

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ARIOSTO SIQUEIRA SILVA

**UMA ABORDAGEM DE MÉTODOS COMPUTACIONAIS
PARA SIMULAÇÃO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS:
SIMULAÇÃO TRIDIMENSIONAL E METABÓLICA DO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL**

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

Campinas, 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ARIOSTO SIQUEIRA SILVA

**UMA ABORDAGEM DE MÉTODOS COMPUTACIONAIS
PARA SIMULAÇÃO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS:
SIMULAÇÃO TRIDIMENSIONAL E METABÓLICA DO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ARIOSTO SIQUEIRA SILVA
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal
e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38a	<p>Silva, Ariosto Siqueira Uma abordagem de métodos computacionais para simulação de processos biológicos: simulação tridimensional e metabólica do desenvolvimento tumoral / Ariosto Siqueira Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: José Andrés Yunes. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Biologia – Simulação por computador. 2. Câncer. 3. Tumores - Crescimento. 4. Carcinoma intraductal não infiltrante. 5. Metabolismo. I. Yunes, José Andrés. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: A computational approach for simulation of biological processes: tridimensional simulation of tumor metabolism and development.

Palavras-chave em inglês: Biology – Computer simulation; Cancer; Tumors - Growth; Noninfiltrating Intraductal carcinoma; Metabolism.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: José Andrés Yunes, Sara Teresinha Olalla Saad, Marcelo Lobato Martins, Laércio Luis Vendite, André Luiz Vettore de Oliveira.

Data da defesa: 30/06/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 30 de Junho de 2008.

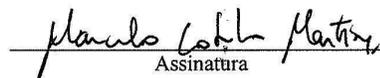
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Andrés Yunes (orientador)



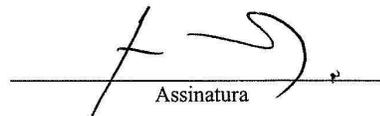
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lobato Martins



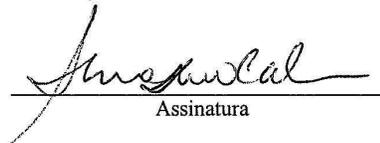
Assinatura

Prof. Dr. Laércio Luís Vendite



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Saad



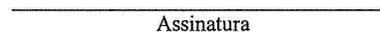
Assinatura

Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira



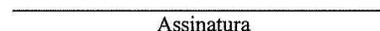
Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Luiz Carlos Zeferino



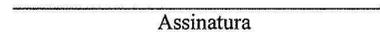
Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Takashi Yoneyama



Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Jörg Kobarg



Assinatura

Resumo

Neste trabalho criou-se uma ferramenta de simulação e modelos computacionais para estudo da carcinogênese a fim de se responder a perguntas biológicas pertinentes ao tratamento desta doença. Os modelos computacionais se basearam no modelo teórico de Evolução Somática e Invasão Mediada por Acidez, proposto por Gatenby e Gillies, e foi implementado em uma ferramenta desenvolvida pelo autor deste trabalho no âmbito deste projeto, o Tissue Simulator (TSim, www.i-genics.com). O modelo teórico de invasão mediada por acidez propõe que células tumorais possuem maior resistência a acidez, assim como produzem quantidade de ácido láctico, originado da glicólise anaeróbica, suficiente para acidificar o meio extracelular, causando assim morte do tecido saudável por apoptose induzida por acidez, e facilitando a invasão do tecido saudável pelo tumor. Estudos experimentais, na literatura, mostraram que a administração de bicarbonato de sódio na água em ratos portadores de tumores reduz o número de metástases, o que seria uma indicação de que a hipótese sobre a importância da acidez na invasividade tumoral é válida. Neste estudo, criou-se um primeiro modelo computacional para testar se o aumento da concentração de bicarbonato no sangue poderia influenciar no gradiente de acidez entre o tumor (micrometástases) e o tecido saudável, e também identificaram-se as características físico-químicas de um tampão ideal a ser usado com esse propósito. O modelo teórico de Evolução Somática, adotado neste projeto, propõe que para que um tumor epitelial se torne invasivo, é necessário que suas células adquiram três fenótipos: hiperplasia, hiperglicólise e resistência a acidez. O segundo modelo criado neste trabalho consistiu na identificação de quais seriam os valores mínimos de hiperglicólise e resistência à acidez para o aparecimento da característica de invasividade em um tumor em desenvolvimento dentro de um duto epitelial (DCIS). Uma vez identificados os fenótipos mínimos para a invasão tumoral de um DCIS, restaria saber quais as mutações em enzimas ou transportadores específicos dessa via metabólica para que o dito fenótipo seja atingido. A título de exemplo de um estudo para responder perguntas desse tipo, fez-se uma análise comparativa da robustez do fluxo glicolítico em duas células distintas: uma levedura (*S. Cerevisiae*) e uma célula humana especializada (célula beta pancreática), cujas enzimas

principais são reguladas por estratégias distintas. Este estudo foi implementado em uma ferramenta computacional disponível na literatura (Jarnac e Matlab) e resultou na publicação de um artigo. No todo, os resultados desta tese mostram que, com o uso de ferramentas computacionais e dados quantitativos da literatura, é possível criar modelos teórico-quantitativos que podem ser usados para validar teorias sobre fenômenos biológicos assim como extrapolar novas hipóteses e testá-las, integrando-se assim a modelagem computacional no processo de pesquisa científica.

Abstract

In this work, we created a piece of software and computer models for studying carcinogenesis, in order to answer biological questions related to the treatment of this disease. The computer models were inspired in the theory of Somatic Evolution and Acid Mediated Tumor Invasion, proposed by Gatenby and Gillies, and were implemented in a tool developed by the author under the scope of this thesis, Tissue Simulator (TSim, www.i-genics.com). The theory of Acid Mediated Tumor Invasion proposes that cancer cells are more resistant to toxicity of an acidic environment that they help create by producing excess of lactic acid through anaerobic glycolysis. Acidification of the extra-cellular environment causes death of healthy tissue through acid-induced apoptosis and ultimately facilitates tumor invasion. Experimental studies, from literature, showed that administration of sodium bicarbonate in water to mice bearing tumors reduced the number of metastases, thus supporting the importance of acidity in tumor invasion. In this study a computer model was built to test if an increase in concentration of bicarbonate in blood serum could alter the pH gradient between the tumor (micrometastases) and healthy tissue, as well as to identify the chemical properties of an ideal buffer with this purpose. The theory of Somatic Evolution, proposes that epithelial tumor cells are submitted to environmental barriers and are selected for three main phenotypes: hyperplasia, hyperglycolysis and acid resistance. A second computer model was created in order to identify the minimum values of these phenotypes that allowed a DCIS to change into an invasive tumor. Once the minimum phenotypic values identified, one can study how mutations on specific enzymes can alter the flux of a metabolic pathway, such as glycolysis, to produce the altered phenotype. As an example of this, we performed a comparative study of robustness of glycolytic flux in two different cells: yeast (*S. cerevisiae*) and pancreatic human beta-cell, whose enzymatic regulatory strategies differ. This computer model was implemented on Matlab and Jarnac. Overall, our results show that the use of computational tools and quantitative data may be used to create theoretical-quantitative models that help addressing theories about biological systems, as well as to extrapolate and test

new hypothesis, integrating the approach of computational modeling in the scientific research process.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família, com quem sempre pude contar, a rocha sobre a qual edifiquei minha vida.

Agradeço a minha esposa, Maria de Lourdes, por seu amor e total dedicação.

Agradeço ao Professor José Andrés Yunes, cuja amizade e orientação me são inestimáveis, pelas inúmeras horas juntos elaborando um tema para minha tese de doutorado, buscando sempre a “pergunta biológica”, pela paciência e dedicação durante este projeto.

Agradeço à Capes por me conceder as bolsas de Mestrado, Doutorado e Estágio de Doutorado durante o período de minha pós-graduação.

Finalmente agradeço à Unicamp, por ter me concedido a chance de participar do programa de Pós-Graduação e dado condições de desenvolver uma tese de doutorado em um ambiente inspirador.

Sumário

Resumo	iv
Abstract	vi
Agradecimentos	viii
1 Introdução	1
2 Motivação e Objetivos	13
3 Um Modelo Computacional 3D para Mapear Modificações do Metabolismo Celular em Fenótipos Tumorais	16
4 The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral pHe and acid-mediated invasion	46
5 Conservation of glycolytic oscillations in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and human pancreatic β -cells: a study of metabolic robustness	79
6 Considerações Finais	90
Apêndice A. Mapa Fenotípico de DCIS	94
Apêndice B. Especificação Geral do Software Tissue Simulator	95
Apêndice C. Implementação do Algoritmo de Difusão no Software TSim	102
Apêndice D. Sintaxe de arquivos usados para simulações do artigo: Conservation of glycolytic oscillations in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and human pancreatic β -cells: a study of metabolic robustness	104
Referências	106
Glossário	110

“When a distinguished but elderly scientist states that something is possible, he is almost certainly right. When he states that something is impossible, he is very probably wrong”.

Arthur C. Clarke (1917 -), Clarke's first law

1

Introdução

Os seres vivos são provavelmente o que de mais intrigante existe na natureza. Desde o maior dos mamíferos ao menor dos seres unicelulares, toda a vida é composta de subsistemas complexos, com funções tão distintas como metabolizar matéria orgânica, reprodução celular, proteção contra patógenos ou absorção de energia solar.

A principais diferenças entre organismos vivos e as máquinas que atualmente conhecemos, são a distribuição do controle (nos seres vivos o controle é distribuído) e a capacidade primordial da vida de se reproduzir.

Estas características fundamentais da vida são implementadas através de intrincadas redes regulatórias intra e extracelulares que, aos poucos, são mapeadas por estudos de diversos grupos de pesquisa, compostos de pesquisadores das mais diversas especialidades, ao redor do mundo.

Estes estudos são periodicamente integrados em teorias unificadoras, que buscam explicar o funcionamento de um dado subsistema, assim como explicar patologias relacionadas e propor terapias médicas ou aplicações industriais.

Neste contexto, esta tese de doutorado propõe a uma descrição quantitativa, através do uso de ferramentas computacionais desenvolvidas no âmbito desse projeto, dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de tumores cancerígenos, baseando-se na teoria de Invasão Mediada por Acidez proposta na literatura (GATENBY e GAWLINSKI., 2003).

1. A importância de modelos quantitativos

A modelagem de um sistema permite uma melhor compreensão de suas características inerentes ao se abstrair o prescindível, obtendo-se assim uma versão simplificada do sistema original que nos permite prever o comportamento do sistema real em condições em que seria inviável o teste no mundo real.

Uma vantagem de se usar um modelo computacional em um projeto de pesquisa é a capacidade dos computadores atuais de processar, em algumas horas, inúmeras simulações previamente determinadas pelo pesquisador antes mesmo que qualquer experimento, que requeira tempo e dinheiro, seja realizado.

Outro ponto a favor do uso de simulações computacionais é a possibilidade de se agregar dados de estudos independentes em um outro estudo, a fim de se extrapolar o comportamento de um sistema composto pelos sub-sistemas previamente estudados.

O desenvolvimento de modelos computacionais integráveis e acessíveis à comunidade científica modificaria a maneira como hoje são relatadas as descobertas científicas, migrando a forma de apresentação dessas descobertas de relatos textuais para representações gráficas formais, que possam ser compreendidas não somente por seres humanos como também por programas especialistas. O impacto dessa evolução será comparável ao do uso de técnicas de bioinformática, o que apenas foi possível após um esforço de homogenização na representação do sequenciamento de seres vivos.

Quando os modelos computacionais de processos biológicos atingirem um nível maior de maturidade, essas ferramentas serão um importante repositório de trabalho para pesquisadores que usarão programas especialistas para sugerir novas possíveis direções a serem seguidas, em um processo iterativo de perfeccionamento do modelo até que estejam disponíveis maquetes de organismos tão completas que será possível a simulação de doenças e tratamentos, minimizando assim o uso de cobaias, o período de testes de laboratório e descobertas tardias de falhas na eficiência de medicamentos ou efeitos colaterais, que são hoje elementos onerosos no processo de desenvolvimento de novos produtos da indústria farmacêutica.

Neste trabalho criamos, entre outros, um modelo computacional tridimensional para estudar o desenvolvimento de carcinoma *in situ* em dutos mamários. Através deste modelo, fomos capazes de representar, em 4 horas, um fenômeno que *in vivo* se estenderia cerca de 20 anos. Apesar dos avanços em técnicas *in vitro*, as dinâmicas simuladas em modelos como o de DCIS deste trabalho ainda não podem ser recriadas em laboratório (BRUGGE, 2005), ressaltando assim o uso de modelos computacionais quantitativos como passo importante no processo da pesquisa do câncer.

2. Caso de Estudo: Câncer

O Câncer é um fenômeno biológico que surge da degeneração genética celular, levando à formação de uma subpopulação heterogênea, tanto genotípica quanto fenotipicamente, que se espalha pelo organismo, colonizando outros tecidos e finalmente levando à morte do organismo.

Estudos sobre o câncer têm gerado uma extensa literatura (2.157.855 artigos referenciados no PubMed para o verbete “cancer”) ao longo dos anos, composta de dados sobre efeitos de mutações em oncogenes, estudos epidemiológicos e modelos teóricos sobre regulação de processos como angiogênese e degradação de matriz extracelular.

A fim de se compreender uma doença deste nível de complexidade, e com tamanha quantidade de informação, se faz necessária a criação de modelos computacionais integrativos, contendo informações obtidas de diversas abordagens experimentais distintas em um modelo teórico-quantitativo que permita a validação de novas hipóteses e tratamentos.

Considerando-se a vasta disponibilidade de dados sobre os fenômenos a serem modelados assim como a importância do tratamento desta doença, decidiu-se concentrar este trabalho na modelagem do câncer e mais especificamente na transição de tumores dormentes para câncer invasivo.

3. Câncer

3.1 Incidência

Câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo.

Jemal et al. (2007), realizaram uma projeção para estimar os novos casos de câncer que iriam ocorrer nos Estados Unidos em 2007, estimaram 1.444.920 de casos novos e 559.650 mortes por câncer, mais de um milhão de casos adicionais de basocelulares e câncer cutâneo de células escamosas e 48.290 casos de melanoma.

Entre os homens, o câncer de próstata, pulmão, brônquios, cólon e reto representaram cerca de 54% de todos os cânceres recém-diagnosticados. Câncer de próstata é responsável por

cerda de 29% (218.890) dos casos incidentes em homens. Baseados em casos diagnosticados entre os anos de 1996 e 2002 estimou-se que 91% desses novos casos de câncer de próstata eram esperados para o ano de 2007 (JEMAL et al., 2007).

Segundo o autor acima mencionado, em 2007 os tipos de câncer mais comuns que foram diagnosticados entre as mulheres foram de mama, pulmão e brônquios, cólon e reto, correspondendo a cerca de 52% de casos estimados. Para o câncer de mama espera-se 26% (178.480) do total de novos casos entre as mulheres.

A Estimativa de Incidência do Câncer no Brasil (INCA, 2008) revela que aproximadamente 470 mil novos casos da doença deverão ocorrer no país em 2008 e 2009. O tipo mais incidente será o câncer de pele não-melanoma, com 115.010 casos a cada ano. Em seguida, vêm: câncer de próstata (49.530 novos casos), mama (49.400), pulmão (27.270), cólon e reto (26.990), estômago (21.800) e colo de útero (18.680). O anúncio foi feito pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), do Rio de Janeiro, durante o 2º Congresso Internacional de Controle de Câncer (ICCC 2007/INCA), realizado de 25 a 28 de novembro, marcando o Dia Nacional de Combate ao Câncer (INCA, 2008).

A dimensão da incidência da doença no país, que é projetada nas Estimativas, evidencia como o câncer precisa ser encarado, definitivamente, como um problema de saúde pública. “Sem contar os casos de câncer de pele não-melanoma, os tipos de câncer com maior número de novos casos no sexo masculino serão os de próstata e pulmão, enquanto em mulheres a incidência será maior nos cânceres de mama e colo de útero. O perfil da doença é semelhante ao observado em outros países”, segundo a epidemiologista Marcell Santos (INCA, 2008).

O INCA estima que entre homens haja 231.860 novos casos de câncer, sendo os tipos mais incidentes o câncer de pele não-melanoma (59 novos casos a cada 100 mil homens), próstata (52/100.000), pulmão (19/100.000), estômago (15/100.000) e cólon e reto (13/100.000).

Apesar do número absoluto de casos entre mulheres ser similar à incidência esperada entre homens – 234.870, o que representa 50,3% do total de casos em 2008 –, o perfil é bastante diferente. Espera-se 51 novos casos de câncer de pele não-melanoma a cada 100 mil mulheres, seguidos pela incidência de câncer de mama (51/100.000), colo de útero (19/100.000), cólon e reto (15/100.000) e pulmão (10/100.000) (INCA, 2008).

No Brasil, Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas esperadas de casos novos de câncer, refletindo as heterogeneidades regionais, enquanto a região Centro-Oeste apresenta padrão intermediário. A região Norte apresenta as menores taxas.

A diferença da incidência de câncer nas regiões no país pode se dever a fatores alimentares, ambientais e étnicos, mas também pode ser devido ao maior acesso da população das regiões mais desenvolvidas (Sul e Sudeste) a atendimento médico, possibilitando assim diagnósticos mais precisos. Por outro lado, nas regiões menos desenvolvidas (Norte e Nordeste), é possível que haja uma considerável quantidade de casos que não é registrada por óbito sem causa especificada.

3.2 Modelo Teórico de Desenvolvimento de Câncer

Câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo progressivo acúmulo de mutações no genoma de uma célula. Estas mutações levam a alterações na expressão ou função de genes-chave para a manutenção da homeostasia celular. Essas alterações genéticas podem converter uma célula normal em uma célula transformada, que se caracteriza por não mais responder aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação que governam a comunidade celular (BRAGA et al. 2004).

Sabe-se ainda que o câncer é uma doença de múltiplos passos, para que ocorra é necessário que aconteça mais de uma lesão diferente no genoma celular.

Ainda de acordo com Braga et al. (2004), mutações são eventos mais frequentes do que geralmente se imagina. Claramente, uma pequena fração delas leva ao desenvolvimento de cânceres. Vários mecanismos moleculares atuam na manutenção da integridade dos genomas celulares. Uma vez que uma célula é mutada, mecanismos operantes ou reparam as lesões no DNA, ou então induzem a morte da célula mutada. Em alguns casos às células mutadas apresentam alguma vantagem que culmina com a expansão da população destas células (expansão clonal), dando origem a um eventual tumor. Dessa forma, os tumores originam-se frequentemente de uma única célula (origem monoclonal) e, à medida que as mutações progressivamente se acumulam, é frequente observar o aumento da heterogeneidade da massa tumoral, devido ao aparecimento de subpopulações.

De acordo com a literatura consultada Braga et al. (2004) e Tenen (2003), pode-se dizer que o processo de carcinogênese é classicamente dividido em quatro fases: iniciação, promoção, manutenção e progressão tumoral.

Na fase de iniciação deste processo, ocorre uma alteração no DNA. Para gerar a doença é necessário que a mutação seja herdável, ou seja, transmitida para as células filhas.

Na fase de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem o efeito de agentes que não são mutagênicos, mas que promovem a expansão da população celular que carrega uma mutação inicial.

Após a iniciação e a promoção, há a fase de manutenção, onde as células geneticamente alteradas são mantidas na população, isto só ocorrerá se as mutações não forem excessivas, se as alterações genéticas estiverem associadas a maior capacidade de proliferar em relação às células normais, e se as mutações levarem ao escape do processo de morte celular induzida.

Se os mecanismos homeostáticos intracelulares não forem capazes de eliminar a célula tumoral, essas mutações serão fixadas na população celular e sua frequência irá aumentar à medida que as células se duplicam e a progressão do tumor se manifestará em função do acúmulo destas mutações, o que está de acordo com Kingsley et al. (2007), ao afirmar que a metástase é uma fase final da progressão do tumor.

Para que uma célula cancerosa crie metástases, primeiro ela deve se soltar do tumor primário. Um ponto chave para essa liberação é a capacidade de invadir os tecidos vizinhos. Essa capacidade invasiva é uma propriedade que define os tumores malignos que apresentam padrão de crescimento desorganizado e bordos irregulares que se estendem penetrando nos tecidos circundantes. Apesar dessa capacidade invasiva não ser totalmente compreendida, é quase certo que ela necessite que haja distúrbio nos mecanismos de adesão que normalmente mantêm as células coesas as suas vizinhas (ALBERTS et al., 2004).

O autor acima citado ainda afirma que a liberação das células dos arredores do tumor primário e o estabelecimento de colônias em tecidos distantes constituem uma operação complexa, lenta e ineficiente, de modo que poucas células conseguem completá-la. Para que a metastatização seja um sucesso, as células devem penetrar em algum vaso sanguíneo ou linfático, atravessar a lâmina basal e a camada endotelial dos vasos para passar para a circulação, abandonar a circulação em algum outro ponto do organismo e, ainda, sobreviver e proliferar no novo ambiente.

Dois fatores são considerados como os principais responsáveis pela seleção das células tumorais, sujeitas a mutações aleatórias, na direção do feótipo do câncer e da invasão de tecido saudável: hipóxia e pH ácido.

4. Hipóxia

As células sofrem uma variedade de respostas biológicas quando colocados em condições de hipóxia, incluindo a ativação de mecanismos de sinalização que regulam a proliferação, angiogênese e morte. Células cancerígenas se adaptaram a estes mecanismos permitindo o crescimento e a sobrevivência de tumores mesmo sob condições de hipóxia (HARRIS, 2002).

Segundo Shannon et al. (2003), a hipóxia ocorre nos tecidos quando há um desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio.

Tumores sólidos estão particularmente sujeitos a hipóxia porque proliferam rapidamente e a má formação de estruturas vasculares no tumor não é capaz de satisfazer as exigências metabólicas de expansão tumoral (KINGSLEY et al., 2007).

5. pH Ácido

A morte celular ocorre, principalmente, através de duas formas: apoptose e necrose. Apoptose, também chamada morte celular programada, é caracterizada pela ativação de caspases (cisteínas proteases), sendo um processo ativo que exige energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). Necrose é um processo passivo que resulta de uma catástrofe bioenergética, caracterizada por uma importante depleção de ATP incompatível com a sobrevivência celular (MEURETTE et al., 2007).

Segundo o autor acima mencionado, condições de baixo pH extracelular induzem morte celular semelhante à necrose, além disso, o papel do pH na morte celular programada já é bem conhecido.

O modelo relacionado de invasão tumoral mediada por acidez, proposto por Gatenby et al. (2006), inclui as seguintes etapas:

-
1. Aumento do metabolismo glicolítico das células tumorais mesmo em condições de normóxia, fato observado clinicamente pelo diagnóstico PET *Positron Emission Tomography*;
 2. Metabolismo glicolítico leva ao aumento da produção de ácido láctico, e conseqüentemente à redução substancial do pH extracelular (pHe) e intratumoral, fenômeno observado experimentalmente;
 3. Difusão dos íons H^+ oriundos do microambiente tumoral para os tecidos adjacentes normais, provavelmente transportados por tampões;
 4. A acidificação do ambiente extracelular peritumoral é vantajosa para o tumor por que:
 - Induz a morte de células normais por necrose ou apoptose (por ativação p53) abrindo espaço para proliferação de células tumorais;
 - Acidose celular também promove angiogênese através da indução-ácida por liberação de interleucina-8 e fator de crescimento endotelial (VEGF);
 - Indiretamente a acidose promove degradação de matriz extracelular por induzir células adjacentes normais (fibroblastos e macrófagos) a liberarem enzimas proteolíticas, como catepsina B, uma protease de cisteína que participa primordialmente na capacidade proteolítica dos lisossomos, participando dessa forma da reciclagem lisossomal ;
 - Acidose inibe resposta imune aos antígenos tumorais;
 - Ao contrário de células normais, células cancerosas possuem mecanismos compensatórios para permitir a sobrevivência e proliferação mesmo a baixo pH extracelular e, portanto, não são susceptíveis a apoptose ácido-induzida (KINGSLEY et al., 2007);

6. O metabolismo glicolítico em tumores

Em 1930 Warburg publicou seus estudos do metabolismo tumoral, em que relatava que células tumorais consomem mais glicose do que células normais. O aumento do consumo de glicose é normal quando células (normais ou tumorais) são submetidas à hipóxia. O trabalho de

Warburg, porém, mostrava que as células tumorais mantinham alto consumo de glicose mesmo em condições de normoxia.

O metabolismo glicolítico anaeróbico é menos eficiente que o aeróbico, gerando duas moléculas de ATP por molécula de glicose, contra as 36 advindas do ciclo do ácido cítrico (Figura 1B). Esta deficiência pode ser compensada pela célula através do aumento do consumo de glicose. Muito embora este fato seja largamente explorado para a localização de tumores através do uso de Fluoro-deoxi-glicose (FdG) seguido de Tomografia por Emissão de Pósitrons (Figura 1A; Czernin e Phelps, 2002; Gambhir, 2002), até hoje ainda não se sabe quais são as alterações moleculares responsáveis pela manutenção do metabolismo glicolítico anaeróbico em condições de normoxia.

A aquisição constitutiva do fenótipo glicolítico anaeróbico parece um evento comum aos mais diferentes tipos de tumores. Além disso, estudos mostram uma correlação positiva entre a taxa de consumo de glicose e o nível de agressividade do tumor (DI CHIRO et al., 1987). Finalmente, cabe ressaltar que poucas células normais empregam o metabolismo glicolítico anaeróbico de forma constitutiva. Assim sendo, a identificação dos eventos moleculares responsáveis pela aquisição da glicólise anaeróbica nos tumores poderia levar à descoberta de novos alvos para o desenvolvimento de drogas.

Na Figura 1C, é apresentado um esquema da carcinogênese proposto por Gatenby e Gillies (2004), consolidado através de uma abordagem teórico/matemática.

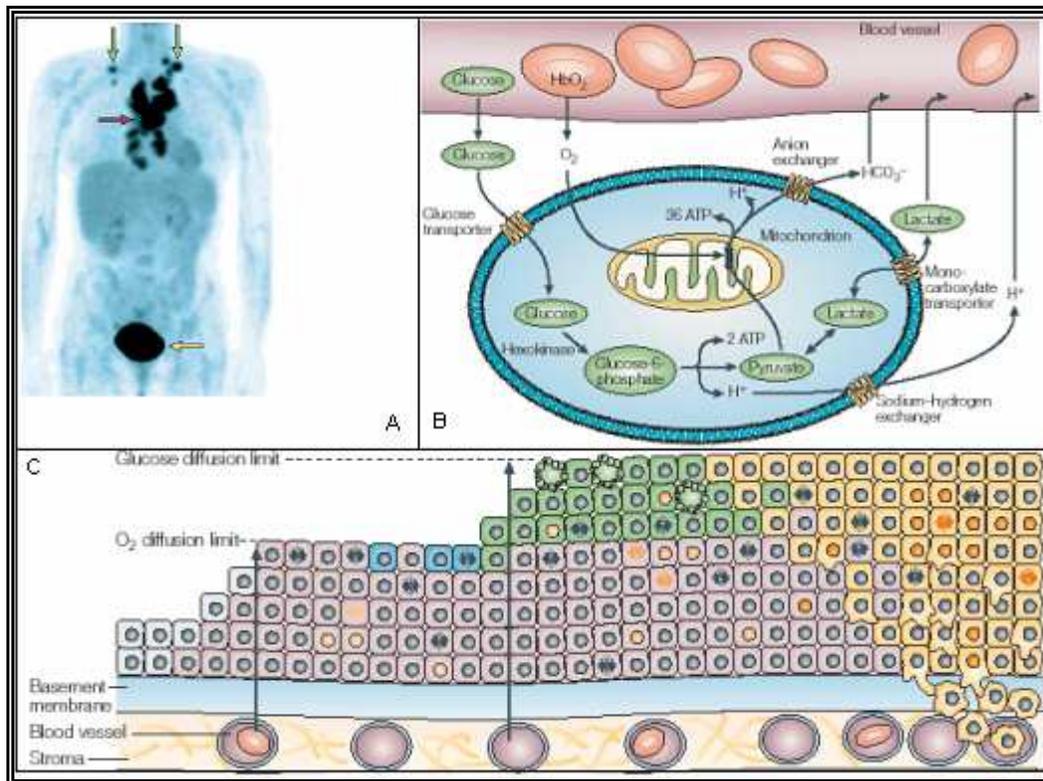


Figura 1 Em (A) uma imagem de PET mostrando com setas verdes e roxas tumores com grande consumo de FDG. A seta amarela mostra a bexiga que tem grande concentração de FDG a ser excretado. Em (B) um esquema resumido da glicólise e o ciclo de Krebs com destaque à produção de 36 ATP por molécula de glicose contra duas da glicólise anaeróbica. Em (C) o modelo de crescimento de tumores em ambiente anaeróbico e progressivamente ácido proposto por Gatenby e Gillies (2004). Figuras adaptadas de Gatenby e Gillies (2004). Segundo este modelo, células (rosa) que adquiram o fenótipo hiperplásico são capazes de proliferar longe da membrana basal até um limite de difusão de oxigênio, o que restringe a quantidade de energia que pode ser produzida pelo metabolismo celular. Esta barreira ambiental seleciona então células (verde) que sejam capazes de metabolizar mais glicose, a fim de suprir suas necessidades metabólicas através do ineficiente metabolismo anaeróbico da glicose. Este metabolismo anaeróbico, porém, gera um excesso de acidez devido à produção de ácido láctico. A acidez, então, age como outra barreira ambiental que seleciona células (amarelo) capazes de manterem seu pH interno em valores adequados, mesmo em um meio extracelular ácido. Este mecanismo de seleção termina por criar uma população capaz de proliferar e colonizar o interior do duto epitelial, provocando morte de células saudáveis e finalmente invadir a membrana basal e estroma.

Nesse modelo o desenvolvimento do tumor passa por três etapas: (1) adaptação a hipóxia através da aquisição da glicólise anaeróbica; (2) resistência à acidez; e (3) invasão do tecido saudável. Segundo Gatenby e Gillies (2004), estes três fenótipos surgiriam gradualmente em função das condições do meio extracelular e da ‘seleção natural’ atuando sobre uma população heterogênea de células tumorais.

7. Modelos Computacionais para Desenvolvimento de Câncer

Modelos computacionais foram usados para facilitar a compreensão de dados experimentais, a fim de se encontrar padrões de desvio da glicólise e ciclo de pentoses em células cancerosas, com o fim último de buscar mecanismos de inibição de duplicação celular e crescimento de tumores (CASCANTE et al., 2004; CASCANTE et al., 2005). Analisando-se a distribuição de isótopos radioativos dentro do ciclo das pentoses buscou-se um algoritmo que explicasse as atividades das principais enzimas a partir das concentrações de metabólitos com isótopos radioativos.

A mesma técnica foi também utilizada para identificar as mudanças de fluxo metabólico em linhagens celulares com diferentes fenótipos. Verificou-se, por exemplo, ao comparar uma linhagem de cancer de mama mais invasiva com uma menos invasiva, que a mais invasiva (linhagem MCF-10) apresentava aumento do fluxo metabólico do ciclo das pentoses (RICHARDSON et al., 2008).

Este fato, porém, não pode ser generalizado, pois não explica, por exemplo, a diferença de invasividade entre as linhagens de câncer de mama MCF7 e MDA-mb-231 (GILLIES, dados não publicados).

Uma explicação para essa discrepância é que, células de linhagens distintas, podem atingir um mesmo fenótipo extracelular através de alterações diferentes em seu metabolismo. Por exemplo, uma célula que tem sua via glicolítica saturada, pode ainda aumentar o metabolismo da glicose através de um aumento da atividade do ciclo das pentoses.

De certa forma, no fim das contas, o mais importante talvez seja o fenótipo pelo qual a célula reage e interage com seu microambiente, e não a maneira como esse fenótipo foi atingido. Sob esta ótica, pesquisadores criaram modelos que busam entender o desenvolvimento de tumores como uma função de fenótipos-chave, de uma população tumoral interagindo com o tecido saudável.

Gatenby e colaboradores criaram modelos computacionais para a análise dessas hipóteses, usando tanto modelos matemáticos contínuos (SMALLBONE et al., 2005) quanto discretos (PATEL et al., 2001), e mostraram que em um modelo bidimensional as hipóteses propostas levariam a um comportamento semelhante ao encontrado em tumores invasivos reais.

Enquanto que o modelo proposto por Gatenby leva em consideração o metabolismo glicolítico, e o efeito da produção de acidez na invasão tumoral, outros trabalhos levaram em consideração outras forças, como migração celular (FERREIRA et al., 2002) ou pressão.

Os modelos propostos na literatura, apesar de serem capazes de emular características de tumores, como morfologia e heterogeneidade populacional e invasão, se dedicam principalmente à validação de hipóteses, e não à validação de dados experimentais ou extrapolação de novas conclusões.

Neste trabalho, buscou-se desenvolver um modelo computacional a fim de se responder a perguntas biológicas, que pudessem ser testadas em experimentos, ou cujo resultados pudessem ser comparados com dados disponíveis na literatura.

"The surest way to corrupt a youth is to instruct him to hold in higher esteem those who think alike than those who think differently".

Friedrich Nietzsche

2

Motivação e Objetivos

Embora exista uma hipótese, já mencionada, do papel da glicolise na acidose tumoral e na carcinogênese, pouco se sabe sobre quais seriam os eventos moleculares necessários para a aquisição permanente do metabolismo glicolítico anaeróbico (“Glycolytic Switch”). Desconfia-se que em parte o “Glycolytic Switch” seja decorrente de uma perda do controle negativo sobre o transporte de glicose para o interior da célula. Existem trabalhos que mostram maior expressão dos transportadores GLUT1 e GLUT3 nas células tumorais (KUNKEL et al., 2003), mas não se sabe se essa alteração é causa ou consequência do “Glycolytic Switch”.

Dada a complexidade das vias metabólicas envolvidas, propomos que a melhor maneira de abordar este problema seja através de simulações computacionais.

Nossa abordagem propõe um modelo híbrido (contínuo e discreto) para a simulação desse processo. Primeiro, porque modelos contínuos com condições de contorno complexas (superfície das células simuladas, topologia dos vasos sanguíneos) e variáveis no tempo (morte celular, mitose, angiogênese) são de difícil implementação. Segundo, porque modelos baseados puramente em autômatos celulares não permitem o uso de equações de cinética química para a representação do metabolismo celular.

Os modelos híbridos hoje propostos na literatura são bidimensionais, o que permite uma aproximação do comportamento do tecido tumoral, mas talvez leve a uma sobre-simplificação da dinâmica do sistema, sobretudo quando se leva em conta que em uma superfície bidimensional o número de células cresce diretamente proporcional ao quadrado do raio enquanto que em uma representação tridimensional esse crescimento é proporcional ao cubo do raio. Acreditamos, portanto, que as condições de equilíbrio entre a geração de acidez por parte do tumor e a difusão dessa acidez através de sua superfície deva diferir entre um modelo com duas e um com três dimensões.

Como solução a este problema, durante os dois primeiros anos do trabalho de tese, criamos um software que simula um conjunto de células em 3D (Tissue Simulator ou TSim), que está brevemente descrito no Apêndice B desta tese. Este software permite obter ou inferir dados que as abordagens atuais não permitem. Atualmente podem ser simuladas 125.000 células, cada uma contendo internamente toda a via metabólica da glicólise.

O TSIM permite alterar os parâmetros de cada uma das enzimas da via glicolítica e ver como se comporta a progressão do tumor, em termos de crescimento, consumo e dependência de oxigênio assim como acidificação do meio (produção de ácido lático). Neste ambiente os processos de difusão do oxigênio, glicose e ácido lático são muito mais realistas do que em ambientes em duas dimensões.

A ferramenta computacional foi então usada em duas situações :

- Para estudar o processo de evolução do Carcinoma in Situ em dutos mamários (DCIS). Mais especificamente, procurou-se responder quais seriam as alterações mínimas necessárias em termos de hiperplasia, hiperglicólise e resistência à acidez, para que um pré-tumor fosse capaz de invadir o duto epitelial.
- Para definir as características físico-químicas ideais que um tampão deveria ter a fim de ser usado no controle da acidez tumoral.

Essas perguntas foram respondidas em dois artigos distintos, no primeiro desenvolvemos um modelo tridimensional de um duto epitelial em que simulamos o crescimento de um tumor de origem epitelial, formando uma população heterogênea oriunda de mutações em dois fenótipos/variáveis considerados : metabolismo glicolítico e resistência à acidez, além de mutações na capacidade de proliferação das células (hiperplasia). As simulações resultaram no surgimento de diferentes tipos de células tumorais, organizadas em diferentes configurações espaciais, em função dos valores atribuídos aos fenótipos considerados. Além disso, os valores dos fenótipos não apenas determinam a distribuição espacial de população tumoral mas a capacidade de invasividade tumoral.

O segundo artigo explora resultados experimentais recentes que demonstraram aumento do pH dentro do tumor (sem alteração do pH do sangue ou músculo) e inibição significativa de

metástases, em animais (camundongos) tratados com bicarbonato de sódio, (ROBEY et al., 2008).

Um terceiro artigo, desenvolvido no âmbito deste curso de doutorado, analisa a influência de mutações em enzimas da via glicolítica no fluxo metabólico da glicólise em dois organismos com duas estratégias distintas de regulação enzimática. O terceiro artigo foi na verdade o primeiro a ser executado, e permitiu que o autor desta tese compreendesse os mecanismos de regulação metabólica assim como entender as limitações das ferramentas disponíveis para a simulação de processos mais complexos, envolvendo centenas ou milhares de células em um espaço tridimensional.

“Nothing shocks me. I'm a scientist”.

Harrison Ford (1942 -), as Indiana Jones

3

Um Modelo Computacional 3D para Mapear Modificações do Metabolismo Celular em Fenótipos Tumorais

Resumo

A modelagem do desenvolvimento de Carcinoma in Situ em dutos mamários se baseou na teoria de Gatenby e Gawlisnky (2001) de que, para o desenvolvimento de um tumor invasivo nesse ambiente é necessário que as células cancerosas passem por três etapas de mudanças fenotípicas: hiperplasia, hiperglicólise e resistência a acidez. No modelo desenvolvido, procurou-se identificar quais os valores mínimos dos dois últimos fenótipos para que um tumor se tornasse invasivo. O modelo consistiu em um duto epitelial com diâmetro de 40 células, sendo rodeado por vasos sanguíneos e revestido interiormente por uma camada de células epiteliais. A conclusão obtida do modelo foi que um aumento de ao menos 9 vezes na produção de ácido láctico - em função de um aumento do consumo de glicose - assim como um aumento de ao menos 1,75 vezes na concentração de H^+ do limiar de apoptose, são necessárias para que o tumor possa invadir o duto e atingir o estroma. A morfologia dos tumores resultantes da simulação *in silico* foi comparada à de amostras reais de DCIS a fim de validar os resultados previstos pelo modelo computacional.

Introdução

Gatenby e Gillies (2004), propuseram um modelo teórico de carcinogênese que identificação de uma seqüência de barreiras microambientais surgidas ao longo do crescimento tumoral em superfícies epiteliais, que se não superadas, impedem a sobrevivência e proliferação

celular. A Evolução Somática do câncer é, portanto, vista como adaptações fenotípicas e genotípicas a essas barreiras.

De acordo com esse modelo, o primeiro passo na carcinogênese deve ser a evolução de um fenótipo que permita às células proliferarem mesmo não estando em contato com a membrana basal. Ou seja, as células tumorais devem superar a primeira barreira, a qual dita que células que não estão em contato com a membrana basal deveriam cometer apoptose (anoikis).

Estas células hiperplásicas em seguida proliferam e ocupam o lúmen do duto epitelial. Um componente crítico deste modelo teórico é a consideração de que uma membrana basal intacta impede que vasos sanguíneos no estroma adjacente entrem em contato com o tumor no interior do duto. Ou seja, lesões pré-malignas são uniformemente avascularizadas de forma que substratos e metabólitos só alcançam o tumor através de difusão pela membrana basal. À medida que a população de células hiperplásicas coloniza o duto, as células do lúmen do tumor vão ficando mais distantes dos vasos sanguíneos. A dinâmica de reação-difusão imposta pela separação do tumor e a vasculatura resulta em um gradiente local de concentração de oxigênio e glicose, dois importantes substratos para o metabolismo energético celular. De uma maneira geral, células hiperplásicas a uma distância de 100 a 150 microns da membrana basal não têm oxigênio suficiente para manter o funcionamento de seu metabolismo energético aeróbico. Essa limitação energética exerce uma pressão seletiva nas células hiperplásicas, favorecendo o surgimento de células que se adaptam à situação em curso pelo uso do metabolismo anaeróbico de glicose. No entanto, este metabolismo é ineficiente, produzindo apenas dois moles de ATP por mol de glicose contra 36 moles de ATP para a mesma quantidade de glicose metabolizada aerobicamente. Assim sendo, para gerar a energia necessária à manutenção da proliferação tumoral, essa ineficiência deve ser compensada por um aumento substancial na absorção de glicose através de um aumento da expressão de transportadores de glicose na membrana celular.

No modelo proposto, essas células - denominadas hiperglicolíticas – continuam a proliferar no lúmen hipóxico gerando uma nova força seletiva no ambiente, a saber, o aumento da acidez, que decorre da alta produção de ácido láctico derivado do metabolismo anaeróbico. Acidez extracelular, além de um determinado limiar, resulta em parada do ciclo celular ou apoptose e pode levar as células a se tornarem quiescentes (quiescência induzida por acidez) e finalmente induzir o surgimento de regiões de morte celular no tumor. A hipótese em questão propõe que a terceira barreira ambiental selecionaria células com maior resistência à acidez (graças a, por

exemplo, um aumento da atividade de transportadores Na⁺/H⁺ na membrana celular), as quais continuariam proliferando e ocupando espaços deixados por células com menor resistência à acidez.

O modelo proposto estipula que essa população de células selecionadas ao longo da carcinogênese para os fenótipos de hiperplasia, hiperglicólise e resistência a acidez, possuem uma considerável vantagem proliferativa em relação às células normais. Em parte por não estarem sujeitas às mesmas restrições de crescimento e por poderem gerar energia suficiente para proliferação em ambientes hipóxicos, além disso, por produzirem e serem imunes à acidez, que é tóxica às demais células, e por promoverem a erosão da matriz extracelular. Essas vantagens são propostas como condições necessárias e suficientes para o surgimento do câncer invasivo (Figura 1).

Este modelo microambiental de carcinogênese surgiu da aplicação da Teoria Evolucionária dos Jogos ao caso da evolução somática do fenótipo maligno. O papel crítico desempenhado pela distância das células tumorais em relação aos vasos sanguíneos já foi explorado por outros autores usando-se simulações contínuas ou de autômatos celulares (PATEL et al., 2001; SMALLBONE et al., 2005, 2007; FRIEBOES et al., 2007).

Resultados dessas simulações parecem concordar razoavelmente bem com modelos de crescimento tumoral *in vitro* (em esferóides) e observações clínicas de DCIS. No entanto, esses modelos são representações bi-dimensionais de um fenômeno tridimensional e, portanto, são incapazes de representar dinâmicas de uma anatomia complexa, como é o caso desses tumores, em um microambiente espacial heterogêneo.

Neste trabalho desenvolvemos um modelo tridimensional do desenvolvimento de DCIS em um duto epitelial a fim de testar a hipótese do modelo de evolução somática proposta por Gatenby e Gillies (2004), assim como para quantificar as alterações fenotípicas mínimas, em termos de metabolismo glicolítico e resistência a acidez, que as células cancerígenas precisam sofrer para ultrapassar as barreiras microambientais decorrentes do seu metabolismo alterado e da distância dos vasos sanguíneos.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi identificar o conjunto mínimo de fenótipos necessário para um DCIS se tornar invasivo. Foram feitas simulações de um mesmo cenário (duto epitelial

saudável com uma pequena quantidade de células propensas a mutações que gradualmente se transformam em DCIS), mas com diferentes valores para os fenótipos (metabolismo glicolítico e resistência a acidez) necessários à sobrevivência/proliferação, buscando identificar uma região no espaço de parâmetros em que houvesse uma mudança qualitativa entre ‘confinamento’ e invasão.

Neste estudo um tumor é considerado em ‘confinamento’ quando é incapaz de causar morte das células epiteliais que recobrem o interior do duto e, portanto entrar em contato com a membrana basal para tentar a invasão desta, o tumor é considerado invasivo no caso contrário.

Materiais e Métodos

Neste estudo foi usado o software TSim (Tissue Simulator, www.i-genics.com), desenvolvido no âmbito dessa tese para simular o modelo 3D de crescimento tumoral (Apêndice B). O DCIS foi representado como uma estrutura tubular de 40 células de diâmetro por 40 células de comprimento, composto por células endoteliais, membrana basal e uma camada de células epiteliais revestindo o interior do duto (Figura 2).

Este tamanho de duto foi utilizado em vista dos requerimentos de poder computacional, especialmente memória, para se simular modelos das dimensões deste estudo, mas também em função de imagens pesquisadas na literatura de amostras de dutos mamários normais e apresentando DCIS de dimensões em concordância com as propostas por nosso modelo teórico (MAN et al., 2003).

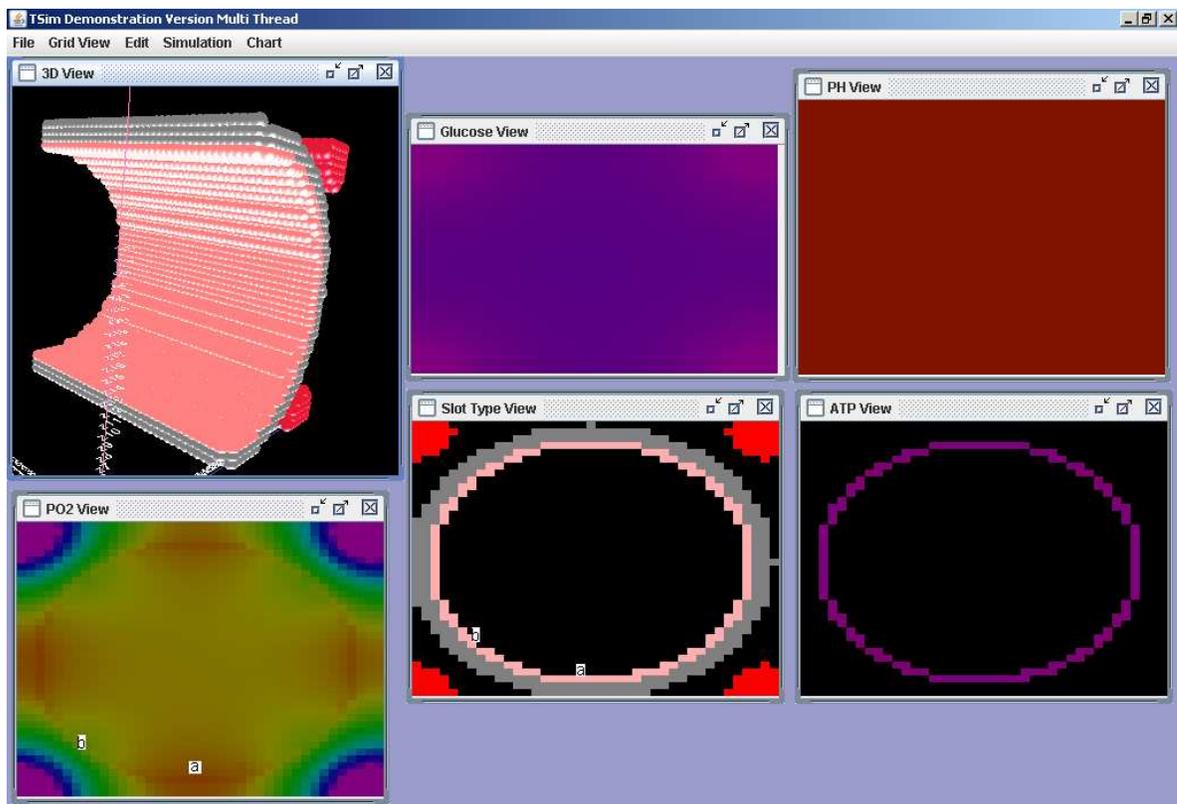


Figura 2 Visões 3D (secção longitudinal mostrando metade do duto epitelial) e 2D do modelo simulado, exibindo gradientes de concentração de espécies (de acordo com legendas nas janelas da figura acima: PO2, oxigênio; Glucose, glicose; ATP, produção de ATP; e PH, acidez) no espaço.

A vascularização é representada como vasos sanguíneos paralelos ao eixo longitudinal do tubo, a uma distância de 28 células de seu centro. A membrana basal é representada com uma espessura equivalente a duas células enquanto que a camada de células epiteliais tem uma célula de espessura. Uma área quadrada de três células de lado, próxima ao centro do cilindro de células epiteliais, foi usada como semente para a população de células tumorais. Estas nove células epiteliais sofrem mutações para um dos três fenótipos relevantes para invasão tumoral (taxa de proliferação, metabolismo glicolítico, resistencia a acidez), em função de uma probabilidade estipulada em 0.1% de que cada mutação venha a ocorrer (SMALLBONE et al., 2007). As demais células epiteliais não sofrem mutações.

O processo de mutação ocorre de forma independente para cada fenótipo, sendo que a cada geração simulada, uma célula tem a probabilidade de 0.1% de adquirir qualquer um dos três fenótipos. O teste para ocorrência de mutação é feito com um número aleatório ,entre 0 e 1, gerado pelo software Tsim, caso este número seja menor do que 0.001 o fenótipo é adquirido. Os

fenótipos, uma vez adquiridos, são irreversíveis tanto em presença quanto em valor. As transições entre fenótipos estão representadas na Figura 3.

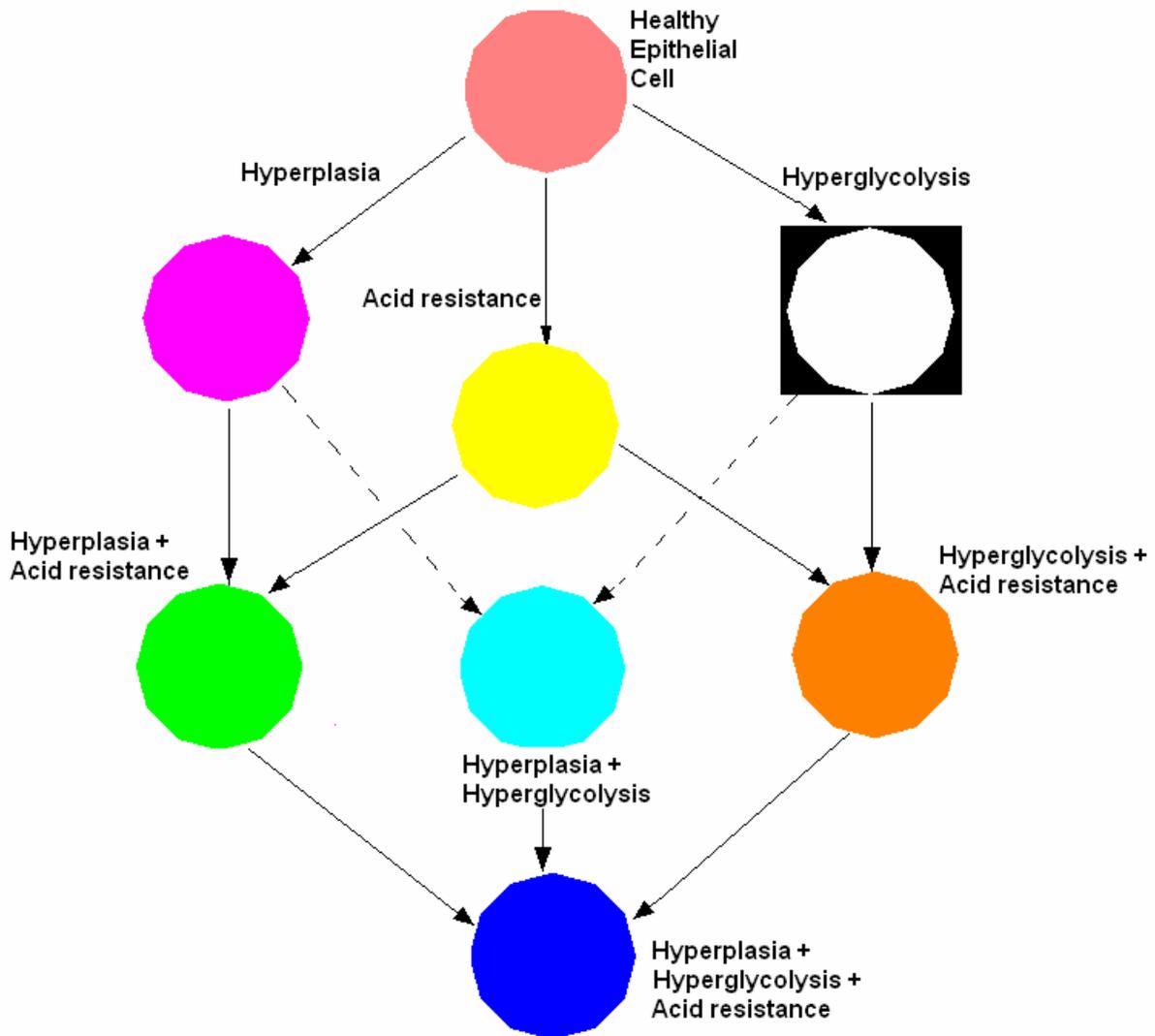


Figura 3 Um célula epitelial saudável pode adquirir qualquer um dos três fenótipos a cada geração, à medida que novos fenótipos são adquiridos, estes se somam aos previamente adquiridos. As setas mostram que as transições são irreversíveis.

A difusão de espécies químicas foi calculada juntamente com o metabolismo em uma proporção de 10 passos de difusão para cada passo metabólico (as constantes de difusão sendo usadas em décimos de segundo e as metabólicas em segundos). 50 passos metabólicos foram simulados antes de testarmos se uma célula deveria duplicar-se, permanecer viva ou morrer (neste estudo consideramos que o intervalo de 50 segundos era o bastante para que este sistema entrasse em equilíbrio em termos de metabolismo e reação-difusão).

Esta sequência de passos é uma estimativa de como o sistema se comportaria durante um intervalo de tempo muito maior (cerca de 20 anos para desenvolvimento de DCIS invasivo), baseado na hipótese de que, uma vez o equilíbrio seja atingido entre metabolismo e difusão de espécies químicas, apenas a duplicação e morte celular possam desequilibrar o sistema novamente. Em nossas simulações, observamos que o modelo atinge equilíbrio em cerca de 20 passos metabólicos (200 passos de difusão ou 20 segundos de tempo real), o que nos permite assumir que a aproximação de 50 passos metabólicos para cada geração não compromete os resultados obtidos.

Vasos sanguíneos foram considerados como condições de contorno, tendo pH, pO₂ e concentração de glicose constantes. Células foram consideradas como sorvedouros de oxigênio e de glicose, sendo a absorção proporcional à concentração dessas espécies no meio. A absorção de glicose, porém, foi aumentada em células cancerosas com o fenótipo hiperglicolítico (SMALLBONE et al., 2007).

Cada simulação foi composta de 50 passos, cada um correspondendo a uma geração, em que os seguintes eventos puderam ocorrer: duplicação celular, morte celular, mutação. Mutações neste modelo foram irreversíveis e herdadas pelas células-filhas depois de uma duplicação. Os valores de fenótipo para metabolismo glicolítico, hiperplasia e resistência à acidez, foram mantidos constantes em uma mesma simulação, porém, testamos os resultados para cenários com diferentes valores para estes fenótipos a fim de montar o quadro fenotípico da Figura 7.

A divisão celular foi permitida caso a célula não estivesse quiescente e tivesse quantidade suficiente de energia (ATP) para a duplicação. A probabilidade de duplicação foi representada como uma função com valor zero para uma produção de ATP de $8.6 \times 10^{-7} \text{M/s}$ (valores abaixo desse causam morte celular por falta de energia) e de 100% para uma produção energética de $8.6 \times 10^{-6} \text{M/s}$ ou maior (ANDERSON, 2005) segundo a equação 1 e Figura 4.

$$p = \frac{(ATP - 0.1 \times ATP_0)}{0.9 \times ATP_0} \quad (1)$$

Onde p é a probabilidade de divisão celular, ATP é a produção energética e ATP_0 é a produção energética para 100% de probabilidade de divisão celular.

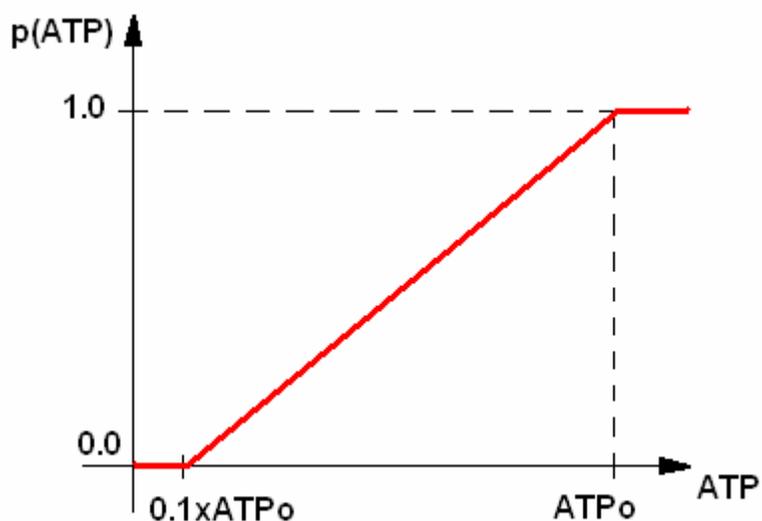


Figura 4 Reperesentação gráfica da equação 1. A probabilidade de uma célula sofrer duplicação é diretamente proporcional à sua produção de ATP, a menos que esta seja inferior a um valor mínimo (10% de ATP_0) ou maior que o limiar de duplicação (ATP_0), quando a probabilidade de duplicação é de zero e 1, respectivamente.

Estabeleceu-se que as células entrariam em quiescência caso o pH externo estivesse abaixo de um determinado limiar (7.1 para células normais e 6.4 para células cancerosas com o mais alto nível de resistência), mas acima do limiar de apoptose (6.8 para células normais e 6.0 para células cancerosas resistentes à acidez), que define a morte celular (GATENBY e GAWLINSKI, 2003).

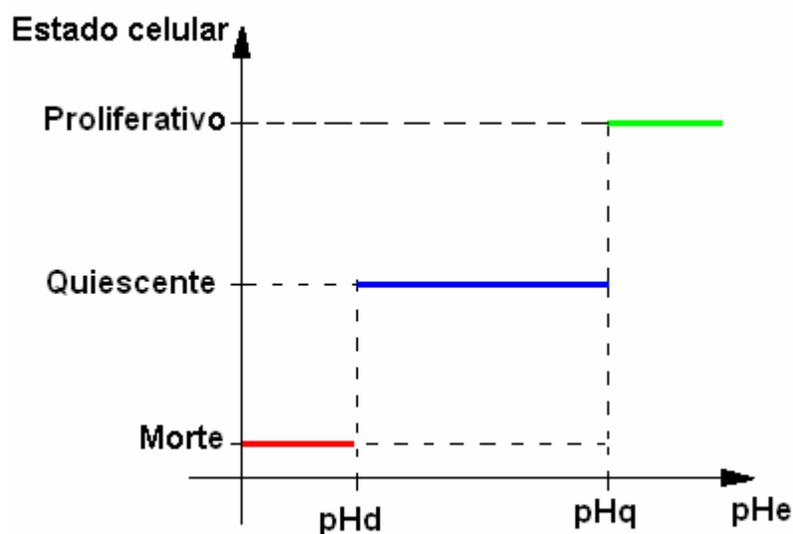


Figura 5 Células podem estar em três estados: proliferativo, quiescente ou mortas. O fenótipo de resistência a acidez foi implementado neste modelo como uma função degrau: caso o pHe esteja abaixo de um limiar de quiescência (pHq) a célula se torna incapaz de proliferar, caso o pHe atinja um valor abaixo de um limiar de morte celular (pHd) a célula morre.

Tabela 1 Constantes usadas no modelo

Grandeza	Valor
Coeficiente de difusão de H^+	$1.08 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ (PATEL et al., 2001)
Coeficiente de difusão de O_2	$1.46 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ (NICHOLS AND FOSTER, 1994)
Coeficiente de difusão de glicose	$5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (GROEB et al., 1994)
Constante de absorção celular de O_2	$9.41 \times 10^{-2} \times [O_2] / \text{s}$ (CASCIARI et al., 1992)
Constante de absorção celular de glicose	$5 \times 10^{-5} \times [\text{Glc}] / \text{s}$ (PATEL et al., 2001)
Limiar de pH de quiescência em células normais	7.1 (SMALLBONE et al., 2007)
Limiar de pH de apoptose em células normais	6.8 (SMALLBONE et al., 2007)
Taxa de mutação de células tumorais	0.1% (SMALLBONE et al., 2007)
Produção de ATP para 100% de probabilidade de duplicação celular	$8.6 \times 10^{-6} \text{ M/s}$ (ANDERSON, 2005)
Produção mínima de ATP para sobrevivência celular	$8.6 \times 10^{-7} \text{ M/s}$ (ANDERSON, 2005)

O modelo foi implementado na ferramenta TSim (desenvolvida pelo autor desta tese, sob o escopo deste projeto de doutorado) e simulado em um supercomputador Altix SGI equipado com 512 processadores, cada um contando com uma memória de 2 GB. Usou-se a máquina virtual Java JRockit versão 1.5 da BEA por ter apresentado a melhor performance entre as máquinas virtuais Java disponibilizadas gratuitamente na Internet (as demais testadas foram Sun e IBM).

Cada simulação foi rodada em 4 processadores ao mesmo tempo, o que permitiu a simulação simultânea de diversos cenários, cada uma levando cerca de quatro horas e consumindo picos de 1GB de memória cada.

Cada uma das simulações deste trabalho poderia ter sido realizada em um computador doméstico, desde que fosse dotado de ao menos 2 GB de memória RAM e suficiente espaço em disco (cerca de 2MB para cada geração). Testes de performance em um laptop HP NX6325 com um processador duplo Turion, equipado de 2.5GB de memória consumiram cerca de 4 horas para cada simulação, os mesmos testes em um computador de mesa HP pavillion com processador celeron e 1 GB de memória consumiram cerca de 10 horas.

Resultados e Discussão

Conforme demonstrado na Figura 7, cada cenário simulado foi representado em uma visão tridimensional (distribuição espacial dos fenótipos) associada a visões bidimensionais mostrando as diferentes concentrações de metabólitos e outras espécies químicas relevantes ao nosso modelo. Cada combinação de fenótipos é representada por uma cor, que aparece tanto na visão tridimensional quanto na visão bidimensional (Figura 7a e Figura 7b).

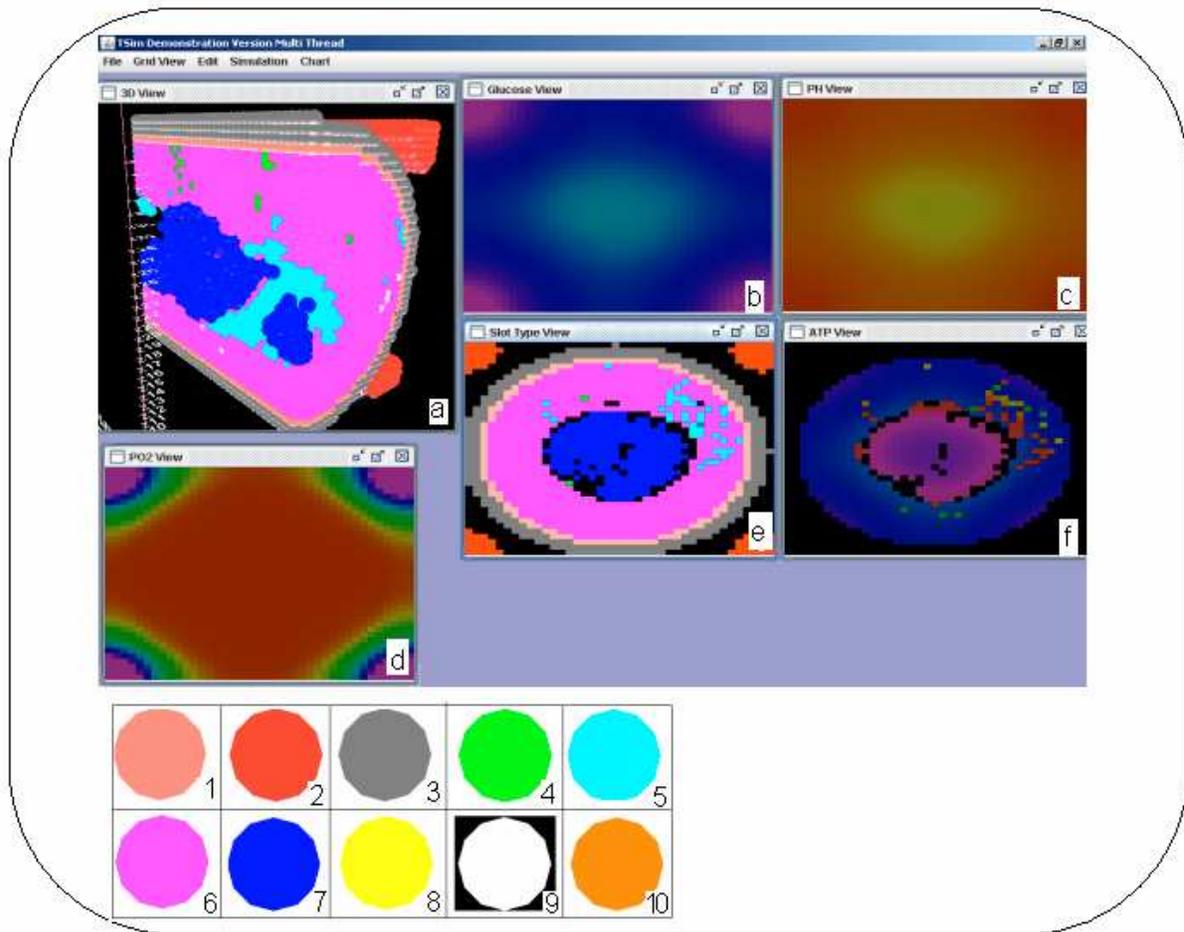


Figura 7 Janela principal do TSim mostrando uma visão 3D do duto epitelial submetido a um corte longitudinal (a). No centro acima (b), uma visão 2D de uma secção transversal do duto (fileira 19 de 40 células, contada de trás para frente da imagem 3D) mostrando a distribuição da concentração de glicose (violeta sendo a mais alta e azul claro a mais baixa). No topo à direita (c) a distribuição de acidez (menor concentração de íons H^+ próximo à vascularização e mais alta no centro do duto). Abaixo à esquerda (d) a concentração de oxigênio, e abaixo à direita (f) a produção de ATP. No centro (e) o mapeamento dos fenótipos das células nesta secção transversal (cores como na visão 3D). Da esquerda para a direita e de cima para baixo, segue a legenda das cores dos fenótipos: células epiteliais normais (1), vasos sanguíneos (2), membrana basal (3), células hiperplásicas e resistentes a acidez (4), hiperplásicas e hiperglicolíticas (5), hiperplásicas (6), hiperplásicas, hiperglicolíticas e resistentes a acidez (7), resistentes a acidez (8), hiperglicolítica (9), hiperglicolítica e resistente a acidez (10).

O método utilizado neste projeto consistiu em se criar um modelo de duto epitelial contendo apenas células epiteliais saudáveis sem nenhum dos três fenótipos considerados necessários para invasão (hiperplasia, hiperglicólise e resistência a acidez). Para cada cenário consideramos que os fenótipos, uma vez adquiridos por uma célula, teriam um valor fixo (por exemplo, para o cenário a1 o fenótipo de hiperglicólise correspondeu a um aumento de 100 vezes no fluxo glicolítico em comparação a uma célula epitelial saudável).

Ao variar de forma empírica os valores de metabolismo glicolítico e resistência a acidez, as simulações resultaram em diferentes situações, que são apresentadas na Figura 8, sob o nome de ‘mapa fenotípico’. Por apresentar grande quantidade de detalhes, a Figura 8 foi ampliada e reproduzida em anexo (Apêndice A) por fins de legibilidade.

O ‘mapa fenotípico’ da Figura 8 representa as mudanças na morfologia de casos de DCIS em função dos valores dos fenótipos adquiridos. Pode-se observar, por exemplo, que à medida que o valor do fenótipo de resistência a acidez aumenta, a vantagem seletiva deste fenótipo pode aumentar ou não, dependendo da intensidade do metabolismo glicolítico. Caso haja um aumento da vantagem seletiva (exemplo cenários a1 a a6), observa-se como consequência uma fixação da população apresentando essa característica.

Dos três fenótipos em estudo, a hiperplasia foi o único que apenas foi testado para dois valores : presença ou ausência, significando que uma célula epitelial hiperplásica pode proliferar em qualquer lugar do duto enquanto uma célula epitelial não-hiperplásica sobrevive apenas em contato com a membrana basal. Esta simplificação reduziu nosso espaço de análise de parâmetros a um plano bidimensional, caso testássemos variações no fenótipo hiperplásico, o mapa fenotípico seria um volume tridimensional. Tal volume de parâmetros requeriria mais simulações e portanto mais tempo de processamento.

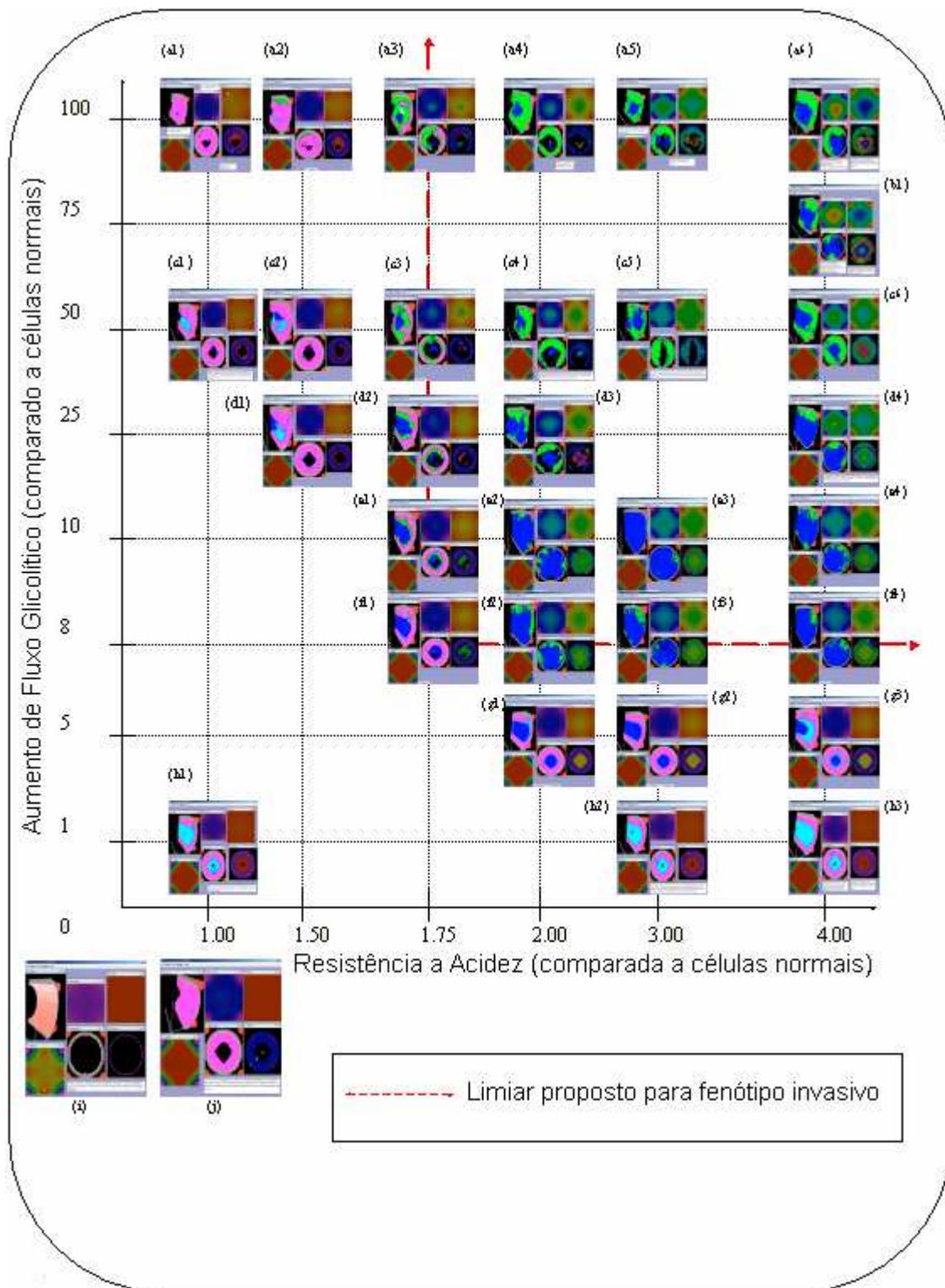


Figura 8 Mapa fenotípico do desenvolvimento de tumores em função dos valores dos fenótipos de hiperglicólise e de resistência a acidez. No eixo das ordenadas temos aumentos de até 100 vezes no fluxo glicolítico e no eixo das abscissas temos aumento de até quatro vezes da máxima concentração de H⁺ tolerada pela célula. Ver cópia ampliada em Anexo.

A análise dessa figura permitiu identificar uma zona de transição que delimita duas regiões: a primeira, composta por tumores incapazes de destruir a camada de células epiteliais e invadir a membrana basal, e uma segunda região, com tumores invasivos. Este limiar corresponde a dois fenótipos:

1. Aumento do metabolismo de glicose em 9 vezes a fim de gerar acidez o suficiente para causar morte das células epiteliais em contato com a membrana basal;
2. Limiar de quiescência em pH de 6.7 e de morte celular em pH de 6.1;

O aumento de metabolismo glicolítico de 100% (valor '1' no eixo vertical da Figura 8) já seria suficiente para que células tumorais sobrevivessem no lúmen do duto epitelial aqui simulado. Além disso, a produção de ácido láctico decorrente deste aumento metabólico também resultaria numa mudança de pH que está dentro do limite de tolerância das células normais. Estas observações indicam que tumores poderiam colonizar dutos mamários sem necessidade de adaptações para resistência a acidez. Entretanto, estes tumores ficariam confinados, pois a acidez produzida não se mostrou capaz de causar a morte das células epiteliais que recobrem o interior do duto.

Um aumento do metabolismo glicolítico se faz necessário para que a acidez produzida seja suficiente para afetar o epitélio que recobre o interior do duto, propiciando a invasividade tumoral. Em contrapartida, essa situação obriga as células tumorais a desenvolverem uma maior resistência a acidez, dessa forma, a evolução do tumor invasivo irá depender de mudanças nessas duas direções, metabolismo glicolítico e resistência a acidez, até que o conjunto mínimo de fenótipos invasivos é atingido.

Um segundo aspecto considerado neste estudo, foi a proporção da população tumoral que estava em estado proliferativo ou quiescente ao final da simulação. Estes dados são apresentados na Figura 9. Verificou-se que em cenários em que o metabolismo de glicose é muito alto, a acidez não somente causa a morte das células epiteliais que revestem o interior do duto, como também causa a parada do ciclo celular das células do próprio tumor. Como exemplo temos os cenários a5, a6, b1 e c5 (Figura 8 e Figura 9).

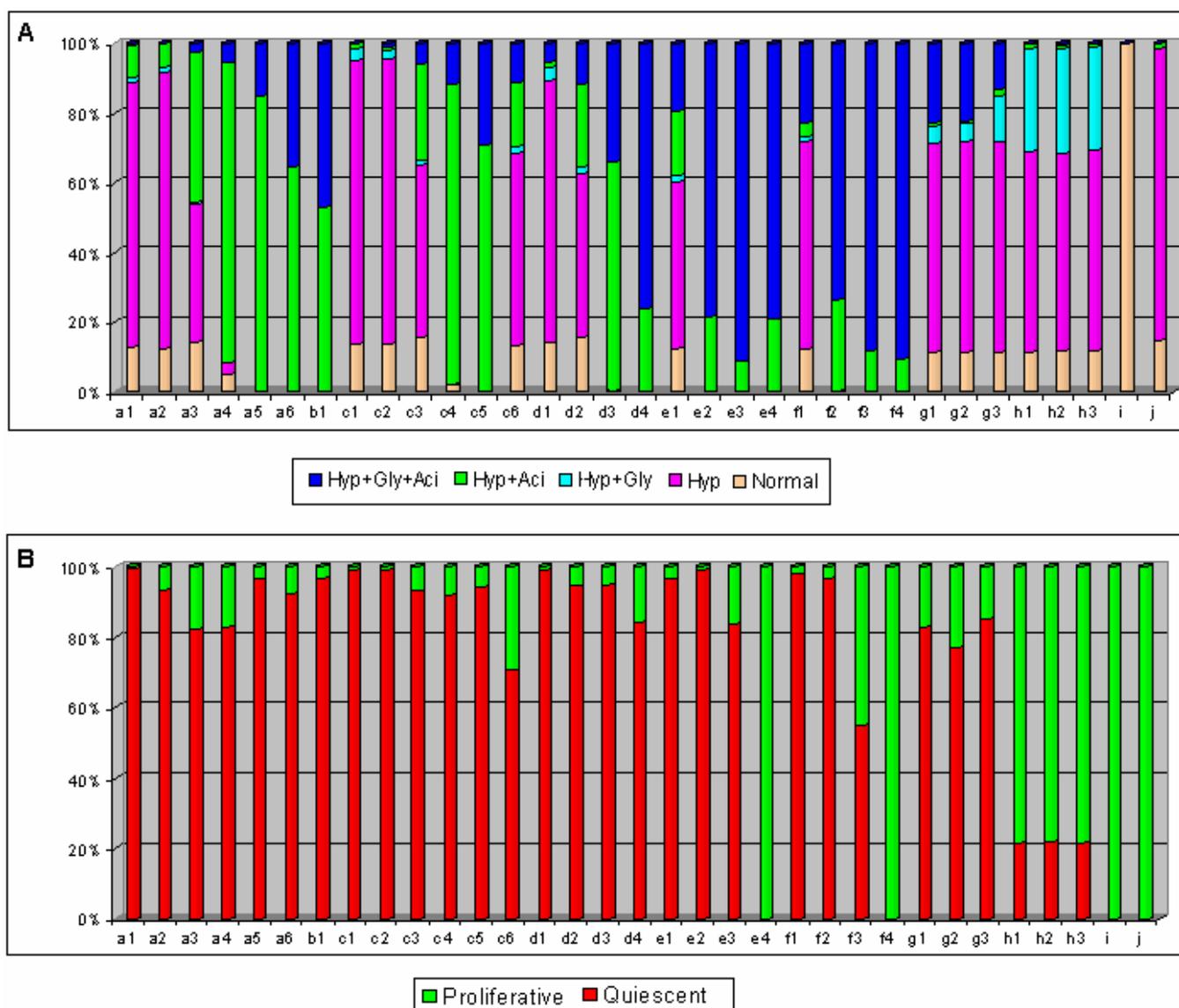


Figura 9 Distribuição da população em combinações de fenótipos distintos (Hyp, hiperplasia; Gly, hiperglicólise; Aci, resistência à acidez), assim como estado proliferativo ou quiescente. Cada coluna corresponde a uma dupla letra e número, que se encontra no mapa fenotípico da Figura 8.

Existe uma região no ‘mapa fenotípico’ em que os tumores simulados se desenvolvem com uma maior quantidade de células invasivas (apresentando os três fenótipos invasivos: hiperplasia, hiperglicólise e resistência a acidez) e com um máximo de células em estado proliferativo (e4 e f4, Figura 9). Esta ‘região fenotípica’ é a que se encontra próxima ao limiar de hiperglicólise (aumento de cerca de nove vezes no metabolismo glicolítico) e tem um valor máximo de resistência a acidez equivalente a pH de 6.7 para quiescência e 7.1 para morte celular.

Observou-se que, em situações em que o fenótipo hiperglicolítico atinge valores altos (acima de 20 vezes o valor de uma célula normal), desenvolve-se uma dinâmica de cooperação entre duas subpopulações, a primeira com os três fenótipos, por nós denominada de ‘trifenotípica’ (hiperplasia, hiperglicólise e resistência a acidez, em azul) e a segunda com os fenótipos de hiperplasia e de resistência a acidez (em verde). Nestes casos, a população trifenotípica se localiza na região central do tumor, em estado de quiescência, cercada por uma região sem células e em seguida pela população bifenotípica proliferativa que se serve da acidez gerada pelas células no interior do tumor, para invadir o restante do tecido na periferia do duto (cenários a4, a5, a6, c4, c5, c6, d3, ver também Figura 10).

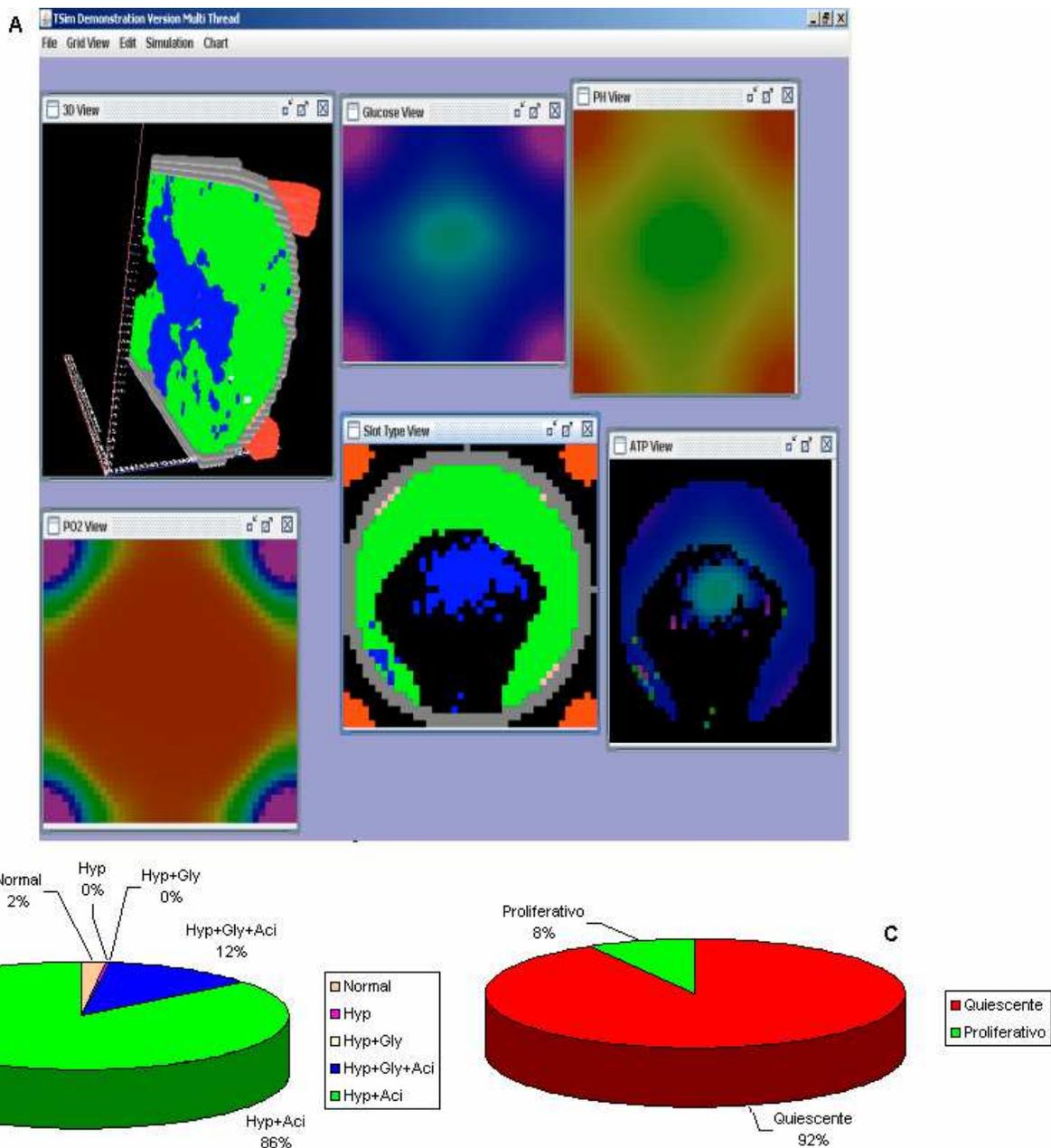


Figura 10 Detalhe referente ao cenário simulado c4. No topo (A), a visão do software TSim mostra a distribuição populacional em que células trifenotípicas (em azul) se encontram no centro do duto (região com maior acidez), enquanto que células com fenótipo de hiperplasia e resistência a acidez mas sem hiperglicólise (em verde), se localizam na parte mais externa. A maior parte das células no interior do duto estão quiescentes (92%), apenas uma fração das células (as mais próximas da membrana basal) está em estado proliferativo. Este exemplo mostra a interação de duas populações (trifenotípica e bifenotípica) cooperando para a invasão, a primeira gera acidez enquanto que a segunda prolifera e ocupa o espaço deixado por células sem resistência a acidez.

Análise de Sensibilidade das Simulações

A fim de estimar até que ponto os resultados das simulações dependem das estimativas e simplificações feitas neste modelo, assim como, para estimar o efeito de fatores aleatórios surgidos durante o desenvolvimento dos tumores dentro do duto, simulamos quatro cenários de ‘metabolismo’ versus ‘resistência a acidez’ ver abaixo, mas usando valores alternativos para o : (i) pH no sangue (8.4, 8.0 e 7.0), (ii) tamanho do duto epitelial, (iii) densidade da vascularização. Para avaliar os eventos estocásticos, simplesmente repetimos a mesma simulação uma segunda vez, usando as condições do modelo original. A distribuição fenotípica da população obtida foi comparada com os valores obtidos nas simulações originais (Figura 8 e Figura 9).

Os cenários usados para este teste foram os seguintes :

- c3 : Aumento em 50 vezes no fluxo glicolítico e em 1.75 vezes na concentração externa de H^+ necessária para causar quiescência ou morte induzida por acidez ;
- f4 : Aumento em 8 vezes no fluxo glicolítico e em 4 vezes no limiar de resistência a acidez ;
- f1 : Aumento em 8 vezes no fluxo glicolítico e em 1.75 vezes no limiar de acidez ;
- f2 : Aumento em 8 vezes no fluxo glicolítico e em 2 vezes no limiar de resistência a acidez ;

Estes quatro cenários foram escolhidos por se encontrarem na fronteira do espaço de parâmetros que distingue um DCIS invasivo e de um DCIS ‘contido’. Espera-se que os ‘valores limiares’ sejam justamente aqueles mais afetados em condições de simulação diversas. Os resultados deste trabalho de validação encontram-se nas Figura 11 e Figura 12.

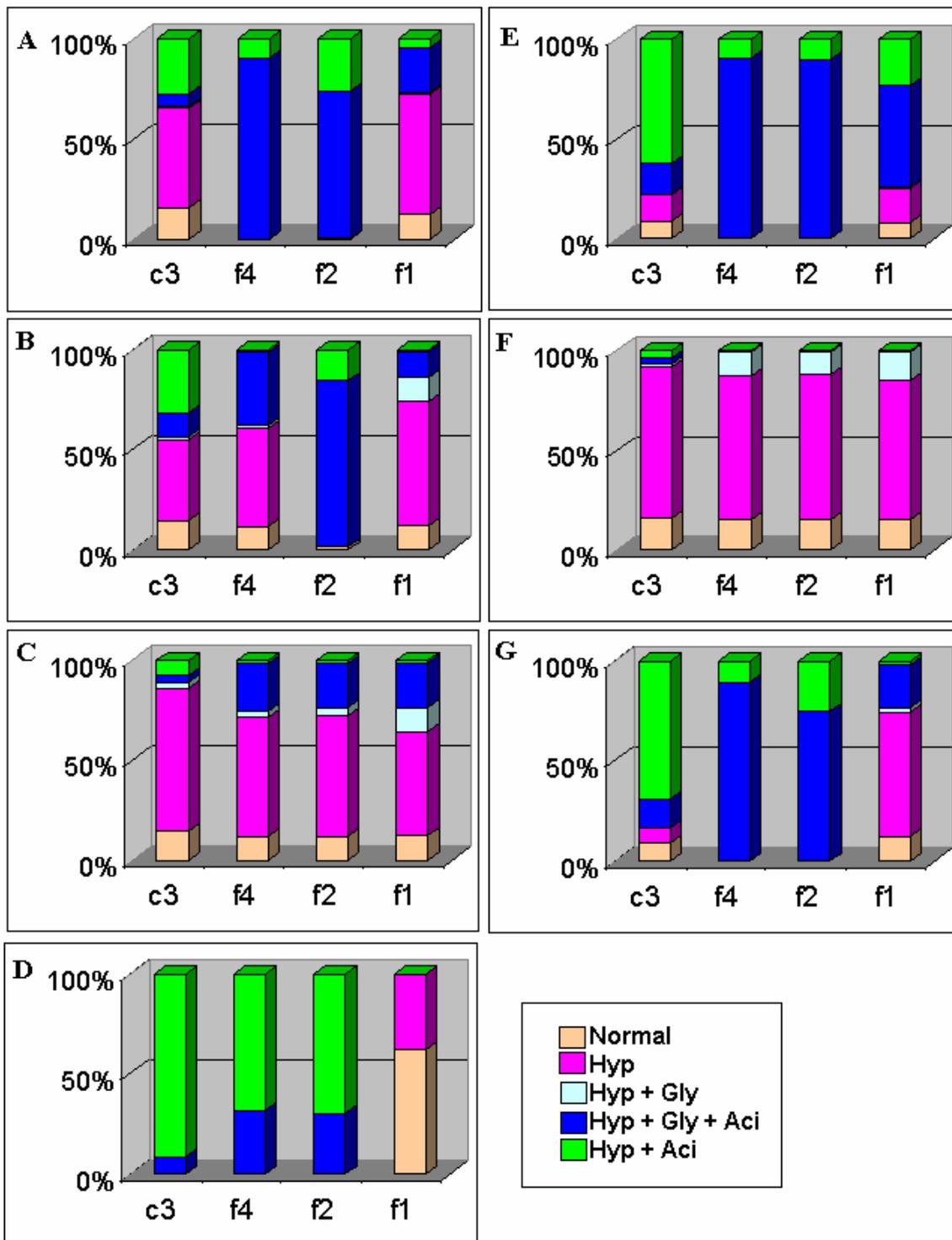


Figura 11 Distribuição fenotípica da população para quatro cenários distintos (c3, f4, f2 e f1, vide Figura 8 e Figura 9), segundo os resultados das simulações originais (A), e modificadas para pH no sangue de 8.0 (B), 8.4 (C), 7.0 (D), para uma vascularização reduzida à metade (E), para um duto com diâmetro 10% menor (F). Uma segunda simulação com os mesmos parâmetros da original (G), foi efetuada para se avaliar o componente estocástico no resultado das simulações. Os fenótipos na legenda são Hyp (hiperplasia), Gly (hiperglicólise) e Aci (resistência a acidez).

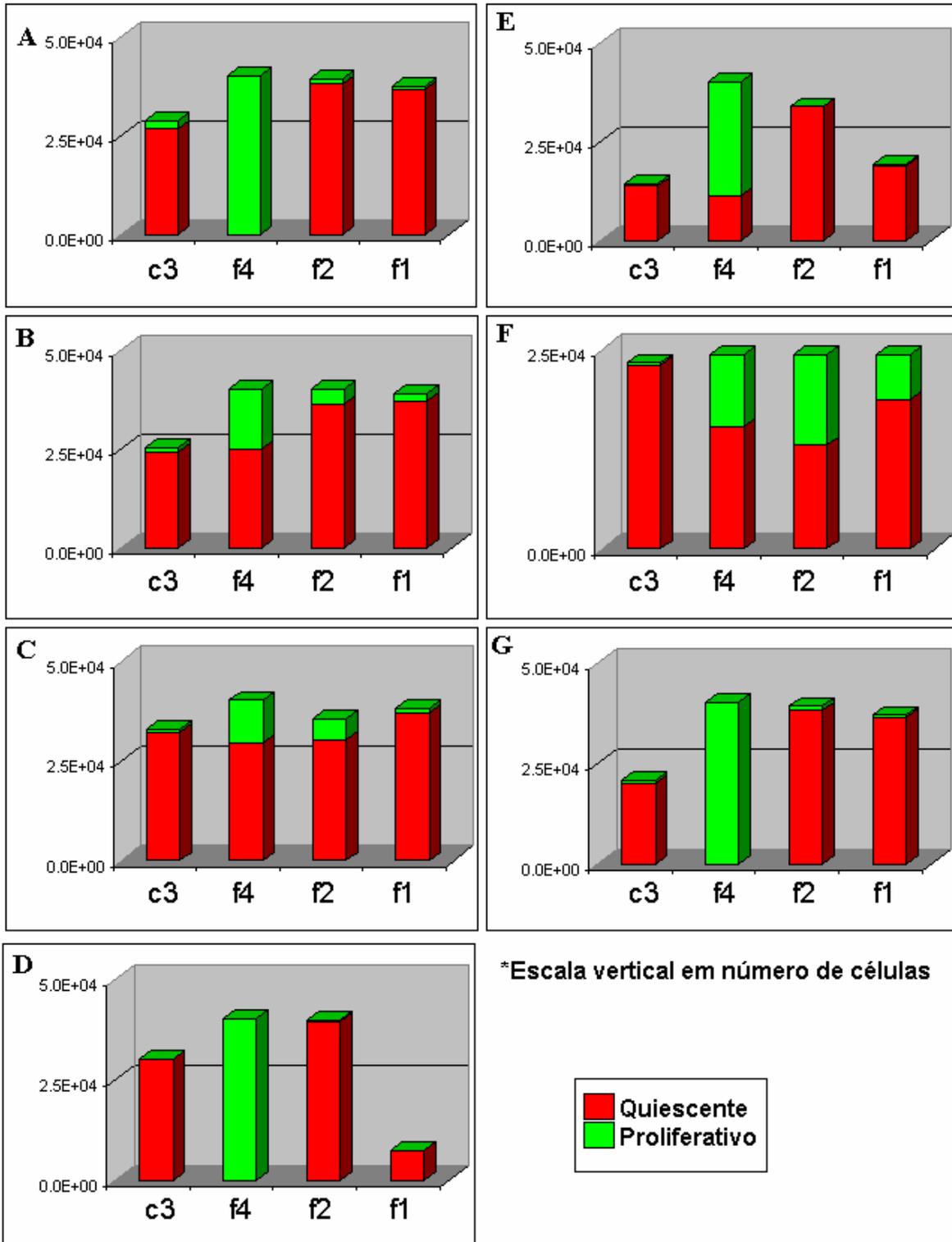


Figura 12 Diagrama complementar à Figura 11, com eixo vertical informando o número de células dentro do duto. Esta figura mostra a proporção de células proliferativas e quiescentes na população total. Cenários de simulação (c3, f4, f2 e f1) e análise de sensibilidade (A a G) de acordo com a Figura 11.

As simulações foram testadas para três pHs diferentes: 7.0, 8.0 e 8.4, o primeiro sendo mais ácido que o usado no modelo original e os dois últimos mais alcalinos. Nas simulações com as condições originais, dois dos cenários (f4 e f2) resultaram em invasão tumoral enquanto que nos outros dois (c3 e f1), a camada de células epiteliais permaneceu intocada (Figura 11A). O pH alcalino de 8.4 foi capaz de preservar a camada de células epiteliais nos quatro cenários simulados (Figura 11C), enquanto que o pH de 8.0 manteve o tumor ‘confinado’ em três dos quatro cenários (c3, f4 e f1, Figura 11B). O pH de 7.0 resultou em perda da camada de células epiteliais em três dos quatro cenários (c3, f4 e f2, Figura 11D), sendo que a totalidade das células dentro do duto, nestes três cenários de invasão, resultou ser resistente à acidez.

Estes resultados mostram que o modelo é sensível ao valor de pH no sangue. Importante lembrar, entretanto que o pH do sangue arterial é mantido próximo a 7.4 através de tampões e da respiração, portanto é aceitável supor que o valor do pH usado nas simulações originais seja realista. Por outro lado, o resultado obtido leva a uma conclusão importante:

- Terapias que busquem afetar o pH do sangue de pacientes de forma crônica poderiam ter resultados positivos no tratamento contra o câncer;

Uma outra variável testada foi a influência da vascularização do tecido em volta do duto epitelial. Testou-se o mesmo modelo, mas com dois vasos sanguíneos, ao invés dos quatro que existiam no modelo original, posicionados em cantos opostos do espaço de simulação como Figura 13.

O resultado foi uma diminuição da população de células desprovidas da resistência à acidez (Figura 11E, Figura 12E e Figura 13). Mudanças na vascularização levam a mudanças na difusão da acidez produzida pelo tumor, levando assim a uma maior probabilidade de surgimento de células resistentes à acidez e portanto mais invasivas. Por outro lado, nos quatro casos houve uma redução na população total de células, tanto as quiescentes quanto as proliferativas (Figura 12E, comparar cenário f1 na Figura 8 e Figura 13). Em dois dos cenários em que os valores de metabolismo glicolítico e de resistência à acidez não propiciam o surgimento de tumores que danificam a camada de células epiteliais (Figura 11A, cenários c3 e f1) percebeu-se uma erosão maior do epitélio do duto ao se reduzir a vascularização (Figura 11E, cenários c3 e f1 e Figura 13). Este resultado sugere que regiões menos vascularizadas apresentariam uma maior propensão a desenvolvimento de DCIS invasivos.

Terapias anti-angiogênicas têm sido usadas a fim de se reduzir o crescimento tumoral, privando o tumor de nutrientes e oxigênio, assim como reduzindo a probabilidade de células do tumor se desprenderem e entrarem na corrente sanguínea podendo iniciar metástases (FOLKMAN, 2003). Neste estudo, observou-se que uma redução da vascularização levaria a um efeito contrário, ou seja, um aumento da invasividade do tumor. É importante observar, porém, que terapias anti-angiogênicas são aplicadas a tumores grandes o bastante para serem detectados, ou seja, tumores em um estágio do desenvolvimento posterior ao estágio simulado nesta tese. Mesmo assim, embora os resultados devam ser interpretados com muita cautela, nossas simulações parecem sugerir que a terapia anti-angiogênica poderia ter efeitos indesejados sobre o desenvolvimento de micrometástases já existentes, contribuindo para a progressão de um tipo de célula tumoral mais invasiva. .

Este exemplo demonstra como, dependendo do estágio de desenvolvimento de um tumor, as barreiras ambientais contra o seu crescimento serão diferentes (Figura 14) e, portanto, o tratamento em cada estágio de desenvolvimento tumoral deve levar em consideração quais os fatores que inibem e quais levariam a um fortalecimento do processo de carcinogênese (GATENBY e GILLIES, 2008).

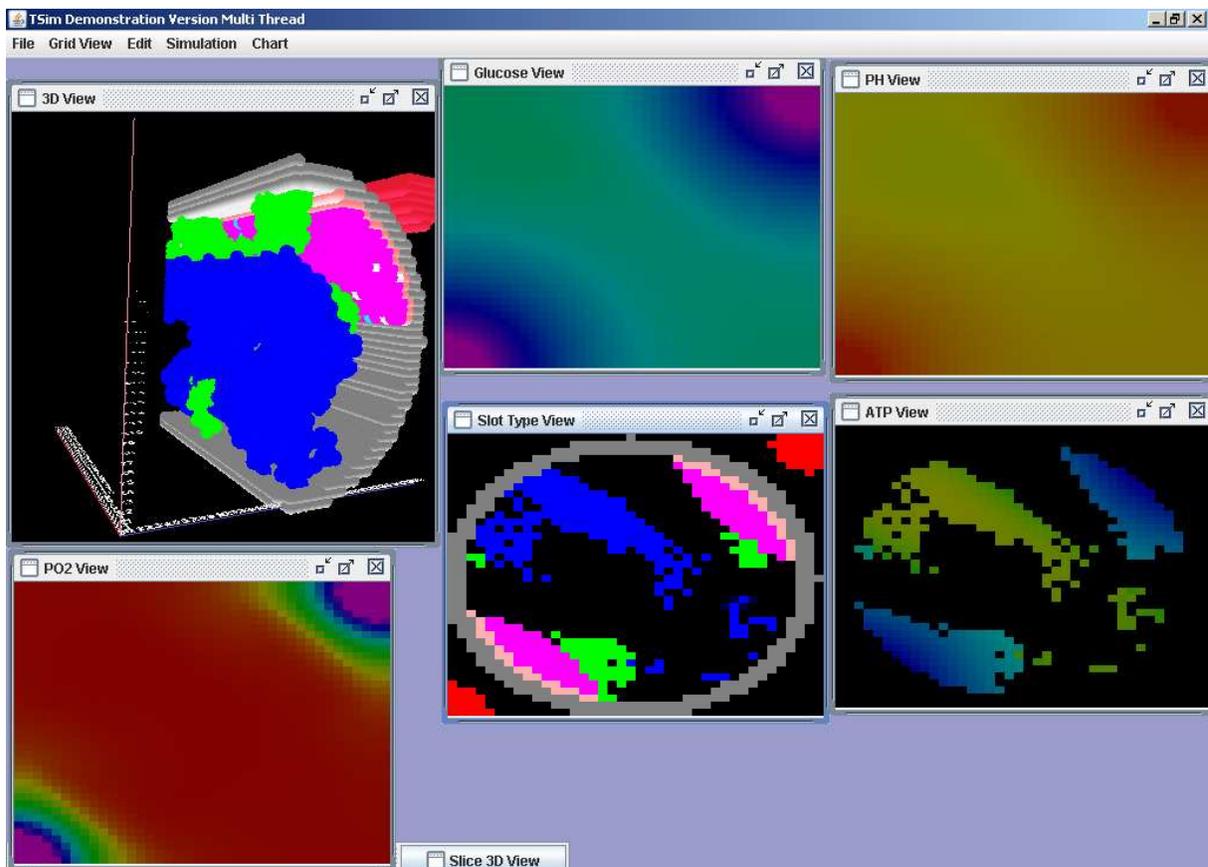


Figura 13 Resultado de simulação com dois vasos sanguíneos ao invés de quatro, como nas simulações originais, correspondendo ao cenário f1. Pode-se observar uma diminuição na quantidade de células tumorais no interior do duto em razão da redução da capacidade da vasculatura de prover oxigênio ao meio - levando a um aumento do fluxo metabólico na via anaeróbica da glicólise e portanto ao aumento da produção de ácido lático- e de retirar o excesso de acidez.

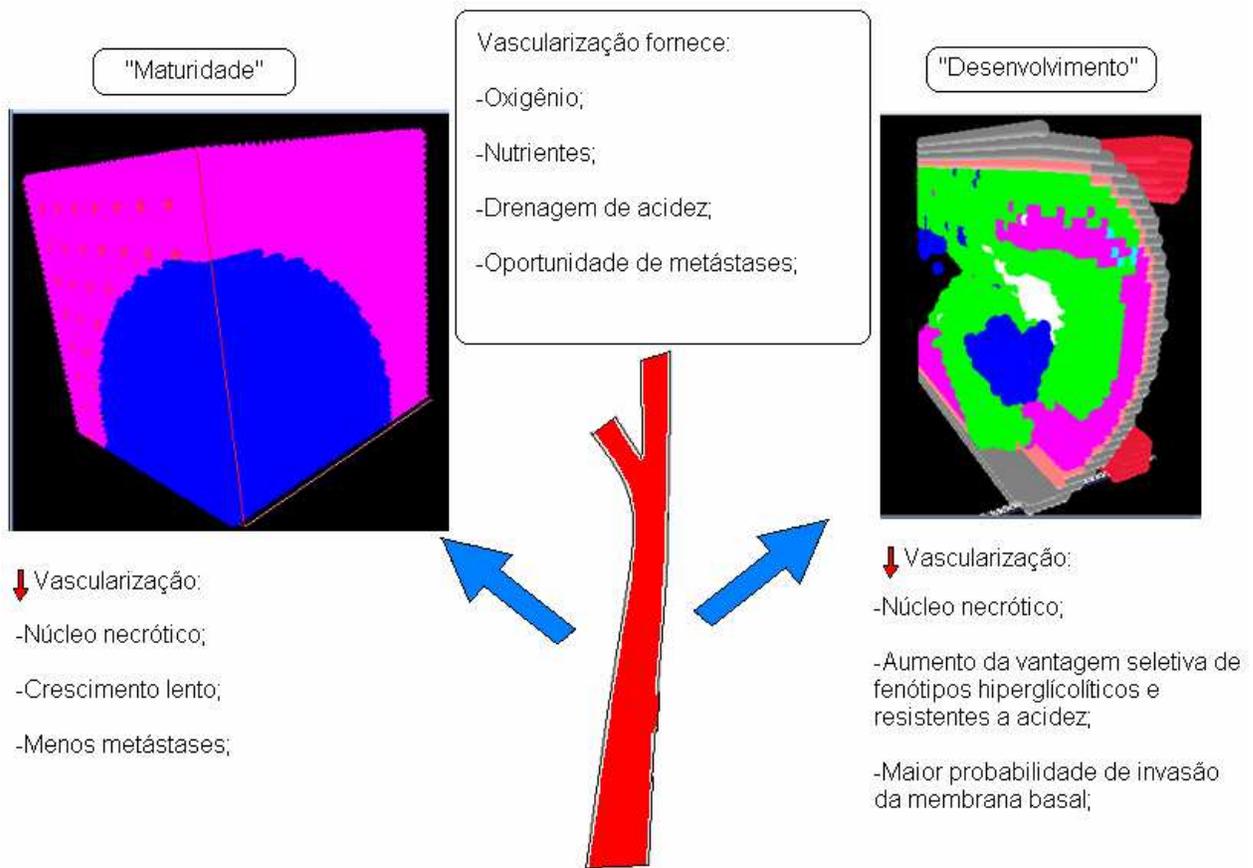


Figura 14 Vasos sangüíneos têm a mesma função em tecidos saudável ou tumores: prover oxigênio e nutrientes, e remover toxinas e subprodutos do metabolismo celular. A redução da vascularização, por outro lado, tem efeitos diferentes em um tumor maduro ou um tumor se desenvolvendo em um duto epitelial. No primeiro caso, a redução da disponibilidade de vasos sangüíneos leva a uma redução da disponibilidade energética do tumor – levando-o a crescer mais lentamente – além de reduzir a possibilidade de células tumorais se desprenderem do tumor original e invadirem a corrente sangüínea (redução da probabilidade de intravasamento). Em tumores em desenvolvimento em dutos epiteliais, a redução da vascularização leva à seleção de fenótipos mais agressivos na população, gerando assim um tumor mais invasivo.

Finalmente, testou-se um modelo com um duto 10% mais estreito que o modelo original, a fim de se determinar se a redução do lúmen teria efeitos no desenvolvimento tumoral. Em todos os casos testados, a camada epitelial saudável é preservada, apesar da presença de células tumorais preenchendo o interior do duto (Figura 11F). Esse efeito pode ser devido à redução da vantagem seletiva de células trifenótípicas no lúmen do duto. Neste cenário, com duto menor, há maior disponibilidade de oxigênio para as células no centro do duto o que leva a uma menor pressão seletiva por hiperglicólise, e conseqüentemente menor produção de ácido láctico oriundo do metabolismo da glicose pela via anaeróbica.

O efeito de eventos estocásticos que podem resultar de variações na localização das células que sofrem mutação foi avaliado repetindo-se uma segunda vez as simulações com os mesmos

parâmetros das originais (Figura 11G e Figura 12G). Para três dos quatro cenários (f4, f2 e f1), a diferença de distribuição populacional em relação ao modelo original foi menor que 10%, porém, para o quarto cenário (c3), observou-se um aumento considerável do núcleo necrótico e redução da população de células não-resistentes à acidez. Esse resultado pode ser devido a uma maior sensibilidade desse cenário às condições iniciais do desenvolvimento tumoral, já que ele se encontra mais longe das condições fisiológicas em relação aos demais cenários simulados (aumento de 51 vezes no metabolismo glicolítico em relação a 9 vezes dos demais).

Estes resultados indicam que os cenários simulados com valores de metabolismo glicolítico e resistência a acidez mais próximos dos valores fisiológicos de células saudáveis são os menos sensíveis aos artificios impostos pela simplificação do modelo e talvez sejam os mais verossímeis.

Comparações com Amostras Histológicas de DCIS

Finalmente, cabe ressaltar que alguns dos resultados das simulações parecem corresponder às diferentes morfologias de DCIS encontradas na literatura clínica. Em alguns casos, observamos que os tumores desenvolviam núcleos necróticos devido à acidez gerada pelo mesmo. Esses núcleos podem estar vazios ou conter uma pequena quantidade de células trifenotípicas em estado quiescente. Este cenário é similar à classificação histopatológica comedo, que está associada a resistência a quimioterapia e invasão (Figura 15).

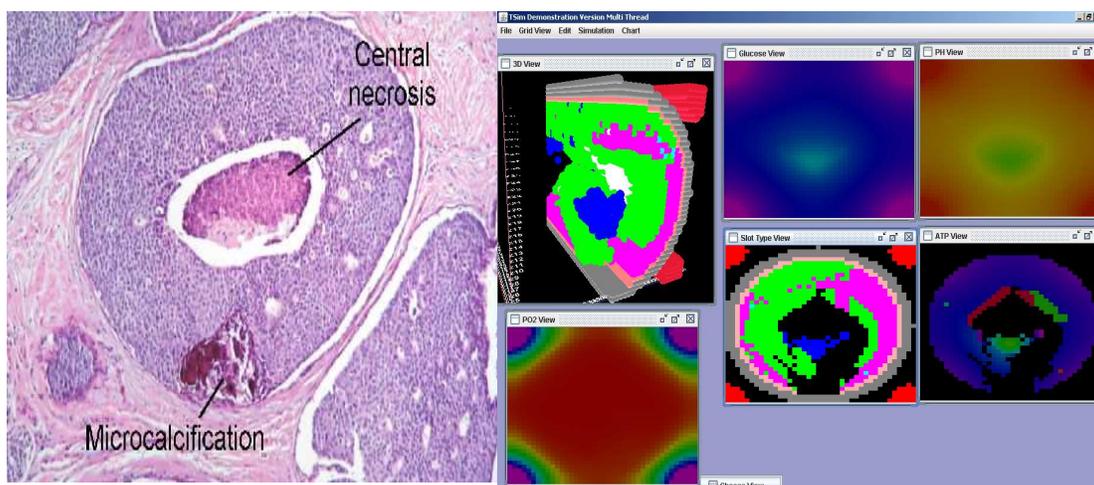


Figura 15 À esquerda, amostra de DCIS comedo, observar a grossa parede de células tumorais preenchendo a periferia do duto, mas deixando o centro deste ocupado por um núcleo necrótico composto de células mortas e quiescentes (imagem retirada do site breastpathology.info). À direita, uma simulação (cenário a3) mostrando uma morfologia semelhante, em que a população de células viáveis e proliferativas se encontra na parte mais exterior do duto, enquanto que uma população de células quiescentes produz acidez suficiente para penetrar o epitélio.

Em casos em que o fenótipo hiperglicolítico tem um valor moderado, ou é contrabalançado por um aumento equivalente na resistência a acidez, o tumor resultante da simulação preenche totalmente o duto e não contém núcleo necrótico. Dependendo do valor da hiperglicólise, a distribuição fenotípica da população pode ser diferente, com células trifenotípicas dividindo espaço com células resistentes à acidez, mas desprovidas de hiperglicólise. Estes casos são semelhantes aos DCIS sólido (Figura 16).

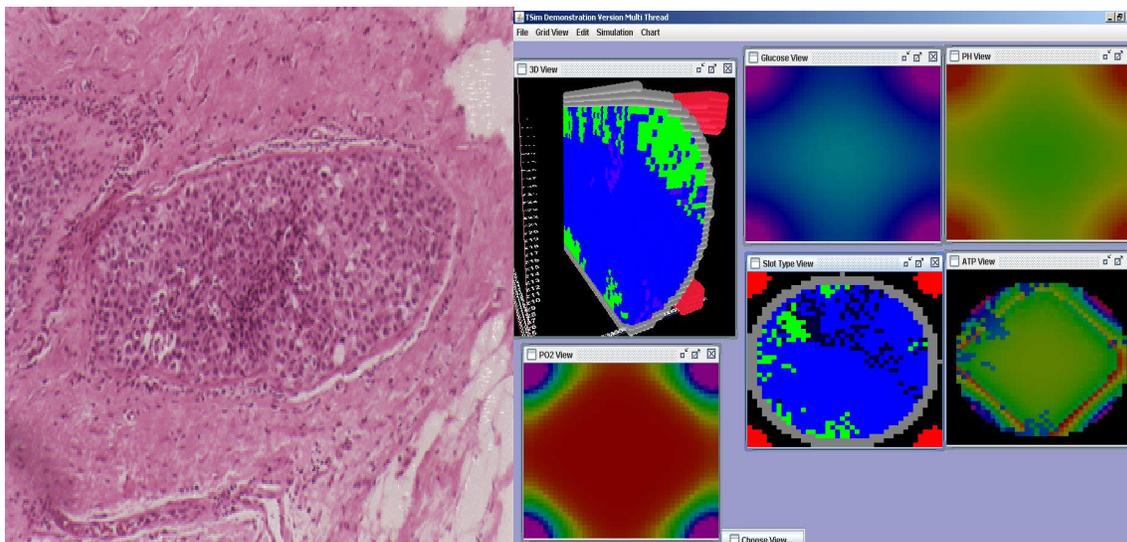


Figura 16 À esquerda, amostra de DCIS sólido. Nota-se que o ducto está totalmente preenchido e não existe núcleo necrótico (imagem retirada do site breastpathology.info). À direita, resultado da simulação do cenário f3, correspondendo a células tumorais com alta resistência a acidez e moderado aumento do metabolismo anaeróbico da glicose.

Não encontramos uma correspondência exata para a morfologia DCIS cribiforme (Figura 17), talvez porque o desenvolvimento desses tumores depende de outros mecanismos não considerados neste modelo, como por exemplo, pressão de flúidos e migração de células, ou mesmo repolarização das células tumorais e criação de novos dutos no interior do ducto original. Apesar disso, em algumas condições, pudemos observar a formação de múltiplas regiões de necrose como resultado de uma distribuição heterogênea de pH dentro do ducto epitelial em função de um espalhamento da população hiperglicolítica através do tumor.

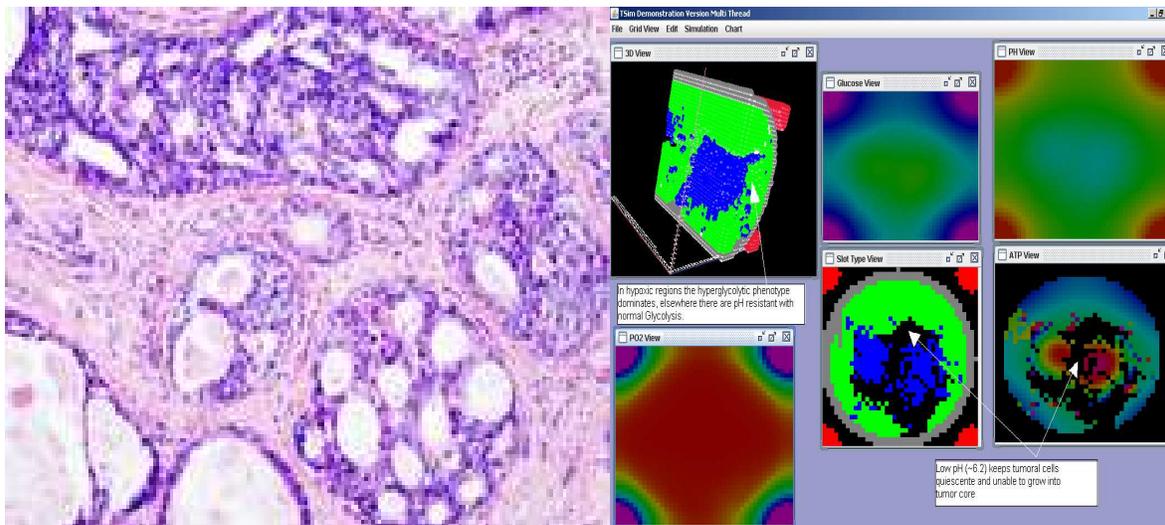


Figura 17 À esquerda, amostra de DCIS cribriforme (imagem retirada do site breastpathology.info), exibindo a morfologia com diversos lumens menores no interior do duto epitelial. Estes lumens são rodeados por células tumorais que podem estar polarizadas ou não. À direita o resultado de uma simulação (a5), com fenótipo de hiperglicólise cerca de 100 vezes maior que uma célula normal e resistência à acidez alta. O resultado final é uma população mista de células tri e bifenotípicas preenchendo o duto epitelial, mas com regiões sem células espalhadas pelo volume, de maneira semelhante ao DCIS cribriforme, mas faltando a suavidade de contorno visto na amostra histológica.

Amostras de DCIS apresentando a morfologia micropapilar têm franjas de células tumorais na periferia do duto e o lúmen está em grande parte desocupado (Figura 18). Nos modelos simulados, essa morfologia apareceu em cenários com valores significativos de hiperglicólise (mais que 25 vezes de aumento) e com resistência a acidez moderada (cerca de duas vezes se comparada a uma célula normal). Os cenários d3 e c4 (Figura 8) são exemplos de simulações que se assemelham a essa morfologia. A dinâmica de formação desse tipo de tumor (segundo dados da nossa simulação) depende de uma interação entre a população de células trifenotípicas, que gera acidez o bastante para causar a morte das células desprovidas de resistência a acidez, enquanto que a população de células resistentes a acidez mas não hiperglicolíticas prolifera na periferia do duto.

Interessante notar como a simulação computacional dos DICS permitiu levantar hipóteses sobre a ‘história natural’ dos tumores. A classificação morfológica dos DICS pode estar associada ao prognóstico dos pacientes (JAFFER, 2002). A atual classificação morfológica, porém, não tem nada a dizer sobre a ‘história natural’ desses tumores. Acreditamos que os nossos resultados abrem novas possibilidades de classificação para este tipo de tumores. Antes, porém, seria preciso confirmar os resultados aqui apresentados através da imunofenotipagem dos

diferentes tipos morfológicos de DCIS com marcadores para os fenótipos propostos por nosso modelo, como GLUT1 (hiperglicolítico), NHE (resistência a acidez) ou HIF1 (hipóxia). Se os resultados da imunofenotipagem estiverem de acordo com a morfologia celular obtida nas simulações *in silico*, então seria possível saber um pouco mais sobre a ‘história’ natural dos diferentes tipos morfológicos, incluindo a composição celular, o que futuramente poderia ser útil como auxílio para a definição do melhor tratamento.

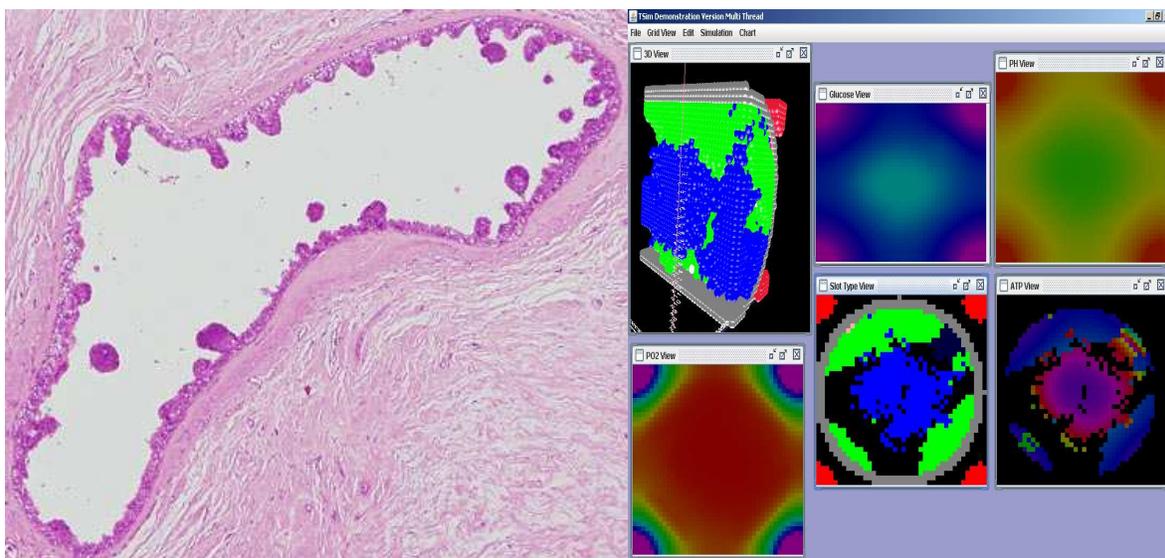


Figura 18 À esquerda um exemplo de DCIS com morfologia micropapilar (imagem retirada do site breastpathology.info) exibindo uma população de células tumorais concentrada na parte externa do interior do ducto epitelial. À direita o resultado de simulações que apresentam morfologia semelhante, porém com a diferença de que na simulação se faz necessária a presença de células trifenotípicas no interior do ducto.

"The most perfidious way of harming a cause consists of defending it deliberately with faulty arguments".

Friedrich Nietzsche

4

The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral pHe and acid-mediated invasion

Authors: A.S. Silva¹, J.A. Yunes¹, R. J. Gillies², R. A. Gatenby²

¹Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil

²Departments of Radiology and Integrative Mathematical Oncology, Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, USA

(Submitted for Cancer Research)

Abstract:

A number of studies have demonstrated that the extracellular pH (pHe) in cancers is typically lower than in normal tissue and that an acidic pHe promotes invasive tumor growth in primary and metastatic cancers. Here we investigate the hypothesis that increased systemic concentrations of pH buffers can reduce intra- and peri-tumoral acidosis and, as a result, inhibit malignant growth. Computer simulations are used to quantify the ability of systemic pH buffers to increase the acidic pHe of tumors *in vivo* and investigate the chemical specifications of an optimal buffer for such purpose. We demonstrate that increased serum concentrations of the sodium bicarbonate (NaHCO₃) can be achieved by ingesting amounts that have been used in published clinical trials. Furthermore, we find the consequent reduction of tumor acid concentrations can significantly reduce tumor growth and invasion without altering the pH of blood or normal tissues. The simulations also demonstrate the critical parameter governing buffer effectiveness is its pKa.

This indicates that NaHCO_3 , with a pKa of 6.1, is not an ideal intratumoral buffer and that greater intratumoral pHe changes could be obtained using a buffer with a pKa around 7. The simulations support the hypothesis that systemic pH buffers can be used to increase the tumor pHe and inhibit tumor invasion.

Introduction:

A number of studies using pH-sensitive MRI contrast agents, microelectrodes, and MR spectroscopy with hyperpolarized C^{13} have consistently demonstrated that pHe of tumors is significantly lower (6.6-7.0) than healthy tissues (7.2 –7.4) (1-4). This acidity is primarily due to: **1.** anaerobic glycolysis in tumor regions subjected to short- or long-term hypoxia as a result of poorly organized vasculature with diminished, chaotic blood flow and **2.** aerobic glycolysis (the Warburg effect) - a common cancer phenotypic property in which the glycolytic metabolic pathways are used even in the presence of oxygen (5).

An acidic pHe induces pleiotropic changes in tumor cells. In many tumor types, acute or chronic incubation in a low pH microenvironment increases invasiveness both *in vitro* and *in vivo* (6). Hill and Rofstad (7-9) have shown that lowering culture pH to 6.7 resulted in a 4-fold increase in the number of *in vivo* metastases of the treated cells compared to controls, following tail vein injection. In addition, a variety of cancer cell populations, when exposed to an acidic environment, have been shown to increase expression of Interleukin-8 (IL-8), Vascular-Endothelial Growth Factor (VEGF), Carbonic Anhydrase IX (CAIX), Lactate Dehydrogenase (LDH), Cathepsin B, and matrix metalloproteinases (MMP-) -2 and -9 (10-13), all of which are associated with increased tumor growth and invasion *in-vivo*. Interestingly, tumor cells are typically able to maintain high proliferation rates even in an acidic environment (14). An acidic extracellular pH, on the other hand, induces significant toxicity in normal cells by reducing proliferation (14) and promoting apoptosis via a p53-dependent pathway (15) initiated by increasing caspase activity (16). In addition, an acidic pHe in normal tissues increases degradation of the ECM due to the production and release of proteolytic enzymes (10), promotes angiogenesis through release of VEGF (12), and limits immune response to tumor antigens (17).

These findings have been synthesized into the acid-mediated tumor invasion model that proposes that intratumoral acidosis result in flow of H^+ ions along concentration gradients into normal tissue adjacent to the tumor. This produces a peritumoral ring of dead and dying cells and degraded ECM into which the still viable malignant cells invade (19). The model is supported by experimental evidence demonstrating a peritumoral acid gradient associated with normal cell apoptosis and ECM degradation (19). Indirect support for this model is seen in a number of clinical studies including: 1. observations that increased glucose uptake on FDG-PET scans (and, therefore, increased acid production) is observed in the transition from *in-situ* to invasive cancer (20, 21) and that a higher level of uptake in many cancer types confers poor prognosis (22-24). 2. Increased intratumoral lactate concentrations is associated with a poor prognosis (25, 26) 3. Increased expression of proteins that are upregulated by acidic pH (including IL-8, cathepsin B, Lactate dehydrogenase, and Carbonic Anhydrase IX) (10-14) is associated with poor prognosis (27- 31).

If intratumoral acidosis facilitates invasion, a reasonable extension of the acid-mediated invasion model leads to the hypothesis that reduction of intra- and peri-tumoral acid concentrations may inhibit malignant tumor growth. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) is one of many physiologic buffers used to control the pH in blood and tissues. Excess H^+ combines with bicarbonate and generates water and CO_2 . Conversely, in environments where CO_2 is produced in excess, there is production of bicarbonate and free protons (figure 1) from carbon dioxide hydration. Previous studies (32, 33) showed that the levels of CO_2 in tumors are higher, and concentrations of bicarbonate lower than in blood or in healthy tissues.

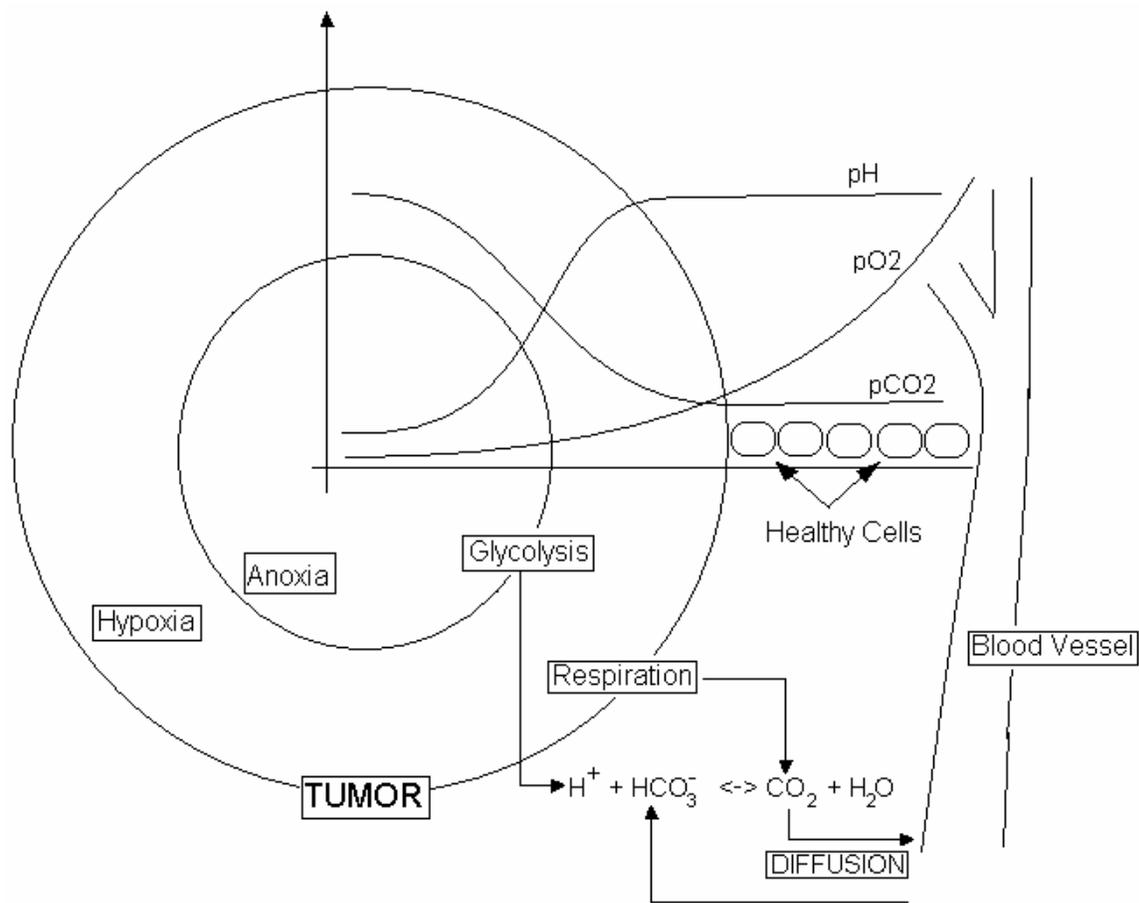


Figure 1 Tumor microenvironment. An avascular tumor with regions of hypoxia and anoxia produces both carbon dioxide from respiration and protons from anaerobic glycolysis. Bicarbonate buffers the pHe in the tissue by converting protons into water and carbon dioxide, the latter diffuses back to blood vessels and is expelled in the lungs.

In this article we examine the effects of increased serum $NaHCO_3$ concentrations on intratumoral pHe and consequent changes in simulations of tumor growth. We then explore the chemical specifications of hypothetical buffers to determine characteristics of an optimal buffer that may be more efficient than bicarbonate in inhibiting cancer invasion. The critical parameters tested are the dissociation constant (pKa) and the diffusion coefficient.

Many computer and mathematical models have been created to represent the growth and interaction of tumors and healthy tissue (34-36) but none have considered the effects of buffers such as bicarbonate and phosphates.

In this work we used a 3-D computer model that represents a tumor as a spheroid with a diameter of 60 cells, embedded in a healthy vascularized tissue represented as a cubic volume 80

cells wide (figure 2). This model was analyzed using a tool developed for tissue simulation (TSim, www.i-genics.com) that calculates metabolic reactions, diffusion of species, buffering effect as well as cell duplication and apoptosis. The major advantages of using such a representation of the tumor-host environment are that (a) the actual dynamics of the tumor-host interactions are better illustrated by a tridimensional model than by a flattened 2-D representation of it, and (b) this representation allows interrogation of the forces that shape the progression or regression of tumors (acidity, energetic metabolism, etc.) without the need of deep mathematical knowledge. This modeling technique is thus able to examine the complex, multiscalar, dynamical, and mutual interactions of molecular, cellular, tissue, and systemic parameters that affect cancer growth and therapy.

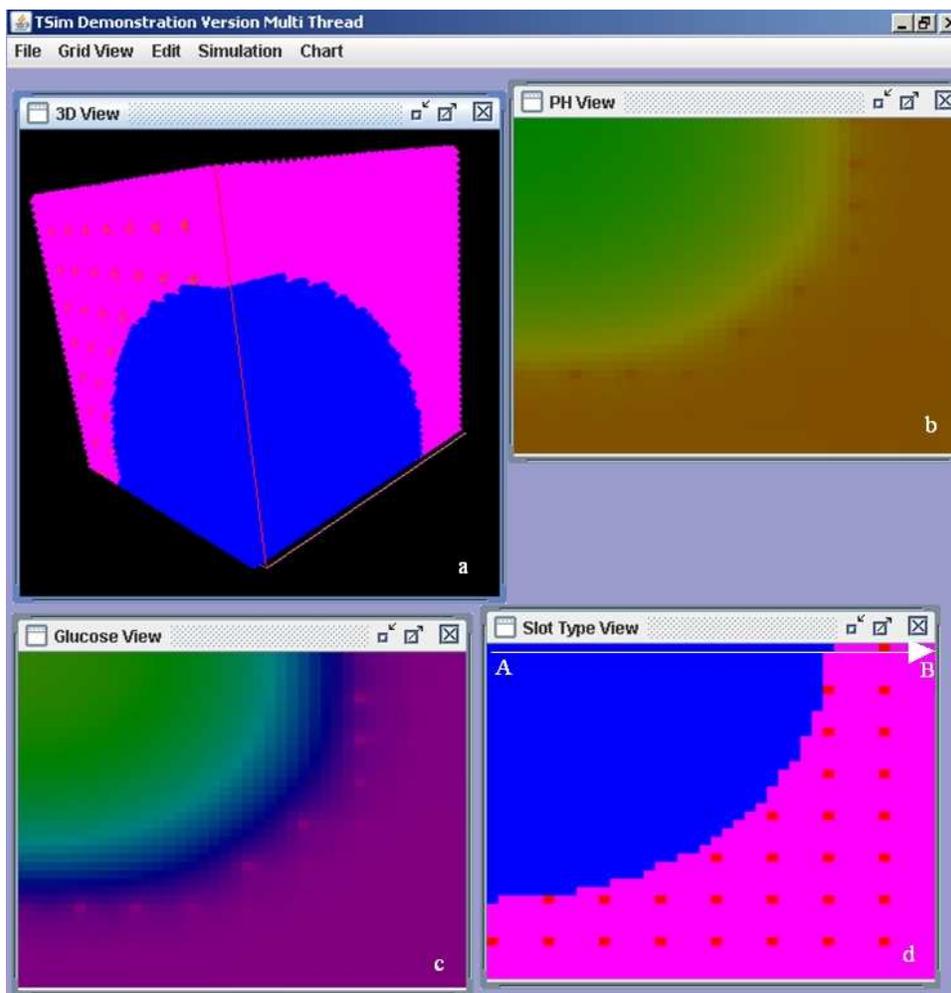


Figure 2 TSim's graphical user interface view of the tumor model. Blue represents one eighth of the tumor sphere. In pink the healthy tissue perfused by blood vessels in red. Simulations allow tumor growth to be simulated along with regional variations in extracellular pH, as well as O_2 , CO_2 , and glucose concentrations as well as intracellular ATP.

Material and Methods:

1-Model:

Our focus in the modeling work is on small tumors (diameter of about 1.5 mm) to investigate the potential for increased bicarbonate concentrations to delay development of metastases or the transition from microinvasive to clinically apparent primary cancers. Due to the computational effort needed to simulate this model, we chose to represent a fraction of the tumor (one eighth) considering that the tumor mass is symmetric (figure 2).

It is well known that most tumors are spatially heterogeneous so that this represents a limitation in this model. However, clinical observations have demonstrated that in the tumor size used in these simulations, the assumption of homogeneity in tumoral cell population is reasonable (40). The dimension of the tumor in this study is also comparable to small tumors implanted in window chambers in mice (19) and, thus, is valid for comparisons of pHe gradients observed in these experiments.

In our model the cancer cells are more resistant to low pHe than normal cells. In previous works (34) the pHe threshold for death of tumor cells was described as being as low as 6.0 but in this work we used a more conservative estimation of 6.4 while normal cells will not survive in a pHe lower than 6.8.

Tumor cells present increased glucose uptake and metabolism even in the presence of oxygen (41). In this study we considered three cases where aerobic glucose metabolism of tumor cells was increased 10-fold, 50-fold and 100-fold compared to normal cells (34) corresponding to the values in table 6 (supplemental data).

Each cell is considered to be a cubical volume with side of 25um in order to simplify the calculation of the diffusion of species (35). The species considered in this study are Glucose, O₂, CO₂, H⁺, Bicarbonate anion, and a hypothetical buffer to test the tumoral pHe effect of adding a non-CO₂-generating buffer with different pKa and diffusion rate. In this model, the concentrations of these species are considered to be constant in the blood vessels.

2-Diffusion:

The simulation process is composed of two steps, the first one being the diffusion of the species and the second one being cellular activities including metabolism, proliferation, and death

(figure 3). The former occurs at a much faster time scale than the latter allowing them to be temporally separated in the simulations.

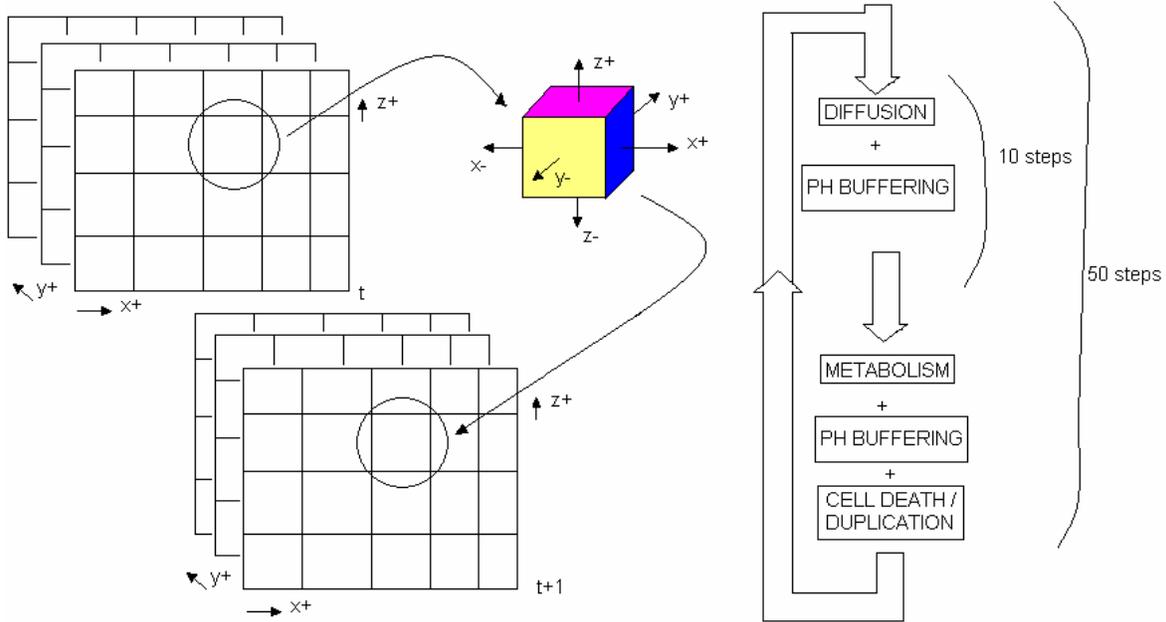


Figure 3 For each volume in simulation space at time t, the diffusion, metabolism, cell duplication and death are calculated and the updated model is stored in the respective volume at time t+1. Diffusion is calculated through an approximative algorithm with steps of one tenth of second. Each generation of the simulation is composed of 50 metabolic steps, after which the decision is made on cell fate: duplication, death or remain as is.

The diffusion was calculated with an approximative algorithm which applies the definition of diffusion coefficient to each volume in the simulated space at 0.1 second intervals. The process was repeated ten times to obtain the equilibrium concentrations of species over one second.

$$C_{t+1} = C_t - (C_t \times 6 - \sum_{i=1}^6 C_{it}) \times D_N \quad (1)$$

Where C_t and C_{t+1} are the concentrations of the species in a volume at times t and t+1 respectively, C_{it} is the concentration of the species in a neighboring volume in time t and D_N is the diffusion coefficient normalized to the surface between two volumes (25um x 25um) and one tenth of a second as time frame.

3-Metabolism, cell duplication and cell death:

Once the diffusion steps have been calculated, the software simulates the uptake of glucose and oxygen, glucose metabolism in either aerobic or anaerobic paths and the production of CO₂ or lactic acid corresponding to an interval of one second of simulated time.

The uptake of Glucose and O₂ is proportional to the concentration of these species in the extracellular environment. The transport of O₂ into the cell is due to simple Fickian diffusion while the transport of glucose is facilitated by Glut transporters whose genes are often over-expressed in cancer cells (42, 43).

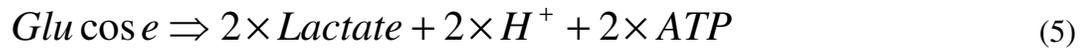
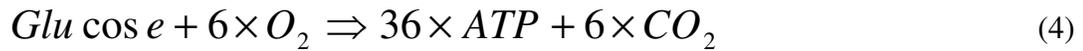
In this model the expressions from Smallbone (35) were used for the uptake of O₂ and Glucose in normal and cancer cells:

$$Uptake_{O_2} = [O_2]_{extracellular} \times K_{O_2} \quad (2)$$

$$Uptake_{Glucose} = [Glu]_{extracellular} \times K_{Glu} \quad (3)$$

K_{O₂} is the same for both normal and cancer cells and K_{Glu} varies depending on the type of cancer cell. In this work the values used for K_{Glu} in tumors were increased in 10, 50 and 100-fold as compared to normal cells, reflecting the increase in glucose metabolism.

The energetic metabolism was restricted to glycolysis and TCA cycle. All glucose uptaken by the cell was considered to be primarily metabolized into ATP and CO₂. The excess of glucose not consumed in respiration is converted into ATP and lactic acid.



After 50 metabolic steps (500 diffusion steps) the fate of each cell was decided based on pHe and ATP production:

- If the pHe is lower than the threshold, the cell dies;
- If the ATP production is lower than a threshold for survival (0.85uM/s), the cell dies (25);

- Should the ATP production rate be above this value, the cell survives with a probability of duplication increasing with ATP production rate, reaching 100% for a value of 8.5uM/s or higher (35);
- Replication was allowed if there is empty space in the vicinity of the cell (any of the six faces of the cubic volume);

Blood vessels are represented as parallel horizontal lines with a cross-section of one cell of area crossing the simulation space separated by 5 cells, which represents a distance of 125um between two blood vessels (34). There are no blood vessels in the tumor tissue as this model consists of micrometastasis.

The concentrations of the species in blood and their diffusion coefficients are listed in tables 1 through 5 (supplemental data).

Table 1 Concentration of Species in Serum and Diffusion Rates in normal conditions

Species	Concentration in Serum (mM)	Diffusion Rate (cm²/s)
Bicarb	23.8 (Mizumori et al., 2006)	5x10 ⁻⁶ (Tanaka et al., 2002)
Glucose	5	5x10 ⁻⁶ (Groeb et al., 1994)
O2	0.15	1.5x10 ⁻⁵ (Nichols and Foster, 1994)
CO2	1.2 (Mizumori et al., 2006)	1.5x10 ⁻⁵ (Tanaka et al., 2002)
H+	3.98x10 ⁻⁵ (pH 7.4)	1.1x10 ⁻⁵ (Patel et al., 2001)

Table 2 Concentration of Species in Serum with High Bicarb Concentration

Species	Concentration in Serum (mM)
Bicarb	33.13
CO2	1.66

Table 3 Concentration of Species in Serum with Very High Bicarb Concentration

Species	Concentration in Serum (mM)
Bicarb	47.88
CO ₂	2.4

Table 4 Concentration of Hypotetical Buffer in Blood Serum with pH= 7.4

Species	Concentration in Serum (mM)
A ⁻ (pKa 6.1)	9.32
AH (pKa 6.1)	0.47
A ⁻ (pKa 7)	12.9
AH (pKa 7)	5.1
A ⁻ (pKa 8)	3
AH (pKa 8)	14.5
A ⁻ (pKa 9)	0.44
AH (pKa 9)	17.56

Table 5 Diffusion Rates of Hypotetical Buffer in three Different Scenarios: Slower, Faster and Same Diffusion Rate as Bicarb and CO₂

Species	Diffusion Rate (cm²/s)
A ⁻ (Slow)	2.5x10 ⁻⁶
AH (Slow)	0.75x10 ⁻⁵
A ⁻ (Normal)	5x10 ⁻⁶
AH (Normal)	1.5x10 ⁻⁵
A ⁻ (Fast)	7.5x10 ⁻⁶
AH (Fast)	2.25x10 ⁻⁵

Table 6 Uptake Constants for O2 and Glucose Uptake

Constant	Uptake (s ⁻¹)
K _{O2}	9.41x10 ⁻² (Smallbone et al., 2006)
K _{Glu} (Normal cell)	1x10 ⁻⁵ (Patel et al., 2001)
K _{Glu} (Cancer 10x)	1x10 ⁻⁴
K _{Glu} (Cancer 50x)	5x10 ⁻⁴
K _{Glu} (Cancer 100x)	1x10 ⁻³

Table 7 Number of healthy and tumor cells for each scenario tested. Despite the loss of tumor cells due to the necrotic core, the scenario with less bicarbonate presents more tumor cells due to invasion of healthy tissue.

Scenario	Number of Healthy Cells	Number of Tumoral Cells	Volume of Tumor (mm ³)
Very High Bicarbonate (VHB)	48,113	15,216	2.38x10 ⁻¹
High Bicarbonate (HB)	48,101	15,228	2.38x10 ⁻¹
NORMAL	45,786	16,332	3.63x10 ⁻¹
Original state	48,113	15,216	2.38x10 ⁻¹

4-Buffer:

The combined buffer effect of bicarbonate and the hypothetical buffer was calculated as below:

In equilibrium the concentrations of both buffers are defined by:

$$\frac{[CO_2]}{[HCO_3^-] \times [H^+]} = 10^{pKaBicarb} \quad (6)$$

$$\frac{[AH]}{[A^-] \times [H^+]} = 10^{pKaHypotheticBuffer} \quad (7)$$

When certain amounts of H^+ (dH) and CO_2 (dCO_2) are added to the solution by glycolysis and respiration, there is an unbalance that must be corrected by the transfer (dX_1 , dX_2) of mass from the exceeding species to the rest of the buffer:

$$\frac{(CO_2 + dCO_2 - dX_1)}{(HCO_3^- + dX_1) \times (H^+ + dH + dX_1 + dX_2)} = 10^{pKaBicarb} \quad (8)$$

$$\frac{(AH - dX_2)}{(A^- + dX_2) \times (H^+ + dH + dX_1 + dX_2)} = 10^{pKaHypotheticalBuffer} \quad (9)$$

The solution of this system of equations, where the variables are dX_1 and dX_2 , provides the concentrations of species in the new equilibrium.

5-Tool Implementation:

The model was implemented in the software TSim (www.i-genics.com), written in Java, which is platform independent. This tool works by simulating the system, one slot at a time (blood vessel, cell or empty space) and stores the resulting simulation space in a file which is next used to compute the following simulation step. The result is a series of snapshots that can be played as a movie or analyzed one frame at a time.

Each simulation was run on a SGI Altix supercomputer and took four hours on four processors to complete with an average requirement 1GB of memory.

Increases in the precision of the simulation are possible by adding more steps for the diffusion and metabolism. However this slows down the processing time in direct proportion to the number of steps simulated.

Results:

Validation of Computer Model:

The first step in this work was to validate the computer model. This was done by comparing of the curves of pHe, O_2 , CO_2 and glucose concentrations in interstitial fluid both in tumor and healthy tissue with data from previously published experiments.

Figure S1 in supplemental data depicts profiles of extracellular Glucose, extracellular O_2 , extracellular CO_2 and pHe in the tumor and healthy tissue. All charts correspond to

measurements along the top horizontal line spanning from the center of tumor through adjacent the healthy tissue (horizontal line from A to B in figure 2).

1-pO₂

The results from our simulations are consistent with previous measurements (44) that showed a decrease in pO₂ from serum levels to practically zero in a distance of 200um (corresponding to 8 cells in this computer model). In our model this profile remained unchanged, irrespective to the addition of buffers (data not shown) or the glycolytic phenotype of the cancer cells simulated (figure S1, supplemental data).

2-Glucose

The simulations showed a slight decrease on the concentration of glucose in the healthy tissue (figure S1, supplemental data) as the cells are further away from blood vessels. There was a steeper decrease in the availability of glucose further into the tumoral tissue due to both the increased uptake of glucose and the lack of vascularization, as predicted by other models (35).

3-pCO₂

The CO₂ concentration curve (figure S1, supplemental data) showed increased levels of carbon dioxide in cells located further from blood vessels. The levels of CO₂ in tumor were between 25% and 125% higher than in blood serum, which is in accordance with values previously measured *in vivo* (32, 33).

4-pHe

The extracellular pH (pHe) of the tumors in our model decreased as a function of the distance from the blood vessels and also with the increased metabolism of glucose into lactic acid (figure S1). In the three tumor phenotypes considered there was no presence of necrotic core.

The pHe curves obtained in this work were consistent with the range of values found in previous *in vivo* experiments (19, 44, 45).

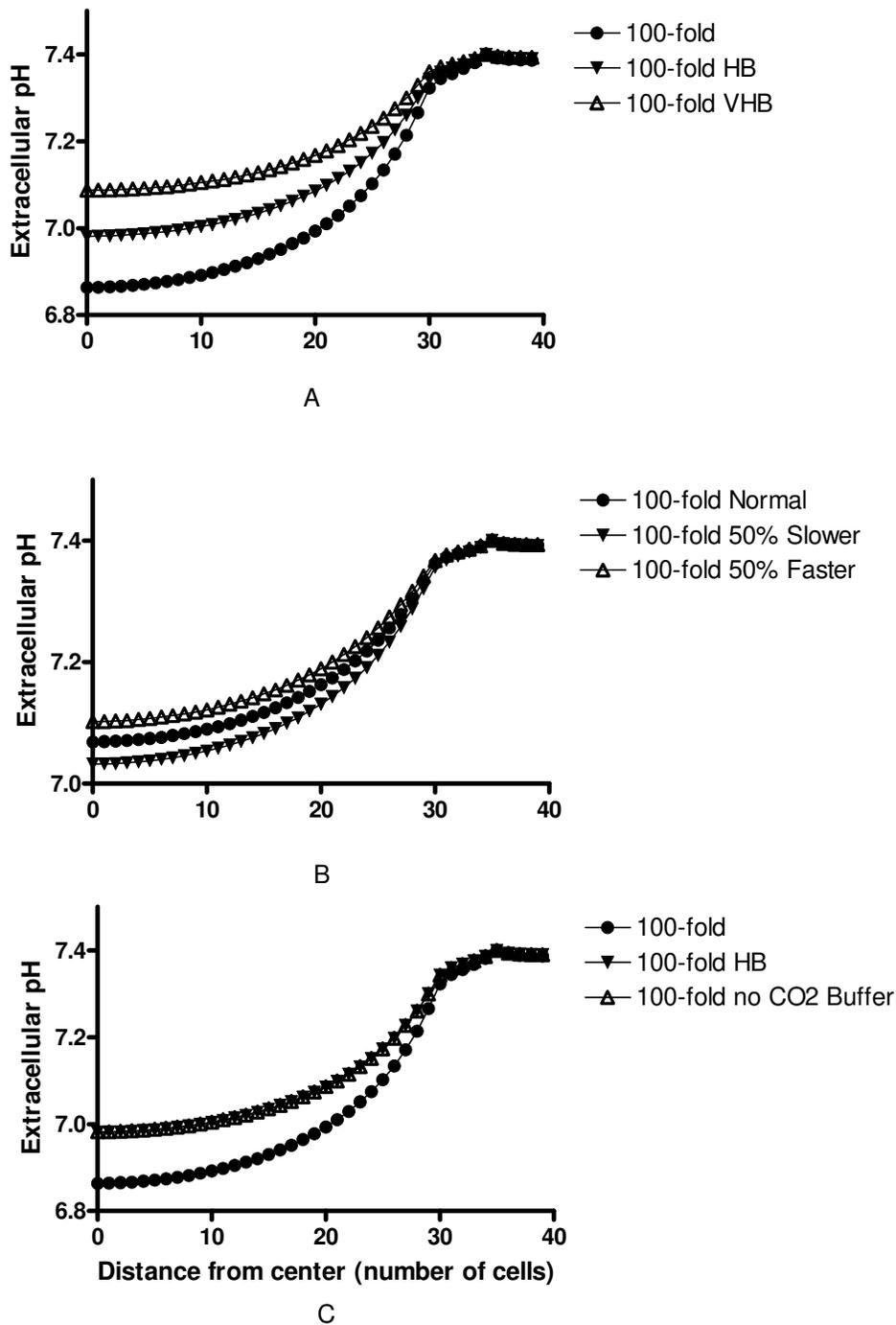


Figure 4 In A the effects of increased serum bicarbonate concentration on pHe gradient in tumors with 100-fold increase in glucose metabolism (HB stands for "High Bicarbonate" and VHB for "Very High Bicarbonate" as specified in tables 1, 2 and 3 in supplemental data). B shows the dependency of pHe gradient on the diffusion rate of a hypothetical buffer added to serum. In C the pHe gradient produced by a hypothetical non-CO₂ producing buffer as compared to bicarbonate confirms that no noticeable difference exists if the other chemical properties (i.e. pK) are kept equal for the two buffers.

Simulation Results:

The main purpose of this work was to evaluate the effect of addition of buffers to the blood serum in the pH of tumors. This was tested first using bicarbonate, which is readily available, and then comparing these results to hypothetical buffers of different pKa values and diffusion coefficients.

1-Variation of bicarbonate concentration

The first test performed was an increase in the bicarbonate buffer concentration in blood serum, simulating the chronic ingestion of bicarbonate in order to evaluate the effect of increased doses of this buffer in the pHe in the tumor-host interface.

The curves of figure 4A represent the pHe gradient for the scenario of 100-fold increase in tumor glucose metabolism and three bicarbonate buffer concentrations as shown in tables 1, 2 and 3 (supplemental data), representing a total of 25, 35 and 50 mM of total buffer in blood serum respectively ($\text{HCO}_3^- + \text{CO}_2$), identified as “Normal”, “High Bicarb” and “Very High Bicarb” concentrations. This is based on a range of serum concentrations that are achievable with ingestion of NaHCO_3 in amounts up to 70 grams per day.

The results showed that for the less glycolytic tumor (10-fold increase), the highest bicarbonate concentration increased the pHe in the center of the tumor from 7.25 to 7.32 while the pHe in the rim rose from 7.38 to 7.39 (data not shown). In the most glycolytic tumors (100-fold increase), the same amount of bicarbonate resulted in an increase of pHe from 6.86 to 7.09, in the center, and 7.32 to 7.36, in the tumor rim.

In our computer model, the increases in total serum buffer concentration were 40% (High Bicarbonate) and 100% (Very High Bicarbonate). The pHe profile for 40% increase (figure 4A) demonstrates that the flattening of the pHe curve in tumors can be explained by the effect of bicarbonate.

2-Diffusion rate of hypothetical buffer:

We next studied the effect of the diffusion rate of a hypothetical buffer used in conjunction with physiological bicarbonate. A buffer that diffuses faster should more efficiently remove the excess of protons generated by the anaerobic glycolytic metabolism.

As before, simulations were performed considering three different scenarios for the glucose metabolism of tumor cells. In all cases (figure 4B) simulations were performed under high serum levels of bicarbonate plus a hypothetical buffer with arbitrary pKa 8 and three different diffusion rates: one with diffusion rates equal to that of bicarbonate and CO₂; one with 50% lower diffusion rate; and the third one with 50% higher diffusion rate. Diffusion coefficients of these hypothetical buffers are shown in table 5 (supplemental data).

As expected, the buffer with faster diffusion rate had the most noticeable effect on raising the pHe. The differences between the slowest and the fastest buffers were 0.02, 0.05 and 0.08 pH units in the tumor center for 10-, 50- (data not shown) and 100-fold glycolysis increase respectively.

The effect of buffers with different diffusion rates are less noticeable than those observed for buffers with different pKa, therefore the diffusion rate seems not to be the main parameter to be considered in the choice of an alternative buffer.

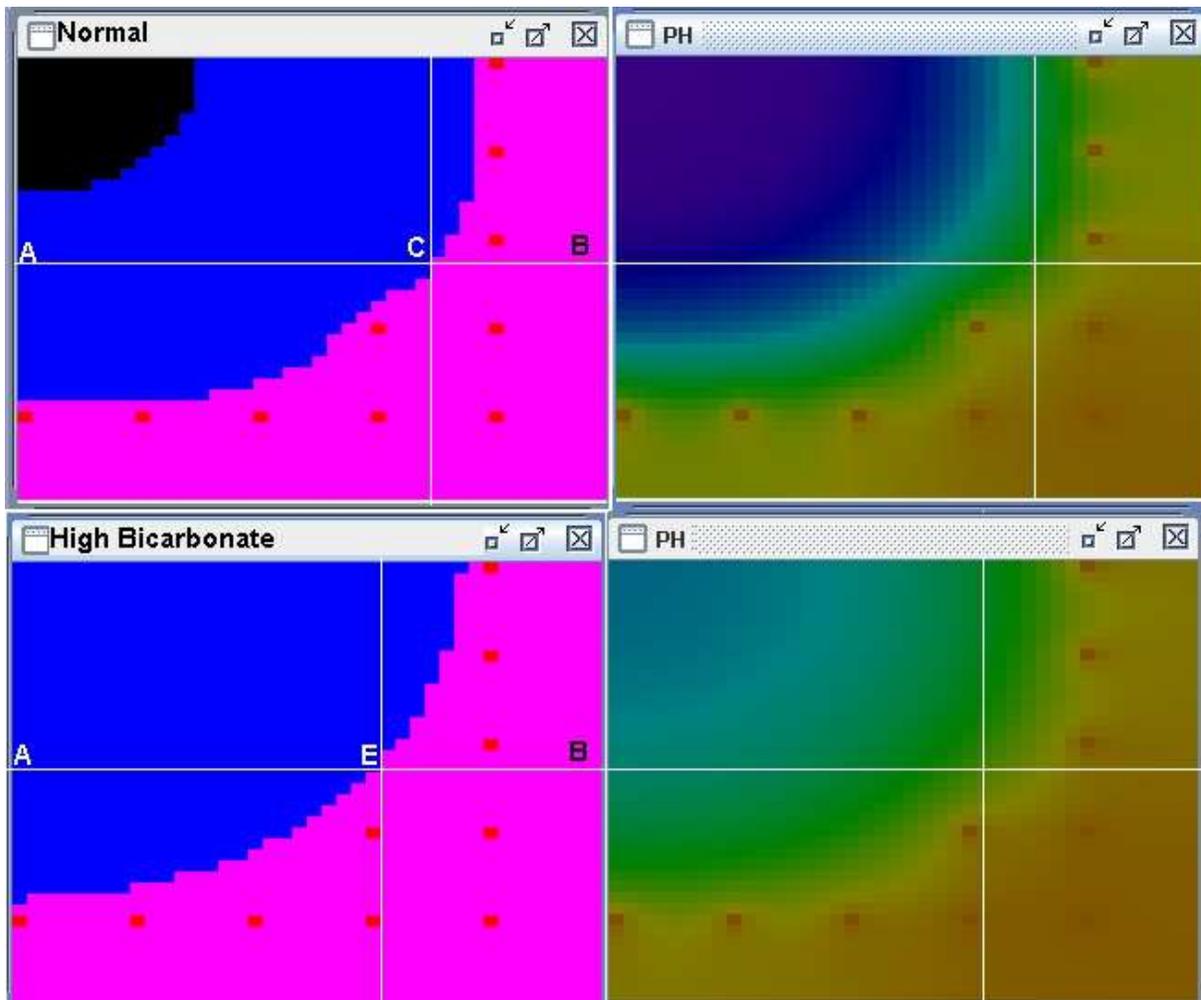


Figure 5 pHe distributions in and around tumors along with tumor growth after 20 generations with normal (top row) serum bicarbonate and with a 40% increase in concentration. As outline in the text, pHe was much less acidic in the presence of increased serum buffer resulting in a dramatic reduction in tumor invasion.

3-Bicarbonate combined with non-CO₂-generating buffer

Tumors are subject to heterogeneous external conditions, for instance, the rim might be exposed to normoxia while the core is hypoxic. We proposed that while lactic acid is produced by anaerobic metabolism in the tumor center, a reasonable amount of CO₂ might be generated by respiration in the tumor rim. Due to lack of vascularization in the center of the tumor, carbon dioxide could accumulate inside the tumor, increasing acidity and reducing the efficiency of the bicarbonate buffer.

We compared the results of two scenarios: in the first case a certain amount of bicarbonate was added to blood (10mM), in the second the same amount was added in the form of a hypothetical buffer with pKa 6.1 and diffusion coefficients equal to the ones of bicarbonate

buffer (A^- equal to HCO_3^- and AH equal to CO_2 diffusion respectively). In both cases the total buffer concentration in blood was the same (35mM). The concentrations for this buffer in blood serum are shown in table 4 (supplemental data).

The simulations show that the pHe curve was not affected by the use of a non- CO_2 generating buffer (figure 4C). Considering that the diffusion rate of CO_2 is three times faster than the one of bicarbonate (table 1, supplemental data) we concluded that the limiting factor for the removal of free protons from the tumor is bicarbonate and not carbon dioxide.

4-Bicarbonate combined with non- CO_2 -generating buffers with different pKa:

We tested hypothetical buffers with the same concentration in blood serum (~18mM) with different pKa values ranging from 6.2 to 8.0, at intervals of 0.2 pH units (figure 6).

In all simulated tumors, the more noticeable effect was the buffer with pKa equal to 7. This can be explained by the better efficiency of a pH buffer when it is used in a solution with pH in the range of one pH unit above or below the buffer pKa.

The pH maintained in blood in this model is 7.4 and the pH in the center of the tumor is close to 6.8 and thus a buffer with a pKa close to the average of these values (~7) is supposedly more effective in absorbing the protons produced by the tumor.

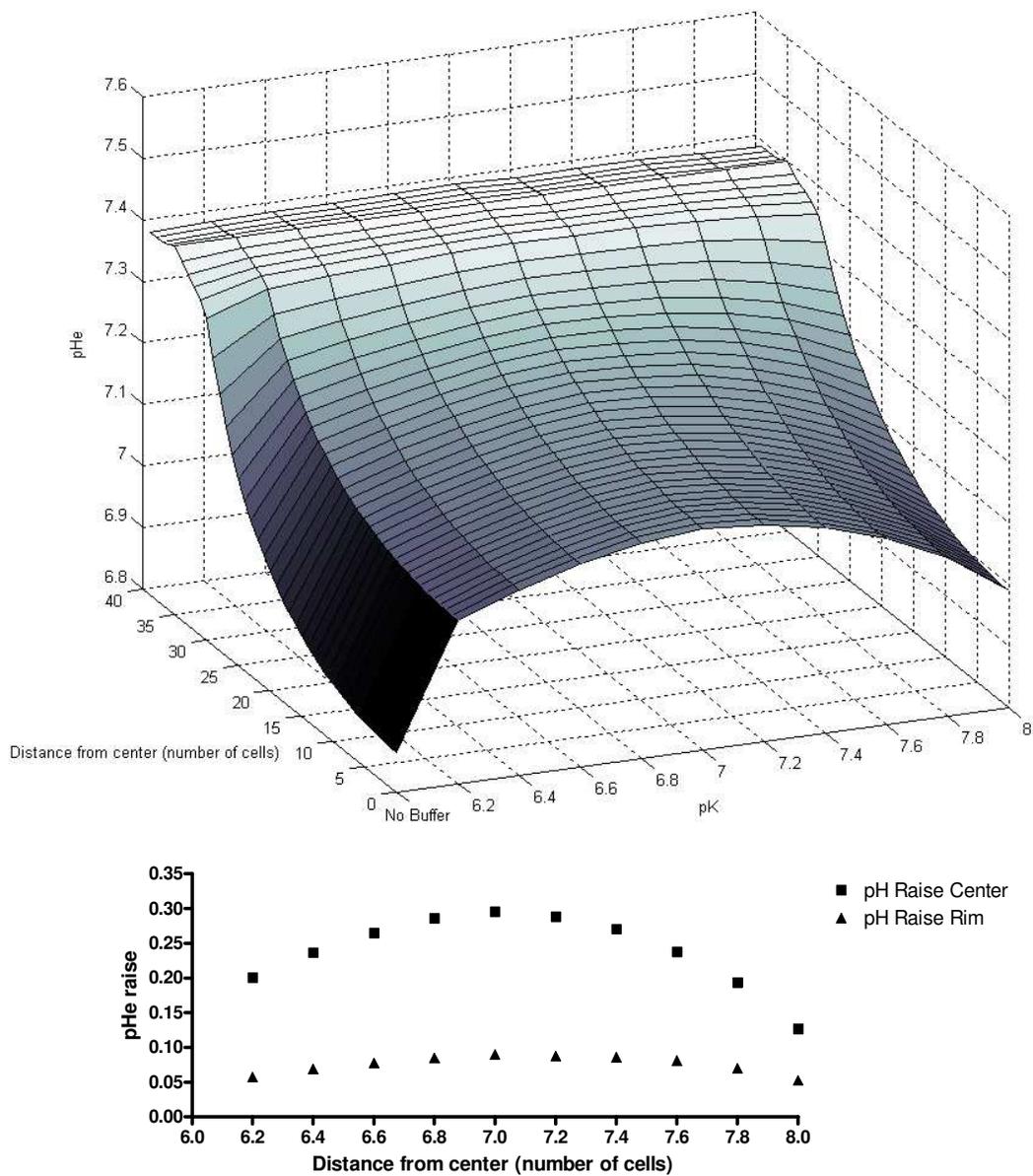


Figure 6 Dependency of pHe gradient on the value of hypothetical buffer's pKa and comparison with no treatment. In the inset, the pHe raise (in pH units) in tumor center and tumor rim.

5-Heterogeneity of tumor energetic metabolism

Tumors with increased glycolytic consumption on the order of magnitude of 50- or 100-fold presented an ATP production profile that reflected the decrease of the concentration of glucose on the environment. For these tumors most of the energy was obtained from anaerobic glycolysis (>97% for 50-fold and >97.5% for 100-fold), even in the rim (data not shown).

Tumors with lower Glucose uptake presented a combination of two behaviors: on the rim of the tumor (around three cells deep) the energy was obtained mostly by aerobic glucose metabolism (~92%) but at concentrations of oxygen below ~18uM, the metabolism switched to anaerobic glycolysis, with >96% of ATP produced anaerobically at a distance five cells away from tumor/healthy tissue interface (data not shown).

6- Tumor growth with increased concentrations of bicarbonate

To estimate the effect of increasing pH buffer availability and consequent reduction of the pHe gradient in tumor invasion, three scenarios were tested: normal bicarbonate concentration (NORMAL), high bicarbonate concentration (HB) and very high bicarbonate concentration (VHB). The HB group corresponded to the bicarbonate concentration expected with ingestion of 40 grams of NaHCO₃ per day by a 70 kg man (see case report in supplemental data). The HB group represented 40% of the VHB dose. Each scenario was run for 20 generations, at the end of each generation, the cells being allowed to duplicate, die or remain unchanged.

The tumor growth and pHe gradients for normal and high bicarbonate concentrations are depicted in figures 5 and S2 (supplemental data). With normal serum concentrations of bicarbonate, the tumor cells were highly acidotic, created a significant peritumoral pHe gradient and extensively invaded into the normal tissue. Addition of a moderate amount of bicarbonate in blood (approximately 40% increase in serum concentration) reduced the amount of intra- and peri-tumoral acidosis and almost completely eliminated tumor invasion (loss of only 12 healthy cells out of more than 48,000). Treatment with higher bicarbonate (table 7, supplemental data) concentrations totally prevented invasion (no loss of normal cells). Note that both treatment scenarios also eliminated the necrotic tumor core that developed with normal bicarbonate concentrations – a potential imaging tumor biomarker for clinical trials.

Discussion:

In this study we used 3-D mathematical models to quantify the ability of systemic buffers to reduce the acidity of tumors and peritumoral normal tissue. The acid-mediated tumor invasion model suggests that reduction of the intra- and peri-tumoral pHe gradients will also reduce tumor growth and invasion. Our study finds that clinically achievable concentrations of NaHCO_3 can reduce malignant tumor growth and, thus, may have value as a clinical therapy.

The simulations demonstrate that increased concentration of serum bicarbonate can decrease intra- and peri-tumor acidosis without altering blood pH. This might, at first, appear paradoxical but we point out that this treatment is not “alkalization” but, rather, treatment with a physiological buffer. The effect of the former is to produce a generalized increase in pH. By contrast, the effect of increasing the concentration of a physiologic buffer is to drive the entire system toward a normal pH (i.e. 7.35-7.45). Thus, regions that are at normal pH (such as blood) will not be affected while regions at abnormal pH (either acidic or alkaline) will tend toward physiologic values.

The results from our computer simulations can be summarized below:

1. There is a linear relationship between the amount of bicarbonate in blood and the pHe in tumors of the size simulated in this work, even though the pH in blood remains unchanged;
2. The use of a non- CO_2 -generating buffer with same pKa and diffusion rates as bicarbonate does not provide advantages over bicarbonate, indicating that the byproduct carbon dioxide is not the limiting factor in the efficiency of bicarbonate buffer;
3. The pKa of a hypothetical buffer is the most important characteristic on its effect on the tumor pHe. The proposed pKa in this study is around 7;
4. The diffusion coefficient of a hypothetical buffer generates less noticeable effects if compared to different pKa, and thus is not the main parameter to be considered in the choice of an alternative buffer;
5. Moderate increases in the serum NaHCO_3 concentrations will substantially reduce intra- and peri-tumoral acidity, which will virtually eliminate tumor invasion into normal adjacent tissue resulting in stable tumor size.

The results obtained in this work are consistent with data measured in window chambers in the companion paper (currently included in the supplemental material (46) and ref (32)). The size of the tumor in the simulations is comparable to those measured in the experimental window chamber model (1.5mm diameter for the simulated tumor and 1.4 mm for the window chamber) and the pHe gradients from figure 4 fit quantitatively the experimental curves (6.86 in center and 7.09 in rim for the simulated tumors, figure 4, and 6.9 in center and 7.15 in rim measured experimentally (see companion paper in supplemental material and ref 19)). The pHe curves in and around tumors obtained in the simulations with normal and elevated serum concentrations of NaHCO_3 can be compared to experimentally determined acid concentrations (see companion paper in supplemental material (46)). In this study, GFP-labelled MDA-mb-231 tumors were grown in window chambers in SCID mice. Bicarbonate concentrations were increased by adding 200mM of NaHCO_3 to the drinking water. This was calculated to be the equivalent of a daily dose of 37 grams in a 70 kg human. The pHe gradient in the tumor and peritumoral normal tissues was measured using fluorescent ratio imaging. As demonstrated in figure 5 of our companion paper (46 – see supplemental material), the pHe gradients of the tumor increased 0.1 to 0.2 pH units when the bicarbonate was added to the water - remarkably similar to the changes observed in the computer simulations.

The clinical feasibility of chronic ingestion of bicarbonate to reduce tumor invasion is an open question. Interestingly, NaHCO_3 is readily available in grocery stores (as baking soda) and in over-the-counter preparations for clinical use as an antacid. The recommended daily dose is 5 teaspoons a day, which is 25-50 grams (depending on how “heaping” the teaspoon is). This dose has been administered chronically (i.e. greater than 1 year) in patients with renal tubular acidosis (RTA) and sickle cell anemia without adverse effects. (47,48) Finally, in the supplemental material we include the experience of a 79 year old man with widely metastatic renal cancer followed at the Moffitt Cancer Center (see supplemental material). After failing first line treatment, he discontinued conventional therapy and began a self-administered course of vitamins, supplements, and 60 grams of bicarbonate mixed in water daily. As of this submission he has remained well with stable tumor for 10 months. While little information can be gained from a single case report, we do note that he has tolerated the “very high” bicarbonate administration used in our simulations without complication for nearly 1 year suggesting it is clinically feasible.

An interesting result of the simulations is that the use of buffers with pKa close to 7 might yield to results similar or better than those obtained with bicarbonate (pKa 6.1 (49)). Candidate buffers could be Choline chloride (pKa 7.1), BES (pKa 7.15), TES (pKa 7.5) or HEPES (pKa 7.55) (50). However the effect of these buffers *in vivo* must be evaluated since bicarbonate is a natural buffer controlled by the organism through ventilation and excretion in kidneys, the use of an artificial buffer might lead to side effects and toxicity.

In conclusion, our study finds that oral administration of clinically feasible amounts of NaHCO₃ may be sufficient to increase the acidic intra- and peri-tumoral pH in small tumors. Furthermore, the consequent changes in the tumor-host dynamics may inhibit tumor growth and invasion. Our results suggest further experimental exploration of systemic administration of pH buffers as a novel cancer therapy is warranted.

SUPPLEMENTAL DATA

Appendix A- A case report

GL is a 79 year old man followed in the GU clinic at the Moffitt Cancer Center. He presented with hematuria in January 2004 and was found to have a large right renal cancer with clot extending into the inferior vena cava (stage T3b, N2, Mx). He underwent a nephrectomy with clot removal at the Moffitt Cancer Center in February, 2004. In June, 2005, he developed metastatic disease in his liver. He was treated with Sutent, but the tumor progressed with metastases developing in the subcutaneous tissues and retroperitoneal lymph nodes. He was unable to tolerate ALT-801. In September 2007 he elected to discontinue all conventional therapy and began a self-administered regimen of vitamins, supplements, and 3 “heaping tablespoons” of sodium bicarbonate in water per day (about 60 grams total). As of the date of this submission, he has maintained this therapy with no complications. His weight is stable. He walks 2 miles every day and had cataract surgery in March 2008 without complications. CT scans from Dec 5, 2007 and April 18, 2008 are shown in figure S3. These images are representative in that some of the liver lesions have increased in size, some have decreased, and some have remained stable. Interestingly, the tumors that were necrotic in the initial scan became much less so on the follow-up study. At the time of this submission the patient remains clinically well.

Appendix B- Computer Model Implementation

B.1 Diffusion

The diffusion of species in this model was calculated based on Fick's first law, which relates the diffusion flux through a surface to the difference of concentration of species in volumes separated by this surface (equation S1).

$$J = -D \times \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad (S1)$$

Where J is the diffusion flux expressed as $\frac{mol}{\mu m^2 \times s}$, D is the diffusion coefficient in $\frac{\mu m^2}{s}$ and ϕ is the concentration of a species in $\frac{mol}{\mu m^3}$.

Two cubic adjacent volumes in this computer model share a contact surface $S = 25\mu m \times 25\mu m$, the distance between centers the two volumes is $d = 25\mu m$ and the time step used in this calculation is $\Delta t = \frac{1}{10}s$. Under these conditions, the variation in concentration of the two volumes due to diffusion can be approximated as being the product of the flux through the contact surface, during the time step, divided by the volume V:

$$C_{t+1} - C_t = \frac{J \times S \times \Delta t}{V} \quad (S2)$$

In the general case, each volume in the model is surrounded by six neighboring volumes, thus the general expression used to calculate the diffusion (equation 1) can be derived from S3:

$$C_{t+1} - C_t = \frac{-D \times \sum_{i=1}^6 (C_t - C_{it}) \times S \times \Delta t}{d \times V \times 6} = -\sum_{i=1}^6 (C_t - C_{it}) \times D_N \quad (S3)$$

Where D_N is a dimensionless constant used to simplify the final expression.

B.2 Cell Metabolism

The metabolism of cells in this model, both healthy and cancerous, was based on Smallbone (2007). Considering that we search a steady-state solution for our system, we ignore the possible transients from the kinetics of the metabolic reactions, and focus on the

stoichiometry of the metabolism of glucose and oxygen into carbon dioxide, lactate, hydrogen ions and ATP.

This simplified mechanism consists on the diffusion of oxygen and glucose from the extracellular environment at fixed rates (simple Fickian diffusion for oxygen and facilitated transport for glucose, equations 2 and 3). Glucose is then metabolized preferentially through respiration (equation 4) and any excess is metabolized anaerobically (equation 5).

This implementation of the model suggests that tumor cells metabolize glucose and produce lactic acid, even in presence of oxygen, not because of malfunctions in mitochondria but due to excess of glucose metabolism, compared to healthy cells.

Supplemental Pictures:

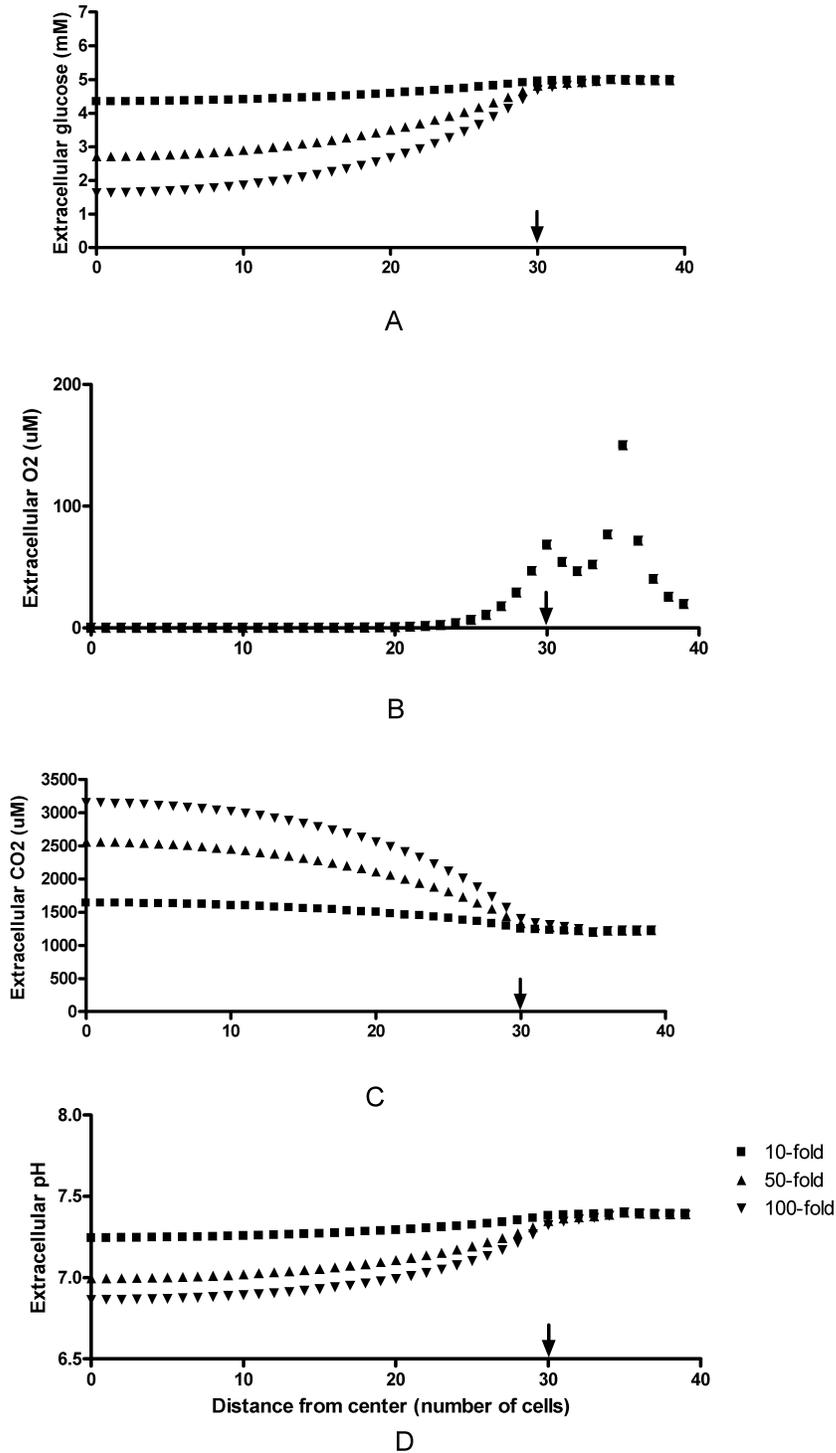


Figure S1 Gradients of extracellular glucose, O₂, CO₂ and pH for three different tumor phenotypes (10-, 50- and 100-fold increase in glucose metabolism) and normal serum bicarbonate concentration. The vertical arrows mark the tumor-host interface. The spikes of O₂ concentration are due to the presence of a blood vessel in the position 37 and a second blood vessel at position 31 on an adjacent plane.

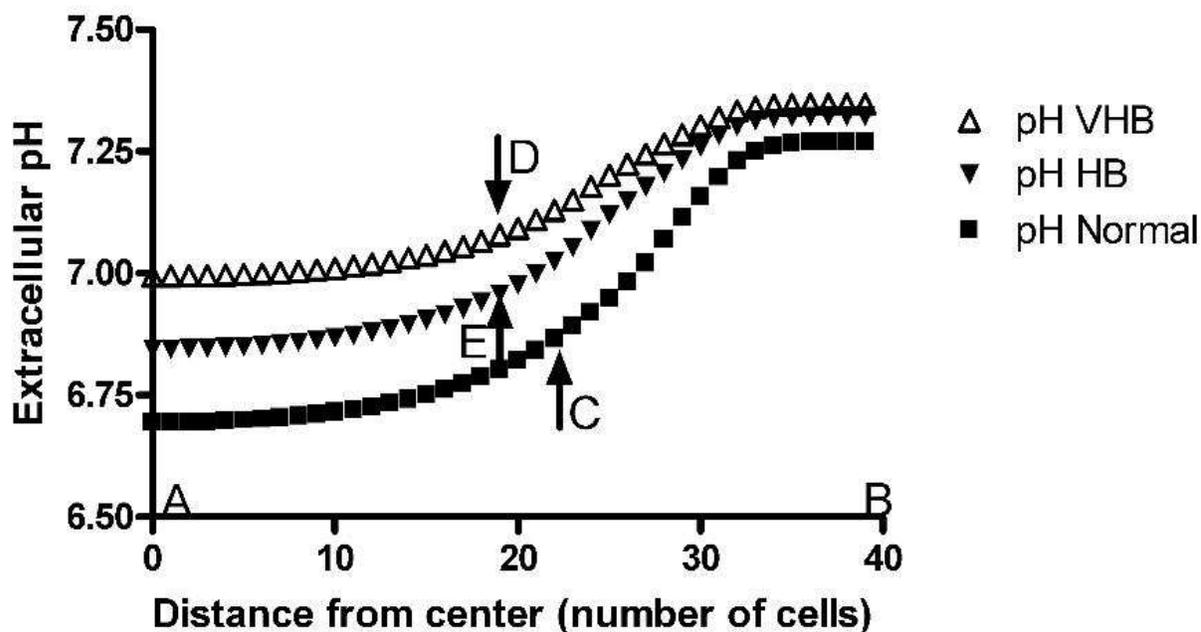


Figure S2. pH gradients for three tumors of original diameter of 60 cells as described in figure 5. After 20 generations the untreated tumor (Normal) presents lower pH curve and invasion of healthy tissue (C) when compared to tumors treated with bicarbonate (E and D). Concentrations of bicarbonate administered for HB and VHB as described in text.

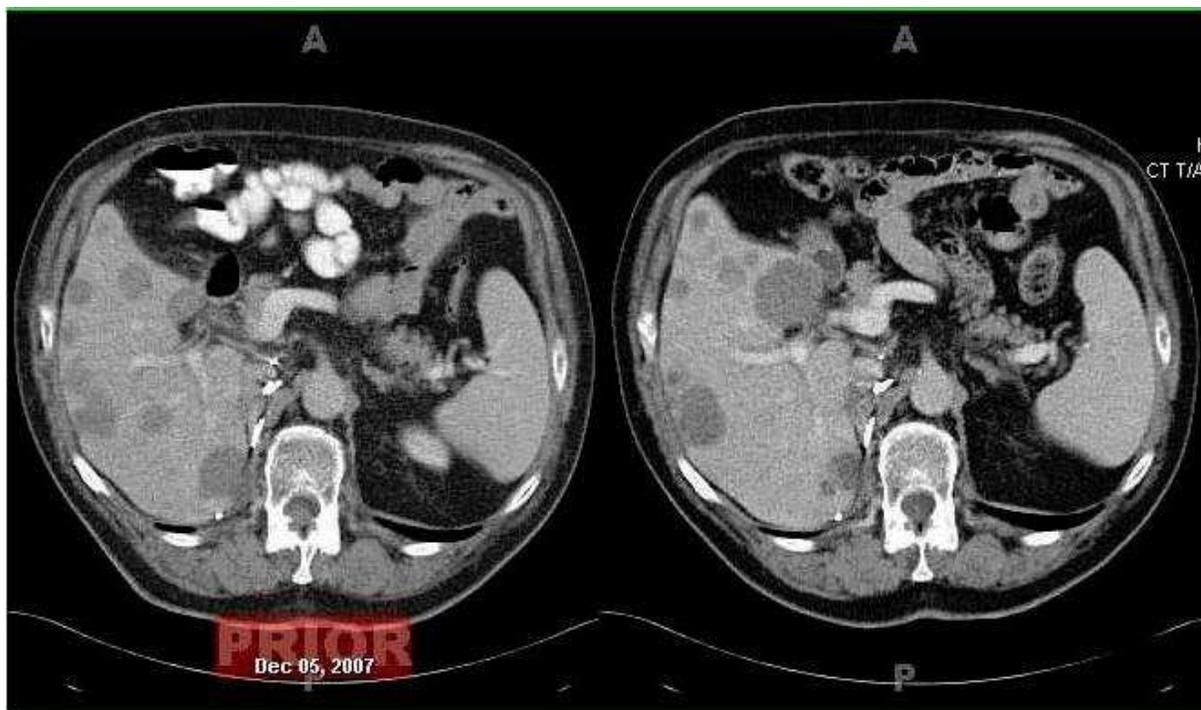


Figure S3. CT scans of the liver from patient with metastatic renal cancer self-administering 40grams of NaHCO_3 daily and receiving no conventional therapy since September 1, 2007. Scans from Dec 5, 2007 (left) and April 18, 2008 (right) are shown. These images are representative in that some of the liver lesions have increased in size, some have decreased, and some have remained stable. Interestingly, the central necrosis seen in several of the tumors on the initial scan was no longer present on the follow-up study.

References:

1. Gillies RJ, Raghunand N, Garcia-Martin ML, Gatenby RA. pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers. *IEEE Eng Med Biol.* 2004;23:57-64.
2. Gillies R., Raghunand, N, Karczmar G., and Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging.* 2002; 16:430-50.
3. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO^2 gradients in solid tumors *in vivo*: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Medicine* 1997; 3:177-82.
4. Gallagher FA, Kettunen MI, Day SE, et. al. Magnetic resonance imaging of pH *in vivo* using hyperpolarized $(13)C$ -labelled bicarbonate. *Nature.* 2008; 453:940-3.
5. Gatenby RA, Gillies R J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:891-9.
6. Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, Gatenby RA, Gillies RJ. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis.* 2008; 25:411-25.
7. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 2006; 66:6699-707.
8. Cuvier C, Jang A, Hill RP. Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L + B) secretion. *Clin Exp Metastasis.* 1997; 1:19-25.
9. Kalliomäki T, Hill RP. Effects of tumour acidification with glucose+MIBG on the spontaneous metastatic potential of two murine cell lines. *Br J Cancer.* 2004; 90:1842-9.

-
10. Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, and Sloane BF. Pericellular pH affects distribution and cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.* 1994; 54: 6517–25.
 11. Xu L, Fidler IJ. Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 4610–6.
 12. Shi Q, Le X, Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y, Xie K. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene.* 2001; 20: 3751–6.
 13. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26:299-310.
 14. Ceccarini C, Eagle H. pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proceedings of the National Acad of Sci (USA).* 1971; 68:229-33.
 15. Park HC, Lyons JC, Ohtsubo T, and Song C W. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br. J. Cancer.* 1999; 80:1892–7.
 16. Williams AC, Collard T J, Parakeva C. An acidic environment leads to p53dependent induction of apoptosis. *Oncogene.* 1999; 16: 3193–204.
 17. Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *J. Leukoc. Biol.* 2001; 69:522–30.
 18. Gatenby RA, Gawlinski ET. A reaction-diffusion model of tumor invasion. *Cancer Res.* 1996; 56: 5745–53.
 19. Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res.* 2006; 66:5216-23.

-
20. Yasuda S, Fuji H, Nakahara T, et. al. 18F-FDG PET detection of colonic adenomas. *J Nucl Med* 2001; 42:989-92.
21. Abbey CK, Borowsky AD, McGoldrick ET, et. al.. In vivo PET imaging of progression of transformation in a mouse model of mammary neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:11438-43.
22. Schwarzbach MH, Hinz U, Dimitrakopoulou-Strauss A, et al. Prognostic significance of preoperative [18-F] fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) imaging in patients with resectable soft tissue sarcomas. *Ann Surg* 2005; 241:286-94.
23. Schwartz DL, Rajendran J, Yueh B, et al. FDG-PET prediction of head and neck squamous cell cancer outcomes. *Head Neck Surg* 2004;130:1361-5.
24. Vansteenkiste J, Fischer BM, Doooms C, Mortense N. Positron-emission tomography in prognostic and therapeutic assessment of lung cancer: systematic review. *J.Lancet Oncol* 2004; 5:531-40.
25. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000; 60:916-21.
26. Schwickert G, Walenta S, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res.* 1995; 55:4757-9.

-
27. Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K. Lactate Dehydrogenase-5 (LDH-5) Expression in Human Gastric Cancer: Association with Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1alpha) Pathway, Angiogenic Factors Production and Poor Prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2008;
28. Hui EP, Chan AT, Pezzella F, et. al.. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:2595-604.
29. Choi SW, Kim JY, Park JY, Cha IH, Kim J, Lee S. Expression of carbonic anhydrase IX is associated with postoperative recurrence and poor prognosis in surgically treated oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2008;
30. Nomura T, Katunuma N. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *J Med Invest*. 2005; 52:1-9.
31. Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, et. al. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:7157-62.
32. Gullino PM., Grantham FH., Smith SH., Haggerty AC. Modifications of the acid-base status of the internal milieu of tumors. *J. Natl. Cancer Inst*. 1965; 34: 857-69.
33. Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, Forbes NS, Jain RK. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1284–91.
34. Patel A, Gawlinski ET, Lemieux SK, Gatenby RA. A cellular automaton model of early tumor growth and invasion: the effects of native tissue vascularity and increased anaerobic tumor metabolism. *J. Theor. Biol*. 2001; 213:315-31.

-
35. Smallbone K, Gatenby RA, Gillies RJ, Maini PK, Gavaghan DJ. Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness. *J. Theor. Biol.* 2007; 244: 703–13.
36. Ferreira SC, Martins ML, Vilela MJ. Reaction–diffusion model for the growth of avascular tumor. *Phys. Rev. E* 2002; 65:021907.
37. Tanaka S, Meiselman HH, Engel E, et al., Regional differences of H⁺, HCO₃⁻, and CO₂ diffusion through native porcine gastroduodenal mucus. *Dig Dis Sci.* 2002; 47(5):967-73.
38. Groebe, K., Erz, S., Mueller-Kleiser, W., Glucose diffusion coefficients determined from concentration profiles in EMT6 tumor spheroids incubated in radioactively labeled L-glucose. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994; 361, 619–625.
39. Nichols, M.G., Foster, T.H., Oxygen diffusion and reaction kinetics in the photodynamic therapy of multicell tumour spheroids. *Phys. Med. Biol.* 1994; 39, 2161–2181.
40. Kanamaru H, Muranaka K, Mori H, Akino H, Arai Y, Okada K. Analysis of histological heterogeneity in renal cell carcinoma: tumor size-related histological change and its prognostic significance. *Int J Urol.* 1996; 3:256-60.
41. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 1956; 124:269-70.
42. Kunkel M, Reichert TE, Benz P, et. al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; 97:1015–24.
43. Wykoff CC, Beasley N, Watson PH, et.al. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am. J. Pathol.* 2001; 158: 1011–9.

-
44. Helmlinger G, Yuan F, Delian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* 1997; 3:177–82.
45. Martin GR, Jain RK. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res.* 1994; 54:5670-4.
46. Robey IF, Baggett BK, Roe DJ, Gatenby RA, Raghunand N, Gillies RJ. Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases in Mice. (2008) submitted to *Cancer Research* as a companion article and included in supplemental material.
47. Booth BE, Gates J, Morris RC . Grocery store baking soda. A source of sodium bicarbonate in the management of chronic metabolic acidosis. *Clin Pediatr* 23(2):94-6. 1984
48. Mann JR, Stuart J. Sodium Bicarbonate Prophylaxis of Sickle Cell Crisis. *Pediatrics* 53: 414-416, 1974.
49. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 1966; 5: 467-77.
50. Putnam RW and Roos A. Which value for the first dissociation constant of carbonic acid should be used in biological work? *Am J Physiol Cell Physiol* 1991; 260: C1113–C1116.

Abbreviations

pHe – Extracellular pH
TCA – Tricarboxylic acid
pKa – Dissociation constant

“As far as the laws of mathematics refer to reality, they are not certain; and as far as they are certain, they do not refer to reality”.

Albert Einstein (1879 - 1955), "Geometry and Experience", January 27, 1921

5

**Conservation of glycolytic oscillations in
Saccharomyces cerevisiae and human pancreatic β -cells:
a study of metabolic robustness**

Authors: A.S. Silva¹, J.A. Yunes¹

¹Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil

Genetics and Molecular Research 5 (3): 225-235 (2006)

Conservation of glycolytic oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* and human pancreatic β -cells: a study of metabolic robustness

A.S. Silva and J.A. Yunes

Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini,
Campinas, SP, Brasil

Corresponding author: A.S. Silva

E-mail: ariostosilva@yahoo.com

Genet. Mol. Res. 5 (3): 525-535 (2006)

Received March 27, 2006

Accepted July 3, 2006

Published August 11, 2006

ABSTRACT. The present study compares two computer models of the first part of glucose catabolism in different organisms in search of evolutionarily conserved characteristics of the glycolysis cycle and proposes the main parameters that define the stable steady-state or oscillatory behavior of the glycolytic system. It is suggested that in both human pancreatic β -cells and *Saccharomyces cerevisiae* there are oscillations that, despite differences in wave form and period of oscillation, share the same robustness strategy: the oscillation is not controlled by only one but by at least two parameters that will have more or less control over the pathway flux depending on the initial state of the system as well as on extra-cellular conditions. This observation leads to two important interpretations: the first is that in both *S. cerevisiae* and human β -cells, despite differences in enzyme kinetics and mechanism of feedback control, evolution seems to have kept an oscillatory behavior coupled to the glucose concentration outside the cytoplasm, and the second is that the development of drugs to regulate metabolic dysfunctions in more com-

plex systems may require further study, not only determining which enzyme is controlling the flux of the system but also under which conditions and how its control is maintained by the enzyme or transferred to other enzymes in the pathway as the drug starts acting.

Key words: Glycolysis, β -cell, Oscillations, Computer simulation, Robustness, Insulin

INTRODUCTION

Nowadays, there are several different computer models available for the simulation of metabolic networks and many have been compared to experimental data for validation. Most computer models are built based on data recovered from articles reporting experimental results on isolated enzymes (most of them *in vitro*) and are expected to provide a simulated behavior comparable to the real behavior of metabolism in the living system. Because of its broad physiological implications, glycolysis is one of the best studied metabolic pathways.

Metabolic control analysis (Burns and Kacser, 1973) has been widely used to identify the steps in a metabolic network that control its flux through a rate-limiting effect. However, most metabolic control analysis tools only handle steady-state systems and cannot evaluate the rate-limiting enzyme in limit cycles.

Robustness is the ability to maintain stable functioning despite various perturbations (Kitano, 2004). A complex system is usually a compromise between an external robustness (i.e., tolerance to modifications in the external environment) and internal fragility (i.e., an intense dependency on the correct functioning of its internal components). This trade-off can be seen, for example, in a fly-by-wire airplane that can be as easily maneuvered amid a storm as in a blue sky but will fall like a rock in case of malfunction of its electronic devices.

This study reports results on the control analysis of two glycolysis models recovered from articles previously published, one for *Saccharomyces cerevisiae* (Termonia and Ross, 1981; Teusink et al., 2000) and another for human pancreatic β -cells (Westermarck and Lansner, 2003). Through variation of parameters and time course analysis, the controlling steps of the metabolic network were identified and their effects on system behavior were recorded. These results allowed us to address whether the currently available mathematical models of glycolysis indicate the occurrence of robustness, and whether robustness has been conserved among different species even though the "components" of the system (enzymes, compartments, organelles, etc.) diverged over the course of evolution.

MODEL AND KINETIC EQUATIONS

The glycolytic metabolic pathway upon which the models were based is depicted in Figure 1. The models and kinetic equations adopted for *S. cerevisiae* were as previously published by Teusink et al. (2000) and Termonia and Ross (1981). Models and kinetic equations for human pancreatic β -cells were as in Westermarck and Lansner (2003).

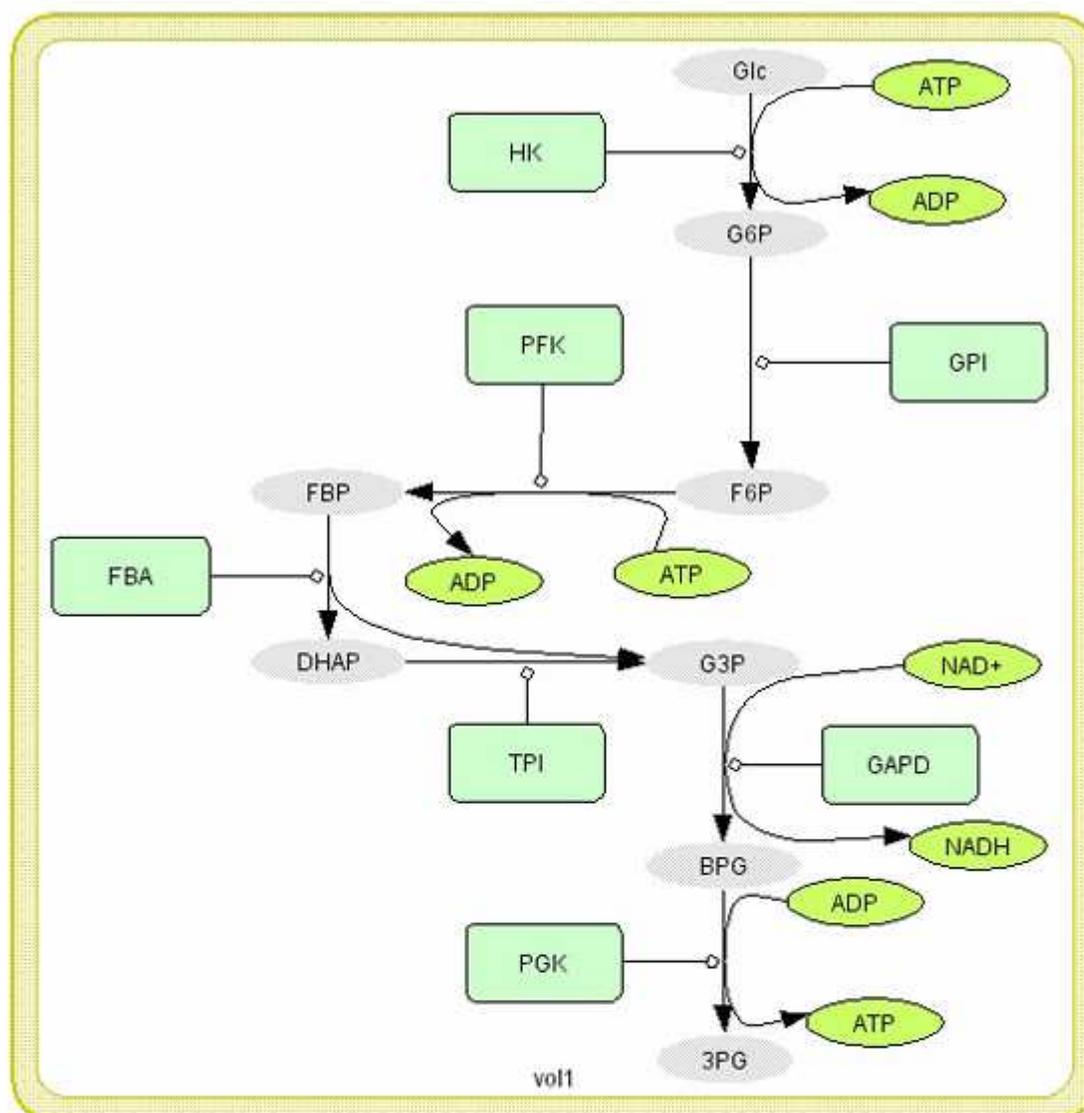


Figure 1. Model including the glycolytic (Glc) pathway from the phosphorylation of glucose up to the synthesis of glyceraldehyde-3-phosphate (G3P); the steps catalyzed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) and phosphoglycerate kinase (PGK) are presented only to illustrate where ATP production occurs but were not included in the calculation. HK = hexokinase; G6P = glucose-6-phosphate; PFK = phosphofructokinase; GPI = glucose-6-phosphate-isomerase; F6P = fructose-6-phosphate; FBP = fructose-1,6-bisphosphate; FBA = fructose-bisphosphate aldolase; DHAP = dihydroxyacetone-phosphate; TPI = triose-phosphate isomerase; BPG = 1,3-bisphosphoglycerate; 3PG = 3-phosphoglycerate.

In the present study, models were written in terms of their differential equations using Jamac 2.16g (Sauro et al., 2003), which can be summarized as follows:

1. $\text{Glc} + \text{ATP} \Rightarrow \text{G6P} + \text{ADP}$: Hill equation, saturated by MgATP;
2. $\text{G6P} \Leftrightarrow \text{F6P}$: fast equilibrium with $[\text{F6P}] = 0.3 * [\text{G6P}]$;

3. $F6P + ATP \Rightarrow FBP + ADP$:
 - a. β -cell: phenomenological Hill-type equation (Hofmeyr and Cornish-Bowden, 1997), FBP as activator;
 - b. Yeast: Hill equation, F6P as substrate, ATP as substrate and inhibitor, AMP as activator;
4. $FBP \Rightarrow DHAP + G3P$: Michaelis-Menten standard reaction;
5. $DHAP \Leftrightarrow G3P$: fast equilibrium with $[DHAP] = 22*[G3P]$;

where Glc = glucose; G6P = glucose-6-phosphate; F6P = fructose-6-phosphate; FBP = fructose-1,6-biphosphate; DHAP = dihydroxyacetone-phosphate; G3P = glyceraldehyde-3-phosphate.

Glucose transport is usually not considered to have a regulatory role because the amount of glucose transported is in vast excess of what can be metabolized. The largest differences between the yeast and human β -cell models are with respect to the regulation of phosphofructokinase (PFK). In yeast, the regulation of this enzyme is handled by the negative feedback of ATP and positive feedback of either AMP or ADP (Termonia and Ross, 1981). The regulation of PFK in β -cells, on the other hand, is suggested to be controlled by the product of the reaction, FBP (Westermarck and Lansner, 2003). The different possibilities for allosteric regulation of the PFK enzyme are schematically presented in Figure 2.

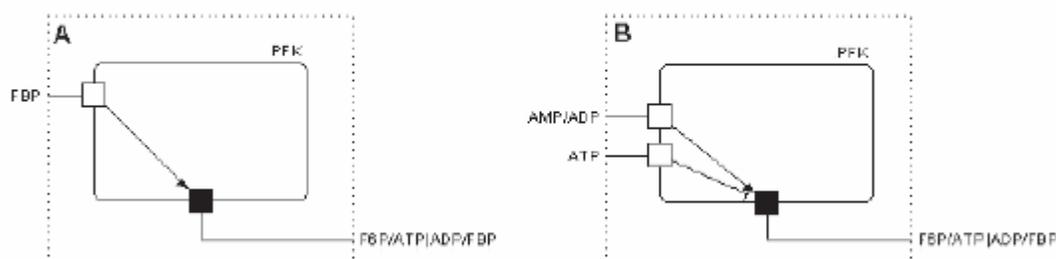


Figure 2. Allosteric control of phosphofructokinase (PFK) in (A) β -cells through positive feedback by the product fructose-1,6-biphosphate (FBP), and (B) in yeast through inhibition by ATP and activation by AMP/ADP. F6P = fructose-6-phosphate.

Time course simulations were carried out to evaluate the behavior of the system. Values were scanned using three different concentrations of glucose: 50% of normal concentration (called hypoglycemia in the case of β -cells), normal and 200% of normal concentration (hyperglycemia). The activities of the enzymes varied from 50 to 200% of their maximum rate. The influence of these variations was evaluated with respect to the pattern of oscillation of the system as well as to the concentrations of the different enzymatic products.

In order to evaluate a possible effect of oscillations on the cell's phosphorylation potential, the ATP/ADP ratio was calculated as well as the ratio between the quantity of molecules in the ATP-consuming part of the metabolic network (synthesis of F6P and FBP; Figure 1) and in the ATP-generating part (synthesis of 3-phosphoglycerate (3PG); Figure 1, and pyruvate (PYR), not shown) estimated as the ratio of F6P to PYR (in cases of oscillation the average value was used).

In the analysis of the model for β -cells, the ratio of ATP to ADP was not used since for this model a simplification suggests that this ratio would not affect the activity of the PFK enzyme (Westermarck and Lansner, 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Parameters controlling the oscillatory behavior

Our first approach was to analyze the models in search of the oscillatory controlling parameters (enzyme activities and metabolite concentrations) by modifying their values while leaving the rest of the model unchanged and by searching for qualitative modifications in the system's behavior. Once identified, their values were scanned to find the bifurcation points where the oscillatory behavior starts. The values found, as well as their effects, are presented in Tables 1 and 2.

Table 1. Analysis of variation of parameters for *Saccharomyces cerevisiae* glycolysis.

[Glc]	V_{GK}	V_{PFK}	$K_{FBP_GAP_FW}$	$T_{OSC}(F6P)$	[ATP]/[ADP] (average)	[F6P]/[PYR] (average)
1x	1x	1x	1x	25s	27.5	72.5
1x	1/2x	1x	1x	Steady state	20.5	57.0
1x	2x	1x	1x	25s	52.5	69.5
1x	1x	1/2x	1x	Steady state	22.5	74.0
1x	1x	2x	1x	16.7s	33.5	70.5
1x	1x	1x	1/2x	20s	34.5	72.5
1x	1x	1x	2x	Steady state	26.6	72.0
1/2x	1x	1x	1x	Steady state	20.0	55.2
1/2x	1/2x	1x	1x	Steady state	14.3	36.3
1/2x	2x	1x	1x	16.7s	26.0	70.0
1/2x	1x	1/2x	1x	Steady state	17.1	57.6
1/2x	1x	2x	1x	Steady state	23.4	53.0
1/2x	1x	1x	1/2x	Steady state	19.8	54.0
1/2x	1x	1x	2x	Steady state	20.1	55.7
2x	1x	1x	1x	17.8s	41.0	70.65
2x	1/2x	1x	1x	Steady state	24.8	68
2x	2x	1x	1x	27.8s	59.7	69.5
2x	1x	1/2x	1x	15.4s	31.7	76.8
2x	1x	2x	1x	25s	54.7	65.7
2x	1x	1x	1/2x	28.6s	51.5	70.0
2x	1x	1x	2x	11.5s	32.3	74.2

[Glc] stands for concentration of glucose, V_{GK} and V_{PFK} are the maximum reaction speeds for glucokinase (GK) and phosphofructokinase (PFK) enzymes. $K_{FBP_GAP_FW}$ is the forward reaction catalytic constant for the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. $T_{OSC}(F6P)$ is the inverse of the oscillation frequency of fructose-6-phosphate (F6P). [ATP]/[ADP] (average) is the average value of the ratio between the concentrations of ATP and ADP. [F6P]/[PYR] (average) is the average value of the ratio between the concentrations of F6P and pyruvate. Glucose concentration 1x stands for base concentration of 11 mM, 2x stands for twice the base concentration or 22 mM and 1/2x means half the base concentration or 5.5 mM. Base reaction speed for GK is 0.5 mM/s, double speed is 1 mM/s and half speed is 0.25 mM/s. Base reaction speed for PFK is 1.5 mM/s, double speed is 3 mM/s and half speed is 0.75 mM/s. Base value for reaction constant $K_{FBP_GAP_FW}$ is 1/s, double value is 2/s and half value is 0.5/s.

Table 2. Analysis of variation of parameters for β -cell glycolysis.

[Glc]	V_{GK}	V_{PFK}	V_{FBA}	$T_{osc}(F6P)$	[F6P] (average)	[FBP] (peak value)	[FBP] (peak width)
1x	1x	1x	1x	1300s	0.5 mM	1.55 mM	250s
1x	1/2x	1x	1x	Steady state	0.91 mM	$\approx 1 \mu\text{M}$	Steady state
1x	2x	1x	1x	875s	0.5 mM	1.9 mM	250s
1x	1x	1/2x	1x	Steady state	1.45 mM	2 μM	Steady state
1x	1x	2x	1x	1000s	0.4 mM	1.8 mM	125s
1x	1x	1x	1/2x	1125s	0.4 mM	2 mM	500s
1x	1x	1x	2x	Steady state	1.2 mM	$\approx 1 \mu\text{M}$	Steady state
1/2x	1x	1x	1x	Steady state	0.9 mM	$\approx 1 \mu\text{M}$	Steady state
1/2x	1/2x	1x	1x	Steady state	0.7 mM	≈ 0	Steady state
1/2x	2x	1x	1x	1250s	0.5 mM	1.5 mM	250s
1/2x	1x	1/2x	1x	Steady state	1.2 mM	$\approx 1 \mu\text{M}$	Steady state
1/2x	1x	2x	1x	Steady state	0.6 mM	$\approx 1 \mu\text{M}$	Steady state
1/2x	1x	1x	1/2x	1750s	0.4 mM	1.8 mM	360s
1/2x	1x	1x	2x	Steady state	0.9 mM	≈ 0	Steady state
2x	1x	1x	1x	880s	0.5 mM	1.7 mM	250s
2x	1/2x	1x	1x	Steady state	1 mM	$\approx 1 \mu\text{M}$	Steady state
2x	2x	1x	1x	750s	0.6 mM	2.2 mM	750s
2x	1x	1/2x	1x	1000s	0.9 mM	0.6 mM	250s
2x	1x	2x	1x	650s	0.4 mM	1.9 mM	130s
2x	1x	1x	1/2x	1125s	0.4 mM	2.2 mM	750s
2x	1x	1x	2x	Steady state	1.3 mM	$\approx 1 \mu\text{M}$	Steady state

[Glc] stands for concentration of glucose, and V_{GK} and V_{PFK} are the maximum reaction speeds for glucokinase (GK) and phosphofructokinase (PFK) enzymes. V_{FBA} is the maximum speed of the reaction catalyzed by the enzyme fructose-biphosphate aldolase (FBA). $T_{osc}(F6P)$ is the inverse of the oscillation frequency of fructose-6-phosphate (F6P). [F6P] (average) is the average value of F6P. [FBP] (peak value) and [FBP] (peak width) are the values of the peak concentration of fructose-1,6-biphosphate (FBP) and its width, respectively. Glucose concentration of 1x is the base level of 10 mM, 2x stands for 20 mM and 1/2x means 5 mM. Base reaction speed for GK is 0.01 mM/s, the double value is 0.02 mM/s and the half value is 0.005 mM/s. The 1x, 2x and 1/2x values for V_{PFK} are 0.1, 0.2 and 0.05 mM/s, respectively. The 1x, 2x and 1/2x values for V_{FBA} are 0.025, 0.05 and 0.013 mM/s, respectively.

In *S. cerevisiae*, these results show that the oscillatory behavior depends on Glc concentration, on glucokinase (GK) activity, on the PFK maximum speed, as well as on the value of the forward reaction constant of the reversible reaction between FBP and G3P.

In human β -cells, oscillations are only possible if the concentration of Glc and the maximum reaction speeds of the enzymes PFK and GK are within a specific interval of values. This seems to indicate that the oscillatory behavior of glycolysis in β -cells is under selective pressure.

The differences in the control of glycolysis lead to two different flux dynamics in the system: in β -cells glycolysis behaves as a series of peaks (Figure 3), while in yeast it is more like a smooth-controlled oscillation (Figure 4).

Several exploratory conclusions may be drawn by analyzing Tables 1 and 2. Regarding robustness, it is noteworthy that in yeast the glycolytic system is focused on the maintenance of energy levels in the cell (negative regulation of PFK by ATP) and thus the ability to limit the conversion of glucose into energy in situations where it is not needed. Therefore, it would be more advantageous to store it or deviate the flux towards other cell cycle activities such as cell division. If a similar situation occurred in β -cells, it would instead lead to a burst in PFK activity

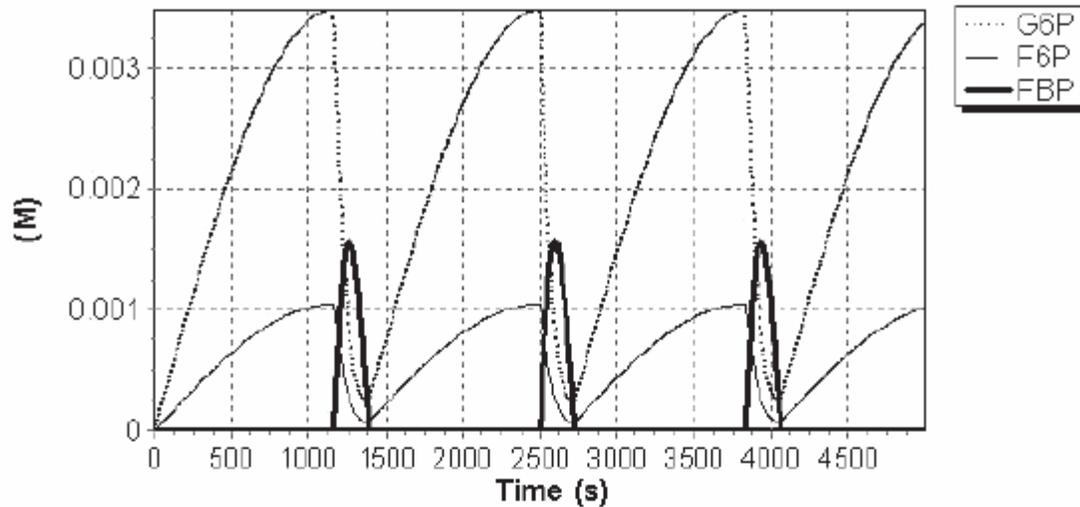


Figure 3. Intra-cellular concentration of metabolites in β -cells (G6P, F6P and FBP) in M (molar) versus time with a glucose stimulatory concentration of 10 mM and a period of oscillation around 20 min. Notice the spikes of FBP concentration in contrast to the smooth waveform in yeast (Figure 4). G6P = glucose-6-phosphate; F6P = fructose-6-phosphate; FBP = fructose-1,6-biphosphate.

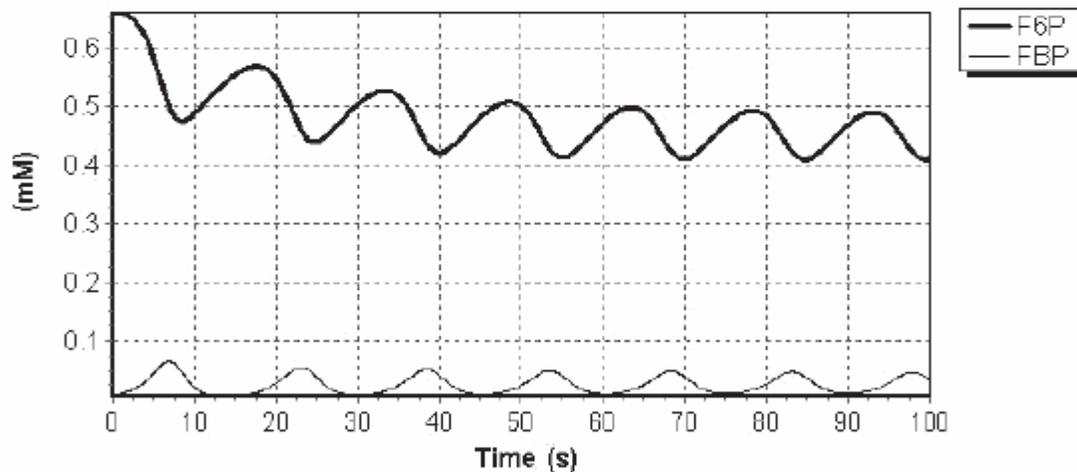


Figure 4. Intra-cellular concentration of metabolites in yeast (F6P and FBP) in mM (millimolar) versus time with a glucose stimulatory concentration of 11 mM and a period of oscillation around 10 s. F6P = fructose-6-phosphate; FBP = fructose-1,6-biphosphate.

that would tend to consume the extra supply of glucose, a strategy that shows the commitment of these cells to controlling blood glucose levels and a particular specialization in sensing high levels of glucose.

Both in yeast and β -cells, decreases in the activity of the enzymes GK and PFK lead to loss of oscillations and reduction of flux, but increases in the activity of GK in both cells are

buffered up to a certain level (5 times in β -cell and 1000 times in yeast), which means that mutations increasing GK activity in yeast would not lead to a noticeable modification in metabolism.

A decrease in glycolytic activity after a 4-fold overexpression of GK has been observed experimentally in β -cells (Wang and Iynedjian, 1997), thus validating our simulation results. The 5-fold increase in GK activity directs the metabolic flow to a steady state with a flux lower than that observed in hypoglycemic situations, an effect that seems to be due to an increase in the frequency of oscillation of the product FBP up to a point where the system stops responding.

Metabolic control analysis

A control coefficient is defined as the ratio between the change in the log values for the reaction's flux and the change in the log values for the enzyme activity. A control coefficient of 1 means that a change in the activity of that enzyme (and thus on its maximum reaction speed) will lead to a change in the metabolic pathway flux of the same magnitude.

In order to identify which enzyme had the greatest influence on the reaction flow, a metabolic control analysis was performed with the enzymes GK and PFK under different conditions of glucose concentration and GK and PFK activities. Even though metabolic control analysis was originally designed for the study of steady-state metabolic fluxes, in this study we used the average value of the metabolites in the case of oscillatory behaviors. The procedure to obtain the control coefficients was to impose a variation of 10% on the enzyme activities and to determine the variation of the average concentration of FBP since this metabolite is produced immediately after the two enzymes studied. The results are presented in Tables 3 and 4.

Table 3. Analysis of control coefficients of enzymes GK and PFK in yeast.

[Glc]	V_{GK}	V_{PFK}	CC_{GK}	CC_{PFK}
1x	1x	1x	0.88	0.03
1x	1/2x	1x	0.79	0.04
1x	2x	1x	0.95	0.03
1x	1x	1/2x	0.88	0.03
1x	1x	2x	0.88	0.03
1/2x	1x	1x	0.80	0.03
1/2x	1/2x	1x	0.72	0.05
1/2x	2x	1x	0.88	0.03
1/2x	1x	1/2x	0.80	0.04
1/2x	1x	2x	0.79	0.03
2x	1x	1x	0.94	0.03
2x	1/2x	1x	0.87	0.03
2x	2x	1x	0.99	0.04
2x	1x	1/2x	0.94	0.03
2x	1x	2x	0.94	0.04

[Glc] stands for concentration of glucose, and V_{GK} and V_{PFK} are the maximum reaction speeds for glucokinase (GK) and phosphofructokinase (PFK) enzymes. CC_{GK} and CC_{PFK} are the control coefficients of GK and PFK, respectively (non-dimensional). Concentrations of glucose of 1x, 2x and 1/2x are 11, 22 and 5.5 mM, respectively. The values of 1x, 2x and 1/2x of V_{GK} are of 0.5, 1 and 0.25 mM/s, respectively. The values of 1x, 2x and 1/2x for V_{PFK} are of 1.5, 3 and 0.75 mM/s, respectively.

Table 4. Analysis of control coefficients of enzymes GK and PFK in β -cell.

[Glc]	V_{GK}	V_{PFK}	CC_{GK}	CC_{PFK}
1x	1x	1x	0.43	-1.47
1x	1/2x	1x	4.05	2.92
1x	2x	1x	1.48	0.29
1x	1x	1/2x	41.04	1.79
1x	1x	2x	1.91	-0.71
1/2x	1x	1x	1.28	0.09
1/2x	1/2x	1x	1.39	0.25
1/2x	2x	1x	0.47	-0.05
1/2x	1x	1/2x	1.45	0.24
1/2x	1x	2x	1.23	0.11
2x	1x	1x	2.49	0.68
2x	1/2x	1x	1.34	0.12
2x	2x	1x	0.99	-0.15
2x	1x	1/2x	3.02	1.48
2x	1x	2x	1.93	0.57

[Glc] stands for concentration of glucose, V_{GK} and V_{PFK} are the maximum reaction speeds for glucokinase (GK) and phosphofructokinase (PFK) enzymes. CC_{GK} and CC_{PFK} are the control coefficients of GK and PFK, respectively (non-dimensional). Concentrations of glucose of 1x, 2x and 1/2x are 10, 20 and 5 mM, respectively. The values of 1x, 2x and 1/2x of V_{GK} are 0.01, 0.02 and 0.005 mM/s, respectively. The values of 1x, 2x and 1/2x for V_{PFK} are 0.1, 0.2 and 0.05 mM/s, respectively.

A comparison of Tables 3 and 4 shows that in yeast most of the control of the metabolic pathway resides in the enzyme GK, while in β -cells this control seems to alternate between the two enzymes (GK and PFK) depending on the conditions considered. This different behavior suggests that a drug treatment or genetic engineering of *S. cerevisiae* could focus solely on the enzyme GK, while modifications of the β -cell glycolytic pathway would require a much more detailed intervention since the enzyme controlling the reaction is not always the same. Similar studies have been performed for host-pathogen treatment strategies (Bakker et al., 1999, 2000).

Experimental studies in β -cells, however, state that the control coefficient of GK should be around 1 even in situations up to 8 times the speed of reaction of wild types. This suggests that the currently accepted model for β -cells may not be correct when large variations in GK kinetics are considered (Wang and Iynedjian, 1997).

The comparison of glycolysis models of two different organisms, yeast and human β -cell, leads to the interpretation that despite the different constant values and the different mechanisms of feedback control of the PFK enzyme both systems keep oscillations coupled to the concentration of glucose available and both are fit to keep their oscillations at higher concentrations of glucose as previously determined by experimentation (Wang and Iynedjian, 1997), while neither can maintain the oscillations at concentrations 50% below those commonly used in experiments as normal ($\cong 10$ mM).

Both systems are also fragile in terms of the enzymatic values, since both lose oscillations in case of a 50% reduction in the maximum activity of GK or PFK or a 100% increase in the forward direction of the reaction FBP to G3P.

Intriguingly, while yeast can handle increases of up to 1000 times in the speed of GK, β -cells tolerate only a 5-fold increase. An increase of more than 5-fold in the activity of GK in β -cells will lead to a flux smaller than in non-oscillatory conditions with a smaller ATP production and thus smaller peaks of insulin secretion. A lowering of blood insulin levels may lead to a deregulation of glucose homeostasis. Therefore, this result predicts that β -cells may have evolved a tight mechanism for controlling GK levels. Indeed, β -cells have post-transcriptional regulation of GK based on its compartmentalization within the cell (Rolland et al., 2001). It seems that at low levels of glucose, part of GK is sequestered in an inactive state in the nucleus, and as the level of glucose increases these inactive molecules of GK are released and activated. This mechanism has two interesting features, the first is that GK activity (V_{GK}) decreases when there is a lower concentration of glucose and thus its control coefficient becomes even higher in these situations than proposed in the current models. The second feature is that this allows the cell to respond quickly to an increase in the concentration of glucose since the sequestration of GK is mediated by phosphorylation, and thus its re-activation time would be comparable to that of the reaction GK catalyzes. Interestingly, this dynamic is similar to the behavior of PFK itself, because GK increases its catalytic activity (through release of sequestered GK from the nucleus) until glucose is depleted, in which case GK would again be sequestered in the nucleus and glucose concentration would again rise.

This manuscript illustrates a strategy of comparing related metabolic pathways by means of computational simulations as a useful approach to pose new hypotheses regarding control mechanisms in biological systems.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. José Manoel Balthazar, from UNESP (Rio Claro, SP, Brazil), for invaluable insights. We thank Thomas Silva for kindly providing his model for glycolysis and Flavia Fuchs de Jesus for revision of the manuscript. A.S. Silva was the recipient a graduate fellowship from CAPES.

Supplemental material

The models used in this article are freely available for both Matlab and SBW/Jarnac platforms at <http://www.i-genics.com>.

REFERENCES

- Bakker BM, Walsh MC, ter Kuile BH, Mensonides FI, et al. (1999). Contribution of glucose transport to the control of the glycolytic flux in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10098-10103.
- Bakker BM, Westerhoff HV, Opperdoes FR and Michels PA (2000). Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106: 1-10.
- Burns JA and Kacser H (1973). The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27: 65-104.
- Hofmeyr JH and Cornish-Bowden A (1997). The reversible Hill equation: how to incorporate cooperative enzymes into metabolic models. *Comput. Appl. Biosci.* 13: 377-385.
- Kitano H (2004). Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4: 227-235.
- Rolland F, Winderickx J and Thevelein JM (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26: 310-317.

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' (I found it!) but, 'That's funny' ...”

Isaac Asimov (1920 - 1992)

6

Considerações Finais

Conclusões Gerais

Os dois trabalhos de simulação tumoral desta tese mostram as vantagens de uma abordagem quantitativa, com dados precisos, a fim de identificar possíveis mecanismos que conferem robustez ao tumor e contribuem para sua evolução. Com o uso de ferramentas computacionais e dados quantitativos da literatura, é possível criar modelos teórico-quantitativos que podem ser usados para validar teorias sobre fenômenos biológicos assim como extrapolar conclusões e testá-las, integrando assim a abordagem de modelagem computacional ao processo de pesquisa científica.

Conclusões do Estudo de Modelagem de DCIS

O primeiro estudo realizado neste projeto consistiu em um modelo computacional quantitativo do desenvolvimento de carcinoma in situ dentro de um duto epitelial. O objetivo deste estudo foi o de determinar quais os valores fenotípicos mínimos que levariam um tumor em desenvolvimento neste ambiente a se tornar invasivo.

Os resultados mostraram que existe um limiar tanto para resistência a acidez como para aumento do metabolismo glicolítico, que determina se o tumor poderá ou não invadir o tecido saudável. Estes limiares consistiram em aumento do consumo e metabolismo de glicose em 9 vezes, e em uma resistência a pHs de 6.7 para quiescência e 6.1 para morte celular.

Um outro resultado importante deste primeiro estudo foi a obtenção de um mapa com diversos fenótipos de DCIS (distribuição espacial da população com diferentes fenótipos) que buscamos identificar e comparar com as morfologias clássicas usadas para classificação de espécimes clínicos. Encontramos correspondências com duas morfologias conhecidas, comedo e

sólido em nossas simulações, a primeira correspondendo a cenários com altos valores de hiperglicólise (aumentos de mais de 50 vezes), e a segunda correspondendo a aumentos moderados do fluxo glicolítico (cerca de 10 vezes). Em ambos os casos é necessário que haja um aumento na resistência a acidez suficiente para que o tumor atravesse o limiar de invasão.

Conclusões do Estudo do Efeito de Tampão em Tumores

O segundo estudo desta tese consistiu na validação da hipótese de que a administração de bicarbonato de sódio na água, que leva ao aumento da concentração deste tampão no sangue, poderia reduzir o gradiente de acidez em micrometástases. O aumento do pH no interior de tumores, segundo a teoria de Invasão Mediada por Acidez, poderia reduzir a capacidade das micrometástases invadirem o tecido saudável, e colonizar órgãos do corpo longe do tumor original. Dessa forma, caso essa hipótese pudesse ser provada em um modelo *in silico*, ela reforçaria uma proposta de tratamento simples e barato que auxiliaria no combate ao câncer.

O modelo computacional criado consistiu em uma pequena esfera de células tumorais, envolvidas em um tecido saudável vascularizado. No modelo proposto, o pH dos vasos sanguíneos permanecia inalterado, apesar do aumento da concentração de bicarbonato no sangue (de acordo com a hipótese inicial). Os resultados mostraram que o aumento da concentração de bicarbonato no sangue, nas quantidades propostas na hipótese inicial, é teoricamente capaz de aumentar o pH no interior do tumor, reduzindo assim o gradiente de acidez entre o tumor e o tecido saudável.

Mostrou-se também que o coeficiente de difusão do tampão usado não é o fator mais importante para sua eficiência e que o fato do bicarbonato gerar dióxido de carbono como subproduto de seu efeito tampão não afeta sua capacidade de reduzir a acidez de tumores.

O fator mais importante para um tampão usado especificamente para uma terapia de acidez em micrometástases, é o pKa, que produzirá melhores resultados para valores próximos de 7.

Conclusões do Estudo da Regulação Glicólise em *Cerevisiae* e Células Beta

Finalmente, no estudo de comparação do metabolismo glicolítico de células beta e levedura, pôde-se observar que a estratégia de regulação dessa via metabólica na célula

pancreática é mais frágil a mutações que afetem a atividade das enzimas principais, enquanto que na levedura esse fluxo é mais robusto tanto a perturbações internas (mutações), como externas (concentração extracelular de glicose).

Estas conclusões foram obtidas através da simulação da glicólise nesses dois organismos, em condições em que a atividade das enzimas eram maiores ou menores do que em condições padrão (conforme levantado da literatura).

A variação do fluxo final em função da atividade de cada enzima, definida como sendo coeficiente de controle da enzima, foi determinada e armazenada em uma tabela para cada organismo.

O resultado final mostrou que o coeficiente de controle das principais enzimas da glicólise na levedura variam muito pouco com alterações na atividade enzimática, enquanto que na célula beta esses valores são muito sensíveis a variações da atividade das principais enzimas.

Próximos Passos e Perspectivas Futuras

Os próximos passos neste projeto serão o uso de modelos experimentais *in vitro*, como esferóides e acini, para testar hipóteses sobre o desenvolvimento tumoral em dutos epiteliais, como as testadas no modelo computacional de DCIS. Estes modelos podem ser usados para se testar hipóteses, como o efeito de tampões no pH de tumores em um ambiente controlado, com um esferóide de células tumorais em um meio com pO_2 , pCO_2 , pH e concentração de metabólitos mantidos constantes em biorreatores.

O uso de acini (Figura 19), em conjunto com irradiação das células tumorais, poderia ser usado para produzir uma população heterogênea de células semelhante ao modelo de DCIS e testar dessa forma se ocorre um processo de seleção de fenótipos como proposto teoricamente.

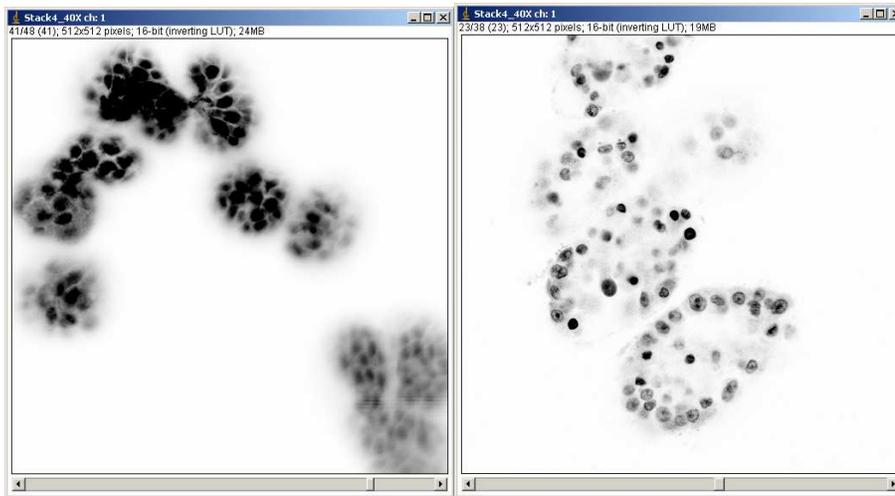


Figura 19 Desenvolvimento de cultura de células desde uma única célula, passando por uma esfera maciça e em seguida a uma esfera oca após processo de apoptose em seu interior. À esquerda a passagem no dia 8, à direita no dia 16, magnificações de 40 vezes.

A simulação computacional de modelos biológicos, como proposta neste trabalho, requer não apenas a implementação de ferramentas capazes de calcular interações complexas entre centenas de milhares de células em um microambiente, mas também consite no levantamento de dados quantitativos confiáveis da literatura. O processo de revisão bibliográfica é provavelmente a etapa mais difícil de um estudo teórico-quantitativo como os aqui propostos, em função das grandezas (concentrações, coeficientes de difusão, atividade enzimática, etc.) usadas no estudo serem especificadas em dimensões e condições distintas em seus artigos de origem.

Um passo importante rumo a uma maior eficiência na criação de modelos quantitativos será a homogeneização da representação de dados experimentais, assim como uma integração entre dados obtidos de fontes distintas, como expressão de um gene através de microarrays e a curva de atividade enzimática e regulação da enzima codificada por este gene.

Somente com dados experimentais quantitativos confiáveis seremos capazes de desenvolver modelos capazes de representar de maneira fidedigna fenômenos complexos como o câncer, e propor alternativas viáveis para o tratamento desta doença.

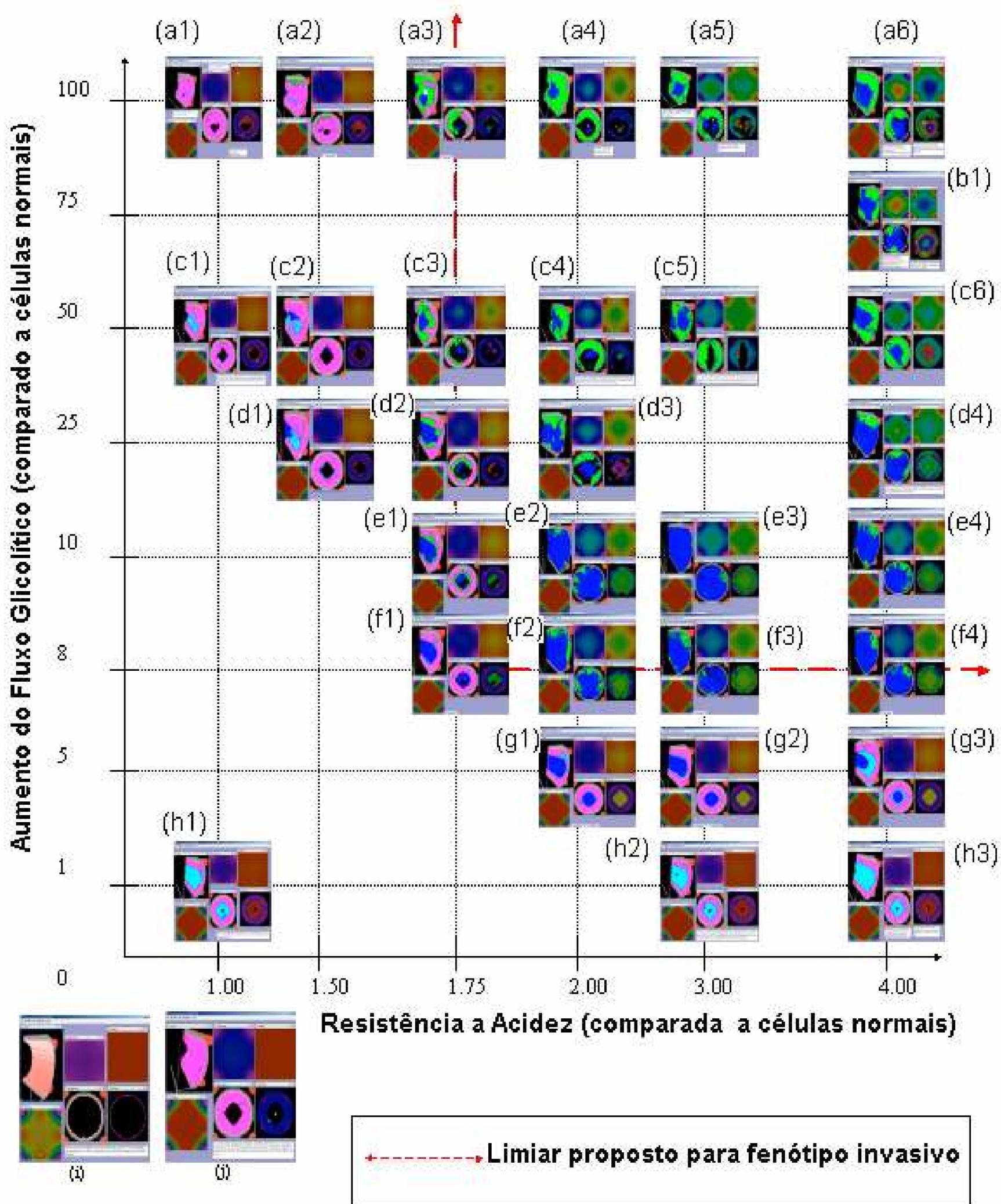


Figura 4 Mapa fenotípico do desenvolvimento de tumores em função dos valores dos fenótipos de hiperglicólise e de resistência a acidez. No eixo das ordenadas temos aumentos até 100 vezes no fluxo glicolítico e no eixo das abscissas temos aumento de até quatro vezes da máxima concentração de H^+ tolerada pela célula.

Apêndice B

Especificação Geral do Software Tissue Simulator

Funcionalidades

A ferramenta TSim (Tissue Simulator, www.i-genics.com) foi desenvolvida com o objetivo de simular modelos com centenas de milhares de células, levando em consideração fenômenos extracelulares, como difusão de espécies químicas, e intracelulares como metabolismo, morte e duplicação celular. A fim de atingir este objetivo, a ferramenta foi equipada com as seguintes funcionalidades :

- Criação de modelos através de procedimentos manuais em uma interface gráfica;
- Criação de modelos através de automação usando-se funções pré-estabelecidas de uma biblioteca de edição de modelos;
- Armazenar modelos em arquivos e recuperá-los;
- Calcular simulações e armazená-las em arquivos;
- Recuperar simulações de arquivos e rodá-las na interface gráfica;
- Gerar relatórios com dados de simulações, tais como concentrações de metabólitos, número de células em um determinado volume, etc.;
- Permitir a visualização tridimensional do modelo simulado;
- Permitir a visualização detalhada em 2D de camadas do modelo simulado, incluindo relatório com os valores das propriedades de cada célula do modelo.

Interface gráfica

A interface gráfica principal do Tissue Simulator consiste em uma área de trabalho com um menu que, quando acionado, exibe janelas com funções específicas, conforme a Figura 20:

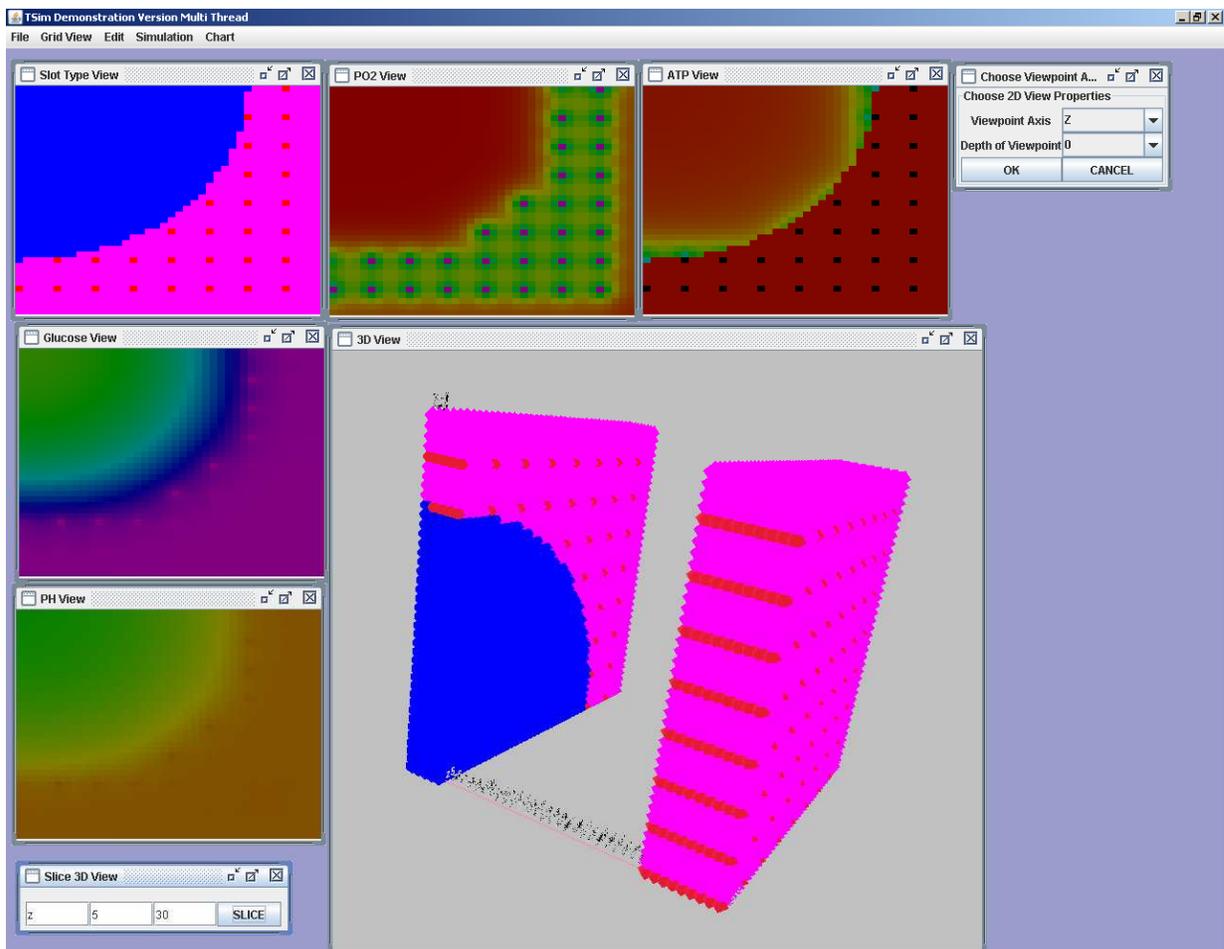


Figura 20 Tela principal de TSim. Neste exemplo são visíveis janelas mostrando uma visão bidimensional com as propriedades de uma camada do modelo, assim como uma visão 3D em que parte do modelo foi tornada invisível para que o usuário possa ver o interior do volume.

O menu principal da ferramenta permite o gerenciamento de arquivos de simulação, invocar janelas com visões do modelo simulado, editar o modelo, computar uma nova simulação ou rodar uma simulação existente, como mostrado na Figura 21.

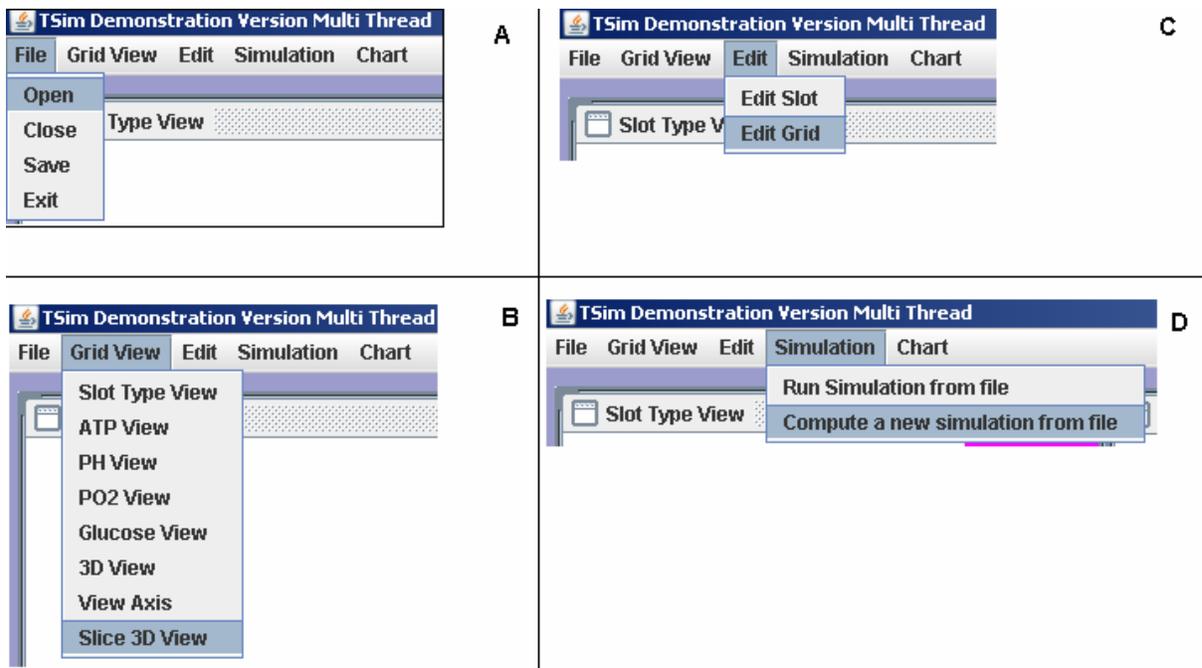


Figura 21 Menu principal do TSim. Em A, as funcionalidades básicas de abertura (Open) e armazenamento de arquivo (Save). Em B, as janelas com visões 2D e 3D do modelo: Slot Type View (visão 2D da distribuição fenotípica), ATP View (visão 2D da produção de ATP), PH View (visão 2D representando a acidez no meio), PO2 View (visão 2D da pressão parcial de oxigênio no meio), Glucose View (visão 2D da concentração de glicose no meio extracelular) e 3D View (visão 3D com posição das células e seus fenótipos). Em C a janela de edição do modelo: Edit Grid (edição das dimensões do modelo) e Edit Slot (edição das propriedades de uma célula em particular). Em D, os dois comandos que permitem rodar uma simulação existente de forma interativa na interface gráfica (Run Simulation from file) ou calcular uma nova simulação (Compute a new simulation from file).

Além das funções básicas de exibição de janelas com informações sobre o modelo simulado, há duas opções no menu 'Grid View' na Figura 21B :

- View Axis, esta função permite mudar o eixo das visões 2D além de mudar a profundidade da camada mostrada por essas visões ;
- Slice 3D View, esta função permite tornar parte do modelo na visão 3D, invisível. Isto permite ao usuário ver camadas do modelo que de outra forma seriam cobertas por outras partes do modelo ;

As simulações na ferramenta TSim são calculadas passo a passo, sempre em função dos dados do passo anterior, e armazenados em um arquivo semelhante a um filme composto de muitos instantâneos. Uma vez computada e armazenada, uma simulação pode ser carregada e exibida passo a passo ou por amostragem.

Implementação

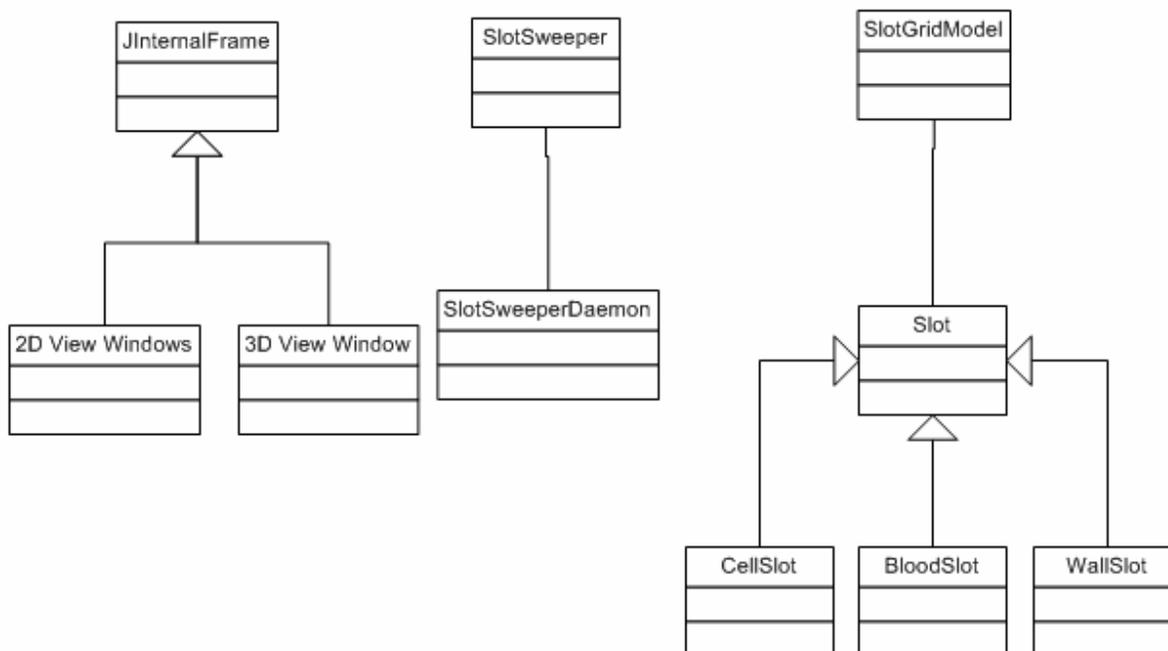


Figura 22 Estrutura de classes usadas para funcionamento do TSim: à esquerda as janelas com visões 2D e 3D são derivadas da classe JInternalFrame. No centro, a classe SlotSweeper é responsável pelo processamento de modelos no cálculo de simulações, em computadores com múltiplos processadores essa classe pode criar mais de um objeto da classe SlotSweeperDaemon para dividir as tarefas em múltiplos threads. À direita, a estrutura de dados básica do software consiste na classe Slot, que pode representar uma célula, uma secção de vascularização ou uma parede. Essa estrutura básica, Slot, está armazenada em uma matriz 3D implementada na classe SlotGridModel.

Apesar de ser composto por várias dezenas de classes, o esqueleto principal da ferramenta TSim está representado na Figura 22. Este esqueleto está dividido em três partes fundamentais, a primeira, à esquerda, consiste nas classes cuja funcionalidade é a visualização de dados. A segunda parte, no centro da figura, consiste nas classes cuja função é ler ou modificar as propriedades da estrutura de dados do modelo simulado. Finalmente, a terceira parte desta ferramenta consiste nas classes usadas para se armazenar os dados do modelo, na Figura 22 estas classes estão à direita.

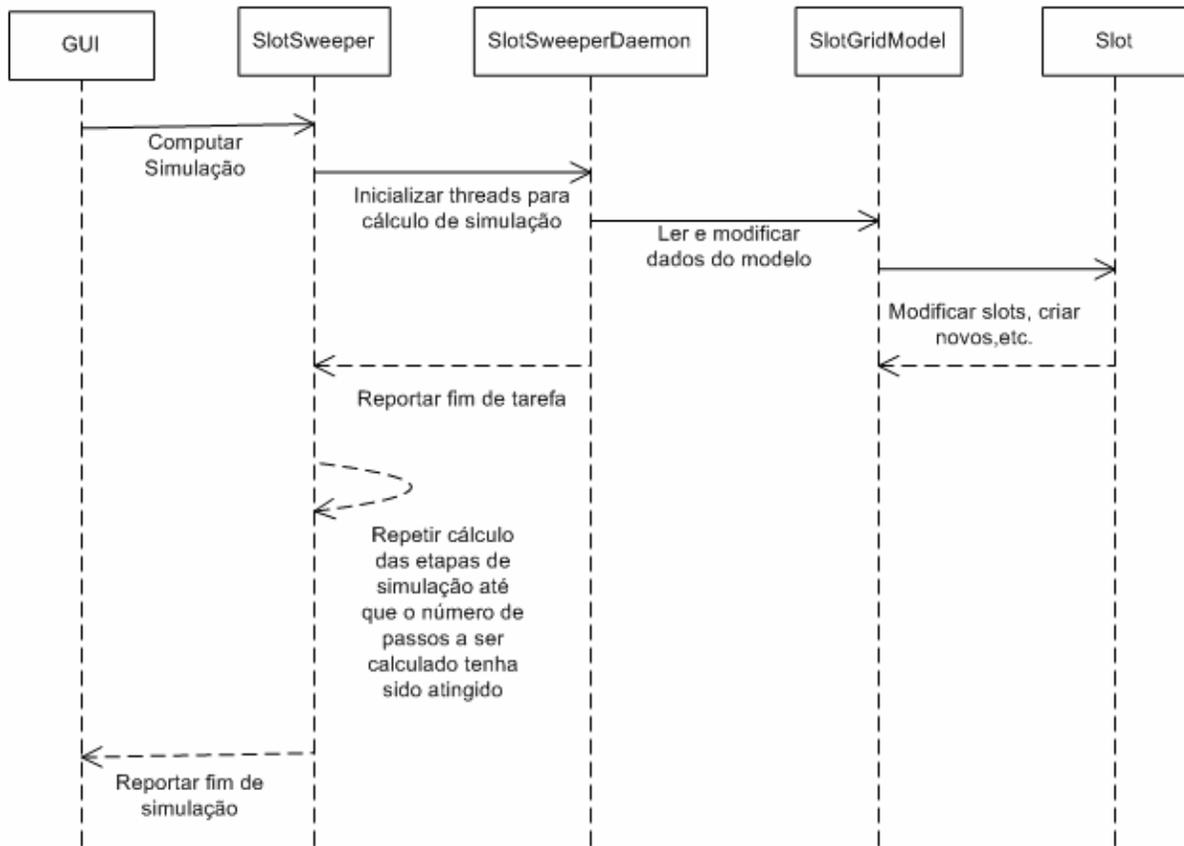


Figura 23 Exemplo de interação entre as diferentes classes que formam o esqueleto funcional do TSim: o comando para se calcular uma nova simulação é enviado através da interface gráfica (GUI, graphical user interface) para um objeto da classe SlotSweeper. Este objeto invoca quantas instâncias de objetos da classe SlotSweeperDaemon quantos forem os processadores disponíveis no sistema, lhes atribuindo parte do modelo a ser simulado. Cada uma dessas instâncias lê e altera os dados do modelo de acordo com as regras da simulação. Uma vez que todos os threads tenham terminado suas respectivas tarefas, o objeto da classe SlotSweeper invoca novo passo no cálculo da simulação ou retorna mensagem à interface gráfica relatando fim do cálculo da simulação.

Uma especificação formal da estrutura e funcionamento das classes que compõem o TSim será detalhada em um artigo ainda a ser elaborado, mas na Figura 23 pode-se ver um exemplo de como a separação de interface gráfica, controle e estrutura de dados, permite o uso do potencial máximo do computador em que a ferramenta é rodada, permitindo uma atualização em tempo real do progresso da evolução da simulação ou em modo de batch (em atualização da interface gráfica), caso a capacidade de processamento da máquina não permita o modo interativo.

Limitações da ferramenta e próximos passos

Apesar dos resultados encorajadores obtidos pelos modelos apresentados neste trabalho, é certo que há muitas limitações no que se pode representar na ferramenta TSim:

- Dutos mamários estão sujeitos a pressão exercida pelo tecido em volta, o que leva o duto a colapsar. Esta deformação altera a simetria do duto (passando de uma secção circular para elíptica) e pode levar a resultados distintos dos aqui encontrados ;
- Tumores em expansão estão sujeitos a pressão exercida pelo tecido em volta, esta pressão pode alterar a difusão de espécies em direção ao tumor ou advindas dele. Esse efeito pode levar à redução da eficácia da difusão de substâncias como bicarbonato em micrometástases, como as representadas neste estudo ;
- Angiogênese é um processo que pode ser provocado por tumores, levando a um aumento na disponibilidade de oxigênio e nutrientes à massa tumoral. Essa vascularização, por outro lado, é imperfeita, em parte, devido à pressão em volta do tumor que leva os vasos a colapsarem e perderem eficiência. A fim de se representar tumores vascularizados, é necessário implementar uma representação mais verossímil de vasos sanguíneos do que a desenvolvida nesta ferramenta ;
- A duplicação celular na ferramenta TSim, ocorre apenas se houver espaço livre em torno da célula em divisão. Em um modelo mais realista, um componente de pressão externa agiria comprimindo todas as células no tumor, forçando a célula em divisão a se reposicionar no espaço à medida que se duplica ;
- Nesta ferramenta, as células estão imóveis no espaço tridimensional, em um modelo realista, células poderiam se mover, seja invadindo tecidos, ou mesmo se soltando do tecido original e flutuando no fluído intersticial, até aderir novamente ao tecido em outra localidade.

Estas funcionalidades foram em parte implementadas em outras ferramentas comerciais ou mesmo disponíveis gratuitamente na internet, e serão gradualmente implementadas no TSim à medida que modelos mais complexos forem desenvolvidos, como por exemplo, tumores vascularizados. É importante observar que a cada nova dinâmica implementada no modelo

(pressão, motilidade celular, compressibilidade e deformação do tecido) maiores serão o tempo e o poder computacional requeridos para se efetuar a simulação.

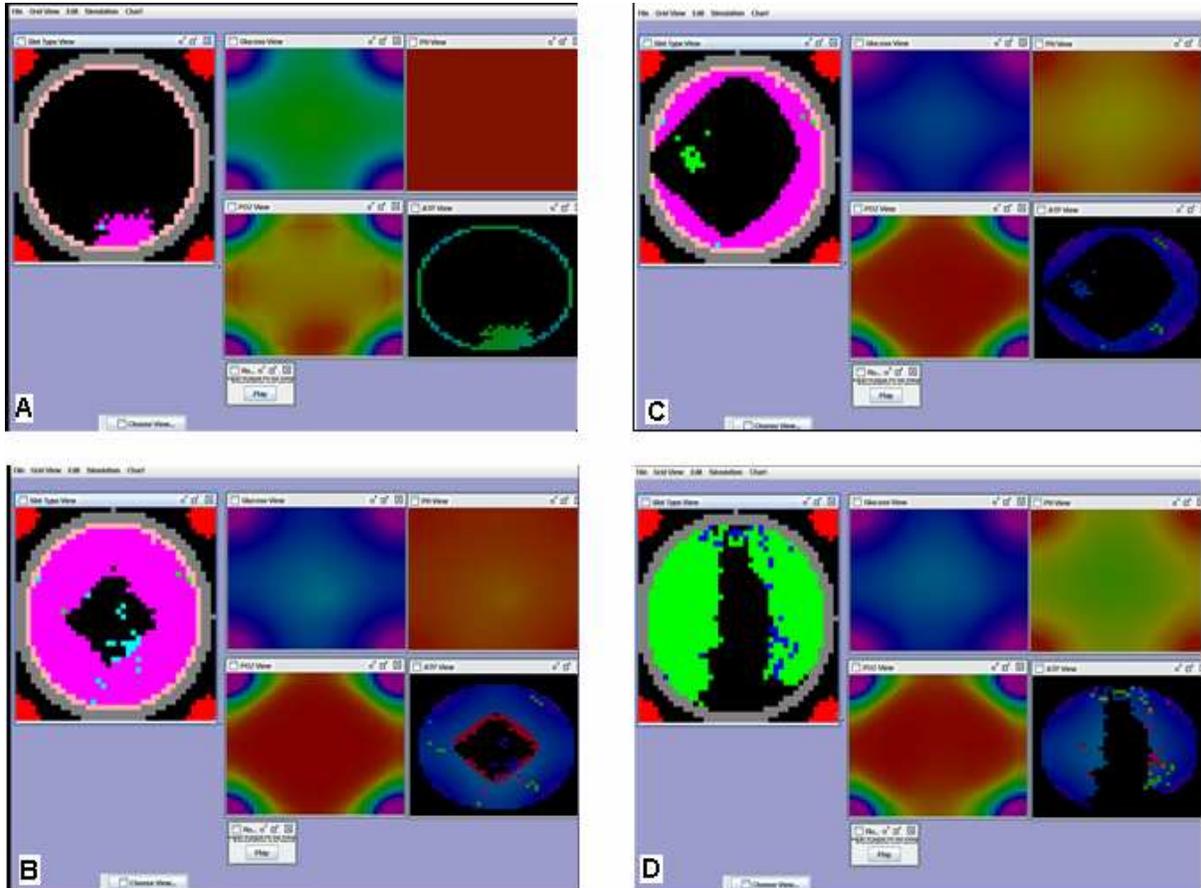


Figura 24 Visão bidimensional de uma secção de duto epitelial simulando o desenvolvimento de um DCIS. Em A, uma massa de células hiperplásicas (rosa choque) se desenvolve a partir da camada de células epiteliais. Em B, a população de células hiperplásicas atinge o limiar de energia para sobrevivência devido à restrição de oxigênio. Esta parece ser a configuração final de equilíbrio, porém células em outras camadas do duto obtiveram fenótipos (hiperglicólise e resistência a acidez) que as permitiram colonizar as demais regiões do duto (C e D).

Um último fator importante a ser considerado em simulações como as apresentadas neste trabalho, é a necessidade de se avaliar o mínimo modelo capaz de representar o fenômeno em estudo. Na Figura 24, podemos ver um exemplo em que um modelo bidimensional não seria capaz de representar corretamente o desenvolvimento de um DCIS. Na simulação em questão, uma população com fenótipos que lhes conferiam vantagem seletiva sobre as demais células do tumor ocupam todo o nicho do duto. Caso o modelo fosse uma representação bidimensional, o estado final desta simulação seria o mostrado na Figura 24B e não o da Figura 24D.

Apêndice C

Implementação do Algoritmo de Difusão no Software TSim

Introdução

A difusão de espécies químicas foi aproximada com o mesmo algoritmo que Smallbone (2007), ou seja, através de uma aproximação usando diferenças finitas ao invés de um sistema de equações diferenciais.

Uma segunda simplificação foi usada a fim de se evitar resolver o sistema de equações lineares obtido no passo anterior (consistindo na inversão de uma matriz esparsa com 64.000 linhas e igual número de colunas, composta por seis diagonais) a cada geração: estimamos que após 50 passos metabólicos (500 passos de cálculo de difusão) o sistema teria atingido o equilíbrio entre metabolismo e difusão. As simulações realizadas neste projeto de tese atingiram o equilíbrio entre metabolismo celular e difusão de espécies após cerca de 20 gerações, dessa forma, nossa simplificação não compromete os resultados obtidos.

A seguir reproduzimos a seção do apêndice matemático do artigo do capítulo 4 em que é descrito o processo de solução da difusão no software TSim:

Implementação

The diffusion of species in this model was calculated based on Fick's first law, which relates the diffusion flux through a surface to the difference of concentration of species in volumes separated by this surface (equation S1).

$$J = -D \times \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad (S1)$$

Where J is the diffusion flux expressed as $\frac{mol}{\mu m^2 \times s}$, D is the diffusion coefficient in $\frac{\mu m^2}{s}$

and ϕ is the concentration of a species in $\frac{mol}{\mu m^3}$.

Two cubic adjacent volumes in this computer model share a contact surface $S = 25\mu m \times 25\mu m$, the distance between centers the two volumes is $d = 25\mu m$ and the time step used in this calculation is $\Delta t = \frac{1}{10}s$. Under these conditions, the variation in concentration of the two volumes due to diffusion can be approximated as being the product of the flux through the contact surface, during the time step, divided by the volume V :

$$C_{t+1} - C_t = \frac{J \times S \times \Delta t}{V} \quad (S2)$$

In the general case, each volume in the model is surrounded by six neighboring volumes, thus the general expression used to calculate the diffusion (equation 1) can be derived from S3:

$$C_{t+1} - C_t = \frac{-D \times \sum_{i=1}^6 (C_t - C_{it}) \times S \times \Delta t}{d \times V \times 6} = -\sum_{i=1}^6 (C_t - C_{it}) \times D_N \quad (S3)$$

Where D_N is a dimensionless constant used to simplify the final expression.

Apêndice D

Sintaxe de arquivos usados para simulações do artigo : Conservation of glycolytic oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* and human pancreatic β -cells: a study of metabolic robustness

Introdução:

Os arquivos descritos nesta seção foram usados no software Jarnac (<http://sbw.kgi.edu/software/jarnac.htm>) e estão disponíveis para download no site <http://www.i-genics.com>. Jarnac usa o integrador LSODA para resolver as equações diferenciais ordinárias usadas para representar o metabolismo celular.

Uma característica de modelos metabólicos, como os dois descritos a seguir, é a complexidade das expressões usadas para se representar a cinética química das reações. Cada uma das principais enzimas possui mais de um sítio alostérico e catalítico e, embora cada um dos mecanismos regulatórios possam ser representados por expressões mais simples como Hill ou Michaelis-Menten, a superposição dessas expressões leva a fórmulas gigantescas, como por exemplo a expressão da atividade da fosfofructoquinase no modelo de células beta.

Cada uma das reações descrita nos scripts da ferramenta Jarnac é escrita na forma de variação das concentrações de reagentes e substratos para aquela dada reação. Caso um substrato ou produto esteja presente em mais de uma reação, como é frequente em vias metabólicas, a ferramenta se encarrega do cálculo da expressão resultante.

Formato dos arquivos e descrição de funções utilizadas:

Um arquivo Jarnac começa com uma declaração das reações químicas a serem simuladas no formato a seguir:

- `model = defn <nome do modelo>`
- `[Jx] $A + B \rightarrow C + D$; <expressão da velocidade da reação>;`
- `end;`

Onde *<nome do modelo>* é o nome escolhido para o sistema de equações a ser simulado e *<expressão da velocidade da reação>* é a expressão matemática da velocidade da reação de conversão de A e B em C e D, segundo a estequiometria especificada.

Em seguida, cada uma das variáveis representadas nas equações da seção anterior tem seu valor inicial especificado na forma:

- *<nome do modelo>.<nome da variável> = <valor da variável>;*

Onde *<nome da variável>* representa a concentração de uma espécie química da via metabólica estudada e *<valor da variável>* é o valor a ser atribuído à concentração inicial desta espécie química.

Referências

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4ed . Porto Alegre: Artmed, 2004, 1463p.

ANDERSON, A. R. A.A hybrid mathematical model of solid tumour invasion: the importance of cell adhesion. **Mathematical Medicine and Biology**, v. 22, p. 163-186, 2005.

BRAGA, P.C.B.B.; TEIXEIRA, V.R.; CHAMMAS, R. **Aspectos Moleculares da Transformação Celular: Conceitos e Implicações**. In: WAITZBERG, D.L. Dieta, nutrição e câncer. São Paulo: Atheneu, p.79-87, 2004.

DEBNATH, J.; BRUGGE, J.S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. **Nat Rev Cancer** v. 5, p. 675-688, 2005.

CASCANTE, M.; SELIVANOV, V.; MESHALKINA, L.; SOLOVJEVA, O.; KUCHEL, P.; MONTOYA, A.; KOCHETOV, G.; LEE, P. Rapid simulation and analysis of isotopomer distributions using constraints based on enzyme mechanisms: an example from HT29 cancer cells. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3558-3564, 2005.

CASCANTE, M.; SELIVANOV, V.; PUIGJANER, J.; SILLERO, A.; CENTELLES, J.; MONTOYA, A.; LEE, P. An optimized algorithm for flux estimation from isotopomer distribution in glucose metabolites. **Bioinformatics**, v. 20, p.3387-3397, 2004.

CZERNIN, J.; PHELPS, M. E. Positron emission tomography scanning: current and future applications. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p.89–112, 2002.

DI CHIRO, G.; HATAZAWA, J.; KATZ, D. A.; RIZZOLI, H. V.; DE MICHELE, D. J. Glucose utilization by intracranial meningiomas as an index of tumor aggressivity and probability of recurrence: a PET study. **Radiology**, v.164, p.521–526, 1987.

ESTIMATIVA da Incidência de Câncer para 2008 no Brasil e nas Cinco Regiões. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793> . Acesso em: 16 março. 2008

FERREIRA, S.C.; MARTINS, M.L.; VILELA, M.J. Reaction–diffusion model for the growth of avascular tumor, **Physical Review E**, v. 65, id. 021907, 2002.

FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process, **Curr Mol Med**, v.3 (7), p. 643-651, 2003.

FRIEBOES, H. B.; LOWENGRUB, J. S.; WISE, S.; ZHENG, X.; MACKLIN, P.; BEARER, E. L.; CRISTINI, V. Computer simulation of glioma growth and morphology, **NeuroImage**, v. 37, n. 1, p. S59-S70, 2007.

GAMBHIR, S. S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 683–693, 2002.

GATENBY, R. A.; GAWLINSKI, E. T.; GMITRO, A. F.; KAYLOR, B.; GILLIES, R. J. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. **Cancer Research**, v. 66, n. 10, p. 5216-5223, 2006.

GATENBY, R. A.; GAWLINSKI, E. T. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. **Cancer Research**, v. 63, 3847-3854, 2003.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 891-899, 2004.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 56-61, 2008.

HARRIS, A. L. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1. p. 38-47, 2002.

JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. J. Histologic Classification of Ductal Carcinoma In Situ, **Microscopy Research and Technique**, v. 59, p. 92-101, 2002.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, JIAQUAN.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2007. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, n. 1, p. 43-66, 2007.

KINGSLEY, L. A.; FOURNIER, P. G. J.; CHIRGWIN, J. M.; GUISE, T. A. Molecular biology of bone metastasis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n.10, p. 2609-2617, 2007.

KUNKEL, M., REICHERT, T.E., BENZ, P., LEHR, H., JEONG, J., WIEAND, S., BARTENSTEIN, P., WAGNER, W., WHITESIDE, T. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 97, p. 1015–1024, 2003.

MAN, Y.-G., TAI, L., BARNER, R., VANG, R., SAENGER, J.S., SHEKITKA, K.M., BRATTHAUER, G.L., WHEELER, D.T., LIANG, C.Y., VINH, T.N., STRAUSS, B.L. Cell clusters overlying focally disrupted mammary myoepithelial cell layers and adjacent cells within the same duct display different immunohistochemical and genetic features: implications for tumor progression and invasion. **Breast Cancer Res.** 5, 231–241, 2003.

MEURETTE, O.; REBILLARD, A.; HUC, L.; MOIGNE, G. L.; MERINO, D.; MICHEU, O.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; DIMANCHE-BOITREL, M. Trail induces receptor-interacting protein 1-dependent and caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions. **Cancer Research**, v. 67, n.1, p. 218-226, 2007.

PATEL, A. A.; GAWLINSKI, A. E. T.; LEMEIEUX, S. K.; GATENBY, R. A. A Cellular Automaton Model of Early Tumor Growth and Invasion: The Effects of Native Tissue Vascularity and Increased Anaerobic Tumor Metabolism. **Journal of Theoretical Biology**, v. 213, p. 315-331, 2001.

RICHARDSON, A. D. ; YANG, C. ; OSTERMAN, A.; SMITH, J. W. Central carbon metabolism in the progression of mammary carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 110 (2), p. 297-307, 2008.

SHANNON, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; CONDRON, C. M.; TOOMEY, D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 2, p. 297-307, 2003.

SMALLBONE, K.; GAVAGHAN, D. J.; GATENBY, R. A.; MAINI, P. K. The role of acidity in solid tumor growth and invasion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 235, p. 476-484, 2005.

SMALLBONE, K.; GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J.; MAINI, P. K.; GAVAGHAN, D. J. Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness. **Journal of Theoretical Biology**, v. 244, p. 703–713, 2007.

Glossário

- 3D – Três dimensões, tridimensional
- 3PG – 3-phosphoglycerate
- Aci – Abreviatura usada neste trabalho para o fenótipo resistente a acidez
- Acini – Termo que denota ‘sem forma’, no escopo deste projeto consiste em esferas ocas, compostas de células imortalizadas, crescidas em cultura
- AER – Aeróbico
- ANAER – Aneróbico
- ATP – Adenosina trifosfato
- Bicarb – Ânion bicarbonato
- BPG – 1,3-biphosphoglycerate
- DCIS – Ductal Carcinoma In Situ
- DHAP – Dihydroxyacetone-phosphate
- F6P – Fructose-6-fosfato
- FBA – Fructose-biphosphate aldolase
- FBP – Fructose-1,6-biphosphate
- G3P – Glyceraldehyde-3-phosphate
- G6P – Glucose-6-fosfato
- GAPD – Glyceraldegyde-3-phosphate dehydrogenase
- Glc – Glicose
- GLUT – Transportador transmembrânico de glicose
- Gly – Abreviatura usada neste trabalho para o fenótipo hiperglicolítico
- GPI – Glucose-6-phosphate isomerase
- GUI – Graphical User Interface, interface gráfica de um software
- HIF1 – Hypoxia-inducible factor 1
- HK – Hexokinase
- Hyp – Abreviatura usada neste trabalho para o fenótipo hiperplásico

-
- *In silico* – Termo usado para denotar experimentos realizados em ambiente computacional, em analogia a termos *in vivo* e *in vitro*, relativos a experimentos em seres vivos ou em bancada
 - Java – Linguagem de programação para desenvolvimento de software
 - Jarnac – Ferramenta computacional para simulação de vias metabólicas
 - Máquina Virtual Java – Software que faz as vezes de sistema operacional, permitindo que programas desenvolvidos na linguagem Java possam ser executados em sistemas plataformas computacionais distintas (i.e. PC, Macintosh, celular, etc.)
 - NHE – Sodium-hydrogen Exchanger
 - $p\text{CO}_2$ – Pressão parcial de dióxido de carbono
 - PET – Positron Emission Tomography
 - PFK – Phosphofructokinase
 - PGK – Phosphoglycerate kinase
 - $p\text{H}_e$ – pH extracelular
 - pK_a / pK – logaritmo negativo da constante de dissociação K_a
 - $p\text{O}_2$ – Pressão parcial de oxigênio
 - SGI – Silicon Graphics
 - TCA – Tricarboxylic acid
 - TPI – Triose-phosphate isomerase
 - TSim – Tissue Simulator, ferramenta desenvolvida para simulação de tecidos. Vide www.i-genics.com
 - VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor