

# MODELS MATEMÀTICS I DE SIMULACIÓ EN PROCESSOS DE REGENERACIÓ

Ricard V. Sole<sup>(1)</sup>, Robert Ransom<sup>(2)</sup>, Jaume Baguña<sup>(3)</sup> and Jordi Ocaña<sup>(4)</sup>

(1) Departament de Física Fonamental. Fac. Física. UB. Diagonal 647

(2) Department of Biology. The Open university. Walton Hall MK7 6AA

(3) Departament de Genètica. Fac. Biologia. UB. Diagonal 645

(4) Departament d'Estadística. Fac. Biologia. UB. Diagonal 645

## ABSTRACT

**Mathematical and Computer Models in Regeneration processes.**

Regeneration phenomena in planarians had been investigated by many authors and some experiments shows that both inhibition by cell density - effect phenomena and activation of proliferation by chemical factors takes place in them. In this paper, we consider a mathematical model about regeneration and differentiation processes based essentially in the next set of equations:

$$\frac{\partial g}{\partial t} = \frac{g^2}{1+sg^2} - kg + g_0 \qquad \frac{\partial s}{\partial t} = s_0 + p - \mu s$$

$$\frac{\partial p}{\partial t} = p_0 - kp + D_p \left[ \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} \right]$$

A computer simulation is presented also, incorporating the two factors both non-linear chemical phenomena and discrete cell simulation, with cell-cell interaction. Blastema regeneration and graft-host experiments can be simulated with this hybrid model, and some numerical and qualitative results agrees with experimental data.

## INTRODUCCIÓ

En un article recent (Sole et al.; 1988a, 1988b) varem introduir un model de simulació de fenòmens de regeneració en planària, on es reproduïa el procés de creixement d'un empelt procedent d'un individu d'una raça A sobre un hoste previament irradiat de raça B.

En aquell article s'introduïa un model molt simple de creixement. Es partia d'una configuració inicial del sistema empelt-hoste, i la simulació donava la evolució temporal del conjunt. Malgrat els essencialment correctes resultats obtinguts referents a les velocitats de migració cel·lular, el model era incomplet, bàsicament per dos fets: la no utilització de regles d'interacció realistes en la simulació dels moviments cel·lulars post-divisionals i d'altra part la no consideració del paper d'activadors de la proliferació cel·lular, relacionats amb neuropeptids.

Aquestes deficiències ens han portat a la realització d'un model de simulació complementat per un model teòric (per ara preliminar) de diferenciació cel·lular amb l'objectiu de modelitzar d'una forma més acurada els processos de regeneració i en especial la regeneració del blastema en planàries. Introduïrem en primer lloc el model matemàtic, basat en una variant del model de Meinhardt-Lewis, per analitzar a continuació el model de simulació per ordinador.

## MODEL DE MEINHARDT-LEWIS DE DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR

En aquest model es considera l'estat diferenciàt com aquell que podem caracteritzar per una concentració elevada d'una certa substància G respecte d'un estat 'no diferenciàt' caracteritzat per un valor inferior de la concentració ( $g$ ) de G.

La substància G tindria l'efecte de 'interruptor' cel·lular, mantenint l'estat diferenciàt enfront de pertorbacions externes. La qüestió està en que el model permeti la presència d'aquests dos estats.

La cinètica plantejada es descriu per l'equació:

$$\frac{\partial g}{\partial t} = \frac{g^2}{1+sg^2} - kg + g_0$$

on  $dg/dt$  és la producció de la substància, el terme  $g^2/(1+g^2)$  és un terme de creixement amb saturació, del tipus que trobem en Michaelis-Menten, el terme '-kg' és el decaïment associat a la destrucció de g, i finalment el terme m és la concentració d'algun morfogen que pot incrementar la producció externament. Podem visualitzar el comportament de la cinètica observant la gràfica producció-concentració de g:

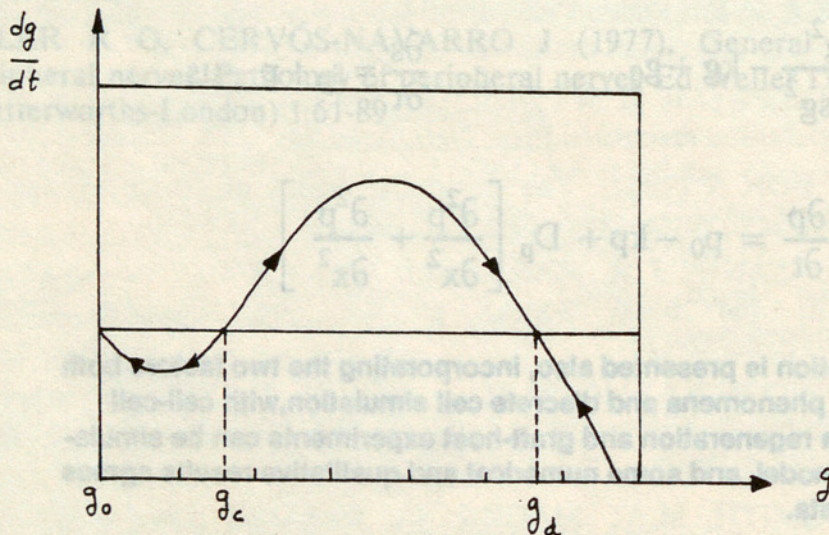


Fig.1: Gràfica  $dg/dt$  (producció) respecte de  $g$  (concentració de la molècula G).

Tenim dos estats ben definits als que el sistema tendeix en funció del valor de la concentració de g. Per sota d'un valor crític  $g_c$  la producció tendeix a un valor donat, i la concentració de g tendeix a zero. Per sobre del llindar crític, la cel·la incrementa la producció de g i arribem a la saturació i a un estat nou. Podem imaginar l'estat A com l'estat no-diferenciàt i l'estat B com l'estat diferenciàt. Podem també veure això a partir de les corbes d'evolució de les concentracions de g en ambdues situacions:

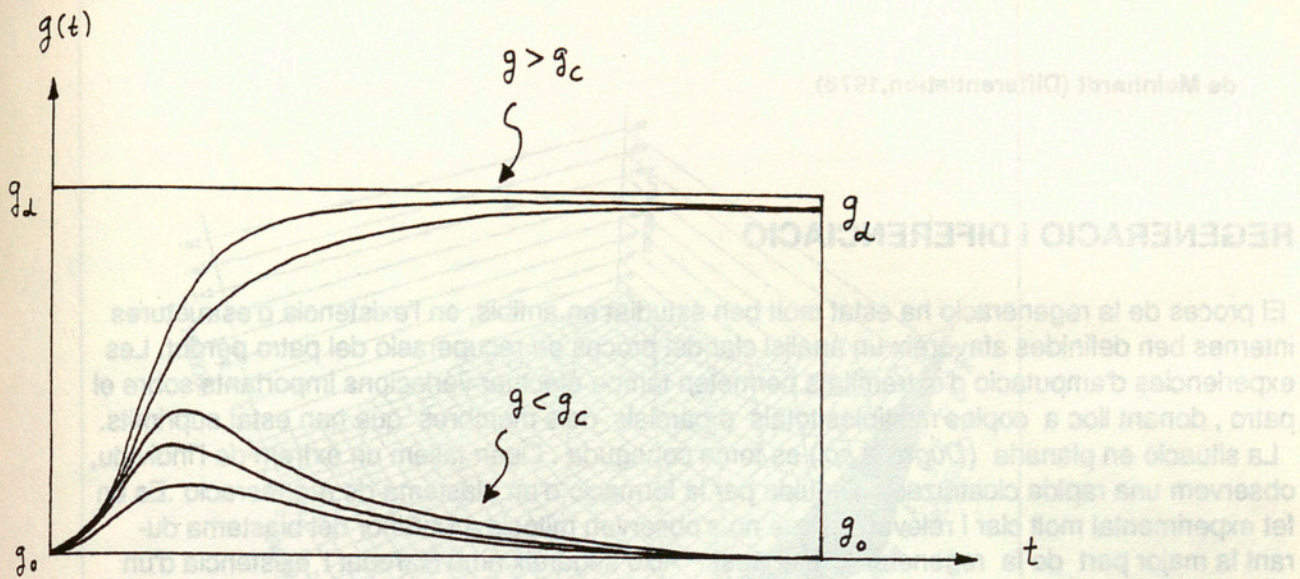


Fig.2: Evolucio temporal de la concentracio de G en els casos (1)  $g < g_c$  i (2)  $g > g_c$

Aquest model ha estat aplicat a la formacio de patrons bidimensionals per J.D. Murray (1979, 1981) que també considera l'efecte del tamany i la forma, amb interessants resultats cualitatius en el que es refereix a la distribucio de pigments. També Meinhardt utilitza el model per simular la formacio de patrons de ramificacio introduint-hi l'efecte inhibitor de les regions ja diferenciades. Aquest model, basat en primera instancia en el conegut model matematic d'activador-inhibidor:

$$\frac{\partial a}{\partial t} = a_0 + c \frac{a^2}{i} - \mu a + D_a \left[ \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 a}{\partial y^2} \right]$$

$$\frac{\partial i}{\partial t} = i_0 + ca^2 - \lambda i + D_i \left[ \frac{\partial^2 i}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 i}{\partial y^2} \right]$$

incloent l'efecte de la diferenciacio de forma que les noves estructures ya diferenciades actuen com inhibidors locals d'altres possibles ramificacions. Una evolucio tipica seria:

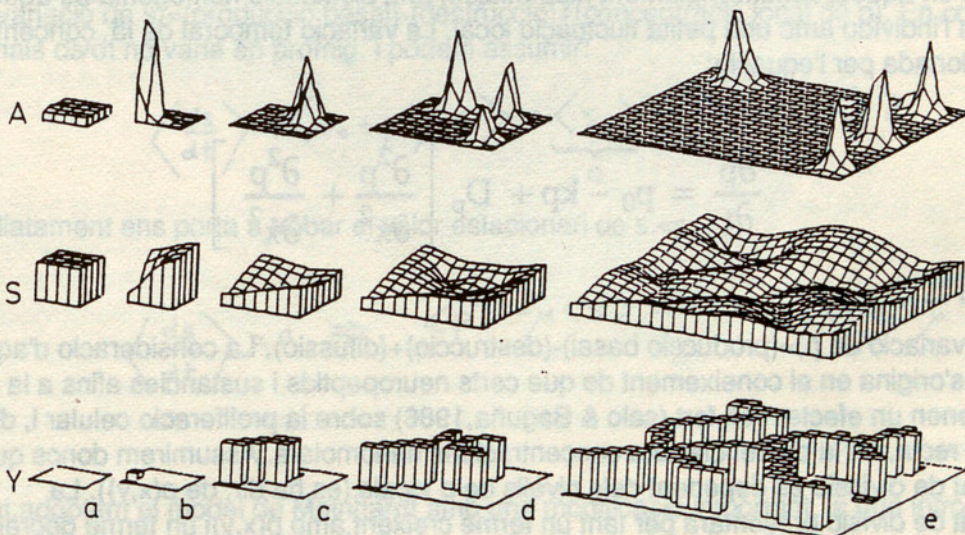


Fig.3: Formacio de patrons ramificats (net-like structures) a partir del model

de Meinhardt (Differentiation, 1976)

## REGENERACIO I DIFERENCIACIO

El proces de la regeneracio ha estat molt ben estudiat en anfibis, on l'existencia d'estructures internes ben definides afavoreix un analisi clar del proces de recuperacio del patro perdut. Les experiencies d'amputacio d'extremitats permeten tambe efectuar variacions importants sobre el patro, donant lloc a copies multiples totals o parcials dels membres que han estat suprimits.

La situacio en planaria (*Dugesia sp.*) es força coneguda. Quan tallem un extrem de l'individu, observem una rapida cicatritzacio seguida per la formacio d'un blastema de regeneracio. Es un fet experimental molt clar i relevant el que no s'observen mitosis a l'interior del blastema durant la major part de la regeneracio d'aquest. Això sugereix amb claredat l'existencia d'un mecanisme d'inhibicio de la proliferacio ja per contacte celula-celula, ja per molecules inhibidores difusibles. Altres experiencies realitzades amb empelts (Salo & Baguña, 1985) proporcionen informacio sobre el comportament dinamic dels neoblasts en divisio, i tant els resultats experimentals com les simulacions preliminars (Sole et al, 1988a, 1988b) semblen indicar que el proces de dispersio dels neoblasts (mesurable per la velocitat de difusio) es basicament un proces passiu a l'atzar, sense direccionalitat.

Altres aspectes interessants a considerar en aquest sentit son la regeneracio d'estructures en el blastema i especialment la rapida determinacio (Salo, 1984) que es produeix. Aquest aspecte es susceptible de modelitzacio matematica, assistida per simulacio amb ordinador.

L'existencia de constriccions de tipus mecanic (la membrana que tanca la ferida) i la possible participacio de morfogens o de autoorganitzacio per interaccio celular (responsables, potser, de la rapida determinacio) ens ha portat a la construccio d'un model tridimensional del blastema en regeneracio. L'incorporacio dels dos tipus de modelitzacio teorica (gradents de morfogens i interaccions celulars discretes) enriqueix el model final, i possiblement permitira la construccio d'un model global per la morfogenesi a planaria. Un tractament similar ha estat realitzat en l'analisi del creixement tumoral (Duchting & Dehl, 1980).

## MODEL MATEMATIC

Una primera hipotesi que realitzarem es la de presencia d'una substancia (diguemne P) que, en condicions normals es present a l'organisme en un nivell de fons  $p_0$ , i que difon en tot l'individu. Podriem associar aquesta substancia a alguna molecula similar a la substancia P i que podria esser secretada pel sistema nervios a una taxa constant o per celules diferenciades; en ausencia d'altra informacio en aquest sentit, simplement hipotetitzem una distribucio homogenia de aquesta molecula dins l'individu amb una petita fluctuacio local. La variacio temporal de la concentracio de p vindria donada per l'equacio:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = p_0 - kp + D_p \left[ \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 p}{\partial y^2} \right]$$

es ha dir: (variacio de p) = (produccio basal) - (destruccio) + (difusio). La consideracio d'aquesta substancia s'origina en el coneixement de que certs neuropeptids i substancies afins a la substancia P tenen un efecte molt fort (Salo & Baguña, 1986) sobre la proliferacio celular i, de forma indi recta, en la diferenciacio, a concentracions nanomolars. Assumirem doncs que la probabilitat de divisio es depenent dels nivells de p locals (es ha dir, de  $p(x,y)$ ). La probabilitat de divisio presentara per tant un terme creixent amb  $p(x,y)$  i un terme decreixent amb el nombre de neo blasts local, i en el nostre model es, graficament:

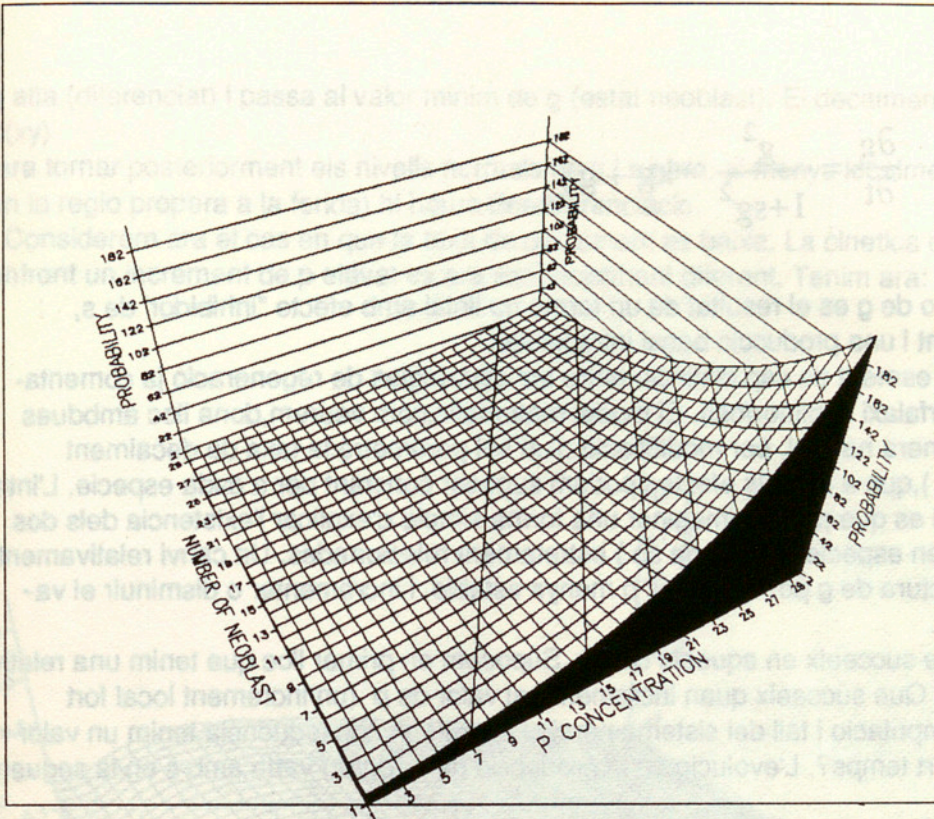


Fig.4: Grafica probabilitat de divisió dels neoblast en funció del nombre local de neoblastes i de la concentració de p(x,y).

L'estat diferenciat s'assoleix en el nostre model d'una forma indirectament acoblada a la substància p(x,y). Assumim que una molècula intermitja, diguem-ne s, intracel·lular i per tant, no difusible, varia la seva concentració en la forma:

$$\frac{\partial s}{\partial t} = s_0 + p - \mu s$$

es ha dir: (variació de s) = (producció basal) - (destrucció) + (concentració local de p). En condicions normals ds/dt no varia en promig, i podem assumir:

$$\left\langle \frac{ds}{dt} \right\rangle = \langle s_0 + p - \mu s \rangle = \underbrace{\langle s_0 \rangle}_0 + \langle p \rangle - \mu \langle s \rangle$$

que immediatament ens porta a trobar el valor estacionari de s, <s>:

$$\left\langle \frac{ds}{dt} \right\rangle = 0 \Rightarrow \langle p \rangle - \mu \langle s \rangle = 0 \Rightarrow \langle s \rangle = \frac{1}{\mu} \langle p \rangle$$

Finalment, adoptem el model de Meinhardt amb una modificació important, ja que introduïrem en la seva expressió la concentració de s:

$$\frac{\partial g}{\partial t} = \frac{g^2}{1+sg^2} - kg + g_0$$

Ara doncs, la variació de g es el resultat de un terme no lineal amb efecte "inhibidor" de s, un terme de decaïment i una producció basal intracelular.

Fins ara no hem fet esment de cap distinció entre les estratègies de regeneració ja comentades anteriorment (morfalaxi i epimorfosi). El model matemàtic, com veurem, dona lloc ambdues alternatives d'una manera natural, per modificació d'un sol paràmetre: la taxa de decaïment de la substància g (k), que a tots els efectes podem suposar constant per a cada espècie. L'interès d'aquesta hipòtesi es que permet imaginar una forma simple d'explicar l'existència dels dos tipus de regeneració en espècies (Planaria sp.) estretament relacionades. Un canvi relativament poc gran sobre l'estructura de g pot fer-la més o menys estable, i incrementar o disminuir el valor del seu decaïment.

Passem a veure que succeeix en aquests casos. Suposem en primer lloc que tenim una relativa alta, com de 0.5. Que succeeix quan incrementa el valor de p (un increment local fort podria donar-se per amputació i tall del sistema nerviós, p.ex.) i en conseqüència tenim un valor alt de s al cap d'un cert temps?. L'evolució en la producció de g (dg/dt) varia amb s en la següent forma:

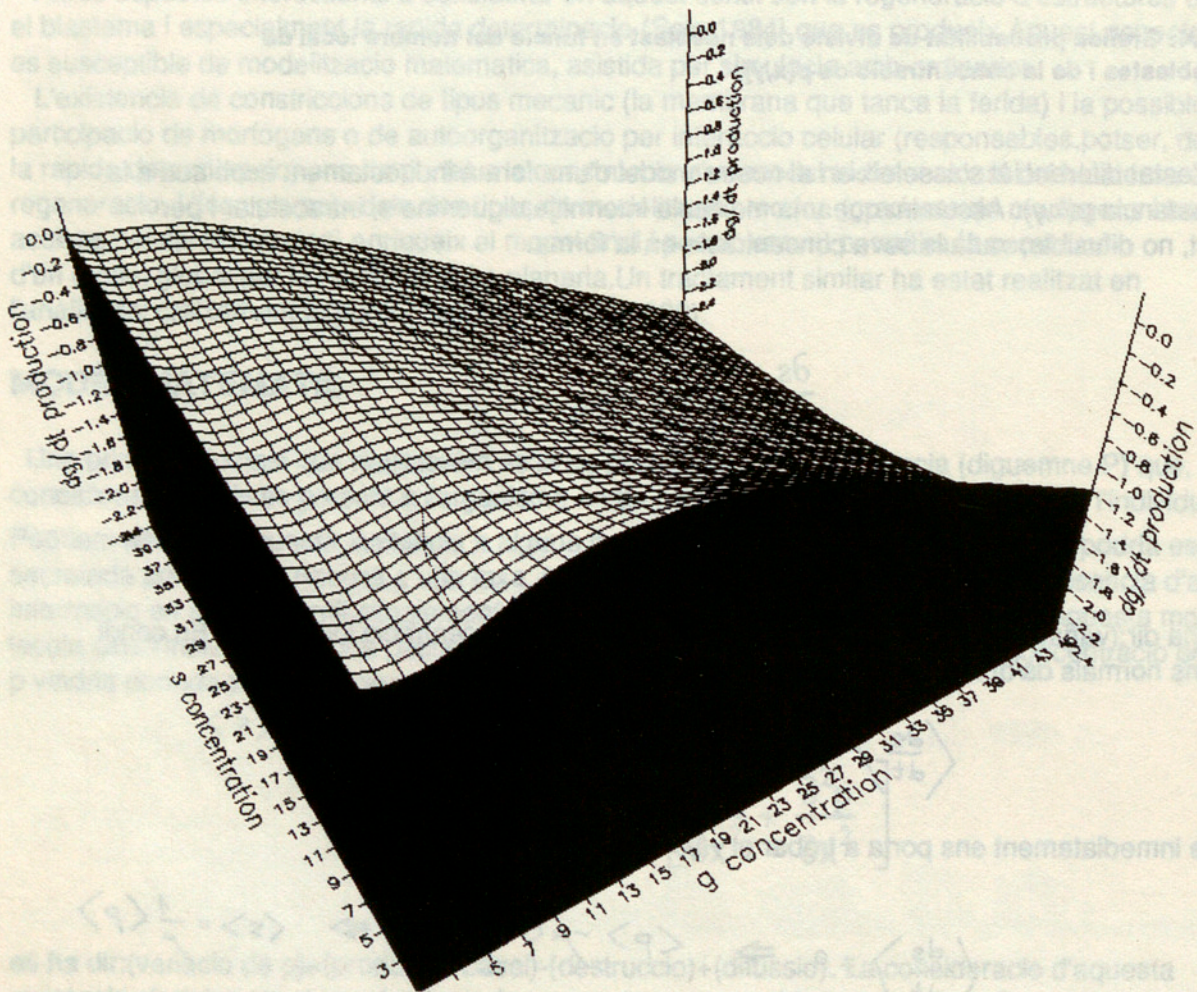


Fig.5: Evolució del perfil de producció-g amb l'increment de s quan la taxa de decaïment es elevada (0.5).

Tenim en aquest cas, a partir de determinada concentració de s, una bifurcació en el comportament de la producció. Per sota del valor diguem-ne  $S_c$  la cel·lula no pot mantenir el seu estat amb

g alta (diferenciat) i passa al valor mínim de g (estat neoplast). El decaïment posterior de  $p(xy)$

fara tornar posteriorment els nivells normals de g i s, pero, al menys localment (per exemple en la regio propera a la ferida) hi haura desdiferenciacio.

Considerem ara el cas en que la taxa de decaïment es baixa. La cinetica de  $dg/dt$ , i per tant de g enfront un increment de p elevat es ara essencialment diferent. Tenim ara:

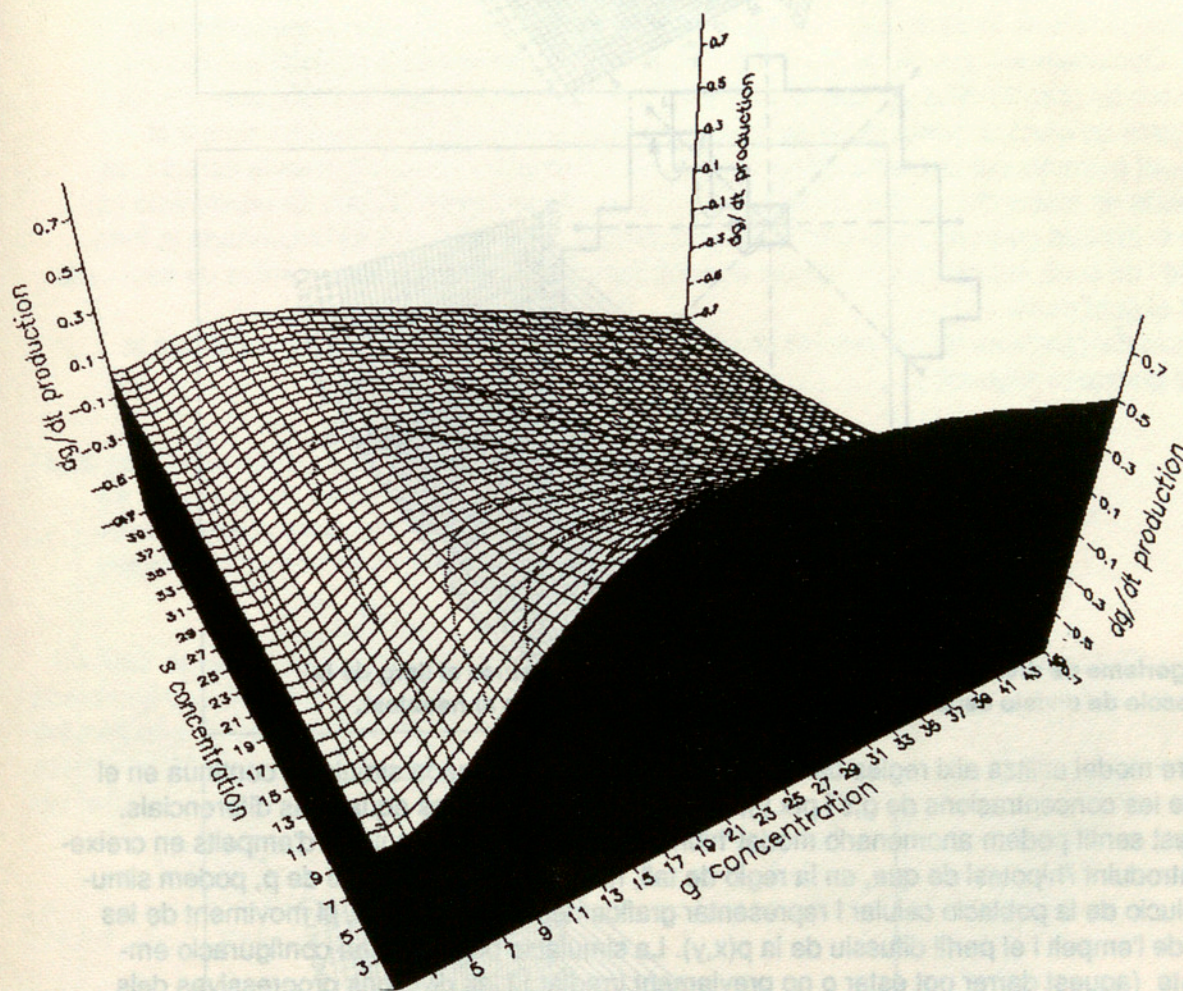


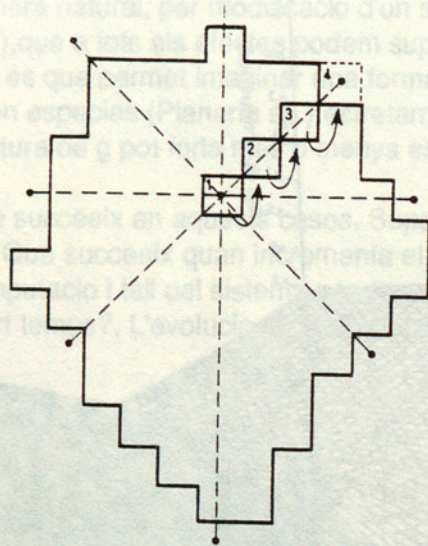
Fig.6: Evolucio de la produccio  $dg/dt$  amb el valor intracelular de s. Taxa de decaïment feble.

Contrariament al que succeïa en el cas anterior, ens trobem que l'estat diferenciat es mante inalterat essencialment, fin i tot a altes concentracions de s. En aquest cas, tenim proliferacio celular pero no desdiferenciacio. Ambdós estratgies poden aleshores explicarse (en una primera i molt possiblement no completa aproximacio) sota el mateix model. Un aspecte basic a analitzar sera la localitzacio i forma d'interaccio plausibles de les molecules G i S, que siguin compatibles amb les dades simesno qualitativament. L'altre aspecte important sera la introduccio de una modelitzacio similar en les simulacions del blastema en creixement.

### SIMULACIONS : MODELS HIBRIDS

La simulacio del creixement de clons celulars ha estat força analitzada en els darrers anys, des

de el treball classic de Williams i Bjerknes (1972) de creixement tumoral. Els models han estat progressivament millorats i un aspecte clau, i que hem introduït en el nostre algorisme es la simulació realista dels moviments celulars postdivisió. Hem aplicat en el nostre cas l'aproximació del creixement de clons ideada per Ransom (Ransom, 1976, 1977) i que consisteix en escollir a l'atzar la posició de la nova celula segons la direcció de creixement més propera a un lloc (espai) vacant. La nova celula desplaça la filera de celules corresponent, i el programa redefineix la llista de celules i posicions. En esquema, tenim:



**Fig.7: Algorisme de divisió celular amb moviment de celules veïnes al llarg de la direcció de divisió escollida al'atzar entre les més properes al neoblast.**

El nostre model utilitza així regles de simulació discreta i a la vegada simulació continua en el càlcul de les concentracions de  $g, s$  i  $p(x, y)$ , per càlcul numèric de les equacions diferencials. En aquest sentit podem anomenar-lo model 'híbrid'. En el cas de la simulació d'empelts en creixement, introduint l'hipòtesi de que, en la regió de tall, hi ha un pic de secreció de  $p$ , podem simular l'evolució de la població cel·lular i representar gràficament, per exemple, el moviment de les cel·les de l'empelt i el perfil difusiu de la  $p(x, y)$ . La simulació parteix d'una configuració empelt hoste (aquest darrer pot estar o no previament irradiat) i les divisions progressives dels neoblasts donen lloc al creixement del teixit empeltat. Si l'hoste es troba en estat normal, es ha de dir, no irradiat, l'empelt creix lenta i tortuosament, ja que per una part l'inhibició associada a l'efecte de densitat de neoblasts no ha canviat i per l'altra banda els neoblasts que es divideixen en l'empelt tenen accés a poques posicions properes. Per contra, el cas de l'hoste irradiat és notablement diferent, ja que l'espai accessible als neoblasts de l'empelt és prou important per facilitar la seva difusió i encara més important: el decaïment del nombre de neoblasts de l'hoste, de caire exponencial (ja que han estat irradiats, i aquest factor físic afecta molt directament a les cel·les soca). És interessant ressaltar que, malgrat l'existència (a la simulació) de l'efecte estimulador de la substància  $P$  a la regió del tall, no hi ha de fet un efecte important sobre la velocitat de dispersió, quedant aquesta propera a la que obtindríem per moviment cel·lular postdivisió estricte. Una evolució típica seria:



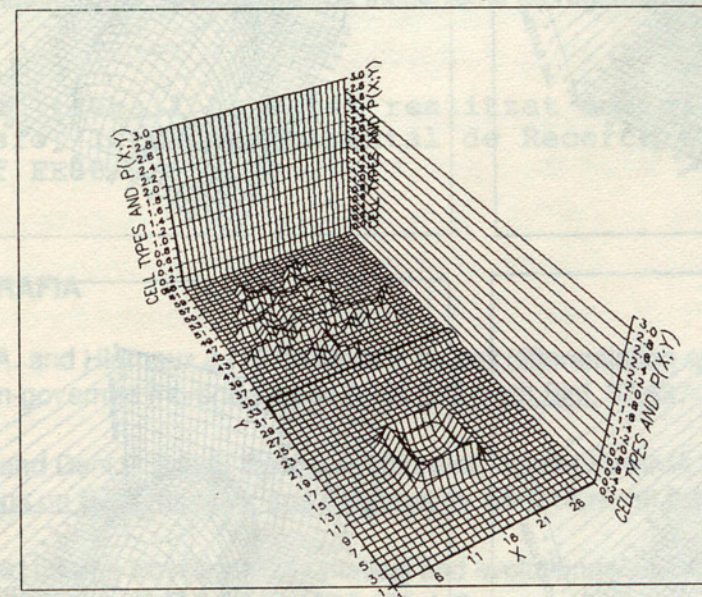
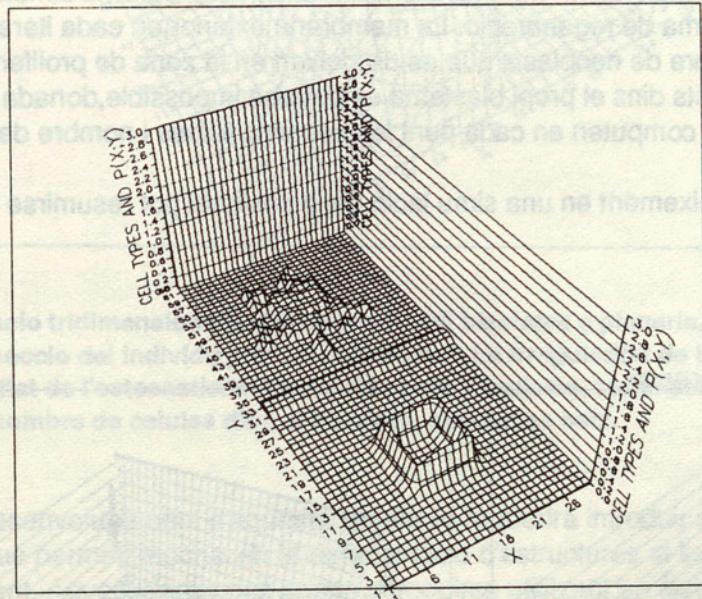
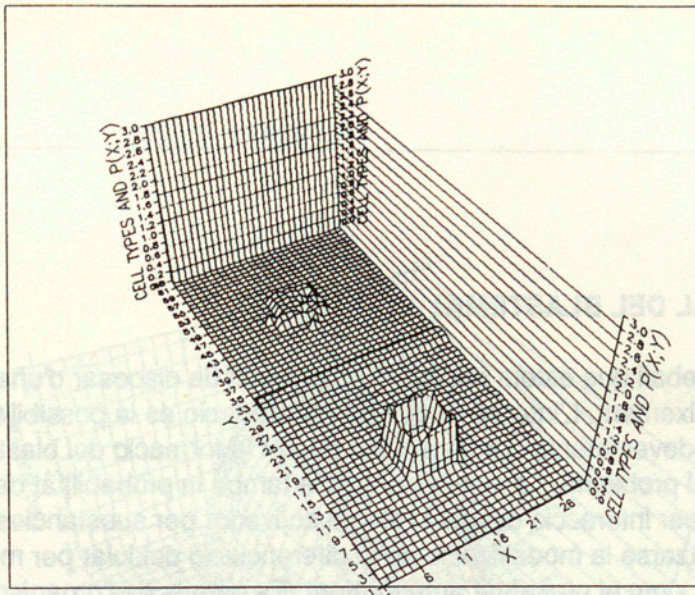
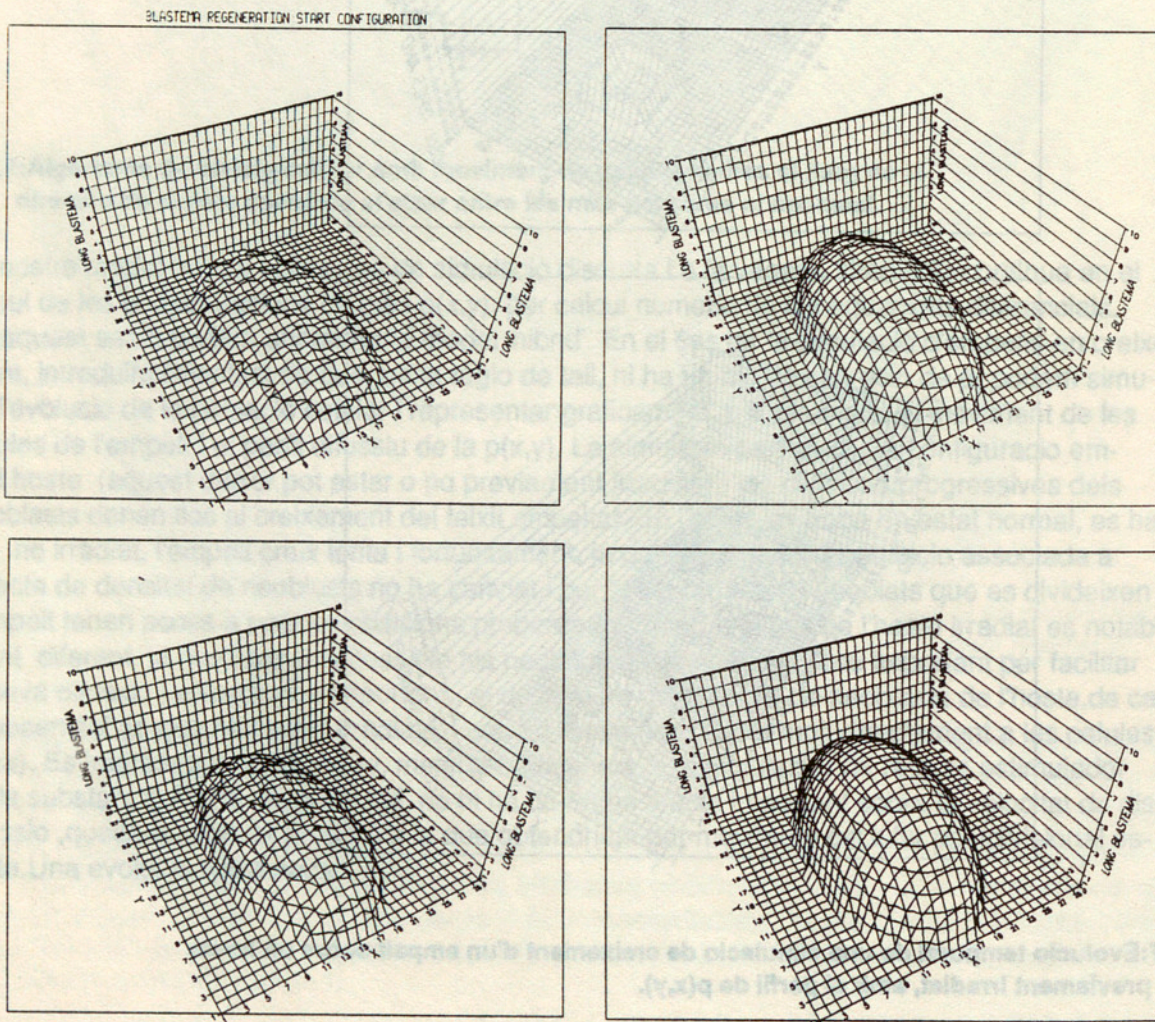


Fig.7: Evolució temporal de una simulació de creixement d'un empelt sobre un hoste previament irradiat, amb el perfil de  $p(x,y)$ .

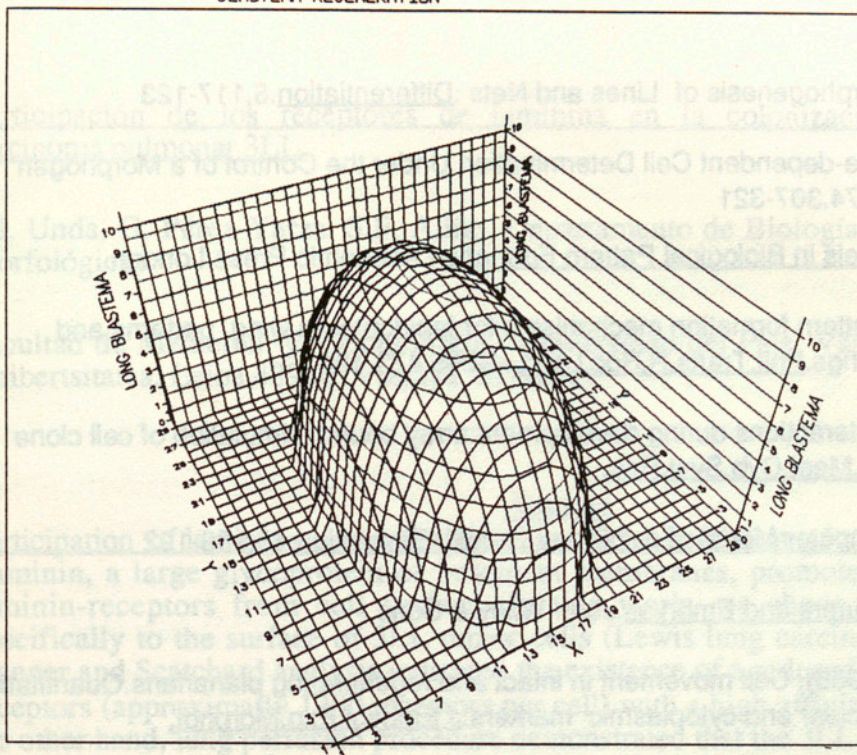
### SIMULACIO TRIDIMENSIONAL DEL BLASTEMA

Finalment, cal esmentar el treball que estem realitzant en el sentit de disposar d'una simulacio realista del blastema en creixement. L'interes d'aquesta aproximacio es la possibilitat de explicar de manera realista els esdeveniments que tenen lloc durant la formacio del blastema incloent la part fisica (mecanica) del problema. La simulacio utilitza també la probabilitat de divisio que recull l'efecte inhibitor per interaccio celular i l'efecte activador per substancies que difonen. Opcionalment, pot utilitzar-se la modelitzacio de la diferenciacio cel.lular per models matematics de reaccio-difusio, com el presentat anteriorment. Es parteix de l'organisme tot just despres de efectuar l'amputacio de l'extrem (proximal o distal) i el programa simula el creixement posterior del blastema de regeneracio. La membrana exterior, en cada iteracio, es recalculada en funcio del nombre de neoblasts que es divideixen en la zona de proliferacio (donat que la divisio dels neoblasts dins el propi blastema es gairebe impossible, donada la forta inhibicio) i en cada moment es computen en cada punt les concentracions i nombre de neoblasts propers al punt donat.

L'evolucio del blastema en creixement en una simulacio tridimensional pot resumir-se en la serie de grafiques seguent:



## BLASTEMA REGENERATION



**Fig.8:** Simulació tridimensional del creixement del blastema a planària. El pla x-y es pla de secció del individu previ al creixement. La irregularitat de la superfície es resultat de l'estocasticitat introduïda en la simulació, i tanmateix al fet que el nombre de cel·lules dins el blastema simulat es baix.

Un futur desenvolupament d'aquesta simulació requerirà introduir algun tipus de informació posicional que permeti reconèixer la determinació d'estructures al llarg de les etapes inicials del creixement. Aquest darrer pas podria introduir-se utilitzant un sistema tal com el de estats excloents (Meinhardt) o bé proposant un mecanisme de regeneració del patró perdut per interacció cel·lular.

Aquest treball ha estat realitzat amb el suport de un ajut de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica, CIRIT. Ref EE88/2

## BIBLIOGRAFIA

- Babloyantz, A. and Hiernaux, J. (1975) Models for cell differentiation and generation of polarity in diffusion-governed morphogenetic fields. Bull. math. Biol. 37, 637-657.
- Duchting, W and Dehl, G. (1980) Spatial structure of Tumor Growth: A Simulation Study. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics. SMC10, num6, 292-296.
- Gierer, A. (1981). Some Physical, Mathematical and evolutionary aspects of biological pattern formation. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B295, 429-440
- Haken, H. (1978) Synergetics-A Field Beyond Irreversible Thermodynamics. In: Lecture Notes in Physics. 84, 140-167.
- Matela, R. J., Ransom, R. and Bowles, M. A. (1983). Computer simulation of Compartment Maintenance in the *Drosophila* Wing Imaginal Disc. J. Theor. Biol. 103, 357-378.

- Meinhardt,H. (1976) . Morphogenesis of Lines and Nets .Differentiation.6,117-123
- Meinhardt,H.(1978).Space-dependent Cell Determination Under the Control of a Morphogen Gradient.J.Theor.Biol. 74,307-321
- Meinhardt,H.(1982). Models in Biological Pattern Formation.Academic Press.London
- Murray,J.D.(1981). On pattern formation mechanisms for lepidopteran wing patterns and mammalian coat markings.Phil.Trans.R.Soc.Lond. B295,473-496
- Ransom,R.(1976). Cell interactions during development:array bound simulation of cell clone growth.Proc.3rd.Europ.Meet.Cyb.Syst.Res.
- Ransom,R.(1977). A Computer Model of cell Clone Growth.Simulation 48,189-192
- Ransom,R.(1981). Computers and Embryos.John Wiley & Sons
- Salo,E. and Baguña,J. (1985). Cell movement in intact and regenerating planarians.Quantitation using chromosomal,nuclear and cytoplasmic markers.J.Embyol.Exp.Morphol.
- Salo,E. and Baguña,J. (1986). Stimulation of Cellular Proliferation and Differentiation in the Intact and Regenerating Planarian *Dugesia(G) tigrina* by the Neuropeptide SubstanceP.J.Exp.Zool.237,129-135
- Sole,R.V.,Ocaña,J and Baguña,J. (1988a) A computer Simulation Model for cellular migration in planarians. Mathematical and Computer Modelling 11,1201-1204.
- Sole,R.V.,Salo,E.,Baguña,J. and Ocaña,J. (1988b).Metodes de Monte Carlo en l'estudi de la morfogenesi a planaria.Biol.Desenv. 6,85-97.
- Sole,R.V. ,Ransom,R.,Baguña,J. and Ocaña,J.(1989) Mathematical and Computer Models in Regeneration Processes.Proc.3rd.World.Conf.on Math.Serv. Man,(in press)
- Williams,T. and Bjerknes,R.(1972). Stochastic Model for abnormal clone spread trough epithelial basal layer.NATURE.236,19-21