos que descrevem a construção das equações do modelo.

5.1.1 Construção da equação de *Notch*

Primeiramente será construída a equação para *Notch*. Para isso, deve-se considerar a ligação entre *Notch* de uma célula (N) e *Delta* de um ambiente externo (D_{ext}) e isso envolve a interação *trans* (k_t). Esta dinâmica é representada pela [Equação 16](#) a seguir.



Observa-se que a [Equação 16](#) acontece em dois sentidos. k_{t-} será considerado o sentido da direita para a esquerda e k_{t+} da esquerda para direita.

Deve-se considerar, também, os quatro fatores que determinam a variação da proteína *Notch* em uma célula, que são:

- O NICD: que penetra no núcleo da célula ativando a produção de *Notch*. Isso faz com que a população de *Notch* em relação ao tempo seja proporcional à taxa de produção de *Notch* (N_0) multiplicada pela função de Hill deslocada dada pela [Equação 8](#). Essa relação é representada pela [Equação 17](#) a seguir, em que $\lambda_{I,N}$ é o parâmetro representado por λ na [Equação 8](#) para a proteína *Notch* e está relacionado à função positiva de Hill deslocada diante da atuação do NICD.

$$\frac{dN}{dt} \propto +N_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,N}) \quad (17)$$

- k_{t+} : se a [Equação 16](#) acontece da no sentido de k_{t+} , há um decréscimo da população de N (e de D_{ext}), que se liga ao D_{ext} para formar outro composto que também depende de D_{ext} . Essa relação é representada pela [Equação 18](#) a seguir.

$$\frac{dN}{dt} \propto -k_{t+} N D_{ext} \quad (18)$$

- k_{t-} : se a [Equação 16](#) acontece da no sentido de k_{t-} , há um aumento da população de N (e de D_{ext}). A [Equação 19](#) representa essa dinâmica.

$$\frac{dN}{dt} \propto +k_{t-}[ND_{ext}] \quad (19)$$

- Degradação natural: a população de *Notch* diminui por um processo de degradação natural que ocorre com uma taxa γ , como mostra a [Equação 20](#)

$$\frac{dN}{dt} \propto -\gamma N \quad (20)$$

Entretanto, pode ocorrer inibição *cis* entre *Notch* da célula que está sendo considerada e *Delta* da mesma célula. Assim como a interação *trans*, a inibição *cis* possui taxas diferentes (k_{c+} e k_{c-}) e é representada pela [Equação 21](#) a seguir.



De acordo com a [Equação 21](#), há mais dois termos que irão contribuir com $\frac{dN}{dt}$, que são:

- k_{c+} : é quando a [Equação 21](#) acontece no sentido da esquerda para direita. Neste caso, haverá um decréscimo de *Notch*, pois *Notch* e *Delta* interagem para formar $[ND]$. Esta dinâmica é representada pela [Equação 22](#).

$$\frac{dN}{dt} \propto -k_{c+}ND \quad (22)$$

- k_{c-} : é quando a [Equação 21](#) acontece no sentido da direita para esquerda. Neste caso, haverá um aumento de *Notch*, pois $[ND]$ se decompõe. Esta dinâmica é representada pela [Equação 23](#).

$$\frac{dN}{dt} \propto +k_{c-}[ND] \quad (23)$$

Ao reunir todas as equações que representam $\frac{dN}{dt}$, até então, tem-se:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,N}) - N(k_{t+}D_{ext} + k_{c+}D) + k_{t-}[ND_{ext}] + k_{c-}[ND] - \gamma N \quad (24)$$

Também devem ser consideradas as equações que representam as variações de $[ND_{ext}]$ e $[ND]$.

Para $[ND_{ext}]$:

- A produção desse composto é aumentada à uma taxa k_{t+} , conforme representa a [Equação 16](#), e depende das concentrações de $[N]$ e $[D_{ext}]$:

$$\frac{d[ND_{ext}]}{dt} \propto +k_{t+}ND_{ext} \quad (25)$$

- Entretanto, a produção de $[ND_{ext}]$ é reduzida pela [Equação 16](#) quando acontece da direita para a esquerda:

$$\frac{d[ND_{ext}]}{dt} \propto -k_{t-}[ND_{ext}] \quad (26)$$

- há também a taxa de degradação (k_l) desse composto relacionada a um sinal enviado por NICD:

$$\frac{d[ND_{ext}]}{dt} \propto -k_l[ND_{ext}] \quad (27)$$

Ao reunir a [Equação 25](#), [Equação 26](#) e [Equação 27](#), tem-se:

$$\frac{d[ND_{ext}]}{dt} = +k_{t+}ND_{ext} - k_{t-}[ND_{ext}] - k_l[ND_{ext}] \quad (28)$$

Para $[ND]$:

Por argumentos semelhantes aos utilizados para construir a equação de $[ND_{ext}]$, a variação de $[ND]$ é dada pela [Equação 29](#) a seguir.

$$\frac{d[ND]}{dt} = +k_{c+}ND - k_{c-}[ND] - k_l[ND] \quad (29)$$

Admitindo que essas populações atingem um estado de equilíbrio (estado estacionário), isto é, $\frac{d[ND_{ext}]}{dt} = 0$ e $\frac{d[ND]}{dt} = 0$, obtém-se:

$$[ND_{ext}] = \frac{k_{t+}}{k_{t-} + k_l} ND_{ext} \quad (30)$$

$$[ND] = \frac{k_{c+}}{k_{c-} + k_l} ND \quad (31)$$

Substituindo a [Equação 30](#) e a [Equação 31](#) na [Equação 24](#) e realizando algumas manipulações matemáticas, tem-se a [Equação 32](#).

$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,N}) - k_{t+} ND_{ext} \left(\frac{k_l}{k_{t-} + k_l} \right) - k_{c+} ND \left(\frac{k_l}{k_{t-} + k_l} \right) - \gamma N \quad (32)$$

Ao definir $k_t = \frac{k_{t+}k_l}{k_{t-} + k_l}$ e $k_c = \frac{k_{c+}k_l}{k_{c-} + k_l}$ a equação de *Notch* será dada por:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,N}) - k_t ND_{ext} - k_c ND - \gamma N \quad (33)$$

5.1.2 Construção da equação de *Delta*

Agora será modelada a variação de *Delta* da célula que está sendo considerada.

A proteína *Delta* (D) desta célula poderá interagir com *Notch* de um ambiente externo (N_{ext}), análogo à [Equação 16](#). Logo,



Se a reação da [Equação 34](#) ocorre da esquerda para direita (k_{t+}), *Delta* diminui, mas no sentido inverso (k_{t-}), *Delta* aumenta:

$$\frac{dD}{dt} \propto -k_{t+} N_{ext} D + k_{t-} [N_{ext}D] \quad (35)$$

A formação de NICD (I) restringe a produção de *Delta*, portanto deve-se multiplicar a taxa de produção de *Delta* (D_0) pela função de Hill deslocada "negativa", isto é, por:

$$H^{S-}(I, \lambda_{I,D}) = \frac{1}{1 + \left(\frac{I}{I_0}\right)^n} \quad (36)$$

resultando em:

$$\frac{dD}{dt} \propto D_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,D}) \quad (37)$$

em que $\lambda_{I,D}$ é o parâmetro para *Delta* que representa λ na [Equação 8](#). Deve-se, também considerar a taxa de degradação natural (γ) de *Delta*, conforme representa a [Equação 38](#).

$$\frac{dD}{dt} \propto -\gamma D \quad (38)$$

Além disso, poderá ocorrer a inibição *cis* entre *Notch* e *Delta* da mesma célula analisada, logo:

$$\frac{dD}{dt} \propto -k_{c+}ND + k_{c-}[ND] \quad (39)$$

Ao reunir todas as equações que representam $\frac{dD}{dt}$, até então, tem-se:

$$\frac{dD}{dt} = D_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,D}) - k_{t+}N_{ext}D - k_{c+}ND + k_{t-}[N_{ext}D] + k_{c-}[ND] - \gamma D \quad (40)$$

Deve-se considerar as equações que representam as variações de $[N_{ext}D]$ e $[ND]$, como foi feito para *Notch*.

Ao rever os argumentos que levaram à [Equação 28](#), [Equação 29](#), [Equação 30](#) e [Equação 31](#), a [Equação 28](#) ficará alterada para:

$$\frac{d[N_{ext}D]}{dt} = +k_{t+}N_{ext}D - k_{t-}[N_{ext}D] - k_l[N_{ext}D] \quad (41)$$

e, no estado estacionário, isto é, $\frac{d[N_{ext}D]}{dt} = 0$, haverá uma equação análoga à [Equação 30](#), como representa a [Equação 42](#):

$$[N_{ext}D] = \frac{k_{t+}}{k_{t-} + k_l} N_{ext}D \quad (42)$$

Para $[ND]$, mantém-se a [Equação 31](#).

Ao substituir a [Equação 42](#) e [Equação 31](#) na [Equação 40](#), o modelo matemático para *Delta* é dado pela [Equação 43](#) a seguir.

$$\frac{dD}{dt} = D_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,D}) - k_t N_{ext}D - k_c ND - \gamma D \quad (43)$$

5.1.3 Construção da equação do NICD

Por fim, deve-se considerar a produção de NICD (I), pois é ela que afeta *Notch* e *Delta* (e também *Jagged* que não está sendo considerado no modelo NDI). O NICD só é produzido pela interação *trans* entre *Notch* da célula e *Delta* do ambiente externo (D_{ext}). Logo:

$$\frac{dI}{dt} \propto +k_{t+}ND_{ext} - k_{t-}[ND_{ext}] \quad (44)$$

Há também a taxa de degradação de NICD que será dada por γ_I , logo:

$$\frac{dI}{dt} \propto +k_{t+}ND_{ext} - k_{t-}[ND_{ext}] - \gamma_I I \quad (45)$$

Como $[ND_{ext}]$ é dado pela [Equação 30](#), no estado estacionário, ao substituir a [Equação 30](#) na [Equação 45](#) e realizar algumas manipulações matemáticas, a equação que representa a dinâmica de NICD é dada por:

$$\frac{dI}{dt} = k_t ND_{ext} - \gamma_I I \quad (46)$$

Portando, o modelo NDI é composto por três equações, sendo elas a [Equação 33](#), a [Equação 43](#) e a [Equação 46](#).

Assim como enfatizam [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#), ressalta-se que as equações do modelo descrevem as concentrações presentes em uma única célula, a qual está imersa em um ambiente externo onde são simuladas as demais concentrações externas.

Parâmetro	Valor	Unidade de medida
N_0	500	proteína / tempo (hora)
D_0	1000	proteína / tempo (hora)
I_0	200	proteína / tempo (hora)
N_{ext}	500	número de proteínas
D_{ext}	1500	número de proteínas
γ	0,1	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
γ_I	0,5	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
$\lambda_{I,N}$	2	sem dimensão
$\lambda_{I,D}$	0	sem dimensão
$n_D = n_N$	2	sem dimensão
k_t	$5 * 10^{-5}$	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
k_c	$5 * 10^{-4}$	$tempo^{-1}(hora^{-1})$

Tabela 1 – Parâmetros do modelo NDI. n_D e n_N são os expoentes de Hill da [Equação 8](#) para *Delta* e *Notch* respectivamente.

5.1.4 A influência da função de Hill deslocada no modelo NDI

A fim de analisar a influência da [Equação 8](#) no modelo NDI, serão utilizados os parâmetros definidos na [Tabela 1](#), propostos por [Boareto et al. \(2015b\)](#).

Com auxílio da [Equação 8](#), [Equação 33](#), [Equação 43](#), [Equação 46](#), os parâmetros da [Tabela 1](#) e considerando as populações iniciais de *Delta* e NICD nulas e de *Notch* = 75 proteínas, tem-se a [Figura 10](#) que representa a influência da função de Hill deslocada no modelo NDI.

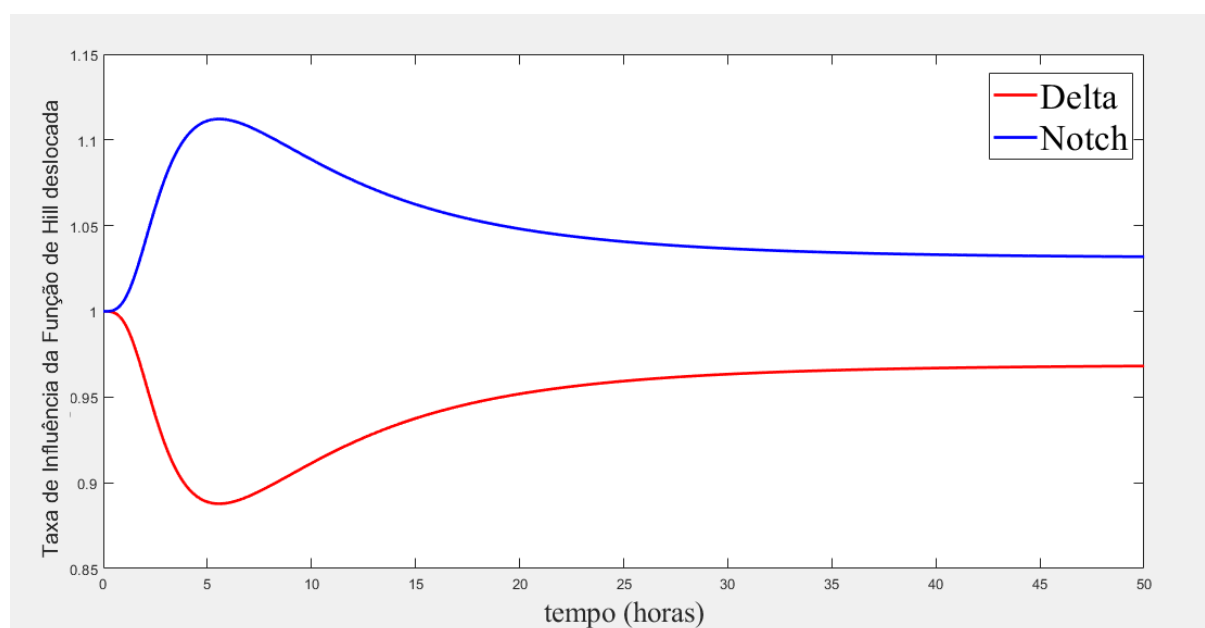


Figura 10 – A curva azul representa a função de Hill deslocada para *Notch* e a curva vermelha representa a função de Hill deslocada para *Delta*.

Pela [Figura 10](#) percebe-se que a função de Hill deslocada modela o efeito do NICD, mesmo o valor estando próximo de uma unidade. Como o efeito modelado pela função de Hill deslocada encontra-se próximo à uma unidade, isso reflete um resultado específico para os parâmetros das condições iniciais consideradas para cada proteína.

O valor alcançado pela função de Hill deslocada para *Delta* é de $9,68 \times 10^{-1}$ e para a função de Hill deslocada para modular *Notch*, é de $1,03 \times 10$. Observa-se que *Notch* tem sua produção lentamente ativada, principalmente no intervalo de zero a cinco horas, enquanto *Delta* tem sua produção lentamente restringida neste mesmo intervalo.

5.1.5 A dinâmica do modelo NDI

Para analisar a dinâmica do sistema, serão utilizadas as equações do modelo NDI e os parâmetros apresentados na [Tabela 1](#). As populações iniciais de *Delta* e NICD serão consideradas nulas e a população inicial de *Notch* será de 75 proteínas. Assim, tem-se a [Figura 11](#) a seguir.

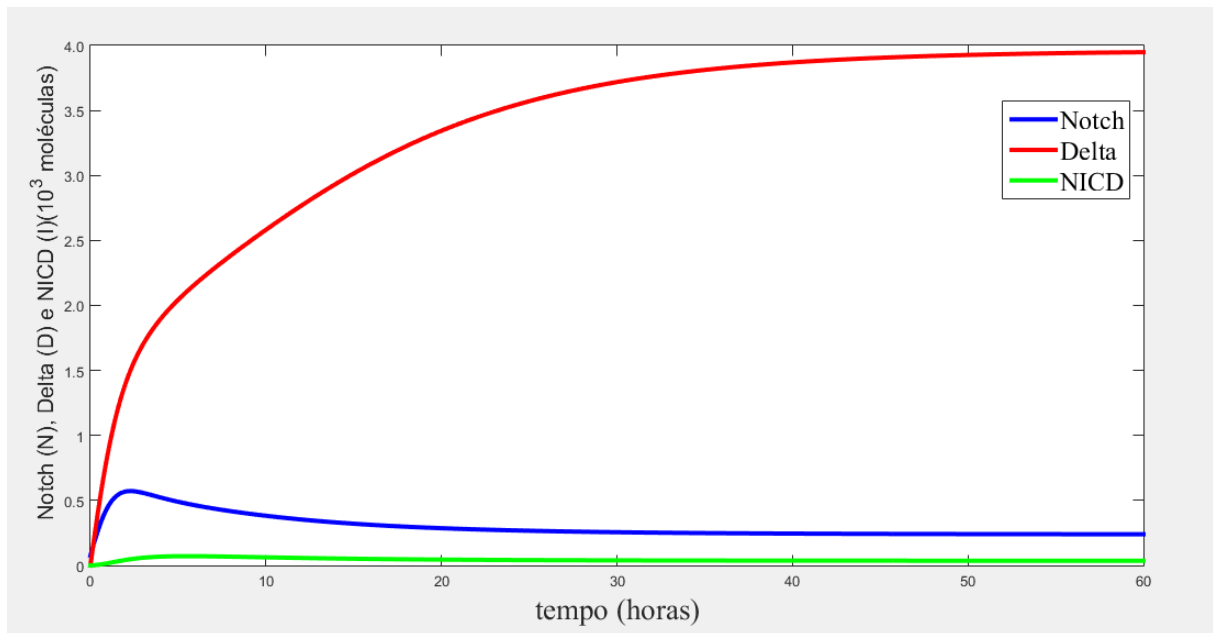


Figura 11 – A curva azul representa a dinâmica de *Notch*, a curva vermelha representa a dinâmica de *Delta* e a curva verde representa a dinâmica do NICD. *Notch*, *Delta* e NICD são dados em função do tempo em horas.

O resultado exposto na [Figura 11](#) mostra que *Delta* demora mais que *Notch* e *NICD* para estabilizar. Enquanto *Notch* e *NICD* estabilizam em cerca de 20 horas, *Delta* entra no estado estacionário em cerca de 50 horas. Além disso, observa-se que a produção de *Delta* é bem maior que a produção de *Notch* e *NICD*. O valor alcançado por *Delta* é $3,95 \times 10^3$, por *Notch* é $2,40 \times 10^2$ e por *NICD* é $3,60 \times 10$.

Pode-se entender este resultado ao observar o comportamento das populações de *Notch* e NICD: essas duas populações, especialmente a de NICD, ficam restritas à taxas muito pequenas ($N_0 = 500$; $I_0 = 200$) e isso faz com que o NICD não "cresça" o suficiente para restringir *Delta*.

Este é um resultado particular para um conjunto específico de condições para N_0 , D_0 e I_0 . Como a taxa de produção de *Delta*, D_0 , é maior do que a taxa de produção das demais proteínas, esta é a população que cresce mais rapidamente. Entretanto, ao aumentar as taxas de produção de *Notch* e NICD a produção de *Delta* decresce, como é esperado.

Como será discutido a seguir, a predominância de *Delta* sobre as demais populações depende fortemente dos valores iniciais das populações – especialmente do valor inicial da população *Notch* uma vez que NICD é diretamente dependente desta última proteína.

5.1.6 Análise das populações de equilíbrio do modelo NDI

Para que uma determinada população atinja o equilíbrio, sua população no instante $t + 1$ deve ser a mesma que no instante t , isto é, $P_{t+1} = P_t$ em que P é a população analisada. Isso indica um estado de estabilização (SILVA, 2012).

Ao fazer $\frac{dN}{dt} = 0$ (estado estacionário para *Notch*), da Equação 33 segue que:

$$N_* = \frac{N_0 H^{S+}(I_*, \lambda_{I,N})}{k_t D_{ext} + k_c D_* + \gamma} \quad (47)$$

O símbolo * representa o equilíbrio das populações. De maneira semelhante, para o estado estacionário de *Delta*, será feito $\frac{dD}{dt} = 0$ a partir da Equação 43, resultando em:

$$D_* = \frac{D_0 H^{S-}(I_*, \lambda_{I,D})}{k_t N_{ext} + k_c N_* + \gamma} \quad (48)$$

E, finalmente, para $\frac{dI}{dt}$, da Equação 46 obtém-se:

$$I_* = \frac{k_t D_{ext} N_*}{\gamma_I} \quad (49)$$

Para as curvas de equilíbrio, será feito um gráfico de *Notch versus Delta*, assim como foi feito por Boareto et al. (2015b). Para isso, uma das curvas será dada por $\frac{dI}{dt} = \frac{dN}{dt} = 0$ ao

substituir a Equação 49 na Equação 47 e a outra curva será dada por $\frac{dI}{dt} = \frac{dD}{dt} = 0$ ao substituir a Equação 49 na Equação 48. Dessa forma, utilizando os parâmetros da Tabela 1 e considerando as populações iniciais de *Delta* e NICD nulas e de *Notch* igual a 75 proteínas, tem-se a Figura 12 a seguir.

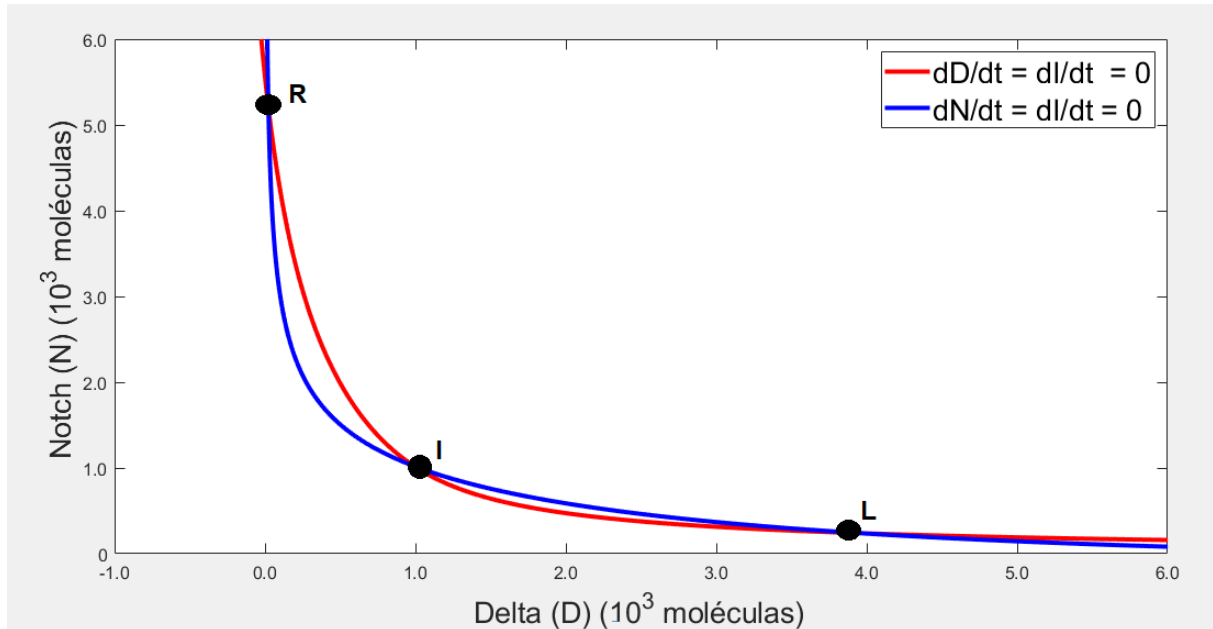


Figura 12 – A curva azul representa $dN/dt = dI/dt = 0$ e a curva vermelha representa $dD/dt = dI/dt = 0$. As concentrações são dadas em números de moléculas.

O gráfico representado na Figura 12 é dado por *Notch versus Delta*. Observa-se a existência de três pontos de equilíbrio (que são os pontos de cruzamento entre as duas curvas). Esses pontos serão chamados de R (receptor), I (instável) e L (ligante). Ao analisar as coordenadas dos pontos de equilíbrio, tem-se que $R \approx (22, 5200)$, $L \approx (3600, 275)$ e $I \approx (1100, 1025)$, isso mostra que o ponto R possui alta concentração de proteínas receptoras (com alto *Notch*) e L possui alta concentração de proteínas ligantes (com alto *Delta*), assim como foi identificado por Boareto et al. (2015b).

Ao tomar um ponto acima, um ponto abaixo, um ponto à esquerda e outro à direita em cada uma das vizinhanças de R, I e L, verificou-se que o sistema tende a se aproximar dos pontos R e L, caracterizando pontos de equilíbrio estáveis. Entretanto, os pontos da vizinhança de I tendem a se afastar caracterizando um ponto de equilíbrio instável, assim como concluído por Boareto et al. (2015b). Isso significa que na vizinhança de R, o sistema tende a um estado com alta concentração de *Notch* e baixa de *Delta*; o contrário acontece na vizinhança de L em que há baixa concentração de proteínas receptoras *Notch* e alta concentração de proteínas ligantes *Delta*. Todavia, na vizinhança de I, o sistema pode tender a R ou a L dependendo da concentração inicial de NICD: se partir de um estado

inicial com população nula para NICD, o sistema tende a um estado com alta concentração de *Delta*, mas ao partir de um estado inicial com alta concentração (em torno de 500) para NICD, o sistema tende para uma alta concentração de *Notch*, como esperado.

Esse resultado reflete que a interação *Notch-Delta* se comporta como um comutador bidirecional (BOARETO et al., 2015b), sendo característica da inibição lateral, visto que nesse estágio há apenas dois estados de equilíbrio estável: um com alto *Delta* (L) e outro com alto *Notch* (R), como é caracterizado na Figura 4(a). De acordo com Boareto et al. (2015b) esse é um dos motivos da sinalização *Notch-Delta* gerar padrões denominados "sal e pimenta" ou padrões do tipo "quadriculado".

Ao comparar a Figura 12 com a Figura 11, chega-se a conclusão que diante dos parâmetros particulares utilizados, a dinâmica do sistema caminha para um estado de alta concentração de proteínas ligantes, isto é, caminha para o ponto de equilíbrio L.

5.2 O modelo NDJI

Conforme foi feito por Boareto et al. (2015a), será incluída a atuação da proteína *Jagged* no sistema. Logo, este modelo será chamado de NDJI e descreve a atuação de *Notch*, *Delta*, *Jagged* e NICD.

A seguir, serão apresentados os processos de construção das equações do modelo.

5.2.1 Construção da equação de *Notch*

Quando *Notch* da célula que está sendo analisada (N) recebe *Jagged* do ambiente externo (J_{ext}), ocorre a ativação *trans* (k_t) e o NICD penetra no núcleo da célula que contém *Notch* ativando a produção dessas duas proteínas. Entretanto, quando *Notch* da célula recebe *Jagged* (J) da mesma célula, o NICD não é acionado e ambas proteínas são degradadas pelo processo de inibição *cis* (k_c). Dessa forma, ao acrescentar essas análises na Equação 33, tem-se a Equação 50 que descreve a dinâmica de *Notch* para o modelo NDJI:

$$\frac{dN}{dt} = N_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,N}) - k_t N (D_{ext} + J_{ext}) - k_c N (D + J) - \gamma N \quad (50)$$

5.2.2 Construção da equação de *Delta*

Como a produção de proteínas *Delta* não sofre influência direta de *Jagged*, a equação que modela *Delta* será a mesma do modelo NDI (Equação 43).

5.2.3 Construção da equação do NICD

O NICD aumenta a produção de *Jagged* no núcleo da célula. Ao acrescentar essa análise na [Equação 46](#), a equação que representa o NICD é dada por:

$$\frac{dI}{dt} = k_t N(D_{ext} + J_{ext}) - \gamma_I I \quad (51)$$

5.2.4 Construção da equação de *Jagged*

Agora, será modelada a variação de *Jagged* da célula que está sendo considerada. Esta análise será semelhante a análise realizada para *Delta* do modelo NDI.

A proteína *Jagged* (J) desta célula poderá interagir com *Notch* de um ambiente externo (N_{ext}), logo:



Se a reação da [Equação 52](#) ocorre da esquerda para direita (k_{t+}), *Jagged* diminui, mas no sentido inverso (k_{t-}), *Jagged* aumenta:

$$\frac{dJ}{dt} \propto -k_{t+} N_{ext} J + k_{t-} [N_{ext}J] \quad (53)$$

A formação de NICD (I) ativa a produção de *Jagged*, portanto deve-se multiplicar a taxa de produção de *Jagged* (J_0) pela função de Hill deslocada representada pela [Equação 8](#), isto é:

$$\frac{dJ}{dt} \propto J_0 H^{S+}(I, \lambda_{I,J}) \quad (54)$$

em que $\lambda_{I,J}$ é o parâmetro representado por λ na [Equação 8](#) e está relacionado com *Jagged*. Deve-se, também considerar a taxa de degradação natural (γ) de *Jagged*, conforme representa a [Equação 55](#).

$$\frac{dJ}{dt} \propto -\gamma J \quad (55)$$

Além disso, poderá ocorrer a inibição *cis* entre *Notch* e *Jagged* da mesma célula analisada, logo:

$$\frac{dJ}{dt} \propto -k_{c+}NJ + k_{c-}[NJ] \quad (56)$$

Ao reunir todas as equações que representam $\frac{dJ}{dt}$, até então, tem-se:

$$\frac{dJ}{dt} = J_0 H^{S^+}(I, \lambda_{I,J}) - k_{t+}N_{ext}J - k_{c+}NJ + k_{t-}[N_{ext}J] + k_{c-}[NJ] - \gamma J \quad (57)$$

Agora, deve-se considerar as equações que representam as variações de $[N_{ext}J]$ e $[NJ]$, como foi feito para *Notch* e *Delta*.

Ao rever os argumentos que levaram à [Equação 28](#), [Equação 29](#), [Equação 30](#) e [Equação 31](#), a [Equação 41](#) será dada será alterada para:

$$\frac{d[N_{ext}J]}{dt} = +k_{t+}N_{ext}J - k_{t-}[N_{ext}J] - k_l[N_{ext}J] \quad (58)$$

e, no estado estacionário, isto é, $\frac{d[N_{ext}J]}{dt} = 0$, haverá uma equação análoga à [Equação 42](#), resultando em:

$$[N_{ext}J] = \frac{k_{t+}}{k_{t-} + k_l} N_{ext}J \quad (59)$$

Para $[NJ]$, de maneira análoga à [Equação 59](#), chega-se em:

$$[NJ] = \frac{k_{c+}}{k_{c-} + k_l} NJ \quad (60)$$

Ao substituir a [Equação 59](#) e [Equação 60](#) na [Equação 57](#), o modelo matemático para *Jagged* será dado pela [Equação 61](#) a seguir.

$$\frac{dJ}{dt} = J_0 H^{S^+}(I, \lambda_{I,J}) - k_{t+}N_{ext}J - k_c NJ - \gamma J \quad (61)$$

Logo, o modelo NDJI é composto por quatro equações, sendo elas a [Equação 43](#), [Equação 50](#), [Equação 51](#) e [Equação 61](#).

Ressalta-se que assim como feito por [Boareto et al. \(2015b\)](#), as equações diferenciais do modelo NDJI representam as concentrações presentes em uma única célula imersa em um ambiente externo onde são simuladas as diversas concentrações externas.

5.2.5 A influência da função de Hill deslocada no modelo NDJI

Semelhante ao que foi feito para o modelo NDI, será analisada a influência da [Equação 8](#) no modelo NDJI. [Boareto et al. \(2015b\)](#) considera novos valores para as taxas de produção de *Notch*, *Delta* e para a concentração externa de *Delta*, logo, para o modelo NDJI serão utilizados os parâmetros descritos na [Tabela 2](#).

Parâmetro	Valor	Unidade de medida
N_0	1600	proteína / tempo (hora)
D_0	1800	proteína / tempo (hora)
I_0	200	proteína / tempo (hora)
J_0	1200	proteína / tempo (hora)
J_{ext}	1750	número de proteínas
N_{ext}	500	número de proteínas
D_{ext}	0	número de proteínas
γ	0,1	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
γ_I	0,5	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
$\lambda_{I,N} = \lambda_{I,J}$	2	sem dimensão
$\lambda_{I,D}$	0	sem dimensão
n_J	5	sem dimensão
$n_D = n_N$	2	sem dimensão
k_t	$5 * 10^{-5}$	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
k_c	$5 * 10^{-4}$	$tempo^{-1}(hora^{-1})$

Tabela 2 – Parâmetros do modelo NDJI. n_J é o expoente de Hill da [Equação 8](#) para *Jagged*.

Com auxílio da [Equação 8](#), [Equação 43](#), [Equação 50](#), [Equação 51](#) e [Equação 61](#), considerando as populações iniciais de *Jagged*, *Delta* e NICD nulas e a de *Notch* igual a 300 proteínas e utilizando os parâmetros da [Tabela 2](#), tem-se a [Figura 13](#) que representa a influência da função de Hill deslocada no modelo NDJI.

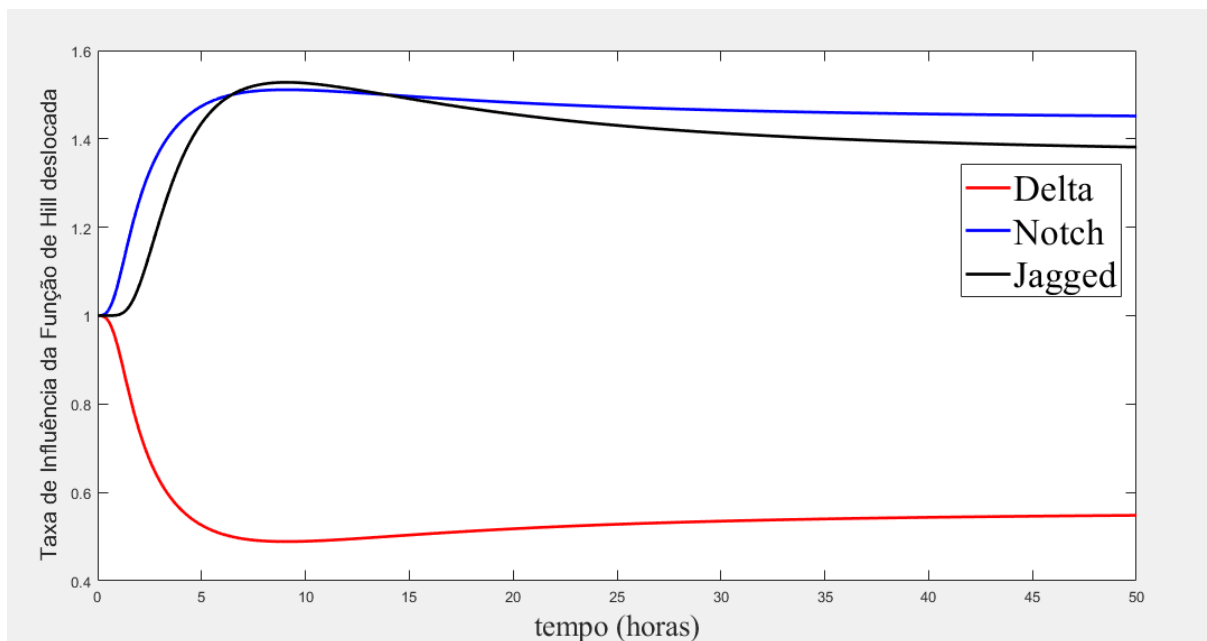


Figura 13 – A curva azul representa a função de Hill deslocada para *Notch*, a curva vermelha representa a influência da função de Hill deslocada para *Delta* e a curva preta representa a função de Hill deslocada para *Jagged*.

Observa-se, pela Figura 13, que diferente do modelo NDI, no modelo NDJI a função de Hill deslocada para modelar o efeito de ativação de *Notch* e *Jagged* e restrição de *Delta* alcança valores mais distantes de uma unidade. Este fato está relacionado com os parâmetros modificados por Boareto et al. (2015b) para modelar as equações ao incluir o *Jagged* no sistema. Os valores em números de proteínas alcançados por $H^{S+}(I, \lambda_{I,N})$, $H^{S-}(I, \lambda_{I,D})$ e $H^{S+}(I, \lambda_{I,J})$, que representam a modulação de *Notch*, *Delta* e *Jagged* respectivamente, são $1,45 \times 10$, $5,48 \times 10^{-1}$ e $1,38 \times 10$.

Observa-se que a produção de *Jagged* é ativada mais rapidamente que a de *Notch* até aproximadamente seis horas e após esse tempo, a ativação de *Jagged* via NICD tende a estabilizar com um valor abaixo da ativação de *Notch*. Além disso, pode-se verificar que a produção de *Notch* e *Jagged* é aumentada de forma crescente até aproximadamente seis horas, enquanto *Delta* é restringido neste mesmo espaço de tempo. Após seis horas, essas populações permanecem influenciadas pela função de Hill deslocada de forma constante.

Além disso, observou-se que ao aumentar a taxa de produção de *Notch* (N_0) o efeito da função de Hill deslocada para ativar *Jagged* e *Notch* e restringir *Delta* tornou-se ainda mais influente.

5.2.6 A dinâmica do modelo NDJI

Para analisar a dinâmica do sistema, serão utilizadas as equações do modelo NDJI e os dados da [Tabela 2](#). As populações iniciais de *Jagged*, *Delta* e NICD serão consideradas nulas e a de *Notch* será de 300 proteínas. Dessa forma, tem-se a [Figura 14](#) a seguir.

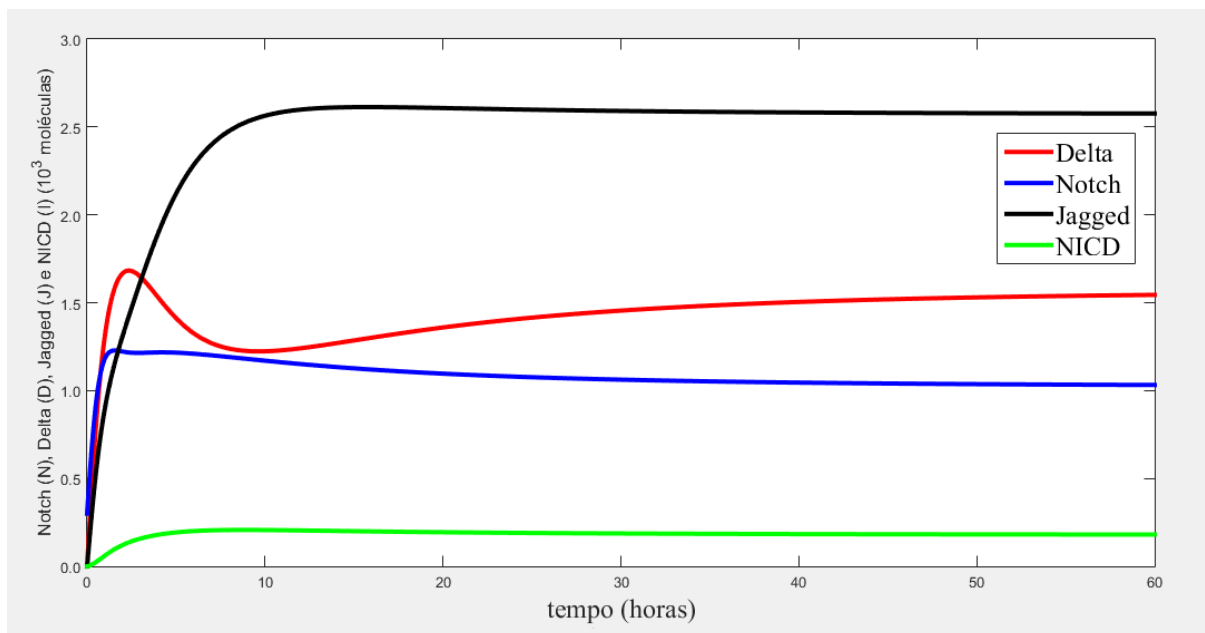


Figura 14 – A curva azul representa a dinâmica de *Notch*, a curva vermelha representa *Delta*, a curva preta representa *Jagged* e a curva verde representa NICD. As concentrações de *Notch*, *Delta*, *Jagged* e NICD são dados em função do tempo em horas.

De acordo com a [Figura 14](#), a produção da proteína ligante *Jagged* é a maior no sistema. Além disso, a concentração de proteínas ligantes *Delta* é maior que a do receptor *Notch* e a de NICD. Isso reflete um estado de alta concentração de proteínas ligantes. Ressalta-se que essa dinâmica é obtida para um conjunto particular de condições para N_0 , D_0 , J_0 e I_0 .

A O valor alcançado por *Notch* é de $1,03 \times 10^3$, por *Delta* é de $1,54 \times 10^3$, por *Jagged* é $2,58 \times 10^3$ e por NICD é de $1,81 \times 10^2$.

Observa-se que o NICD estabiliza em menos de cinco horas, enquanto *Jagged* leva em média 10 horas para estabilizar. As concentrações de *Notch* e *Delta* estabilizam após cerca de 50 horas.

A seguir, a análise feita a partir da [Subseção 5.2.7](#) descreverá a representação da dinâmica aqui apresentada.

5.2.7 Análise das populações de equilíbrio do modelo NDJI

Assim como foi feito para o modelo NDI, será considerado o estado estacionário das populações do modelo NDJI.

Ao fazer $\frac{dI}{dt} = 0$ (estado estacionário para NICD), da [Equação 51](#) segue que:

$$I_* = \frac{k_t N_* (D_{ext} + J_{ext})}{\gamma_I} \quad (62)$$

Assim como anteriormente, * representa o equilíbrio das populações. De maneira análoga, para o estado estacionário de *Delta*, será feito $\frac{dD}{dt} = 0$ a partir da [Equação 43](#), resultando em:

$$D_* = \frac{D_0 H^{S-}(I_*, \lambda_{I,D})}{k_t N_{ext} + k_c N_* + \gamma} \quad (63)$$

Ao impor $\frac{dJ}{dt} = 0$ na [Equação 61](#), tem-se o estado estacionário da população de *Jagged* representado por:

$$J_* = \frac{J_0 H^{S+}(I_*, \lambda_{I,J})}{k_c N_* + k_t N_{ext} + \gamma} \quad (64)$$

As equações de I_* , D_* e J_* determinam, em função de N_* , os valores para $\frac{dI}{dt} = \frac{dD}{dt} = \frac{dJ}{dt} = 0$ e essa será a condição para uma das curvas de equilíbrio do modelo NDJI.

Impondo $\frac{dN}{dt} = 0$ na [Equação 50](#), pode-se obter uma nova equação para J_* , resultando em:

$$J_* = \frac{1}{k_c} \left\{ \frac{N_0 H^{S+}(I_*, \lambda_{I,N})}{N_*} - [k_c D_* + k_t (D_{ext} + J_{ext}) + \gamma] \right\} \quad (65)$$

e, portanto, na [Equação 65](#) $J_* = J_*(N_*)$.

Para as curvas de equilíbrio, será feito um gráfico de *Notch versus Jagged*, assim como foi feito por [Boareto et al. \(2015b\)](#). Para isso, uma curva será dada por $\frac{dI}{dt} = \frac{dN}{dt} = \frac{dD}{dt} = 0$ e a outra curva será dada por $\frac{dI}{dt} = \frac{dJ}{dt} = \frac{dD}{dt} = 0$.

Ao utilizar a [Equação 62](#), [Equação 63](#), [Equação 64](#) e [Equação 65](#), considerando os parâmetros da [Tabela 2](#), as populações iniciais de *Jagged*, *Delta* e NICD nulas e a de *Notch* igual a 300 proteínas, tem-se a [Figura 15](#).

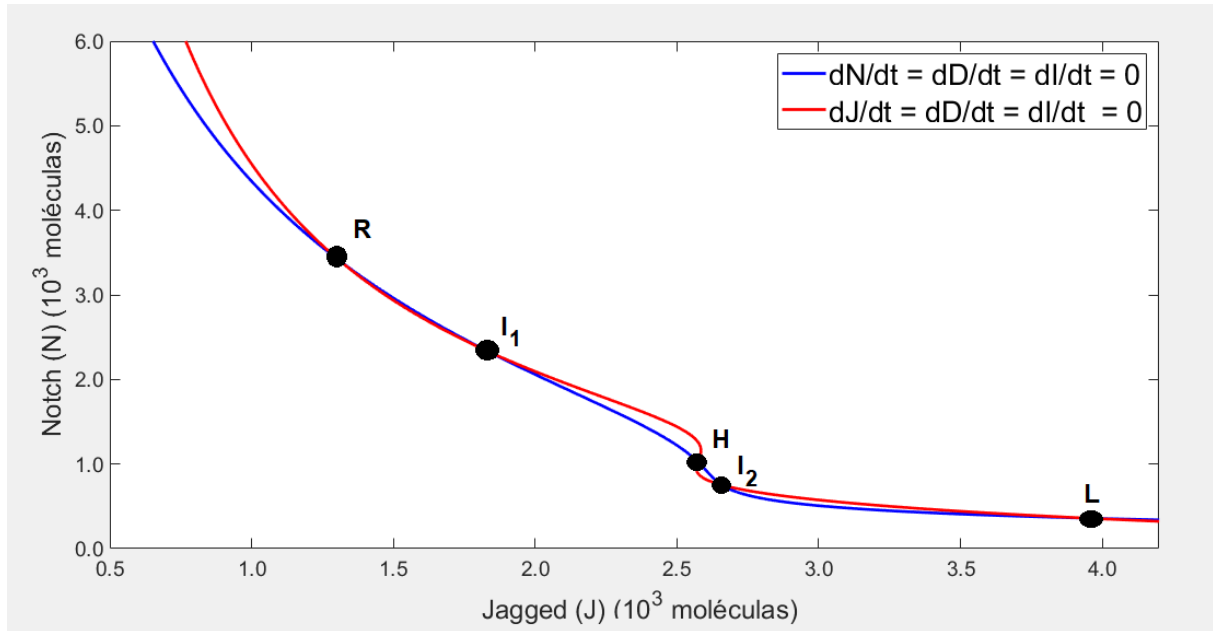


Figura 15 – A curva azul representa $dN/dt = dD/dt = dI/dt = 0$ e a curva vermelha representa $dJ/dt = dD/dt = dI/dt = 0$. No eixo horizontal tem-se *Jagged* e no vertical *Notch*, ambos dados em número de moléculas.

Na [Figura 15](#), pode-se identificar cinco pontos de equilíbrio, designados por L (ligante), R (receptor), H (híbrido), I_1 (instável 1) e I_2 (instável 2). Ao analisar as coordenadas desses pontos de equilíbrio, obtêm-se que $L \approx (3945, 360)$, $I_2 \approx (2660, 750)$, $H \approx (2575, 1025)$, $I_1 \approx (1835, 2330)$ e $R \approx (1310, 3390)$.

Ao investigar o estado de equilíbrio de cada um desses pontos, obteve-se que os pontos R, H e L representam equilíbrio estável. Isto é, ao tomar pontos vizinhos à esses o sistema tende a retornar ao equilíbrio. Entretanto, ao tomar pontos na vizinhança de I_1 e I_2 o sistema se afasta, caracterizando equilíbrio instável nesses dois pontos. Essa análise corrobora a investigação feita por [Boareto et al. \(2015b\)](#).

Com relação ao ponto L, observou-se alta concentração de proteínas *Delta* e *Jagged* e baixa concentração de *Notch* e NICD, configurando um estado com alta concentração de ligantes, assim como foi concluído por [Boareto et al. \(2015b\)](#). Este ponto reflete o estágio da dinâmica apresentada pela [Figura 14](#), que representa a dinâmica do sistema considerando um conjunto particular de parâmetros.

No ponto R foram encontradas altas concentrações de proteínas receptoras *Notch* e con-

concentrações baixas de proteínas ligantes *Jagged* e, especialmente, *Delta*. Esse resultado configura um sistema rico em proteínas receptoras e este resultado também corrobora a análise de [Boareto et al. \(2015b\)](#).

Ao analisar as concentrações no ponto H descobriu-se um novo estado para o sistema. De acordo com [Boareto et al. \(2015b\)](#), a assimetria do NICD em restringir *Delta* e aumentar a produção de *Jagged* é responsável pelo surgimento deste estado de equilíbrio estável híbrido, que faz com que as células adquiram destinos semelhantes, sendo receptoras e ligantes ao mesmo tempo. As análises mostraram que para este ponto há concentrações intermediárias do receptor *Notch* e dos ligantes *Delta* e *Jagged*, como encontrado por [Boareto et al. \(2015b\)](#). Logo, este ponto de equilíbrio estável com concentrações híbridas permite que a célula emita e receba sinais, tendo características de receptora e ligante ao mesmo tempo ([BOARETO et al., 2015b](#)).

Ao analisar o ponto I_2 percebeu-se que ao tomar valores em sua vizinhança, de um lado ele tende para o ponto de equilíbrio H e de outro tende para o ponto de equilíbrio L, caracterizando instabilidade.

Da mesma forma, ao analisar o ponto I_1 , ao tomar valores em sua vizinhança, de um lado ele tende para o ponto de equilíbrio H e de outro tende para o ponto de equilíbrio R e assim como o ponto I_2 , I_1 reflete instabilidade.

É importante destacar que no modelo NDJI, o sistema não se comporta como um comutador bidirecional. Isto é, não há apenas estados com células com alto ligante ou alto receptor. A introdução de *Jagged* no sistema dá origem ao fenótipo híbrido em que as células podem emitir e enviar sinais ao mesmo tempo, assim como destaca [Boareto et al. \(2015b\)](#).

5.3 O modelo NDJVI

No modelo NDJVI serão consideradas todas as proteínas necessárias para a angiogênese. Para isso, as equações do modelo NDJI serão ajustadas de forma a acrescentar a influência do VEGF no sistema.

A seguir, serão apresentados os processos que levam à construção deste modelo.

5.3.1 Construção da equação de *Notch*

No estudo de [Boareto et al. \(2015a\)](#) o VEGF é incluído de forma que:

- Afeta positivamente a produção de *Delta* diante da atuação do NICD representado pelo termo $H^{S+}(V, \lambda_{V,D})$, pela sinalização de VEGF, em que $\lambda_{V,D}$ é o parâmetro

referente à *Delta* representado por λ na [Equação 9](#).

- Afeta negativamente a produção de VEGFR2 pelo efeito do NICD, representado pelo termo $H^{S-}(I, \lambda_{I,VR})$ referente à sinalização de *Notch*, em que $\lambda_{I,VR}$ é o parâmetro referente à VEGFR2 representado por λ na [Equação 8](#).

Assim, como a inclusão de VEGF não afeta diretamente a produção de *Notch*, para essa concentração será utilizada a mesma equação do modelo NDJI, isto é, a [Equação 50](#).

5.3.2 Construção da equação de *Delta*

Como já visto, deve-se considerar que a taxa de produção de *Delta* (D_0) é aumentada pela atuação do NICD pela via de sinalização *Notch* e restringida pelo efeito do NICD pela via de sinalização VEGF. Logo, para modelar a inclusão da atuação de VEGF na concentração de *Delta*, basta inserir o termo $H^+(V, \lambda_{V,D})$ multiplicando a taxa de produção de *Delta* (D_0) na [Equação 43](#). Dessa forma, para *Delta* tem-se:

$$\frac{dD}{dt} = D_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,D}) H^{S+}(V, \lambda_{V,D}) - k_t N_{ext} D - k_c N D - \gamma D \quad (66)$$

5.3.3 Construção da equação do NICD

Assim como para *Notch*, a inclusão de VEGF no sistema não afeta a produção de NICD. Dessa forma, para modelar o NICD pode-se considerar a mesma equação do modelo NDJI, isto é, [Equação 51](#).

5.3.4 Construção da equação de *Jagged*

Assim como para *Notch* e NICD, a inclusão de VEGF no sistema não altera a produção de *Jagged*, logo, pode-se utilizar a [Equação 61](#) do modelo NDJI.

5.3.5 Construção da equação do VEGF

Agora será considerada a produção de VEGF. Esse fator, assim como o NICD, só é produzido pela interação *trans* (k_t) que neste caso ocorrerá quando o receptor VEGFR2 da célula (VR) recebe o ligante VEGF-A (V_{ext}). Dessa forma, semelhante à [Equação 44](#), tem-se:

$$\frac{dV}{dt} \propto +k_{t+} V_{ext} VR - k_{t-} [V_{ext} VR] \quad (67)$$

Há também a taxa de degradação de VEGF que será dada por γ_I , logo, incorporando esta análise, tem-se:

$$\frac{dV}{dt} \propto +k_{t+}V_{ext}VR - k_{t-}[V_{ext}VR] - \gamma_I V \quad (68)$$

Por argumentos semelhantes aos utilizados para determinar $[ND_{ext}]$, encontra-se a equação do termo $[V_{ext}VR]$ e realizando algumas manipulações matemáticas, a equação que representa a dinâmica de VEGF será dada por:

$$\frac{dV}{dt} = k_t V_{ext}VR - \gamma_I V \quad (69)$$

5.3.6 Construção da equação do receptor VEGFR2

Para modelar o VEGFR2, deve-se considerar que sua taxa de produção (VR_0) é inibida pelo NICD, como dito anteriormente, logo:

$$\frac{dVR}{dt} \propto VR_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,VR}) \quad (70)$$

Há também a taxa de degradação natural de VEGFR2 (γ):

$$\frac{dVR}{dt} \propto -\gamma VR \quad (71)$$

Além disso, essa reação só acontece diante da ativação *trans* (k_t), que resulta em:

$$\frac{dVR}{dt} \propto -k_{t+}V_{ext}VR + k_{t-}[V_{ext}VR] \quad (72)$$

Reunindo a [Equação 70](#), [Equação 71](#) e [Equação 72](#), tem-se:

$$\frac{dVR}{dt} = VR_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,VR}) - k_{t+}V_{ext}VR + k_{t-}[V_{ext}VR] - \gamma VR \quad (73)$$

Considerando a equação que representa a variação de $[V_{ext}VR]$, por argumentos semelhantes aos utilizados para a sinalização de *Notch*, chega-se na [Equação 74](#), que representa a variação do VEGFR2.

$$\frac{dVR}{dt} = VR_0 H^{S-}(I, \lambda_{I,VR}) - k_t V_{ext} VR - \gamma VR \quad (74)$$

Logo, o modelo NDJVI é composto por seis equações, sendo elas a [Equação 50](#), [Equação 51](#), [Equação 61](#), [Equação 66](#), [Equação 69](#) e [Equação 74](#).

Ressalta-se que as equações do modelo NDJVI, assim como as equações dos modelos NDI e NDJI, representam as concentrações presentes em uma única célula imersa em um ambiente externo em que são simuladas as diversas concentrações externas presentes.

Assim como foi feito nos modelos anteriores, será analisada a influência da função de Hill deslocada no modelo NDJVI, bem como a dinâmica e os pontos de equilíbrio do sistema.

5.3.7 A influência da função de Hill deslocada no modelo NDJVI

Para analisar a influência da função de Hill deslocada no modelo NDJVI, serão utilizados os parâmetros propostos por [Boareto et al. \(2015a\)](#) representados na [Tabela 3](#). Com auxílio das equações do modelo NDJVI e considerando as populações iniciais de *Delta*, *Jagged*, *VEGF*, *VEGFR2* e *NICD* nulas e de *Notch* igual a 50 proteínas, tem-se a [Figura 16](#).

Parâmetro	Valor	Unidade de medida
N_0	1200	proteína / tempo (hora)
J_0	800	proteína / tempo (hora)
$D_0 = VR_0$	1000	proteína / tempo (hora)
$I_0 = V_0$	200	proteína / tempo (hora)
$N_{ext} = D_{ext} = J_{ext} = V_{ext}$	2000	número de proteínas
γ	0,1	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
γ_I	0,5	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
$\lambda_{I,N} = \lambda_{I,J} = \lambda_{V,D}$	2	sem dimensão
$\lambda_{I,D} = \lambda_{I,VR}$	0	sem dimensão
$n_D = n_N = n_V = n_{VR}$	2	sem dimensão
n_J	5	sem dimensão
k_t	$2.5 * 10^{-5}$	$tempo^{-1}(hora^{-1})$
k_c	$5 * 10^{-4}$	$tempo^{-1}(hora^{-1})$

Tabela 3 – Parâmetros do modelo NDJVI. n_V e n_{VR} são os expoentes de Hill da [Equação 8](#) para *VEGF* e *VEGFR2* respectivamente.

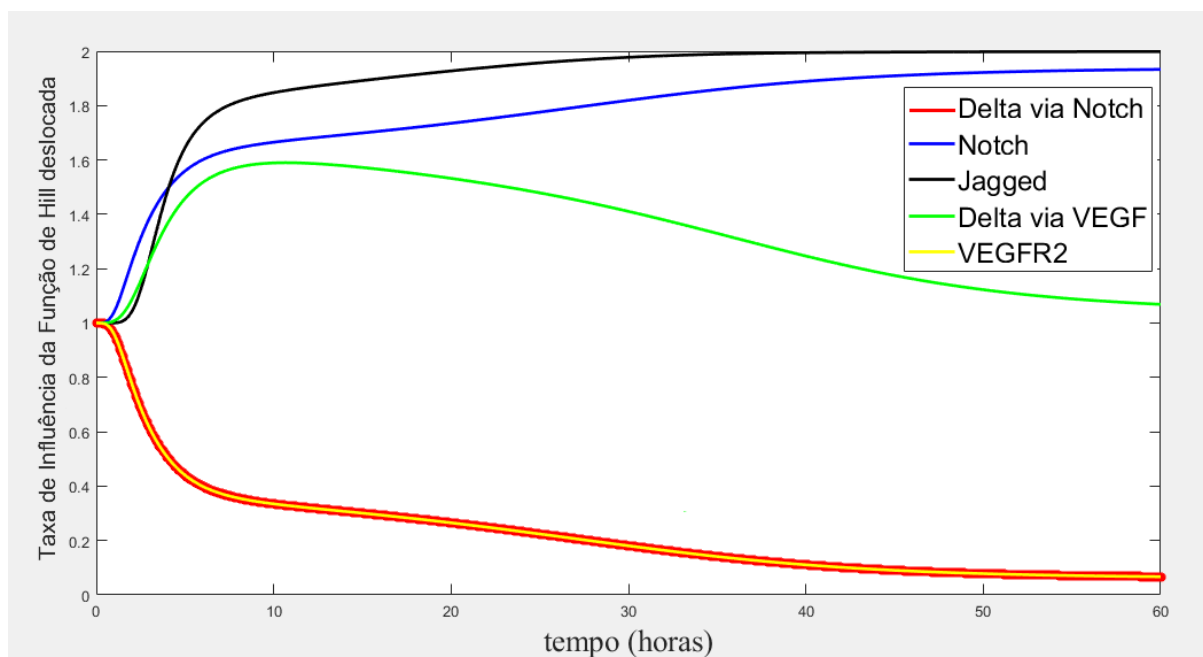


Figura 16 – A curva azul representa a função de Hill deslocada para *Notch*. A curva vermelha representa a função de Hill deslocada para *Delta* via sinalização de *Notch*. A curva preta representa a função de Hill deslocada para *Jagged*. A curva verde representa a função de Hill para *Delta* via VEGF. A curva amarela representa a função de Hill deslocada para VEGFR2 via NICD. As equações são dadas em função do tempo em horas.

O valor alcançado pela função de Hill deslocada para modular o efeito do NICD para *Delta* via sinalização *Notch* é de $6,69 \times 10^{-2}$, para *Notch* é de $1,93 \times 10$, para *Jagged* é $2,00 \times 10$, para VEGFR2 é de $6,69 \times 10^{-2}$ e para *Delta* via VEGF é de $1,07 \times 10$.

Observa-se que para o modelo NDJVI, diante dos parâmetros propostos por Boareto et al. (2015a), o efeito de restringir ou ativar determinada população através das sinalizações de VEGF e NICD mostrou-se mais eficiente que nos casos dos modelos NDI e NDJI. Isso pode ser analisado mediante os valores alcançados pelas pelas equações.

Percebe-se, pela Figura 16, que as curvas que representam a restrição de *Delta* e VEGFR2 estão sobrepostas. Isso reflete que a eficiência do NICD em restringir *Delta* e VEGFR2 é a mesma.

Nota-se que a função de Hill deslocada que representa a ativação de *Jagged* via NICD possui uma taxa de influência mais elevada em relação às demais.

Além disso, observa-se que a função de Hill para ativar *Delta* via sinalização de VEGF tende a se estabilizar próximo à uma unidade.

5.3.8 A dinâmica do modelo NDJVI

Ao utilizar as equações do modelo NDJVI, os parâmetros da [Tabela 3](#) e considerar as populações iniciais de *Delta*, *Jagged*, VEGF, VEGFR2 e NICD nulas e de *Notch* igual a 50 proteínas como na foi feito na [Subseção 5.3.7](#), será analisada a dinâmica do modelo NDJVI. Dessa forma, tem-se a [Figura 17](#).

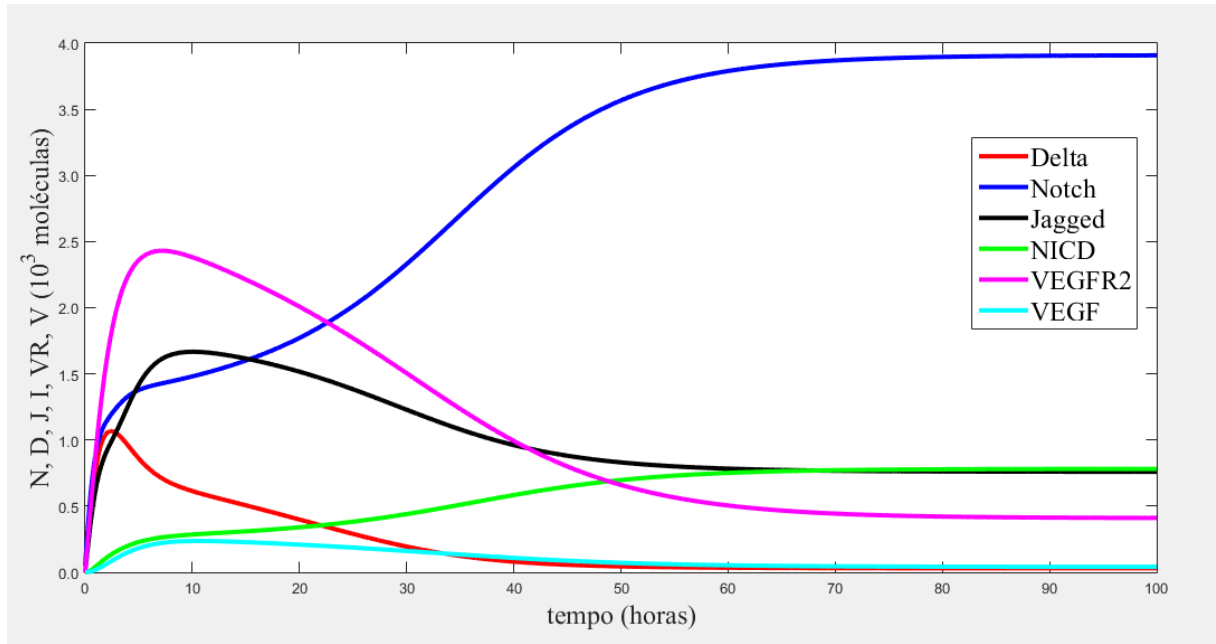


Figura 17 – As curvas azul, vermelha, preta, verde, azul claro e rosa representam, respectivamente, as dinâmicas de *Notch*, *Delta*, *Jagged*, NICD, VEGF e VEGFR2 em função do tempo, dado em horas.

Percebe-se, pela [Figura 17](#), que a concentração de proteína receptora *Notch* é predominante no modelo. Além disso, as concentrações de *Jagged* e NICD são predominantes em relação às concentrações de VEGFR2, *Delta* e VEGF. Diante dos parâmetros específicos utilizados, essa dinâmica representa um estado de concentração de células *stalk*, que são as células que alongam a formação das paredes dos novos vasos sanguíneos

O valor alcançado por *Notch* é $3,91 \times 10^3$, por *Delta* é $3,04 \times 10$, por *Jagged* é $7,60 \times 10^2$, por VEGF é $4,11 \times 10$, por VEGFR2 é $4,11 \times 10^2$ e por NICD é $7,82 \times 10^2$, em número de moléculas.

Pode-se concluir que o modelo NDJVI reproduz o comportamento esperado, isto é, NICD favorece produção de *Notch* e *Jagged*, porém *Notch* estabiliza com valor maior do que *Jagged* pois as taxas de produção dessas proteínas são diferentes e $N_0 > J_0$. Por outro lado, NICD inibe a produção de *Delta* que poderia ser favorecida se a concentração de VEGF fosse alta; todavia, o crescimento de VEGF também é inibido por NICD.

Ressalta-se que este resultado reflete um comportamento para um conjunto particular de condições para N_0, D_0, J_0, I_0 e VR_0 e nele, percebe-se alta concentração de *Notch* que representa um estado de células *stalk*.

5.3.9 Análise das populações de equilíbrio do modelo NDJVI

As equações de equilíbrio do modelo NDJVI serão deduzidas a fim de avaliar as curvas a serem representadas, para então validar o modelo de acordo com os dados fornecidos por [Boareto et al. \(2015a\)](#).

Primeiramente, será deduzida a equação para NICD no estado estacionário. Para isso, ao impor $\frac{dI}{dt} = 0$ na [Equação 51](#), segue que:

$$I_* = \frac{k_t N * (D_{ext} + J_{ext})}{\gamma_I} \quad (75)$$

assim como o I_* do modelo NDJI ([Equação 62](#)).

Conhecendo I_* , da condição $\frac{dVR}{dt} = 0$ imposta na [Equação 69](#) obtém-se:

$$VR_* = \frac{VR_0 H^{S-}(I_*, \lambda_{I,VR})}{k_t V_{ext} + \gamma} \quad (76)$$

Conhecendo I_* e VR_* , pode-se avaliar todas as funções de Hill deslocadas do modelo NDJVI, isto é $H^{S-}(I, \lambda_{I,VR})$, $H^{S+}(I, \lambda_{I,N})$, $H^{S+}(I, \lambda_{I,J})$, $H^{S-}(I, \lambda_{I,D})$ e $H^{S+}(V, \lambda_{V,D})$.

Para estimar a equação de equilíbrio para *Jagged*, será considerado $\frac{dJ}{dt} = 0$ na [Equação 61](#), resultando em:

$$J_* = \frac{J_0 H^{S+}(I_*, \lambda_{I,J})}{k_c N_* + k_t N_{ext} + \gamma} \quad (77)$$

assim como na [Equação 64](#).

Para $\frac{dV}{dt} = 0$ na [Equação 74](#), tem-se:

$$V_* = \frac{k_t V_{ext} VR_*}{\gamma_I} \quad (78)$$

Finalmente, ao fazer $\frac{dD}{dt} = 0$ na [Equação 66](#), tem-se a relação de equilíbrio para *Delta*:

$$D_* = \frac{D_0 H^{S-}(I_*, \lambda_{I,D}) H^{S+}(V_*, \lambda_{V,D})}{k_c N_* + k_t N_{ext} + \gamma} \quad (79)$$

Da condição $\frac{dN}{dt} = 0$ para a [Equação 50](#) é possível encontrar uma nova equação para D_* , logo, após algumas manipulações matemáticas, obtém-se:

$$D_* = \frac{N_0 H^{S+}(I_*, \lambda_{I,N})}{k_c N_*} - \left\{ J_* + \frac{k_t}{k_c} + (D_{ext} + J_{ext}) + \frac{\gamma}{k_c} \right\} \quad (80)$$

dessa forma, a [Equação 80](#) será dada por $D_*(N_*)$.

Ao utilizar os parâmetros apresentados na [Tabela 3](#), bem como as equações de equilíbrio do modelo NDJVI e ao considerar as populações iniciais de *Delta*, *Jagged*, VEGF, VEGFR2 e NICD nulas e de *Notch* igual a 50 proteínas, tem-se a [Figura 18](#) a seguir.

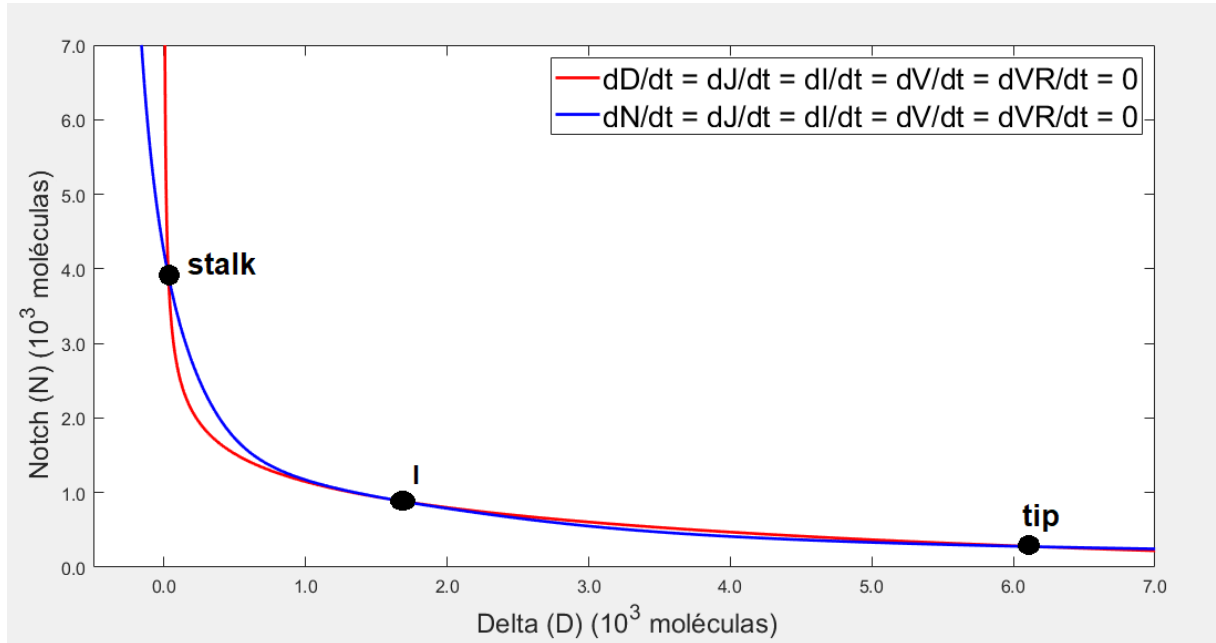


Figura 18 – A curva azul representa $dN/dt = dJ/dt = dI/dt = dV/dt = dVR/dt = 0$ e a curva vermelha representa $dD/dt = dJ/dt = dI/dt = dV/dt = dVR/dt = 0$. No eixo horizontal tem-se a concentração de *Delta* e no vertical tem-se a concentração de *Notch*, ambos dados em número de moléculas.

a [Figura 18](#) mostra *Notch versus Delta* e observa-se a existência de três pontos de equilíbrio, que são os pontos onde as duas curvas se cruzam. Esses pontos de equilíbrio serão cha-

dados de *stalk*, I (instável) e *tip*. Ao analisar as coordenadas, tem-se que $tip \approx (6061, 280)$, $I \approx (1632, 900)$ e $stalk \approx (30, 3910)$.

Ao tomar pontos nas vizinhanças dos pontos *stalk*, I e *tip*, chegou-se a conclusão que *stalk* e *tip* são pontos de equilíbrio estáveis e I instável. Isso significa que ao analisar as vizinhanças dos pontos *stalk* e *tip* o sistema tende a retornar ao equilíbrio, e portanto, tende a adotar as mesmas características *tip* ou *stalk*, refletindo a dinâmica da inibição lateral. Ao tomar valores na vizinhança do ponto I, observou-se que de um lado o sistema tende ao *tip* e de outro lado tende ao ponto *stalk* representando instabilidade.

Ao analisar os valores alcançados de cada proteína para o ponto *tip*, com auxílio do *MatLab*, observou-se que este ponto caracteriza células *tip*. Dessa forma, o ponto de equilíbrio estável *tip* possui alta concentração proteína ligante *Delta* e proteína receptora VEGFR2. Além disso, há baixas concentrações de proteína receptora *Notch* e proteína ligante *Jagged* no ponto *tip*. Portanto, pode-se concluir que este ponto configura células do tipo *tip*, que são as células que irão guiar o crescimento dos novos vasos sanguíneos, corroborando os resultados obtidos por Boareto et al. (2015a).

Ao verificar as concentrações das proteínas presentes para o ponto de equilíbrio estável *stalk*, encontrou-se altas concentrações de proteína receptora *Notch*, proteína ligante *Jagged* e NICD. Além disso, observou-se baixas concentrações de proteína ligante *Delta*, de proteína receptora VEGFR2 e de VEGF. Logo, o ponto *stalk* possui características de células *stalk*, que são as células que irão compor e alongar as paredes dos vasos sanguíneos, corroborando os resultados obtidos por Boareto et al. (2015a).

Ao comparar a Figura 18 com a Figura 17 nota-se que o sistema, diante dos parâmetros específicos propostos por Boareto et al. (2015a) e representados na Tabela 3, tende às concentrações do ponto de equilíbrio *stalk*, isto é, um sistema de célula *stalk*.

Nota-se que diferente do modelo NDJI, no modelo NDJVI não há um estado híbrido exposto na Figura 18. Entretanto, de acordo com Boareto et al. (2015a), o aumento excessivo de proteínas *Jagged* no sistema corrobora o surgimento de um estado híbrido. Neste estado híbrido, as células terão características *tip* e *stalk* ao mesmo tempo, apresentando concentrações intermediárias de proteínas *Notch*, *Delta*, *Jagged*, NICD, VEGFR2 e VEGF. Para confirmar essa informação, a taxa de produção de *Jagged* (J_0) foi aumentada de 800 a 1500 proteínas em intervalos de 100 proteínas. Percebeu-se que o sistema caminha à um único ponto de equilíbrio estável: o híbrido. Com $J_0 = 900$ proteínas há apenas o ponto de equilíbrio instável I e o ponto de equilíbrio estável *tip*. Porém, ao considerar $900 < J_0 < 1500$ há apenas o ponto de equilíbrio estável. Entretanto, as concentrações que antes representavam células *tip* agora representam células híbridas. Logo, de fato, o aumento excessivo da taxa de produção de *Jagged* leva o sistema à um único caminho: o

híbrido, como afirmado por [Boareto et al. \(2015a\)](#).

De acordo com [Boareto et al. \(2015a\)](#), as células híbridas, *tip/stalk*, competem com as células *tip* para guiar o crescimento dos novos vasos sanguíneos, mas possuem características comprometidas. Logo, a célula híbrida possui vantagem para as condições da angiogênese patológica ao trocar rapidamente sua posição entre *tip* ou *stalk*. Isso induz o crescimento dos novos vasos de forma rápida, mas irregular, para liberar oxigênio e nutrientes para os tumores que necessitam dessa alimentação de maneira acelerada ([BOARETO et al., 2015a](#); [BOARETO et al., 2015b](#)). Nesta ocasião, as células híbridas levam à formação de pequenos vasos excessivos, emaranhados e mal perfundidos. Sendo a característica da angiogênese tumoral ou mal sucedida ([BOARETO et al., 2015a](#)).

O modelo NDJVI envolve todas as proteínas atuantes na angiogênese. Ao utilizar este modelo e os parâmetros adotados por [Boareto et al. \(2015a\)](#) foi possível chegar à resultados consistentes mesmo não utilizando o efeito *fringe* sugerido por [Boareto et al. \(2015a\)](#). Logo, considera-se que o modelo aqui proposto seja funcional e mais simples que o sugerido por [Boareto et al. \(2015a\)](#).

Por fim, chama-se a atenção para os resultados expostos na [Figura 18](#), pois tem-se os pontos fixos que descrevem os estados que serão vistos adiante no estudo de [Alves \(2018\)](#).

5.4 A influência de VEGF-A no modelo NDJVI

Como pode ser observado na [Tabela 3](#), o valor de V_{ext} é 2000 proteínas e para analisar a influência desse fator de crescimento, que representa o VEGF-A, este parâmetro será variado de 800 a 3000 proteínas ([Figura 19](#)). Após, a dinâmica do equilíbrio do sistema será avaliada.

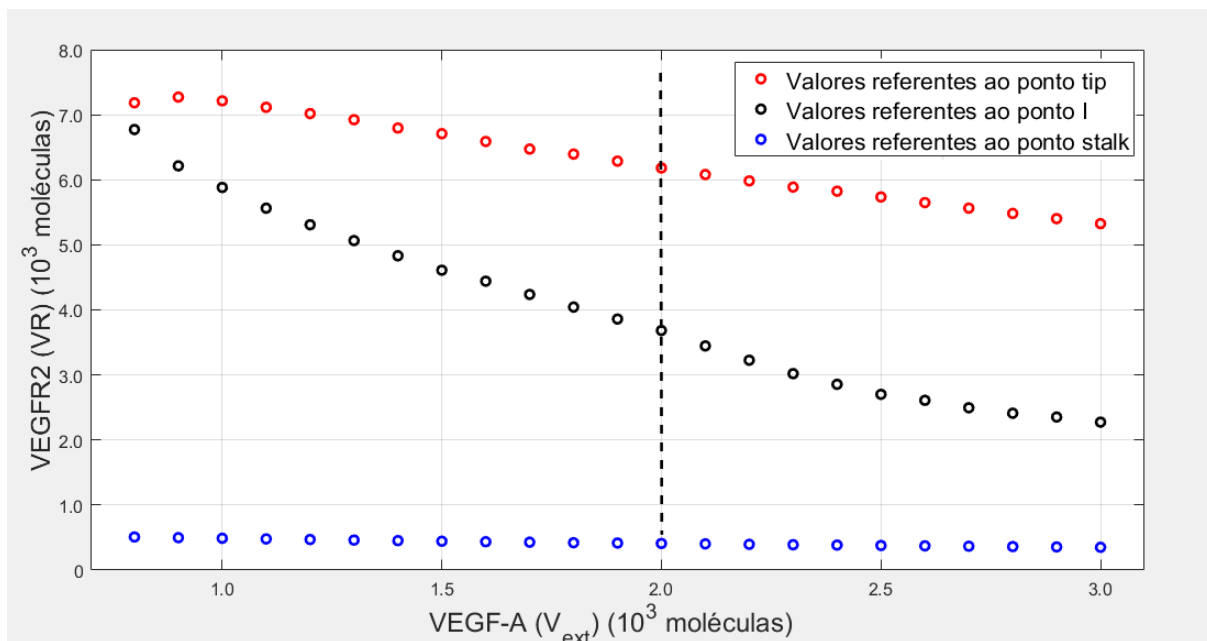


Figura 19 – Os novos valores de *VEGFR2* em relação aos pontos de equilíbrio L, I e R do modelo NDJVI são dados pelos círculos vermelho, preto e azul, respectivamente. A linha pontilhada representa os dados obtidos com $VEGF-A = 2000$ moléculas.

A [Figura 19](#) caracteriza o gráfico de *VEGFR2 versus VEGF-A*, em que os valores de *VEGF-A* foram variados de 800 a 3000 proteínas, em intervalos de 100 moléculas. Cada ponto representado na [Figura 19](#) apresenta novas concentrações de equilíbrio para as proteína do modelo NDJVI.

Para cada novo valor de *VEGF-A*, obteve-se três novos pontos de equilíbrio. Esses novos pontos referentes às novas concentrações de *VEGF-A* mantiveram as mesmas características observadas na [Figura 18](#) (instável, estável *tip* e estável *stalk*). Logo, as análises mostraram que os pontos *tip* e *stalk* são estáveis e representam células *tip* e *stalk*, respectivamente. Além disso, o ponto de equilíbrio I é instável ora tendendo a *stalk* e ora tendendo a *tip*. Isso mostra que foram mantidas as mesmas características ao tomar $V_{ext} = 2000$ moléculas como apresentado pela [Tabela 3](#). Entretanto, as concentrações das proteínas em cada sistema foram alteradas, como apresentado no [Apêndice A](#).

Na [Figura 19](#), observa-se que quanto maior o valor de *VEGF-A*, menor é a concentração de *VEGFR2* no sistema. Este fato é explicado pelo comportamento apresentado na [Figura 5\(a\)](#), em que o composto *VEGF-A+VEGFR2* forma a "chave" que torna o receptor ativo, diminuindo a concentração de *VEGFR2* livre. Além disso, segundo [Boareto et al. \(2015a\)](#), quando forma-se *VEGF-A+VEGFR2*, o níveis de *Delta* são aumentados no sistema e este fato pode ser observado ao analisar essas concentrações apresentadas no [Apêndice A](#).

A [Figura 19](#) mostra que o contrário também é acontece, pois quanto menor a concentração de VEGF-A livre, maior será a aglomeração de VEGFR2, pois o composto VEGF-A+VEGFR2 não será formado e o receptor não será ativado, inibindo a angiogênese. Este fato se relaciona ao que acontece na [Figura 5\(b\)](#), pois quando o Avastin, que é um fármaco inibidor da angiogênese, recebe o VEGF-A, a concentração deste ligante é diminuída, o que torna a concentração do receptor livre VEGFR2 maior.

O aumento e o decréscimo de VEGF-A não altera significativamente a concentração de VEGFR2 no ponto de equilíbrio *stalk*. Na verdade, as concentrações de todas as proteínas do modelo NDJVI permanecem praticamente constantes no ponto *stalk*, como pode ser visto de forma detalhada no [Apêndice A](#).

Outra análise que pode ser retirada da [Figura 19](#) é que o decréscimo de VEGF-A faz com que as concentrações de VEGFR2 nos pontos *tip* e *I* se aproximem, indicando que a angiogênese fisiológica pode ser alcançada quando o VEGF livre na matriz extracelular diminui, como esperado.

5.4.1 Relação entre a influência de VEGF na angiogênese e o estudo quantitativo de [Alves \(2018\)](#)

Como visto na [Seção 2.4](#), [Alves \(2018\)](#) observou o crescimento da rede vascular em embriões de galinha divididos em dois grupos distintos: o grupo controle e o grupo tratado. O grupo controle foi utilizado para extrair parâmetros quantitativos e isso significa dizer, que neste grupo os níveis de VEGF-A foram mantidos a fim de possibilitar um sistema fisiológico. No grupo tratado, foi aplicado o fármaco Avastin para diminuir a sinalização de VEGF e isso significa, de acordo com o que foi observado na [Figura 19](#), que os valores de VEGF-A livre na matriz extracelular foram diminuídos fazendo com que o receptor VEGFR2 aumentasse.

O estudo de [Alves \(2018\)](#) foi baseado no tratamento de imagens. Com auxílio do *software AngioToll*, a autora selecionou a área de vascularização e analisou a topologia das rede dos vasos sanguíneos dos dois grupos, como mostra a [Figura 20](#).

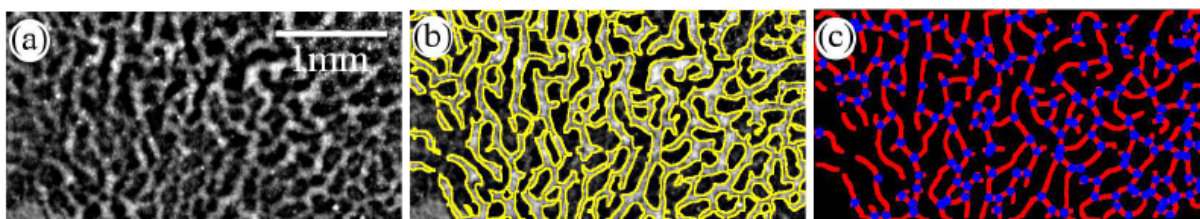


Figura 20 – Em (a) tem-se a imagem original obtida no experimento. Em (b) tem-se a seleção da área vascularizada. Em (c) tem-se a topologia da rede. Os pontos em cor azul destacam os nós entre os vasos sanguíneos representados em vermelho. Fonte: [Alves \(2018\)](#).

Para relacionar as células *tip* e *stalk* com a formação da rede vascular, tem-se a [Figura 21](#), que representa a formação da rede vascular em três dimensões.

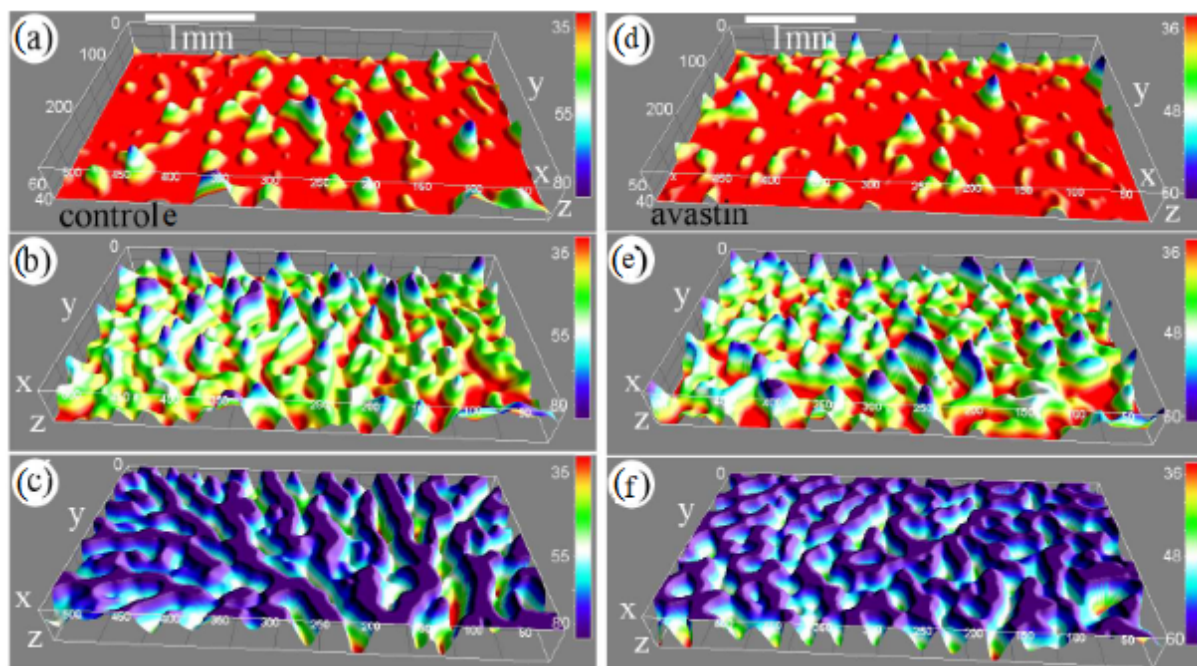


Figura 21 – Representa um perfil em três dimensões da ocupação dos aglomerados celulares para o grupo controle (a) 0 hora, (b) 7.5 horas e (c) 15horas. E para o grupo tratado com Avastin em (d) 0 horas, (e) 7,5horas e (f) 15horas. A escala de cores varia do vermelho ao azul, sendo que o vermelho representa regiões não vascularizadas e o azul representa regiões ocupadas pelos vasos sanguíneos. Fonte: Cedido por Ana Paula Alves.

A [Figura 21](#) representa o crescimento dos aglomerados celulares em amostras dos grupos controle e tratado. A escala de cores varia do vermelho ao azul e está relacionada com o nível de cinza das imagens originais do experimento ([Figura 20\(a\)](#)). O vermelho representa

o menor nível de cinza, que é a área não vascularizada, e o azul representa a escala mais alta de cinza, que é quando os vasos sanguíneos são totalmente destacados.

Ao analisar a [Figura 21](#) e compará-la com a estrutura de crescimento de novos vasos sanguíneos, proposta no modelo NDJVI e representado na [Figura 19](#), pode-se dizer que os aglomerados celulares de cor amarela representam um sistema rico em células *tip*. Esse sistema é caracterizado por alta concentração de do ligante *Delta* e do receptor VEGFR2 (ponto de equilíbrio estável *tip*), pois dá-se o início do crescimento dos vasos sanguíneos. Já os aglomerados de cor azul representam as células *stalk*, caracterizando um sistema rico *Notch*, *Jagged* e NICD (ponto de equilíbrio estável *stalk*) que refletem a formação do alongamento dos vasos sanguíneos.

No intuito de descrever as diferenças entre as topologias de redes, as análises seguintes irão descrever o comportamento do sistema no grupo controle e no grupo tratado com Avastin. O grupo tratado com o fármaco representa o grupo em que houve restrição do VEGF-A.

Uma das análises realizada por [Alves \(2018\)](#) foi a verificação do comprimento entre as bifurcações dos vasos sanguíneos nos dois grupos de embriões. Ao verificar essa métrica, [Alves \(2018\)](#) utiliza as médias obtidas para os grupos controle e tratado. Esse resultado é exposto a seguir na [Figura 22](#).

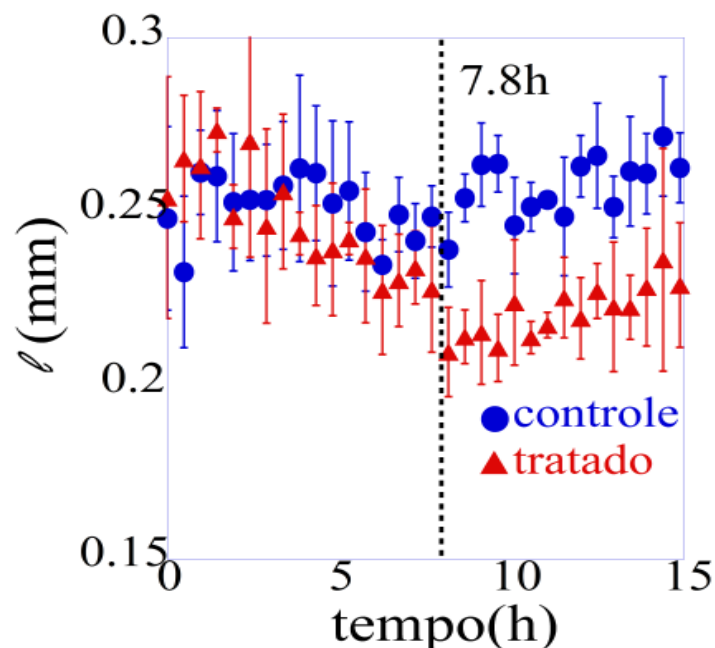


Figura 22 – Comprimento médio entre as bifurcações, dado em milímetros, em relação ao tempo, dado em horas. O círculo azul representa o grupo controle e o triângulo vermelho representa o grupo tratado. As barras indicam o desvio-padrão para as amostras e a reta pontilhada destaca o tempo de 7,8 horas de experimento. Fonte: [Alves \(2018\)](#).

Observa-se, pela [Figura 22](#), que até cerca de 7,8 horas o comprimento médio entre as bifurcações nos dois grupos cresce de forma semelhante. A partir de 7,8 horas o comprimento médio entre as bifurcações dos vasos sanguíneos no grupo tratado é menor que no grupo controle. Esse resultado é um indicio de que a ação do Avastin aproxima as bifurcações no grupo tratado ([ALVES, 2018](#)). Além disso, [Alves \(2018\)](#) identifica que essas diferenças entre os grupos controle e tratado são mais expressivas após 7,8 horas de experimento.

Para analisar a posição relativa entre os grupos e verificar se a tendência apresentada após 7,8 horas é estatisticamente significativa, será verificado o *boxplot* dos dois grupos em conjunto. Para isso, será considerado o intervalo de 0 a 15 horas de experimento ([Figura 23\(a\)](#)) e o intervalo de 7,8 a 15 horas de experimento ([Figura 23\(b\)](#)).

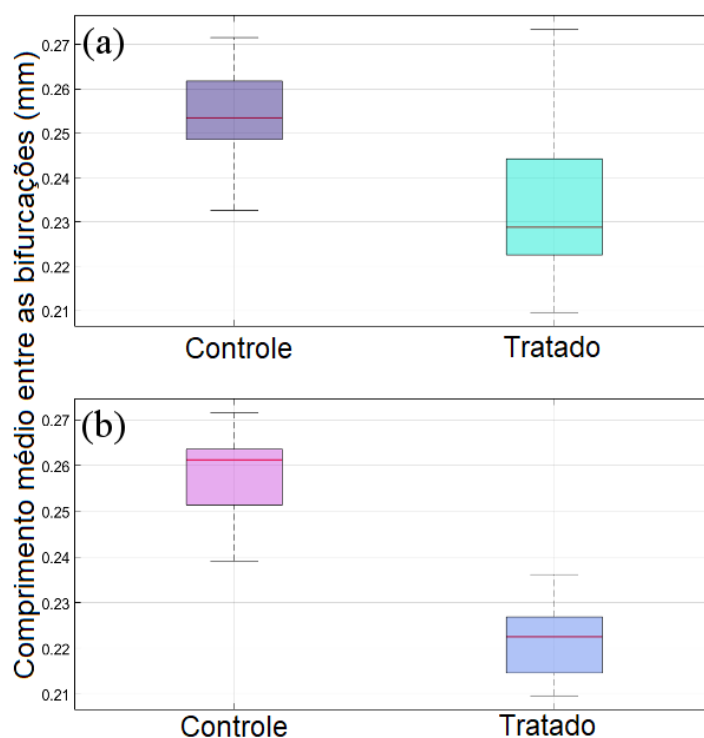


Figura 23 – Comparação dos *boxplots* para o comprimento médio entre as bifurcações. (a) representa os dados coletados para o comprimento médio entre as bifurcações para 15 horas de experimento e (b) representa os dados coletados entre 7,8 e 15 horas de experimento. Os dados para gerar a imagem foram coletados do estudo de [Alves \(2018\)](#).

De acordo com a [Figura 23](#), no grupo tratado o comprimento médio entre as bifurcações é menor do que no grupo controle. Essa diferença se torna mais clara quando analisamos os dados a partir de 7,8 horas. Isso sugere que o Avastin age na rede vascular aproximando os nós dos vasos sanguíneos. No entanto, no grupo controle os microdomínios de VEGF-A servem como guia criando caminhos que direcionam a migração celular.

Ao longo do processo do crescimento dos vasos sanguíneos, o VEGF-A liga-se ao Avastin inibindo o VEGFR2, como visto na [Figura 5\(b\)](#). Isso indica que esse sistema no grupo tratado caminha para concentrações do ponto de equilíbrio I representado na [Figura 18](#), indicando instabilidade. Porém, ressalta-se que a diminuição de VEGF-A diante da atuação do fármaco, induz que o sistema instável caminhe para a angiogênese fisiológica com características de células *tip*, como representado na [Figura 19](#).

Em contrapartida, nota-se que os vasos sanguíneos no grupo controle possuem comprimentos maiores entre as bifurcações. Isso indica que o lúmen do vaso em formação é mais alongado que no grupo tratado, como representado na [Figura 3\(b\)](#) pela indução lateral. Logo, pode-se dizer que o grupo controle apresenta características de células *stalk* e tende ao ponto de equilíbrio estável *stalk* da [Figura 18](#).

Ao fazer o recorte a partir de 7,8 horas esse comportamento é mais claro: os *boxplots* permanecem sem interseção e claramente o comprimento médio entre as bifurcações é menor no grupo tratado, confirmando a tendência apresentada na [Figura 22](#).

É importante considerar a [Figura 23\(b\)](#), pois de acordo com [Alves \(2018\)](#) o maior aglomerado conectado é formado após 5 horas de experimento. Logo, após 7,8 horas de experimento considera-se, de fato, o processo de angiogênese e não mais o processo de vasculogênese (que é a formação inicial dos vasos sanguíneos em embriões).

Uma outra análise feita por [Alves \(2018\)](#) é referente ao grau médio dos vértices em função do tempo, isto é, o número de conectividades dos nós dos vasos das amostras, para os grupos controle e tratado. A [Figura 24](#) mostra essa representação.

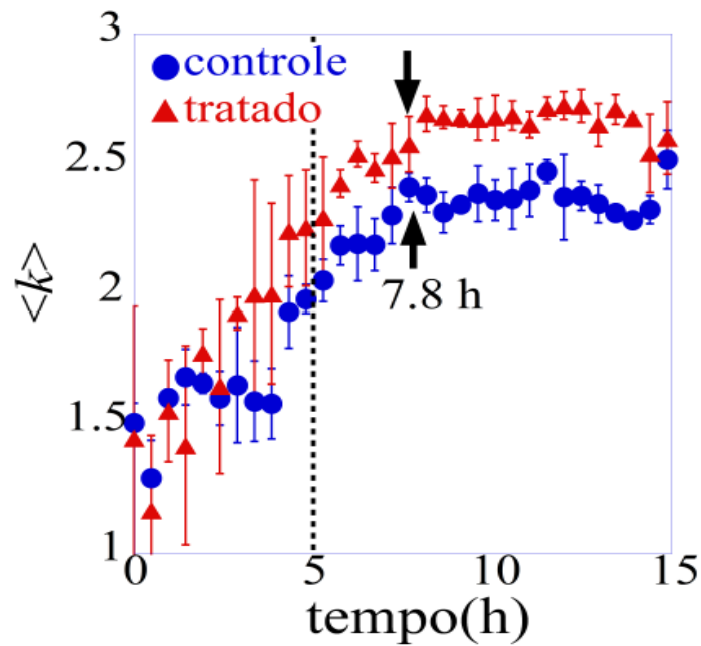


Figura 24 – Grau médio dos vértices ($\langle k \rangle$) em função do tempo para os grupos controle e tratado. O círculo azul representa o grupo controle e o triângulo vermelho representa o grupo tratado. As barras indicam o desvio-padrão para as amostras. A linha pontilhada indica o tempo de 5 horas e as setas destacam o tempo de 7,8 horas de experimento. Fonte: [Alves \(2018\)](#).

A linha pontilhada na [Figura 24](#) é uma referência para acompanhar o tempo de 5 horas, que de acordo com [Alves \(2018\)](#) é quando o maior aglomerado conectado é formado. As setas pretas identificam o tempo de 7,8 horas, que é o tempo próximo à saturação dos dois grupos. Com 7,8 horas de experimento [Alves \(2018\)](#) identifica maiores diferenças entre as topologias de redes dos dois grupos estudados.

A [Figura 24](#) mostra evidências de diferenças entre as conectividades da rede vascular no grupo controle e no grupo tratado. Este resultado corrobora o estudo de [Jain \(2005\)](#) que afirma que os fármacos anti angiogênicos promovem uma rede vascular reorganizada a fim de melhorar a oxigenação e penetração do medicamento no sistema.

Para analisar a posição relativa entre os grupos e verificar se a tendência apresentada pela [Figura 24](#) após 7,8 horas é estatisticamente significativa, será verificado o *boxplot* dos dois grupos em conjunto. Para isso, será considerado o intervalo de 0 a 15 horas de experimento ([Figura 25\(a\)](#)) e o intervalo de 7,8 a 15 horas de experimento ([Figura 25\(b\)](#)).

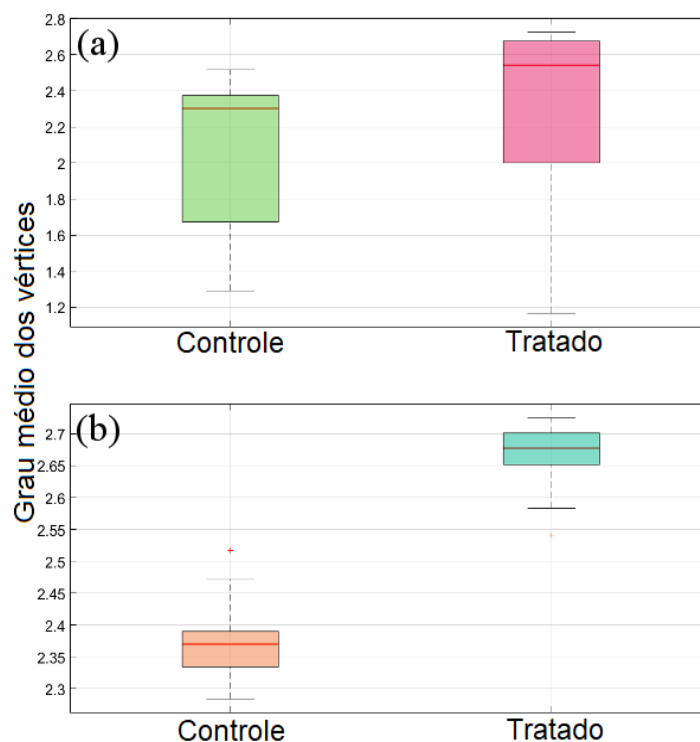


Figura 25 – Comparação dos *boxplots* para o grau médio dos vértices. (a) representa os dados para 15 horas de experimento e (b) representa os dados entre 7,8 e 15 horas de experimento. Os dados para gerar a imagem foram coletados do estudo de [Alves \(2018\)](#).

A [Figura 25\(a\)](#) apresenta os dados referentes à 15 horas de experimento. Observa-se interseção entre as caixas e grande dispersão dos dados.

Entretanto, a análise a partir de 7,8 horas de experimento, em que de fato observa-se dados referentes à angiogênese, mostra independência entre os grupos, simetria e baixa dispersão nos dados, como representado pela [Figura 25\(b\)](#).

Pode-se dizer que o grupo tratado apresenta maiores valores para o grau médio dos vértices. Isso mostra que a tendência apresentada na [Figura 24](#) a partir de 7,8 horas é estatisticamente significativa. De acordo com [Alves \(2018\)](#), o Avastin age no sistema tornando as conexões aleatórias, indicando a instabilidade apresentada pelo ponto de equilíbrio I representado na [Figura 18](#). Além disso, essa maior conectividade indica que este sistema instável caminha para altas concentrações de *Delta* e VEGFR2, como pode ser visto no [Apêndice A](#), o que caracteriza tendência à angiogênese fisiológica dada pelas células *tip*.

Por outro lado, a menor conectividade no grupo controle mostra que as concentrações de *Delta* e VEGFR2 no sistema, que dão origem às células *tip* que lideram o crescimento dos vasos, são menores que as concentrações de *Notch*, *Jagged* e NICD. Logo, o sistema do

grupo controle tende ao ponto de equilíbrio *stalk* que reflete alta incidência de células *stalk*, como representado na [Figura 18](#).

Capítulo 6

Conclusões

Neste estudo foi proposto um modelo matemático para descrever a dinâmica celular envolvida no processo de angiogênese, a partir dos modelos apresentados por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#).

Para validar o modelo proposto, seguiu-se os passos destacados por [Boareto et al. \(2015b\)](#) e as análises qualitativas mostraram-se semelhantes resultando em um modelo mais simples matematicamente e funcional. O modelo aqui apresentado, e baseado no modelo de [Boareto et al. \(2015a\)](#), descreve de maneira satisfatória as concentrações das proteínas receptoras e ligantes envolvidas na dinâmica celular ao longo do processo da angiogênese.

O modelo proposto neste estudo desconsidera a atuação do efeito *fringe*, visto que este efeito pôde ser modelado ao considerar a população inicial de *Notch* maior que zero. Além disso, as análises iniciais do estudo mostraram que a inclusão deste efeito não era determinante na modelagem matemática proposta por [Boareto et al. \(2015a\)](#).

Os resultados apresentados neste trabalho apresentam de maneira satisfatória a dinâmica celular para uma única célula, a qual encontra-se imersa em um ambiente externo em que são simuladas as demais concentrações externas assim como feito por [Boareto et al. \(2015a\)](#) e [Boareto et al. \(2015b\)](#).

Além disso, foi possível correlacionar os pontos de equilíbrio do sistema com os experimentos de [Alves \(2018\)](#), em que foi estudado a interação dos aglomerados celulares em redes vasculares em formação. Neste sentido, o modelo matemático abstrato foi aplicado ao estudo experimental de [Alves \(2018\)](#), em que foi possível explicar a formação da rede vascular. Essa relação foi obtida ao utilizar o modelo NDJVI e variar a quantidade de VEGF externo, diante da sinalização de VEGF. Feito isso, percebeu-se que o equilíbrio do sistema é perturbado e gera mudanças no processo de crescimento dos vasos sanguíneos. Observou-se que a diferença entre as topologias de rede para o grupo controle e para o grupo tratado torna-se mais evidente a partir de 7,8 horas de experimento.

O crescimento dos novos vasos sanguíneos no grupo controle observado por [Alves \(2018\)](#) corresponde a um estado de alta concentração de células *stalk*, que compõem a formação das paredes dos vasos. Entretanto, o crescimento dos novos vasos sanguíneos no grupo tratado, diante das reflexões sobre o modelo NDJVI, reflete uma tendência ao ponto de equilíbrio I, representando instabilidade. Logo, foi possível obter uma solução das equações diferenciais ordinárias com pontos fixos que correspondem aos resultados obtidos por [Alves \(2018\)](#).

Por fim, para estudos futuros, sugere-se a utilização de ferramentas provenientes de Sistemas Dinâmicos e Sistemas Complexos para identificar e caracterizar o equilíbrio do modelo.

Referências

ABOUTAVASTIN: Proposed mechanism of action. 201–. Disponível em: <<http://www.avastin.com/hcp/mcrc/proposed-moa.html>>. Citado na página 12.

ALVES, A. P. **Análise estatística de agregados celulares na formação de redes vasculares**. 2018. 94 f. Tese (Doutorado em Física) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Citado 22 vezes nas páginas vi, vii, xiii, 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 23, 24, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62 e 63.

ANDERSSON, E. R.; SANDBERG, R.; LENDAHL, U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. **Development**, v. 138, n. 17, p. 3593–3612, 2011. Citado na página 5.

APTE, R. S.; CHEN, D. S.; FERRARA, N. Vegf in signaling and disease: Beyond discovery and development. **Cell**, v. 176, n. 6, p. 1248–1264, mar. 2019. Citado 3 vezes nas páginas 1, 2 e 7.

BASSANEZI, R. C. **Ensino-aprendizagem com modelagem matemática**: uma nova estratégia. Campinas: Contexto, 2002. Citado na página 15.

BHADADA, S. V.; GOYAL, B. R.; PATEL, M. M. Angiogenic targets for potential disorders. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 29–47, jan 2011. Citado na página 1.

BILLIARD, F. et al. Delta-like ligand-4-notch signaling inhibition regulates pancreatic islet function and insulin secretion. **Cell**, v. 22, n. 4, p. 895–904, jan. 2018. Citado na página 7.

BOARETO, M. et al. Jagged mediates differences in normal and tumor angiogenesis by affecting tip-stalk fate decision. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. E3836–E3844, jun. 2015. Citado 29 vezes nas páginas vi, vii, xii, 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 30, 35, 43, 46, 47, 49, 51, 52, 53 e 62.

BOARETO, M. et al. Jagged–delta asymmetry in notch signaling can give rise to a sender/receiver hybrid phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 5, p. E402–E409, jan. 2015. Citado 23 vezes nas páginas vi, vii, 1, 2, 6, 7, 10, 19, 22, 23, 24, 30, 31, 33, 34, 35, 38, 39, 41, 42, 43, 52 e 62.

BRAY, S. J. Notch signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, p. 722–735, aug. 2016. Citado na página 7.

CHEN, S. et al. Resistin facilitates vegf-a-dependent angiogenesis by inhibiting mir-16-5p in human chondrosarcoma cells. **Cell Death Disease**, v. 10, n. 31, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 11.

DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 8, p. 457–474, jul. 2017. Citado na página 1.

DEYAMA, S. et al. Role of neuronal vegf signaling in the prefrontal cortex in the rapid antidepressant effects of ketamine. **The American Journal of Psychiatry**, p. 388–400, may 2019. Citado na página 10.

DI BIASIO, A. et al. Mean-field cooperativity in chemical kinetics. **Theor Chem Acc**, v. 1104, n. 131, feb. 2012. Citado na página 19.

DOMINGUES, J. S. **Modelo Matemático e Computacional do Surgimento da Angiogênese em Tumores e sua Conexão com as Células-Tronco**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Modelagem Matemática e Computacional) — Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Citado na página 3.

FRAGOSO, C. R.; FERREIRA, T. F.; MARQUES, D. M. **Modelagem Ecológica em Ecossistemas Aquáticos**. São Paulo: Oficina de textos, 2009. Citado na página 21.

HUANG, Y.; NAN, G. Oxidative stress-induced angiogenesis. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 63, p. 13–16, may. 2019. Citado na página 2.

JAIN, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. **Science**, v. 307, p. 5706–5862, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 59.

JARRIAULT, S. et al. Signalling downstream of activated mammalian notch. **Nature**, v. 377, p. 355–358, 1995. Citado na página 5.

KARGOZAR, S. et al. Nanotechnology for angiogenesis: opportunities and challenges. **Chem. Soc. Rev**, v. 49, p. 5008–5057, jun. 2020. Citado 2 vezes nas páginas 1 e 2.

KUMAR, S. et al. Estrogen-dependent dll1-mediated notch signaling promotes luminal breast cancer. **Oncogene**, v. 38, n. 1, p. 2092–2107, 2019. Citado na página 11.

KöHN-LUQUE, A. et al. Early embryonic vascular patterning by matrix-mediated paracrine signalling: A mathematical model study. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. E24175, sep. 2011. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 14.

LEITE, N. M. G. **Modelagem matemática para a conexão entre células-tronco e câncer**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Modelagem Matemática e Computacional) — Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. Citado na página 3.

LIAO, B.; OATES, A. C. Delta-notch signalling in segmentation. **Arthropod Structure Development**, v. 46, n. 3, p. 429–447, 2017. Citado na página 5.

LINDSELL, C. E. et al. Jagged: A mammalian ligand that activates notch1. **Cell**, v. 80, p. 909–917, mar. 1995. Citado na página 6.

LIU, F.; HEINER, M.; GILBERT, D. Fuzzy petri nets for modelling of uncertain biological systems. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 198–210, dec. 2018. Citado na página 3.

LUGANO, R.; RAMACHANDRAN, M.; DIMBERG, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, p. 1745–1770, 2020. Citado na página 11.

MERCURIO, A. M. Vegf/neuropilin signaling in cancer stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–12, jan. 2019. Citado na página 10.

MEURETTE, O.; MEHLEN, P. Notch signaling in the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 34, n. 4, p. 536–548, oct. 2018. Citado na página 7.

MUKHERJI, S. K. Bevacizumab (avastin). **American journal of neuroradiology**, v. 31, n. 2, p. 235–236, 2010. Citado na página 11.

NANDAGOPAL, N. et al. Dynamic ligand discrimination in the notch signaling pathway. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 869–880, feb. 2018. Citado na página 5.

NOWELL, C. S.; RADTKE, F. Notch as a tumour suppressor. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, p. 145–159, feb. 2017. Citado na página 7.

NUNES, D. N. et al. Synchronous down-modulation of mir-17 family members is an early causative event in the retinal angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1–6, mar. 2015. Citado na página 1.

PHNG, L.; GERHARDT, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. **Developmental Cell**, v. 16, n. 2, p. 196–208, feb. 2009. Citado na página 3.

PUCA, L. et al. Delta-like protein 3 expression and therapeutic targeting in neuroendocrine prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 11, n. 484, p. E3836–E3844, mar. 2019. Citado na página 7.

ROSEN, L. S. et al. A phase i, dose-escalation study of pf-06650808, an anti-notch3 antibody–drug conjugate, in patients with breast cancer and other advanced solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 38, p. 120–130, 2020. Citado na página 3.

SALABARRIA, A. et al. Local vegf -a blockade modulates the microenvironment of the corneal graft bed. **American Journal of Transplantation**, v. 19, mar. 2019. Citado na página 10.

SCHNEIDER, M. et al. Inhibition of delta-induced notch signaling using fucose analogs. **Nature Chemical Biology**, v. 14, p. 65–71, 2018. Citado na página 7.

SIEBEL, C.; LENDAHL, U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. **Physiological Reviews**, v. 97, p. 1235–1294, aug. 2017. Citado na página 5.

SILVA, G. M. F. **Células - tronco e surgimento de tumores**: um estudo comparativo entre o modelo determinístico e o modelo aleatório. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Modelagem Matemática e Computacional) — Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 3 e 33.

SIVEEN, K. S. et al. Vascular endothelial growth factor (vegf) signaling in tumour vascularization: Potential and challenges. **Current Vascular Pharmacology**, v. 15, n. 7, p. 339–351, 2017. Citado na página 3.

TINDEMANS, I. et al. Mechanisms of allergy/immunology notch signaling in t cells is essential for allergic airway inflammation, but expression of the notch ligands jagged 1 and jagged 2 on dendritic cells is dispensable. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 4, p. 1079–1089, oct. 2017. Citado na página 7.

WANG, Z. et al. Emerging role of notch in stem cells and cancer. **Cancer Lett**, v. 279, n. 1, p. 8–12, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 11.

XIU, M. X.; LIU, Y. M. The role of oncogenic notch2 signaling in cancer: a novel therapeutic target. **American Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 837–854, may 2019. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 11.

ZARBIN, M. A. Anti-vegf agents and the risk of arteriothrombotic events. **Asia-Pacific Academy of Ophthalmology**, v. 7, n. 1, p. 63–67, jan 2018. Citado na página [3](#).

ZARRINTAJ, P. et al. Theranostic platforms proposed for cancerous stem cells: a review. **Current Stem Cell Research Therapy**, v. 14, n. 2, p. 137–145, may 2019. Citado na página [11](#).

ZOLNERKEVIC, I. A fome do câncer. **Fapesp**, n. 239, p. 55–57, 2016. Citado na página [10](#).

Apêndices

APÊNDICE A – Variação de VEGF-A e valores de equilíbrio

A [Tabela 4](#) apresenta a variação de VEGF-A de 800 a 3000 moléculas em intervalos de 100 moléculas. Para cada novo valor de VEGF-A identificou-se três pontos de equilíbrio no sistema, representados por *tip*, *I* (instável) e *stalk*. As análises mostraram que os pontos *tip* e *stalk* são estáveis, caracterizando células *tip* e *stalk*, respectivamente. Observou-se, também, que o ponto *I* representa equilíbrio instável no sistema.

Para cada valor de VEGF-A, e para cada ponto de equilíbrio analisado, a [Tabela 4](#) apresenta as concentrações de cada proteína.

VEGF-A	PE	Delta	Notch	NICD	Jagged	VEGF	VEGFR2
800	<i>tip</i>	4120	400	80	2309	287	7184
	<i>I</i>	3433	480	96	2102	271	6773
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	20	509
900	<i>tip</i>	4735	350	70	2474	327	7272
	<i>I</i>	2945	560	112	1958	280	6214
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	22	499
1000	<i>tip</i>	5040	330	66	2549	361	7214
	<i>I</i>	2810	600	120	1906	294	5882
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	24	489
1100	<i>tip</i>	5220	320	64	2589	391	7115
	<i>I</i>	2570	640	128	1867	306	5564
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	26	479
1200	<i>tip</i>	5410	310	62	2630	421	7018
	<i>I</i>	2445	670	134	1846	319	5309
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	28	470
1300	<i>tip</i>	5599	300	60	2673	450	6924
	<i>I</i>	2324	700	140	1830	329	5065
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	30	461
1400	<i>tip</i>	5621	300	60	2673	476	6796
	<i>I</i>	2250	730	146	1820	338	4832
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	32	453
1500	<i>tip</i>	5813	290	58	2717	503	6709
	<i>I</i>	2095	760	152	1815	346	4610

	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	33	444
1600	<i>tip</i>	5830	290	58	2717	527	6589
	<i>l</i>	2026	780	156	1813	355	4441
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	35	436
1700	<i>tip</i>	5840	290	58	2717	550	6473
	<i>l</i>	1920	810	162	1814	360	4237
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	36	429
1800	<i>tip</i>	6040	280	56	2763	576	6395
	<i>l</i>	1819	840	168	1817	364	4043
	<i>stalk</i>	30	3920	784	758	38	421
1900	<i>tip</i>	6051	280	56	2763	597	6287
	<i>l</i>	1723	870	174	1822	367	3859
	<i>stalk</i>	30	3910	782	760	40	416
2000	<i>tip</i>	6061	280	56	2763	618	6182
	<i>l</i>	1632	900	180	1828	368	3683
	<i>stalk</i>	30	3910	782	760	41	409
2100	<i>tip</i>	6070	280	56	2763	638	6081
	<i>l</i>	1486	950	190	1838	362	3446
	<i>stalk</i>	30	3910	782	760	42	403
2200	<i>tip</i>	6077	280	56	2763	658	5983
	<i>l</i>	1353	1000	200	1846	355	3226
	<i>stalk</i>	30	3910	782	760	44	396
2300	<i>tip</i>	6084	280	56	2763	677	5888
	<i>l</i>	1234	1050	210	1850	347	3020
	<i>stalk</i>	30	3910	782	760	45	390
2400	<i>tip</i>	6287	270	54	2811	699	5825
	<i>l</i>	1148	1090	218	1849	343	2856
	<i>stalk</i>	30	3910	782	760	46	384
2500	<i>tip</i>	6292	270	54	2811	717	5736
	<i>l</i>	1069	1130	226	1844	338	2702
	<i>stalk</i>	30	3910	782	760	47	378
2600	<i>tip</i>	6297	270	54	2811	734	5649
	<i>l</i>	1034	1150	230	1840	339	2610
	<i>stalk</i>	31	3910	782	760	48	372
2700	<i>tip</i>	6302	270	54	2811	751	5564
	<i>l</i>	983	1180	236	1833	337	2495
	<i>stalk</i>	31	3910	782	760	49	367
2800	<i>tip</i>	6306	270	54	2811	768	5483
	<i>l</i>	951	1200	240	1828	338	2411

	<i>stalk</i>	21	3910	782	760	51	361
2900	<i>tip</i>	6311	270	54	2811	783	5403
	I	937	1210	242	1824	341	2353
	<i>stalk</i>	31	3910	782	760	52	356
3000	<i>tip</i>	6314	270	54	2811	799	5326
	I	907	1230	246	1817	241	2274
	<i>stalk</i>	31	3910	782	760	53	351

Tabela 4 – Variação de VEGF-A (V_{ext}) e novos valores de equilíbrio para as proteínas. PE representa os pontos de equilíbrio *tip*, I (instável) e *stalk*. Todas as proteínas são dadas em números de moléculas.