

Tese apresentada à Comissão de Pós-graduação do Programa Interunidades em Bioinformática da USP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioinformática no Curso de Doutorado em Bioinformática.

Luiz Carlos da Silva Rozante

**MODELOS DISCRETOS PARA SISTEMAS DE
SINALIZAÇÃO CELULAR BASEADOS NO
CONTATO CÉLULA-CÉLULA**

Prof. Dr. Marco Dimas Gubitoso
Orientador

Prof. Dr. Sergio Russo Matioli
Co-orientador

Profa. Dra. Helaine Carrer
Presidente da Comissão de Pós-graduação

Cidade Universitária - Rua do Matão, 1010

São Paulo, SP - Brasil

2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Serviço de Informação e Biblioteca “Carlos Benjamin de Lyra” do IME-USP

Rozante, Luiz Carlos da Silva

Modelos Discretos para Sistemas de Sinalização Celular Baseados no Contato Célula-Célula /

Luiz Carlos da Silva Rozante.

São Paulo, 2008.

135f.

Tese de Doutorado – Curso de Doutorado em Bioinformática – Área de Bioinformática, 2008.
Orientador: Prof. Dr. Marco Dimas Gubitoso. Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Russo Matioli.

1. Modelagem de Sistemas de Sinalização Justácrina. 2. Atratores em Sistemas Dinâmicos Discretos Finitos. 3. Rede Neurogênica. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Matemática e Estatística. Comissão de Programa Interunidades. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ROZANTE, Luiz Carlos da Silva. **Modelos Discretos para Sistemas de Sinalização Celular Baseados no Contato Célula-Célula**. 2008. 135f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Luiz Carlos da Silva Rozante

TÍTULO DO TRABALHO: Modelos Discretos para Sistemas de Sinalização Celular Baseados no Contato Célula-Célula.

TIPO DO TRABALHO/ANO: Tese / 2008

É concedida à Universidade de São Paulo permissão para reproduzir cópias desta tese e para emprestar ou vender cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta tese pode ser reproduzida sem a autorização do autor.

Luiz Carlos da Silva Rozante

Rua do Matão, 1010

CEP 05508-090 – Cidade Universitária - São Paulo

MODELOS DISCRETOS PARA SISTEMAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR BASEADOS NO CONTATO CÉLULA-CÉLULA

Luiz Carlos da Silva Rozante

Composição da Banca Examinadora:

Prof. Dr.	Marco Dimas Gubitoso	IME-USP
Prof. Dra.	Rita Maria Zorzenon dos Santos	DF-UFPE
Prof. Dr.	Odemir Martinez Bruno	ICMC-USP
Prof. Dr.	Junior Barrera	IME-USP
Prof. Dr.	Hugo Aguirre Armelin	IQ-USP

Para Débora, como símbolo do final de um ciclo de lutas e o início de outro, repleto de boas expectativas e cumplicidade.

Agradecimentos

Ao Gubi e ao Sergio, pela orientação deste trabalho e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Andy Wuensche (*University of Sussex*), que mesmo sem nos conhecer pessoalmente, mostrou grande prestatividade e disposição em ajudar.

Ao Aparecido, pelo imprescindível suporte nos problemas e nas tensões do cotidiano de trabalho no Imes. Sem este suporte certamente eu não teria a tranquilidade de que desfrutei durante o desenvolvimento da tese.

À grande amiga Eliany, pelo apoio “logístico” vital e pelas longas e agradáveis conversas.

Ao caríssimo Marcelo Lauretto, pela leitura e dicas na qualificação.

Aos componentes da banca qualificação (Profs. Jordão Neves e Nina Sumiko Tomita Hirata) pelas dicas e sugestões.

À Patricia pela presteza, competência e cordialidade com que sempre atendeu aos meus pedidos e consultas na secretaria da CPG.

Aos amigos que, de um modo ou de outro, estiveram presentes: Andrea, Claus, Val, Eunice, Fafá, Fábio e Said.

Ao Fabio, Marco, Daniel e Gustavo, pelas discussões, colaborações e tudo o mais.

Ao velho amigo Marco Aurélio, pela leitura, revisão, dicas e sugestões.

À Débora, minha estrela, cuja ajuda veio em tantos momentos e em tão variadas formas. Por muitas vezes foi sutil e delicada, quase insondável, mas em muitas outras foi contundente e vigorosa; por tantas vezes foi prática e objetiva, mas por tantas outras foi subjetiva e profunda. Sem ela, teria sido muito, muito mais difícil.

*Se entrega Corisco, se entrega Corisco!
Não me entrego não, não me entrego não.
Só me entrego na morte de parabelo na mão.*

— GLAUBER ROCHA

*Quando penso em você penso nas luzes que navegam a esmo pelo espaço.
Penso nas estrelas que vemos e que não existem mais.
Penso nos dragões negros que engolem planetas e galáxias.
Penso nas bilhões de bilhões de combinações de matéria e energia
que se manifestam nos infinitos tempos que não conseguimos mensurar.
Penso na terra primitiva e primordial, nos vulcões, na lava...
Penso nos abismos oceânicos e em suas vulcânicas profundezas.
Penso na argila, no carbono, no calor e nos ácidos primordiais.
Penso na fatal e ao mesmo tempo improvável origem da vida.
Penso na sua longa e dramática trajetória:
vejo as bactérias, os dinossauros, o macaco e o homem.
Penso na manifestação fria e abstrata (para não dizer divina)
dos números e interações que lhe modelam:
me pergunto que matemática é esta que te guiou por tão insólita viagem até aqui?
Que lógica é esta que te fez?
Quando penso em você sinto o cheiro da lótus e vejo libélulas ao meu redor...*

— LUIZ ROZANTE

Resumo

Sinalização justácrina é um tipo de sinalização celular, no qual tanto o receptor do sinal (geralmente uma proteína) quanto o ligante (também geralmente uma proteína, responsável pela ativação do receptor) estão ancorados nas membranas plasmáticas, de modo que neste tipo de sinalização a ativação do receptor depende do contato direto entre as membranas das células envolvidas. Sinalização justácrina está presente em diversos e importantes eventos celulares de vários organismos, em especial no processo de desenvolvimento. Propomos um modelo formal genérico (um *framework* de modelagem) para sistemas de sinalização justácrina, que é uma classe de sistemas dinâmicos discretos. Ele possui características desejáveis em um bom *framework* de modelagem, tais como: a) similaridade estrutural com modelos biológicos normalmente utilizados, b) capacidade de representação modular de sistemas de sinalização, c) capacidade de operar em diferentes escalas de tempo e d) capacidade de tratar explicitamente tanto os eventos e elementos moleculares que ocorrem na membrana, quanto aqueles que ocorrem no meio intracelular e que estão envolvidos no processo de sinalização justácrina. Propomos um método para identificação de padrões celulares, modulados por interações justácrinas, via o cálculo de atratores em uma subclasse desse *framework* constituída de sistemas dinâmicos discretos finitos. Desenvolvemos um *software* de suporte à modelagem e à análise de sistemas de sinalização justácrina neste *framework* que incorpora o método proposto de identificação de padrões celulares. Como aplicação, desenvolvemos um novo modelo discreto para a rede neurogênica e sua participação na segregação de neuroblastos em *Drosophila melanogaster*, com o qual reproduzimos *in silico* os mais bem estabelecidos e documentados experimentos envolvendo os elementos moleculares chave do sistema Delta-Notch, sendo que os resultados obtidos foram compatíveis com os resultados esperados.

Abstract

*Juxtacrine signaling is intercellular communication, in which the receptor of the signal (typically a protein) as well as the ligand (also typically a protein, responsible for the activation of the receptor) are anchored in the plasma membranes, so that in this type of signaling the activation of the receptor depends on direct contact between the membranes of the cells involved. Juxtacrine signaling is present in many important cellular events of several organisms, especially in the development process. We propose a generic formal model (a modeling framework) for juxtacrine signaling systems that is a class of discrete dynamic systems. It possesses desirable characteristics in a good modeling framework, such as: a) structural similarity with biological models, b) capacity of operating in different scales of time, and c) capacity of explicitly treating both the events and molecular elements that occur in the membrane, and those that occur in the intracellular environment and that are involved in the juxtacrine signaling process. We propose a method for identification of cellular patterns, modulated by juxtacrine interactions, via attractor calculation in a subclass of this framework constituted of finite discrete dynamical system. We have developed a support software to the modeling and to analyses of juxtacrine signaling systems in this framework that incorporates the proposed method of identification of cellular patterns. As application, we have developed a new discrete model for the neurogenic network and its participation in the neuroblast segregation in *Drosophila melanogaster*, with which we reproduced in silico the best established and documented experiments involving the key molecular elements of the Delta-Notch system, considering the obtained results were compatible with the expected results.*

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Sinalização Celular	18
1.2 Sinalização Celular Justácrina	19
1.3 Trabalhos Anteriores: Modelos Formais	21
1.4 Motivação, Objetivos e Contribuições	22
1.5 Organização do Texto	26
2 <i>J-SYSTEMS</i>: UM <i>FRAMEWORK</i> PARA MODELAGEM DIS- CRETA DE SISTEMAS DE SINALIZAÇÃO JUSTÁCRINA	27
2.1 Uma Visão Geral dos <i>J-Systems</i>	27
2.2 Caracterização da Estrutura Tecidual	29
2.3 Caracterização das Células	30
2.4 Transições de Estado	34
2.4.1 Regras de Transição para Variáveis Intracelulares	37
2.4.2 Regras de Transição para Variáveis de Saída	39
2.4.3 Regras de Transição para Variáveis de Membrana	40
2.5 Definição das Condições Iniciais	42

2.6	Modelos Estocásticos em <i>J-Systems</i>	42
2.7	Classificação de <i>J-Systems</i>	43
3	IDENTIFICAÇÃO DE PADRÕES CELULARES POR CÁLCULO DE ATRADORES EM <i>J-SYSTEMS</i>	45
3.1	Atratores em Redes Dinâmicas Discretas	47
3.2	Atratores em Redes Intracelulares de <i>J-Systems</i>	49
3.3	Atratores em Redes de Membrana de <i>J-Systems</i>	52
3.4	Algumas Definições, Nomenclatura e Notação	53
3.5	Atratores Globais em <i>J-Systems</i>	58
3.6	Primeiro caso: <i>J-Systems</i> sem Sinalizadores de Membrana	59
3.6.1	Combinação de Atratores Locais Pontuais	61
3.6.2	Combinação de Atratores Locais Periódicos	62
3.6.3	Sintonia entre Atratores Locais Posicionados em Células Vizinhas	63
3.6.4	Identificação de Agrupamentos Sintônicos	65
3.6.5	Montagem de Atratores Globais	70
3.7	Segundo caso: <i>J-Systems</i> com Sinalizadores de Membrana	76
3.7.1	Sintonia entre Rede Intracelular e Rede de Membrana	78
3.7.2	Identificação de Células Sintônicas	81
3.7.3	Montagem de Atratores Globais	82
3.8	Considerações Relativas a Desempenho e Eficiência	82
4	IMPLEMENTAÇÃO	85
4.1	Ambiente de Modelagem	85
4.2	Simulador Progressivo	88
4.3	Simulador Regressivo	89
4.4	Ambiente de Análise	92
4.5	<i>J-Systems</i> e SBML	93

5	APLICAÇÕES	95
5.1	Interpretações Biológicas	95
5.2	A Via do Notch	98
5.2.1	Delta-Notch e Neurogenesis em <i>D. melanogaster</i>	99
5.3	Modelo de Três Níveis em <i>J</i> para Padronização de Neuroblastos .	102
5.3.1	Suposições do Modelo	103
5.3.2	Representação da Região Neurogênica e dos Componentes e Mecanismos Moleculares	106
5.3.3	Simulações e Resultados	109
5.3.4	Discussão	116
6	CONCLUSÕES	118
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	Apêndice A – REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES MOLE- CULARES DA REDE NEUROGÊNICA	128
	Apêndice B – ATRADORES DE REDE INTRACELULAR DO SIS- TEMA DELTA-NOTCH	130
	Apêndice C – MEDIDAS DA DINÂMICA DA REDE INTRACELU- LAR DO SISTEMA DELTA-NOTCH	132
	Apêndice D – TIPOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR	134

Lista de Figuras

- Figura 2.1 Um exemplo de reticulado planar de células hexagonais representando as células da região neurogênica, que é um grupo de células ectodérmicas presentes durante a neurogênese em *D. melanogaster*. 28
- Figura 2.2 Todas as células do reticulado contém os mesmos componentes: uma classe de variáveis de estado associada aos elementos moleculares intracelulares e uma classe de variáveis de estado associada aos elementos moleculares presentes em cada uma das faces (segmentos de membrana) da célula. O número de faces depende da geometria e das dimensões adotadas para o reticulado. 28
- Figura 2.3 As redes intracelular e de membrana são replicadas em todas as células e segmentos de membrana do reticulado e a comunicação entre elas é governada pelas mesmas regras de transição. 29
- Figura 2.4 A linha tracejada representa a membrana da célula p . As setas representam as relações de influência entre as classes de variáveis em uma célula p . Por exemplo, $S_p \rightarrow B_p$ significa que S_p influencia, de algum modo, B_p ; esta influência é realizada através das funções de Θ . $\langle B \rangle_p$ denota sinalizadores que estão na vizinhança da célula p . **(A)**: À esquerda, na arquitetura de *J-System* onde há estrutura de membrana explicitamente definida, os sinalizadores B têm origem nos segmentos de membrana da própria célula p . **(B)**: À direita, na arquitetura de *J-System* onde não há estrutura de membrana explicitamente definida, os sinalizadores B têm origem na rede intracelular das células vizinhas. 36

- Figura 2.5 Recorte de três células ($p - 1$, p e $p + 1$) de um reticulado linear retangular. A linha tracejada representa a membrana das células. A célula p neste reticulado tem duas vizinhas: uma à esquerda ($p - 1$) e uma à direita ($p + 1$). E_p , G_p e S_p denotam, respectivamente, as entradas, o estado dos genes e/ou metabólitos intracelulares, e as saídas da rede de regulação gênica da célula p . As setas representam as relações de influência entre as variáveis de estado. **(A)**: Acima, na arquitetura de *J-System* onde há estrutura de membrana explicitamente definida, $B_{p,i}$ denota o vetor de sinalizadores B da célula p na face i , e, similarmente, $A_{p,i}$ denota o vetor de sinais ambientais A da célula p na face i . **(B)**: Abaixo, na arquitetura de *J-System* onde não há estrutura de membrana explicitamente definida, os sinalizadores B têm origem na rede intracelular das células vizinhas. 40
- Figura 3.1 (a): Parte de uma órbita $O(x)$ em um espaço de estados X , onde $f^2(x)$ é o sucessor de $f^1(x)$ e x é a pré-imagem (ou predecessor) de $f^1(x)$. (b): O estado y tem grau de entrada 3. (c): Exemplo de atrator pontual (à esquerda) e periódico (à direita); (d): Exemplo de atrator periódico com uma de suas árvores transientes. O estado x é um exemplo de estado do tipo *jardim do Éden*. (e): Exemplo de bacia de atração. 46
- Figura 3.2 Nesse exemplo de rede intracelular, os sinais $b_0[t]$, $b_1[t]$, $e_0[t]$, $e_1[t]$ são localmente independentes e os sinais $g_0[t]$, $g_1[t]$, $g_2[t]$ e $g_3[t]$ e $g_4[t]$ são localmente regulados. Na rede intracelular expandida é incorporada uma variável para cada sinal localmente independente e é definida uma função de transição do tipo constante para cada uma. 51
- Figura 3.3 Recorte de um reticulado linear de células retangulares contendo as células $p - 1$, p e $p + 1$ (as linhas tracejadas representam os limites das células) na arquitetura de *J-System* onde não há variáveis de estado associadas às membranas das células, isto é, onde temos $\mathcal{B} = \emptyset$. Nesse caso os sinais externos, oriundos das funções de vizinhança Δ na saídas \mathcal{S} das células vizinhas, incidem diretamente sobre um subconjunto \mathcal{V} das variáveis de estado da rede intracelular, que representa a “porta” de entrada dos sinais externos. 60

Figura 3.4 Exemplos de vizinhança em reticulados linear e planar. À esquerda, num reticulado linear quadrado, se $p = i$ temos que $V(p) = \{i - 1, i + 1\}$ e que $V(P) = \{i - 2, i + 2\}$. Ao centro, num reticulado planar quadrado, se $p = (i, j)$ temos que $V(p) = \{(i, j - 1), (i - 1, j), (i, j + 1), (i + 1, j)\}$ e que $V(P) = \{(i, j - 2), (i - 1, j - 1), (i - 2, j), (i - 1, j + 1), (i, j + 2), (i + 1, j + 1), (i + 2, j), (i + 1, j - 1)\}$. À direita, num reticulado planar hexagonal, se $p = (i, j)$ temos que $V(p) = \{(i - 1, j), (i, j + 1), (i + 1, j + 1), (i + 1, j), (i, j - 1), (i - 1, j - 1)\}$ e que $V(P) = \{(i - 2, j), (i - 1, j + 1), (i, j + 2), (i + 1, j + 2), (i + 2, j + 2), (i + 2, j + 1), (i + 2, j), (i + 1, j - 1), (i, j - 2), (i - 1, j - 2), (i - 2, j - 2), (i - 2, j - 1)\}$ 63

Figura 3.5 Um exemplo de árvore de possibilidade para teste e inserção de dois atratores (a_1 e a_2) num reticulado planar de células hexagonais. Suponha que o atrator a_2 quando inserido duas vezes no agrupamento de células torna o arranjo inválido. Todos os arranjos que contém uma inserção inválida (marcadas com X) e todos aqueles que dele derivam (subárvores neles enraizadas) podem ser descartados. . . . 70

Figura 3.6 Recorte de um reticulado linear de células retangulares contendo as células $p - 1, p$ e $p + 1$ (as linhas tracejadas representam os limites das células) na arquitetura onde há sinalizadores de membrana explicitamente definidos. Nesse caso, os sinais de saída da rede intracelular (\mathcal{S}) incidem sobre os sinalizadores de membrana (\mathcal{B}_0 e \mathcal{B}_1 nessa geometria de célula) através de $\mathcal{V}\mathcal{B}_0$ e $\mathcal{V}\mathcal{B}_1$, com $\mathcal{V}\mathcal{B}_0 \subset \mathcal{B}_0$ e $\mathcal{V}\mathcal{B}_1 \subset \mathcal{B}_1$, os quais representam a “porta de entrada” dos sinais externos que operam nos sinalizadores de membrana. Sobre $\mathcal{V}\mathcal{B}_0$ e $\mathcal{V}\mathcal{B}_1$ também incidem os sinais de saída das redes de membranas das faces opostas e adjacentes das células vizinhas, que são representados $\mathcal{S}\mathcal{B}_0$ e $\mathcal{S}\mathcal{B}_1$. Os sinais de saída \mathcal{S} da rede intracelular também incidem sobre $\mathcal{V}\mathcal{B}_0$ e $\mathcal{V}\mathcal{B}_1$ e as funções de vizinhança Δ nos sinais de saída das redes de membrana ($\mathcal{S}\mathcal{B}_0$ e $\mathcal{S}\mathcal{B}_1$) incidem sobre \mathcal{V} , o qual, por sua vez, representa a “porta de entrada” da rede intracelular. 77

- Figura 3.7 À esquerda, num reticulado linear quadrado, se $p = i$ temos que $\mathcal{F}_p = \{0, 1\}$ e que, por exemplo, para $f = 0$ na célula i , temos $f' = 1$ na célula $i + 1$. Ao centro, num reticulado planar quadrado, se $p = (i, j)$ temos que $\mathcal{F}_p = \{0, 1, 2, 3\}$ e que, por exemplo, para $f = 1$ na célula (i, j) , temos $f' = 3$ na célula $(i - 1, j)$. À direita, num reticulado planar hexagonal, se $p = (i, j)$ temos que $\mathcal{F}_p = \{0, 1, 2, 3, 4, 5\}$ e que, por exemplo, para $f = 2$ na célula (i, j) , temos $f' = 5$ na célula $(i + 1, j + 1)$ 79
- Figura 4.1 Arquitetura global do *software* JSS. 86
- Figura 4.2 Exemplo de janelas da aplicação do *Wizard* responsável pelo cadastro de variáveis e funções. 87
- Figura 4.3 Organização do Simulador Progressivo. 89
- Figura 4.4 Organização do Simulador Regressivo. 90
- Figura 4.5 Fluxo no componente Reversor. 90
- Figura 4.6 Fluxo no componente Seletor de Atratores. 91
- Figura 4.7 Fluxo no componente Agrupador. 91
- Figura 4.8 Fluxo no componente Montador. 92
- Figura 4.9 Exemplo de reticulado hexagonal planar na representação do Projetor. 93
- Figura 5.1 Elementos básicos da via do Notch. (a): Na ausência de Notch_intra no núcleo, os fatores de transcrição da família CSL associam-se com um complexo co-repressor (Co-R) e reprimem a transcrição dos genes alvos do Notch. (b): A interação entre o ligante Delta e o domínio extracelular de Notch leva a clivagens em Notch que liberam o domínio intracelular de Notch (Notch_intra), o qual migra para o núcleo onde associa-se com um co-ativador (Co-A). O complexo formado por Notch_intra e Co-A desfaz a ligação entre Co-R e CSL e ativam a transcrição dos genes alvos do Notch. 100
- Figura 5.2 Aqui elipses representam mRNAs, retângulos representam proteínas, hexágonos representam complexos proteicos. Notch e DA têm expressão constitutiva, representadas por '+ → Notch' e '+ → DA', respectivamente. 'X → Y' denota que X ativa Y e 'X • Y' denota que X inibe Y. 101

-
- Figura 5.3 Exemplo de padronização de precursores neuronais onde verificamos a ocorrência de inibição lateral. As células pintadas de branco correspondem aos epidermoblastos e as de preto aos neuroblastos. 112
- Figura 5.4 Rede intracelular expandida do sistema Delta-Notch. 114

Lista de Tabelas

Tabela 5.1	Elementos moleculares essenciais da via do Notch e organismos onde já foram identificados.	99
Tabela 5.2	As variáveis da rede intracelular são identificadas por inteiros 18, 17, . . . , 0. Além de variáveis para os componentes moleculares próprios de sistema Delta-Notch, incluímos – na versão expandida da rede intracelular – as variáveis de entrada e^0 e e^1 e o sinalizador externo b^0	112
Tabela B.1	Lista de atratores da rede intracelular. Nas linhas estão representados os atratores a_0, a_1, \dots, a_{43} e nas colunas as variáveis da rede, as quais são identificadas pelos inteiros 18, 17, . . . , 0.	131
Tabela C.1	Nas linhas estão as bacias a_0, a_1, \dots, a_{43} e nas colunas, da esquerda para a direita: tamanho do período atrator, total de estados na bacia, percentagem do espaço de estados (considerando apenas os estados de saída constante e com expressão de DA e Notch constitutivas) ocupado pela bacia, número de estados que são do tipo jardim do Éden na bacia, a densidade dos estados do tipo jardim do Éden na bacia, máximo nível (altura) nas árvores transientes presentes na bacia e máximo grau de incidência encontrado na bacia.	133

Lista de Abreviaturas e Siglas

CAM	molécula de adesão celular
CM	matriz extracelular
CSL	família de fatores de transcrição contendo os fatores CBF1, Su(H) e LAG1
EEL	estado estacionário local
EEG	estado estacionário global
EGF	fator de crescimento epidérmico
TNF	fatores de necrose tumoral
JSS	simulador de sinalização justácrina
RBN	redes Booleanas aleatórias
RDD	rede dinâmica discreta
SDF	sistema dinâmico discreto finito
SLI	sinais localmente independentes
SLR	sinais localmente regulados
SSJ	sistema de sinalização justácrina

Capítulo 1

Introdução

A comunicação entre células é um evento observado em organismos unicelulares e multicelulares, em vegetais e animais.

Em organismos unicelulares, como, por exemplo, em leveduras, a comunicação pode influenciar na proliferação mútua e na preparação da reprodução sexual. Nos organismos multicelulares a troca de informação entre as células por meio de *moléculas sinalizadoras*, também denominadas *sinais químicos*, corresponde ao principal meio de comunicação entre as células. Essa troca de informação começa nas fases embrionárias iniciais e persiste durante toda a vida, desempenhando papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção do organismo (ALBERTS et al., 2002).

Durante o desenvolvimento, estes sinais são essenciais à estruturação do plano do corpo, à formação e ordenação dos tecidos e órgãos, bem como à coordenação do crescimento e funcionamento de diferentes partes do corpo. Na fase adulta eles participam, de um modo ou de outro, de praticamente quase todas as atividades e funções celulares como, por exemplo, metabolismo, reprodução, secreção, fagocitose, apoptose, produção de anticorpos, etc (WOLPERT, 2002).

1.1 Sinalização Celular

Na comunicação intercelular, a célula emissora do sinal (molécula sinalizadora) é costumeiramente conhecida por *célula sinalizadora* e a receptora do sinal por *célula-alvo*.

Em animais superiores, as moléculas sinalizadoras (ou *ligantes*) podem ser espécies moleculares de diversos tipos, como proteínas, pequenas cadeias peptídicas, aminoácidos,

estereóides, retinóides, nucleotídeos, gases (como óxido nítrico e monóxido de carbono) e derivados de ácidos graxos (ALBERTS et al., 2002).

Nas células-alvo, os ligantes acoplam-se às *moléculas receptoras* (ou *receptores*) e desencadeiam uma resposta nas células-alvo. Para ser caracterizada como receptor, uma molécula deve ser capaz de reconhecer um ligante específico, e, quando acoplado a ele, desencadear uma resposta na célula-alvo. Na maioria dos casos, os receptores são proteínas transmembrana (proteínas que permanecem ancoradas na membrana plasmática) ou moléculas que estão no interior das células-alvo.

Os principais mecanismos utilizados pela célula sinalizadora para realizar a emissão dos sinais são: a) os ligantes são secretados por exocitose; b) os ligantes são liberados por difusão através da membrana plasmática e c) os ligantes permanecem conectados à superfície celular, influenciando apenas células-alvo que estabelecem contato direto com as células sinalizadoras.

Os sinais, por sua vez, podem ser recebidos pelas células-alvo de duas maneiras: a) os receptores transmembrana são ativados pelo acoplamento (*binding*) a ligantes extracelulares, gerando uma cascata de sinais intracelulares que provocam a resposta das células-alvo e b) os receptores intracelulares são ativados por ligantes que penetram nas células-alvo; isso exige que estes ligantes sejam suficientemente pequenos e hidrofóbicos a ponto de se difundirem através da membrana plasmática (ALBERTS et al., 2002).

As formas de comunicação celular são tradicionalmente classificadas em sinalização autócrina, parácrina, endócrina, sináptica, sinalização por junções de fenda e sinalização justácrina. No Apêndice D há um texto introdutório descrevendo brevemente as cinco primeiras formas de comunicação. Na seção que segue descrevemos sinalização justácrina, o objeto de estudo deste trabalho.

1.2 Sinalização Celular Justácrina

O conceito fundamental com o qual trabalharemos — *sinalização justácrina* (do inglês *juxtacrine*) — pode ser definido como um tipo de sinalização, baseado no contato célula-célula, no qual tanto o receptor do sinal (geralmente uma proteína) quanto o ligante (também geralmente uma proteína, responsável pela ativação do receptor) estão ancorados nas membranas plasmáticas, de modo que neste tipo de sinalização a ativação do receptor depende do contato direto entre as membranas (justapostas) das células envolvidas. Isso

implica que neste tipo de sinalização os ligantes atuam de modo mais restrito, operando apenas sobre as células adjacentes (imediatamente vizinhas). Existe uma variedade de vias de sinalização que são disparadas por ligantes ancorados na membrana (FAGOTTO; GUMBINER, 1996).

Há casos em que a sinalização justácrina parece uma variante da sinalização parácrina, nos quais ligantes ancorados na membrana são virtualmente os mesmos que aqueles secretados (como, por exemplo, fatores de crescimento), exceto pelo fato de que têm um domínio de ancoragem. Nesses casos, geralmente os ligantes ancorados são precursores de formas solúveis que podem ser obtidas facilmente por clivagem proteolítica (MASSAGUÉ; PANDIELLA, 1993; MASSAGUÉ, 1990).

Em algumas situações, receptores específicos permanecem não afetados pela clivagem do ligante, de modo que as células sinalizadoras ganham a flexibilidade de usar o mesmo fator para sinalização de “curto” ou “longo” alcance. Um exemplo desse tipo de situação são as formas solúveis e as ancoradas na membrana dos ligantes da família de fatores de crescimento epidérmico (EGF) que se ligam ao mesmo receptor EGF.

Por outro lado, há casos em que os ligantes parácrinos e justácrinos, embora similares, agem via diferentes receptores para disparar respostas qualitativamente diferentes, como, por exemplo, nos fatores de necrose tumoral (TNF).

É interessante observar que moléculas de adesão celular (CAMs) podem influir na sinalização justácrina. Isso porque CAMs podem conduzir as células ao estabelecimento (e manutenção) do contato próximo entre as suas membranas, favorecendo, dessa forma, a conexão entre ligantes e receptores justácrinos, de modo que as CAMs assumem papel regulador na sinalização justácrina.

Sinalização justácrina é vital em vários momentos do desenvolvimento e na manutenção dos tecidos como, por exemplo, na neurogênese em *Drosophila melanogaster* (CASTRO et al., 2005), na geração de polaridade celular em ommatídias (BRAY, 2000) e no desenvolvimento anterior de vertebrados (LEWIS, 1998), entre outros. Ela participa ativamente dos processos de padronização celular, em particular da padronização “fina” (de curto alcance).

Os dois principais mecanismos que operam em sistemas de sinalização justácrina para a formação de padrões são a inibição e a indução lateral. Vamos usar o termo *inibição lateral* para identificar interações do tipo célula-célula que levam uma célula a optar por determinada identidade, e, ao mesmo tempo, inibir (“desestimular”) as células vizinhas de

seguirem o mesmo destino. O termo *indução lateral* será usado para o mecanismo reverso da inibição lateral, ou seja, o utilizaremos para identificar interações célula-célula que levam uma célula a optar por uma identidade, e, ao mesmo tempo, induzir (“estimular”) as células vizinhas a seguirem o mesmo destino.

Bons modelos de sistemas de sinalização justácrina devem ser capazes de capturar (representar) esses mecanismos e reproduzir padrões de expressão espaço-temporais observados em muitos eventos celulares, em especial no processo de desenvolvimento.

1.3 Trabalhos Anteriores: Modelos Formais

O primeiro, e muito citado, modelo formal para sinalização justácrina (COLLIER et al., 1996) foi formulado em termos da atividade do ligante Delta e seu receptor Notch. Neste modelo, o mecanismo de inibição lateral foi descrito através de um laço de retroalimentação, por meio do qual pequenas diferenças entre células vizinhas são amplificadas e consolidadas. Neste trabalho, Collier *et al.* propuseram um conjunto de equações diferenciais para governar a taxa de produção dessas proteínas, onde tempo e espaço são, respectivamente, de natureza contínua e discreta.

Marnellos e Mjolsness também propuseram modelos formais para sinalização justácrina em *Xenopus* (MARNELLOS et al., 2000) e em *Drosophila* (MARNELLOS; MJOLSNESS, 1998), que partem de outro trabalho do próprio Mjolsness (MJOLSNESS; SHARP; REINITZ, 1991), baseado num conjunto de equações diferenciais não lineares. No entanto, a ênfase desses trabalhos não está na análise matemática, mas sim na validação experimental do modelo.

Os trabalhos de Owen e Sherratt (OWEN; SHERRATT, 1998; OWEN; SHERRATT; WEARING, 2000) e de Wearing e colegas (WEARING; OWEN; SHERRATT, 2000; WEARING; SHERRATT, 2001) apresentam uma novidade em relação aos modelos anteriores: em vez de adotar uma medida “arbitrária” da atividade das proteínas como parâmetro, eles supõem que as variáveis do modelo são: a) a quantidade de moléculas ligantes livres; b) a quantidade de moléculas receptoras livres e c) a quantidade de complexos ligante/receptor formados na superfície da célula. Ou seja, eles acrescentam “detalhes” que refletem os eventos de acoplamento (*binding*) entre moléculas ligantes livres (L) e receptores livres (R) para formação de complexos ligante/receptor (C) na membrana das células.

Segundo esses modelos, estas quantidades (de L , R e C) governam (inibindo ou induzindo) a produção de novos ligantes e receptores, e, conseqüentemente, promovem inibição

ou indução lateral, que, em última instância, acaba influenciando na formação de padrões.

Há trabalhos (OWEN; SHERRATT; MYERS, 1999; WEARING; SHERRATT, 2001; OWEN, 2002; WEBB; OWEN, 2004b) que analisam o comportamento destes modelos e o tipo de padrão que são capazes de gerar em várias geometrias de células (quadradas, hexagonais, etc).

A maioria dos modelos propostos para sinalização justácrina é basicamente contínua. Alguns são contínuos no tempo e no espaço (OWEN; SHERRATT, 1998), outros são contínuos no tempo e discretos no espaço (MONK, 1998; OWEN; SHERRATT; WEARING, 2000; WEARING; OWEN; SHERRATT, 2000).

Luthi e colegas (LUTHI et al., 1998) propuseram um modelo para sinalização justácrina onde tempo e espaço são ambos de natureza discreta, que consiste basicamente em um autômato celular com variáveis de estado contínuo.

O mais recente modelo para sinalização justácrina (WEBB; OWEN, 2004a) incorporou o tratamento de distribuição não homogênea de receptores na membrana da célula. Ele é uma extensão do modelo proposto por Owen e Sherratt (OWEN; SHERRATT, 1998; OWEN; SHERRATT; WEARING, 2000) e Wearing e colegas (WEARING; OWEN; SHERRATT, 2000; WEARING; SHERRATT, 2001) e a ele adicionou termos relativos ao transporte difusível de proteínas entre segmentos de membrana de uma mesma célula e modificou as funções de retroalimentação (*feedback*) de modo que elas considerassem a produção localizada de ligantes e receptores.

1.4 Motivação, Objetivos e Contribuições

Definimos um *sistema de sinalização justácrina* como sendo o conjunto formado pelos elementos moleculares, suas interações e os mecanismos moleculares que participam do processo de sinalização justácrina. Estes elementos e mecanismos podem ser intracelulares — como, por exemplo, vias de transdução de sinal ou redes de regulação gênica — ou estar associados às membranas das células em processo de comunicação como, por exemplo, eventos de acoplamento (*binding*) entre ligantes e receptores posicionados na membrana.

Os principais modelos existentes para sistemas de sinalização justácrina (daqui para frente referidos como SSJ) podem ser divididos em três grupos: a) os Modelos de Atividade como, por exemplo, o modelo de Collier *et al.* (COLLIER et al., 1996); b) os Modelos Ligante-Receptor como, por exemplo, o modelo de Owen e Serratt (OWEN; SHERRATT,

1998; OWEN; SHERRATT; WEARING, 2000) e c) os Modelos Segmentais como, por exemplo, o modelo de Webb *et al.* (WEBB; OWEN, 2004a). Todos eles têm em comum o fato de que:

- (i) são baseados em equações diferenciais, o que os torna difíceis de analisar caso o número de variáveis dependentes cresça, pois exigem o conhecimento de muitos parâmetros experimentais, os quais geralmente não estão disponíveis;
- (ii) com exceção do tipo de modelo proposto por von Dassow *et al.* (DASSOW *et al.*, 2000; DASSOW; ODELL, 2002), eles simplificam a participação dos componentes e mecanismos intracelulares envolvidos no processo de sinalização justácrina como, por exemplo, a participação de alguns genes críticos e seus correspondentes mecanismos de regulação; isto é, esses modelos não descrevem “de modo detalhado” como estes componentes intracelulares operam no processo de sinalização. Isso é feito “encapsulando” a influência dos componentes intracelulares em funções de retroalimentação, o que faz com que os modelos citados sejam focados nos eventos de *binding* que ocorrem na membrana.

Os modelos existentes que são discretos no tempo e no espaço como, por exemplo, o modelo de Luthi *et al.* (LUTHI *et al.*, 1998), também não capturam explicitamente as interações moleculares intracelulares que ocorrem no processo de sinalização justácrina.

Em um bom modelo genérico (um *framework*) para SSJ, deveríamos observar as seguintes características:

1. ter uma estrutura semelhante à dos modelos normalmente utilizados por biólogos, de modo que seja intuitivamente forte a eles;
2. ter a capacidade de representar os diversos elementos e as suas modificações no tempo (dinâmica) presentes em SSJ;
3. ser rico e abrangente o suficiente a ponto de ser capaz de capturar diversos tipos de eventos moleculares (intra e extra-celulares) que ocorrem no processo de sinalização justácrina como, por exemplo, modificações conformacionais em proteínas de membrana, interações proteína-proteína que podem ocorrer na membrana ou no interior da célula, transcrição, tradução, dependência entre genes e modificações pós-traducionais;
4. ter capacidade de representação modular dos sistemas de sinalização, pois: a) a complexidade das redes de sinalização e regulação sugere que sua análise exige que

os métodos de modelagem sejam capazes de tratar partes da rede como módulos e b) muitas redes de sinalização apresentam grupos de elementos e mecanismos que apresentam funcionamento e organização modulares (BRUGGERMAN et al., 2002);

5. ser capaz de trabalhar com diferentes escalas de grandeza de tempo e espaço, pois redes de sinalização celular operam com eventos cujas respostas variam de décimos ou centésimos de segundo (por exemplo, modificações em proteínas) a vários minutos (regulação transcricional e traducional, por exemplo) (PAPIN et al., 2005);
6. permitir a integração de dados experimentais de diferentes tipos e origens.

Embora os modelos de tempo contínuo permitam um nível de descrição mais detalhado das taxas de variação envolvidas (por exemplo, de concentração de mRNA e proteínas), eles – como já mencionamos – exigem o conhecimento de dados experimentais nem sempre disponíveis (por exemplo, valores de constantes cinéticas). Além disso, a modelagem discreta de sistemas de sinalização (ALLEN et al., 2006) e de regulação (THOMAS, 1973; ALBERT; OTHMER, 2003) já é uma atividade relativamente bem estabelecida.

Dadas essas características dos modelos até então desenvolvidos para SSJ, um dos objetivos que estabelecemos para trabalho foi desenvolver um *framework* de modelagem para SSJ que fosse aberto e geral o suficiente para permitir a manipulação de modelos para sistemas de sinalização justácrina de diferentes granulosidades, mas que fosse também fechado e restritivo o suficiente a ponto de permitir que suas restrições, associadas às características próprias dos SSJ, pudessem ser exploradas.

Nesse sentido, propusemos um *framework* (denominado *J-Systems*) de modelagem qualitativa discreta de SSJ que, ao mesmo tempo, contempla algumas das características desejáveis mencionadas acima e que pode ser utilizado em diversas situações e aplicações, contextualizadas no processo de sinalização justácrina. Os *J-Systems* são definidos como uma classe de sistemas dinâmicos com tempo e espaço discretos e variáveis de estado que podem ser contínuas ou discretas.

Redes intracelulares de sinalização e regulação gênica podem ser modeladas como sistemas dinâmicos discretos finitos (SDF) (JONG, 2002; GUBITOSO et al., 2001) e tipos celulares podem ser interpretados como bacias de atração desses SDF (KAUFFMAN, 1993; WUENSCH, 1998b, 2004), dentro das quais a dinâmica celular estabiliza-se em atratores a partir de vários estados iniciais. Essa visão permite explicar, do ponto de vista dos modelos (abstração) das redes de regulação e sinalização, o fato de que um mesmo genoma pode

criar e manter uma variedade de tipos e sub-tipos celulares.

Propusemos uma extensão para essa interpretação de modo a conceber as bacias de atração global em uma subclasse de *J-Systems* – composta de SDF – como padrões celulares: um tipo celular corresponde a uma bacia de atração local da rede intracelular e um padrão celular corresponde a uma bacia de atração global, que é composta por um arranjo de bacias locais posicionadas em células vizinhas tal que as saídas e as entradas das dinâmicas locais em cada célula e em cada segmento de membrana são compatíveis.

Outro objetivo que estabelecemos para o trabalho foi o desenvolvimento de um método automático para identificação de padrões celulares em SSJ modelados em *J-Systems*. Nesse sentido, propusemos um método para computação de atratores globais (padrões celulares) nesta subclasse dos *J-Systems* composta de sistemas dinâmicos discretos finitos.

Desenvolvemos um *software*, denominado *Juxtacrine Signaling Simulator* (JSS), para dar suporte à construção e à análise de modelos de SSJ em *J-Systems*. Ele provê recursos para facilitar o desenvolvimento e o refinamento de modelos, tal como interfaces de modelagem e análise de dinâmicas e padrões celulares. Além disso, dispõe também de um simulador de SSJ e um módulo que implementa o método de identificação de padrões celulares (atratores globais) mencionado acima.

O terceiro objetivo que estabelecemos para o trabalho foi o desenvolvimento de uma aplicação que servisse ao propósito de validação dos *J-Systems* e do método proposto para cálculo de padrões celulares em SSJ. Tendo em vista este propósito, escolhemos um SSJ já estabelecido e bem compreendido do ponto de vista biológico, o sistema Delta-Notch, descrito na Seção 5.2.1.

Construímos um novo modelo do tipo *J-System* de três níveis para o sistema Delta-Notch e sua participação no processo de segregação de neuroblastos em *D. melanogaster*. A este modelo pudemos atribuir um comportamento esperado, visto que ele deve mimetizar o comportamento (já conhecido) do sistema biológico. Logo, a fim de validá-lo, realizamos alguns experimentos *in silico* e comparamos os resultados com o comportamento esperado. Os comportamentos e padrões celulares obtidos com esses experimentos foram compatíveis com os resultados esperados, visto que reproduziram características já bem estabelecidas e documentadas dos processos em questão.

1.5 Organização do Texto

No Capítulo 2, fazemos uma descrição detalhada e formal dos *J-Systems*, o *framework* de modelagem de SSJ. No Capítulo 3, descrevemos o método para identificar padrões celulares em SSJ modelados em *J*, isto é, para computar os atratores globais em *J-Systems*. No Capítulo 4, descrevemos a estrutura e as características fundamentais do *software* JSS. No Capítulo 5, discutimos algumas interpretações biológicas e mostramos a aplicação de *J-Systems* na modelagem dos elementos e interações básicas que participam da segregação de neuroblastos em *D. melanogaster*. Por fim, no Capítulo 6, tecemos as conclusões e considerações finais.

Capítulo 2

J-Systems: um *Framework* para Modelagem Discreta de Sistemas de Sinalização Justácrina

Neste capítulo propomos um modelo formal genérico para sistemas de sinalização justácrina¹ denominado de *J-Systems* (ou *Metamodelo J*) e definido como uma classe de sistemas dinâmicos com tempo e espaço discretos e variáveis de estado que podem ser contínuas ou discretas. Um modelo M em J corresponde a um sistema dinâmico cuja forma geral é

$$M = (\mathcal{R}, \mathcal{V}, \mathcal{T}, \mathcal{I}),$$

onde \mathcal{R} é um reticulado regular, \mathcal{V} é um conjunto finito de variáveis associado a cada elemento de \mathcal{R} , \mathcal{T} é um conjunto de regras de transição e \mathcal{I} é um conjunto de condições iniciais associado a \mathcal{V} . Nas seções seguintes as propriedades e restrições que definem estes componentes são descritas em detalhe.

2.1 Uma Visão Geral dos *J-Systems*

Em *J-Systems* uma estrutura tecidual (um grupo de células vivas) é representada por um reticulado finito, cujos elementos, denominados células, guardam uma correspondência 1 : 1 com as células vivas, de modo que estas são representadas individualmente. Na Fig. 2.1 há um esquema ilustrativo dessa representação. Uma célula do reticulado é uma

¹Uma versão deste modelo foi publicada em (ROZANTE; GUBITOSO; MATIOLI, 2007)

entidade autônoma cujo estado é definido pelo estado dos seus componentes intracelulares e de membrana.

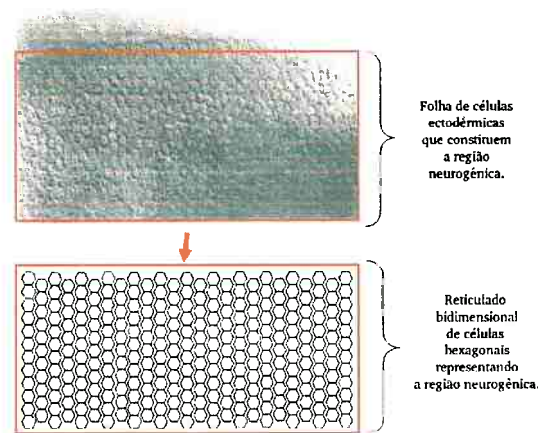


Figura 2.1: Um exemplo de reticulado planar de células hexagonais representando as células da região neurogênica, que é um grupo de células ectodérmicas presentes durante a neurogênese em *D. melanogaster*.

Os *componentes intracelulares* de uma célula do reticulado são uma classe de variáveis de estado que representam os estados dos elementos moleculares intracelulares da célula viva. Os *componentes de membrana* de uma célula do reticulado são outra classe de variáveis de estado, a qual é dividida em subclasses, sendo que cada subclasse está associada a uma face (segmento de membrana) da célula. Os componentes de membrana representam os estados dos elementos moleculares presentes nos segmentos de membrana plasmática da célula viva. Na Fig. 2.2 há um esquema ilustrativo dessa representação.

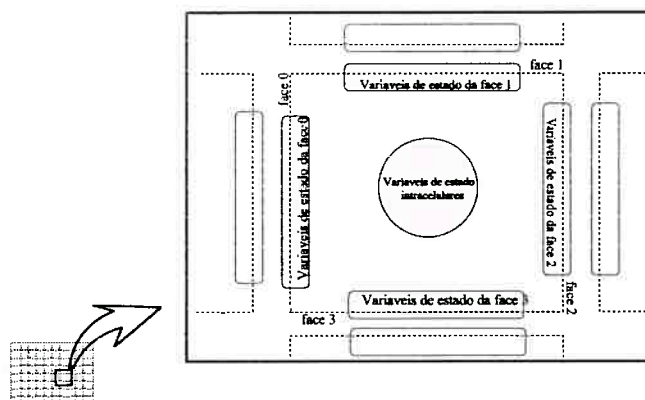


Figura 2.2: Todas as células do reticulado contêm os mesmos componentes: uma classe de variáveis de estado associada aos elementos moleculares intracelulares e uma classe de variáveis de estado associada aos elementos moleculares presentes em cada uma das faces (segmentos de membrana) da célula. O número de faces depende da geometria e das dimensões adotadas para o reticulado.

Todas as células do reticulado contêm os mesmos componentes (intracelulares e de membrana) e seus estados, a cada passo de tempo discreto, são determinados pela aplicação das mesmas regras de transição que valem para toda célula do reticulado finito. As regras de transição definem o esquema de ligação/interação entre os componentes da célula e podem ser classificadas em intracelulares (aquelas que atualizam os componentes intracelulares) e de membrana (aquelas que atualizam os componentes de membrana).

Os componentes intracelulares, juntamente com as suas regras de transição, representam as redes de sinalização e de regulação intracelular presentes na célula viva, as quais serão denominadas simplesmente de *redes intracelulares*. Os componentes de membrana, juntamente com as suas regras de transição, representam os mecanismos de sinalização que operam na membrana plasmática da célula viva, abreviadamente chamados de *redes de membrana*. As redes intracelulares e de membrana trocam sinais entre si, em toda célula, através das mesmas regras. Na Figura 2.3 há uma representação esquemática dessas redes e suas relações.

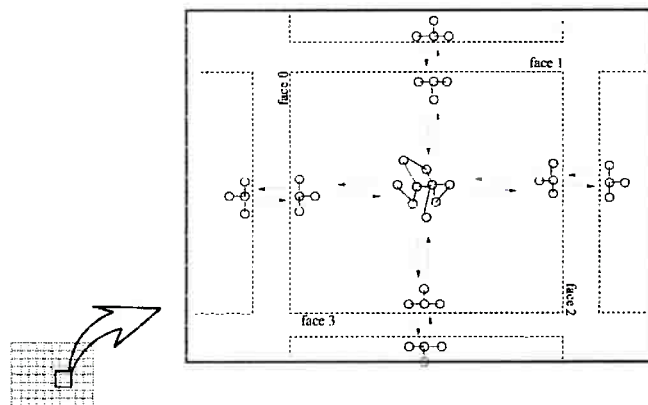


Figura 2.3: As redes intracelular e de membrana são replicadas em todas as células e segmentos de membrana do reticulado e a comunicação entre elas é governada pelas mesmas regras de transição.

2.2 Caracterização da Estrutura Tecidual

A estrutura utilizada na representação de tecidos em *J-Systems*, denominada *reticulado* e denotada por \mathcal{R} , é uma rede regular finita de elementos, denominados *células*, as quais são dotadas de topologia fixa e regras regulares de acoplamento mútuo. Os elementos que caracterizam um reticulado são:

- suas dimensões, que em *J-Systems* estão restritas aos casos $1D$, $2D$ e $3D$;

- seu tamanho, ou seja, seu número de células;
- sua topologia, ou seja, a geometria de suas células;
- as condições de limite (ou de contorno), ou seja, o número de vizinhos das células que se localizam nas extremidades (bordas) do reticulado. Estas condições são usadas para determinar, por exemplo, se uma célula, localizada na borda esquerda de um reticulado, tem ou não vizinhos à sua esquerda. Em *J-Systems* tais condições estão restritas a dois casos:
 - Limite *periódico*: consiste em copiar o reticulado em seus limites laterais, isto é, as células das bordas opostas do reticulado são vizinhas entre si, dando a impressão de que ele se fecha ou se completa nas laterais;
 - Limite *linear* (ou de valores fixos): consiste em fixar valores para as células presentes nos limites do reticulado. O valor a ser atribuído deve carregar a informação de que a célula não possui a mesma quantidade de vizinhos daquelas posicionadas no “interior” do reticulado.

2.3 Caracterização das Células

Dado um reticulado \mathcal{R} , uma célula em \mathcal{R} é identificada por sua posição relativa p , representada por um ponto nos eixos coordenados: $p = (x) \in \mathbb{N}$ (para reticulado linear), $p = (x, y) \in \mathbb{N}^2$ (para reticulado planar) ou $p = (x, y, z) \in \mathbb{N}^3$ (para reticulado espacial). Além do seu identificador, cada célula p em \mathcal{R} contém um conjunto de variáveis $\mathcal{V} = \{\mathcal{E}, \mathcal{G}, \mathcal{S}, \mathcal{B}, \mathcal{A}\}$, cujos elementos são assim descritos:

- Um conjunto finito \mathcal{E} de variáveis denominado *entrada da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica*, abreviadamente chamado de *entrada da rede intracelular*. Denominamos um elemento $e^k \in \mathcal{E}$ por *entrada* e $e^k(t) \in \mathbb{E}$, por *valor da entrada* e^k no tempo t , $t \in \mathbb{T}$, em que $\mathbb{T} \subset \mathbb{N}$ denota o domínio do tempo discreto e $\mathbb{E} \subset \mathbb{R}$ é o conjunto dos possíveis valores que uma entrada pode assumir. Representamos os diversos valores de entrada $e^k(t)$ por um vetor bidimensional E que denominaremos de *vetor de entradas da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica* ou, abreviadamente, *vetor de entradas da rede intracelular*. Denotamos por E_p o vetor E associado à célula p , por e_p^k a variável de entrada e^k representada em E_p e por

$e_p^k(t)$ o valor de entrada $e^k(t)$ relativo à célula p . Desse modo, o vetor E na célula p é definido como segue:

$$E_p = \begin{bmatrix} e_p^1(t-0) & e_p^1(t-1) & \cdots & e_p^1(t-\tau_E) \\ e_p^2(t-0) & e_p^2(t-1) & \cdots & e_p^2(t-\tau_E) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ e_p^{|\mathcal{E}|}(t-0) & e_p^{|\mathcal{E}|}(t-1) & \cdots & e_p^{|\mathcal{E}|}(t-\tau_E) \end{bmatrix}$$

Assim, $E_p[k][t-x]$ representa $e_p^k(t-x)$, isto é, o valor da entrada e^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{E}|$, na célula p , no instante $t-x$, $0 \leq x \leq \tau_E$, sendo que τ_E denota a *memória* (o mais antigo instante considerado) do sistema para as variáveis em \mathcal{E} .

- Um conjunto finito \mathcal{G} de variáveis de estado denominado *estado dos genes e/ou metabólitos intracelulares na rede de regulação e sinalização intracelular*, abreviadamente chamado de *estado da rede intracelular*. Denominamos um elemento $g^k \in \mathcal{G}$ por *estado* e $g^k(t) \in \mathbb{G}$ por estado de g^k no instante t , $t \in \mathbb{T}$, sendo que $\mathbb{G} \subset \mathbb{R}$ denota o conjunto dos possíveis estados que um gene e/ou metabólito intracelular pode assumir. Representamos os estados $g^k(t)$ por um vetor bidimensional G de variáveis de estado, que chamaremos de *vetor de estados dos genes e/ou metabólitos intracelulares*, abreviadamente denominado *vetor de estados intracelular* e que denota o *histórico* (estado em passos de tempo atual e anteriores) dos genes e/ou metabólitos considerados no modelo. Denotamos por G_p o vetor de variáveis de estado G associado à célula p , por g_p^k a variável de estado g^k representada em G_p e por $g_p^k(t)$ o estado $g^k(t)$ relativo à célula p . Desse modo, o vetor G na célula p é definido como segue:

$$G_p = \begin{bmatrix} g_p^1(t-0) & g_p^1(t-1) & \cdots & g_p^1(t-\tau_G) \\ g_p^2(t-0) & g_p^2(t-1) & \cdots & g_p^2(t-\tau_G) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ g_p^{|\mathcal{G}|}(t-0) & g_p^{|\mathcal{G}|}(t-1) & \cdots & g_p^{|\mathcal{G}|}(t-\tau_G) \end{bmatrix}$$

Assim, $G_p[k][t-x]$ representa $g_p^k(t-x)$, isto é, o estado do gene e/ou metabólito intracelular g^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{G}|$, na célula p , no instante $t-x$, $0 \leq x \leq \tau_G$, sendo que τ_G denota a *memória* (o mais antigo instante considerado) do sistema para as variáveis em \mathcal{G} .

Nessa representação é fácil ver que:

- Uma coluna x , $0 \leq x \leq \tau_G$, de G_p corresponde à representação, no instante $t - x$, do estado de todos os genes e/ou metabólitos intracelulares considerados, sendo que a primeira coluna ($x = 0$) corresponde ao instante corrente;
 - Uma linha k , $1 \leq k \leq |\mathcal{G}|$, de G_p corresponde à representação do estado do gene e/ou metabólito intracelular g^k em todos os instantes considerados;
- Um conjunto finito \mathcal{S} de variáveis denominado *saída da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica*, abreviadamente chamado de *saída da rede intracelular*. Denominamos um elemento $s^k \in \mathcal{S}$ por *saída* e $s^k(t) \in \mathbb{S}$ por *valor da saída* s^k no tempo t , $t \in \mathbb{T}$, sendo que $\mathbb{S} \subset \mathbb{R}$ denota o conjunto dos possíveis valores que uma saída pode assumir. Representamos os diversos valores de saída $s^k(t)$ por um vetor bidimensional S que denominaremos de *vetor de saídas da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica*, abreviadamente chamado de *vetor de saídas da rede intracelular*. Denotamos por S_p o vetor S associado à célula p , por s_p^k a variável de saída s^k representada em S_p e por $s_p^k(t)$ o valor de saída $s^k(t)$ relativo à célula p . Desse modo, o vetor S na célula p é definido como segue:

$$S_p = \begin{bmatrix} s_p^1(t-0) & s_p^1(t-1) & \cdots & s_p^1(t-\tau_S) \\ s_p^2(t-0) & s_p^2(t-1) & \cdots & s_p^2(t-\tau_S) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ s_p^{|\mathcal{S}|}(t-0) & s_p^{|\mathcal{S}|}(t-1) & \cdots & s_p^{|\mathcal{S}|}(t-\tau_S) \end{bmatrix}$$

Assim, $S_p[k][t-x]$ representa $s_p^k(t-x)$, isto é, o valor da saída s^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{S}|$, na célula p , no instante $t-x$, $0 \leq x \leq \tau_S$, sendo que τ_S denota a *memória* (o mais antigo instante considerado) do sistema para as variáveis em \mathcal{S} .

- Existem duas diferentes arquiteturas de *J-Systems*: com ou sem estrutura de membrana explicitamente definida. Se o *J-System* tem estrutura de membrana explicitamente definida, a cada célula em \mathcal{R} é associado um conjunto finito $\mathcal{F} \subset \mathbb{N}$ de segmentos representando as faces (segmentos de membrana) da célula. O número $|\mathcal{F}|$ de faces de uma célula depende da geometria e das dimensões do reticulado. Por exemplo, para um reticulado planar e quadrado temos $|\mathcal{F}| = 4$.

Por sua vez, a cada face $f \in \mathcal{F}$ de cada célula do reticulado estão associados dois conjuntos de variáveis, descritos da seguinte forma:

- Um conjunto de variáveis de estado \mathcal{B}_f denominado *estado de sinalização trans-*

membrana da face f , abreviadamente chamado *estado da membrana f* . Denominamos um elemento $b_f^k \in \mathcal{B}_f$ por *senalizador de membrana* e $b_f^k(t) \in \mathbb{B}_f$ por *estado do sinalizador de membrana b_f^k* no instante t , sendo $\mathbb{B}_f \subset \mathbb{R}$ o conjunto dos possíveis estados que um sinalizador de membrana pode assumir na face f . Os estados dos sinalizadores de membrana, em uma face f , são representados por um vetor bidimensional B_f de variáveis de estado, denominado *vetor de sinalização de membrana da face f* . Denotamos por $B_{p,f}$ o vetor de variáveis de estado B da célula p associado à face f , por $b_{p,f}^k$ a variável de estado b_f^k representada em $B_{p,f}$ e por $b_{p,f}^k(t)$ o estado $b_f^k(t)$ relativo à célula p na face f . Desse modo, o vetor $B_{p,f}$, que representa a quantidade, a concentração, a atividade das proteínas ou os produtos de membrana da célula p na face f , é definido da seguinte forma:

$$B_{p,f} = \begin{bmatrix} b_{p,f}^1(t-0) & b_{p,f}^1(t-1) & \cdots & b_{p,f}^1(t-\tau_{B_f}) \\ b_{p,f}^2(t-0) & b_{p,f}^2(t-1) & \cdots & b_{p,f}^2(t-\tau_{B_f}) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ b_{p,f}^{|\mathcal{B}_f|}(t-0) & b_{p,f}^{|\mathcal{B}_f|}(t-1) & \cdots & b_{p,f}^{|\mathcal{B}_f|}(t-\tau_{B_f}) \end{bmatrix}$$

Assim, $B_{p,f}[k][t-x]$ representa $b_{p,f}^k(t-x)$, isto é, o estado do sinalizador b^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{B}_f|$, na célula p , na face f , no instante $t-x$, $0 \leq x \leq \tau_{B_f}$, sendo que τ_{B_f} denota a *memória* (o mais antigo instante considerado) do sistema para as variáveis em \mathcal{B}_f .

Nessa representação é fácil ver que:

- * Um coluna x , $0 \leq x \leq \tau_{B_f}$, de $B_{p,f}$ corresponde à representação, no instante $t-x$, do estado de todos os sinalizadores da célula p , sendo que a primeira coluna ($x=0$) corresponde ao instante corrente;
- * Uma linha k , $1 \leq k \leq |\mathcal{B}_f|$, de $B_{p,f}$ corresponde à representação do estado do sinalizador $b_{p,f}^k$ em todos os instantes considerados;

Evidentemente, o número de vetores B_f que cada célula contém é igual ao número de faces da célula, que, como vimos, depende da geometria e dimensões do reticulado. Por exemplo, para um reticulado cúbico teremos seis vetores B_f .

- Um conjunto \mathcal{A}_f de variáveis denominado *estado de sinalização ambiental da face f* . Denominamos um elemento $a_f^k \in \mathcal{A}_f$ por *senal ambiental* e $a_f^k(t) \in \mathbb{A}_f$ por *valor do sinal ambiental a_f^k* no instante t , sendo $\mathbb{A}_f \subset \mathbb{R}$ o conjunto dos possíveis valores que um sinal ambiental pode assumir na face f . Os

sinais ambientais representam eventos externos não explicitamente modelados e que alteram o estado dos sinalizadores de membrana. Os estados dos sinais ambientais, em uma face f , são representados por um vetor bidimensional A_f de variáveis, denominado *vetor de sinalização ambiental* da face f . Denotamos por $A_{p,f}$ o vetor A da célula p associado à face f , por $a_{p,f}^k$ a variável a_f^k representada em $A_{p,f}$ e por $a_{p,f}^k(t)$ o valor $a^k(t)$ relativo à célula p na face f . Desse modo, o vetor $A_{p,f}$ é definido como segue:

$$A_{p,f} = \begin{bmatrix} a_{p,f}^1(t-0) & a_{p,f}^1(t-1) & \cdots & a_{p,f}^1(t-\tau_{A_f}) \\ a_{p,f}^2(t-0) & a_{p,f}^2(t-1) & \cdots & a_{p,f}^2(t-\tau_{A_f}) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{p,f}^{|\mathcal{A}_f|}(t-0) & a_{p,f}^{|\mathcal{A}_f|}(t-1) & \cdots & a_{p,f}^{|\mathcal{A}_f|}(t-\tau_{A_f}) \end{bmatrix}$$

Assim, $A_{p,f}[k][t-x]$ representa $a_{p,f}^k(t-x)$, isto é, o valor do sinal ambiental a^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{A}_f|$, na célula p , na face f , no instante $t-x$, $0 \leq x \leq \tau_{A_f}$, sendo que τ_{A_f} denota a *memória* (o mais antigo instante considerado) do sistema para as variáveis em \mathcal{A}_f .

De modo similar ao caso anterior, o número de vetores A_f que cada célula contém é dependente da geometria e dimensões do reticulado.

A Figura 2.5 (página 40) fornece uma intuição acerca do “posicionamento” desses vetores no reticulado.

2.4 Transições de Estado

A evolução no tempo dos valores das variáveis de estado em *J-Systems* é determinada pelas regras de transição de estado \mathcal{T} , que são as mesmas para toda célula do reticulado; elas podem ser divididas nas seguintes classes:

- Classe Ψ , contendo as regras para atualização de G . O vetor de variáveis de estado G_p , $p \in \mathcal{R}$, pode ser atualizado de três maneiras (não exclusivas): a) por influência do estado de G_p , ou seja, pelo nível de expressão dos genes e/ou estado dos metabólitos intracelulares da própria célula p e/ou b) por influência de E_p , ou seja, pela influência de um sinal independente presente na entrada da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica da própria célula p e/ou c) pela influência do estado

dos sinalizadores transmembrana B_p , que podem representar sinais de membrana presentes na própria célula p ou sinais intracelulares das células vizinhas.

Uma observação importante a fazer é que aquelas funções em Ψ responsáveis por atualizar variáveis em G , e que sofrem influência dos sinalizadores transmembrana, não têm como parâmetros os próprios sinais transmembrana, mas sim uma função nestes sinais que os trata individualmente para cada face da célula. Em outras palavras, se uma variável de estado intracelular g^k sofre influência do sinalizador de membrana b^h da própria célula (caso o J -System tenha estrutura de membrana explicitamente definida) ou de um sinal de saída s^h das células vizinhas (caso o J -System não tenha estrutura de membrana explicitamente definida), a função responsável por atualizar g^k não tem como parâmetros $b_1^h, \dots, b_{|\mathcal{F}|}^h$ (ou $s_1^h, \dots, s_{|\mathcal{F}|}^h$), mas sim uma função em $b_1^h, \dots, b_{|\mathcal{F}|}^h$ (ou em $s_1^h, \dots, s_{|\mathcal{F}|}^h$). Estas funções são denominadas *funções de vizinhança ou membrana* e estão contidas em outra classe de funções denotada por Δ .

Na Seção 2.4.1 detalhamos como os vetores G são atualizados.

- Classe Φ , contendo as regras para atualização de S . O vetor de variáveis de saída S_p , $p \in \mathcal{R}$, pode ser atualizado de duas maneiras (não exclusivas): a) por influência de G_p , ou seja, pela influência do estado do genes e/ou metabólitos intracelulares da própria célula p e/ou b) por influência de E_p , ou seja, pela influência dos valores presentes na entrada da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica da própria célula p . Na Seção 2.4.2 detalhamos como os vetores S são atualizados.
- Classe Θ , contendo as regras para atualização de B . Sejam $B_{p,f}$, com $1 \leq f \leq |\mathcal{F}|$ e $p \in \mathcal{R}$. O vetores de variáveis de estado $B_{p,f}$ podem ser atualizados de quatro maneiras (não exclusivas): a) por influência dos valores de S_p , ou seja, pelas saídas da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica na célula p e/ou b) por influência do estado de B nas células vizinhas à célula p , ou seja, pelo estado de sinalização de membrana nas células vizinhas à célula p e/ou c) por influência do estado de $B_{p,f}$, ou seja, pelo estado dos sinalizadores de membrana na própria célula célula p na face f e/ou d) por influência de um sinal independente, representado através dos vetores $A_{p,f}$; este sinal independente representa um evento externo, uma alteração ambiental (como por exemplo, interação com a matriz extracelular, choque térmico, estímulo mecânico, etc) que pode levar os vetores $B_{p,f}$ a alguma modificação nos seus valores. Na Seção 2.4.3 detalhamos como os vetores $B_{p,f}$ são

atualizados.

Os vetores E_p e A_p , $p \in \mathcal{R}$, representam sinais independentes, de modo que não são alterados por influência de alguma outra variável do sistema.

E_p representa algum(s) evento(s) interno(s) – um sinal de uma via de sinalização alternativa ou a expressão constitutiva de genes, por exemplo – não explicitamente modelado(s) e que altera(m) o estado dos genes e/ou metabólitos intracelulares. Seus valores são fixados na definição do modelo e não são alterados por alguma regra de transição do sistema.

A_p representa algum(ns) evento(s) externo(s) – um sinal ambiental, como, por exemplo a alteração da temperatura – não explicitamente modelado(s) e que altera(m) o estado dos sinalizadores transmembrana. Seus valores são fixados na definição do modelo e não são alterados por alguma regra de transição do sistema.

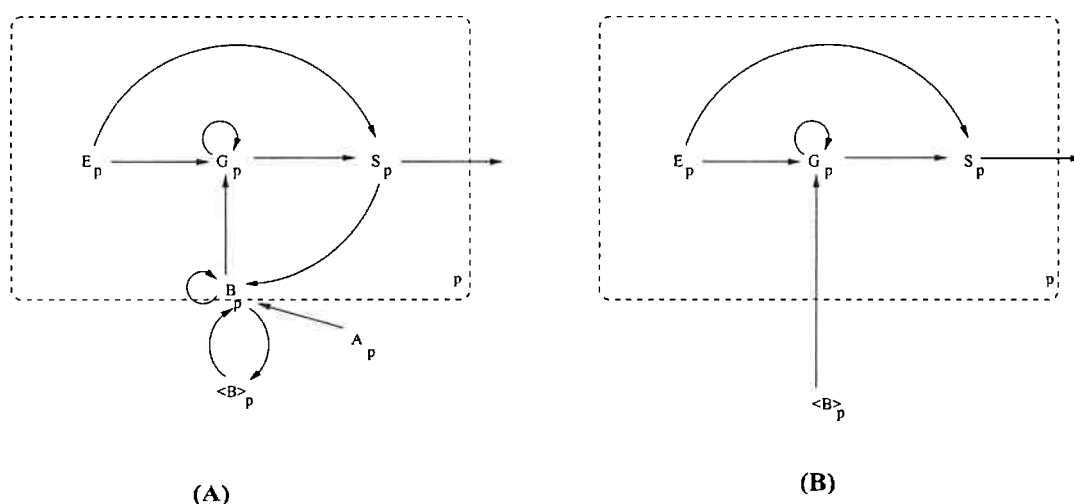


Figura 2.4: A linha tracejada representa a membrana da célula p . As setas representam as relações de influência entre as classes de variáveis em uma célula p . Por exemplo, $S_p \rightarrow B_p$ significa que S_p influencia, de algum modo, B_p ; esta influência é realizada através das funções de Θ . $\langle B \rangle_p$ denota sinalizadores que estão na vizinhança da célula p . **(A)**: À esquerda, na arquitetura de J -System onde há estrutura de membrana explicitamente definida, os sinalizadores B têm origem nos segmentos de membrana da própria célula p . **(B)**: À direita, na arquitetura de J -System onde não há estrutura de membrana explicitamente definida, os sinalizadores B têm origem na rede intracelular das células vizinhas.

As restrições nas relações de influência, definidas pelas classes Ψ , Φ e Θ , podem ser resumidas do seguinte modo:

- $G_p \leftarrow \Psi(G_p, E_p, B_p)$, representando que as funções em Ψ alteram somente os

valores de G_p com base apenas nos valores de G_p , E_p e B_p , sendo que

$$B_p = \begin{cases} \Delta(B_{p,1}, \dots, B_{p,|\mathcal{F}|}), & \text{se há estrutura de membrana explicitamente definida,} \\ \Delta(S_{\langle p \rangle,1}, \dots, S_{\langle p \rangle,|\mathcal{F}|}), & \text{caso contrário,} \end{cases}$$

onde $\langle S \rangle_p$ denota o conjunto de vetores S_p que estão na vizinhança da célula p ;

- $S_p \longleftarrow \Phi(G_p, E_p)$, representando que as funções em Φ alteram somente os valores de S_p com base apenas nos valores de G_p e E_p ;
- $B_{p,f} \longleftarrow \Theta(S_p, \langle B \rangle_p, B_{p,f}, A_{p,f})$, representando que as funções em Θ alteram somente os valores dos vetores $B_{p,f}$, $1 \leq f \leq |\mathcal{F}|$, com base apenas nos valores de S_p , $\langle B \rangle_p$, $B_{p,f}$ e $A_{p,f}$, sendo que $\langle B \rangle_p$ denota o conjunto de vetores B_p que estão na vizinhança da célula p .

Na Fig. 2.4 apresentamos uma representação esquemática dessas restrições nas relações de influência entre as classes de variáveis em *J-Systems* e na Fig. 2.5 (página 40) ilustramos essa representação para o caso do reticulado linear de células retangulares. Nas Subseções seguintes detalhamos cada uma dessas classes de funções.

2.4.1 Regras de Transição para Variáveis Intracelulares

A atualização do vetor de estados G , para toda célula $p \in \mathcal{R}$, a cada passo de tempo, é feita através de um conjunto finito de funções representado por um vetor de funções

$$\Psi = [\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_{|\mathcal{G}|}],$$

sendo que uma função ψ_k denota o modo como o gene e/ou metabólito intracelular g^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{G}|$, é atualizado no tempo, ou seja, descreve como evolui a variável de estado g^k (para toda célula $p \in \mathcal{R}$) na medida em que transcorrem os passos de tempo.

As funções $\psi_k : \mathbb{G}^{\tau+1} \times \mathbb{E}^{\tau+1} \times \mathbb{B}^{\tau+1} \rightarrow \mathbb{G}$ são aqui chamadas de *funções de transição da rede intracelular* e são da forma

$$g_p^k(t+1) = \psi_k \left(\begin{array}{l} g_p^u(t-x), \dots, g_p^v(t-y), \\ e_p^a(t-x), \dots, e_p^r(t-y), \\ b_p^h(t-x), \dots, b_p^i(t-y) \end{array} \right),$$

sendo que $1 \leq u, v \leq |\mathcal{G}|$, $1 \leq q, r \leq |\mathcal{E}|$, $1 \leq h, i \leq |\mathcal{B}|$ e lembrando que $g^k(t) \in \mathbb{G}$, $e^k(t) \in \mathbb{E}$, $b^h(t) \in \mathbb{B}$ e $0 \leq x, y \leq \tau$, onde τ corresponde ao máximo recuo no tempo utilizado pela função ψ_k .

Os elementos b_p^h, \dots, b_p^i representam as funções $\delta_h, \dots, \delta_i$, denominadas *funções de vizinhança ou membrana*. Se o *J-System* tem variáveis de membrana explicitamente definidas, temos uma função $\delta_k : (\mathbb{B}_1^{\tau+1} \times \dots \times \mathbb{B}_{|\mathcal{F}|}^{\tau+1}) \rightarrow \mathbb{B}$, $1 \leq k \leq |\mathcal{F}|$, assumindo a forma

$$b_p^k(t) = \delta_k(b_{p,1}^k(t), \dots, b_{p,|\mathcal{F}|}^k(t)).$$

Se o *J-System* não tem variáveis de membrana explicitamente definidas, temos uma função $\delta_k : (\mathbb{S}_1^{\tau+1} \times \dots \times \mathbb{S}_{|\mathcal{F}|}^{\tau+1}) \rightarrow \mathbb{B}$, $1 \leq k \leq |\mathcal{F}|$, assumindo a forma

$$b_p^k(t) = \delta_k(s_{p,1}^k(t), \dots, s_{p,|\mathcal{F}|}^k(t)).$$

Desse modo, atualizar o vetor G no instante $t + 1$ na célula p significa atualizar o estado de cada gene e/ou metabólito intracelular g_p^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{G}|$, no instante $t + 1$, por funções ψ_k definidas em termos:

1. dos estados de outros genes e/ou metabólitos intracelulares — podendo incluir o próprio g^k — da célula p no instante atual e/ou em instantes anteriores (G_p);
2. das entradas da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica da célula p no instante atual e/ou em instantes anteriores (E_p);
3. dos estados dos sinalizadores de membrana da célula p ou dos sinais intracelulares das células vizinhas no instante atual e/ou em instantes anteriores (B_p);

Ou seja,

$$G_p[k][t + 1] = \psi_k \left(\begin{array}{l} G_p[u][t - x], \dots, G_p[v][t - y], \\ E_p[q][t - x], \dots, E_p[r][t - y] \\ B_p[h](t - x), \dots, B_p[i](t - y) \end{array} \right),$$

sendo que

$$B_p[k](t) = \begin{cases} \delta_k(B_{p,1}^k(t), \dots, B_{p,|\mathcal{F}|}^k(t)), & \text{se há membranas explicitamente definidas,} \\ \delta_k(S_{p,1}^k(t), \dots, S_{p,|\mathcal{F}|}^k(t)), & \text{caso contrário.} \end{cases}$$

2.4.2 Regras de Transição para Variáveis de Saída

A atualização do vetor de saídas S , para toda célula $p \in \mathcal{R}$, a cada passo de tempo, é feita através de um conjunto finito de funções representado por um vetor de funções

$$\Phi = [\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_{|\mathcal{S}|}],$$

sendo que uma função ϕ_k denota o modo como a saída k , $1 \leq k \leq |\mathcal{S}|$, da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica é atualizada no tempo, ou seja, descreve como evolui a variável de saída s^k (para toda célula $p \in \mathcal{R}$) na medida em que transcorrem os passos de tempo.

As funções $\phi_k : \mathbb{G}^{\tau+1} \times \mathbb{E}^{\tau+1} \rightarrow \mathbb{S}$ são aqui chamadas de *funções de saída* da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica e são da forma

$$s_p^k(t+1) = \phi_k(g_p^u(t-x), \dots, g_p^v(t-y), e_p^q(t-x), \dots, e_p^r(t-y)),$$

sendo que $1 \leq u, v \leq |\mathcal{G}|$, $1 \leq q, r \leq |\mathcal{E}|$, $g_p^k(t) \in \mathbb{G}$, $e_p^k(t) \in \mathbb{E}$, e, como no caso anterior, $0 \leq x, y \leq \tau$, onde τ corresponde ao máximo recuo no tempo utilizado pela função ϕ_k .

Desse modo, atualizar o vetor S no instante $t+1$ na célula p significa atualizar as variáveis de saída s_p^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{S}|$, no instante $t+1$, por uma função ϕ_k definida em termos:

1. dos estados dos genes e/ou metabólitos intracelulares da célula p no instante atual e/ou em instantes anteriores (G_p);
2. dos valores das entradas da célula p no instante atual e/ou em instantes anteriores (E_p).

Ou seja,

$$S_p[k][t+1] = \phi_k \left(\begin{array}{c} G_p[u][t-x], \dots, G_p[v][t-y], \\ E_p[q][t-x], \dots, E_p[r][t-y] \end{array} \right).$$

2.4.3 Regras de Transição para Variáveis de Membrana

A atualização dos vetores de estados $B_{p,f}$, com $1 \leq f \leq |\mathcal{F}|$ e $p \in \mathcal{R}$, é feita através de um conjunto finito de funções representado por um vetor de funções

$$\Theta = [\theta_1^1, \dots, \theta_{|\mathcal{F}|}^1, \dots, \theta_1^2, \dots, \theta_{|\mathcal{F}|}^2, \dots, \theta_1^{|\mathcal{B}_f|}, \dots, \theta_{|\mathcal{F}|}^{|\mathcal{B}_f|}],$$

sendo que uma função θ_f^j denota o modo como o sinalizador de membrana j , $1 \leq j \leq |\mathcal{B}_f|$, da face f , é atualizado no tempo, ou seja, descreve como evolui a variável de estado b_f^j (para toda célula $p \in \mathcal{R}$) na medida em que transcorrem os passos de tempo. Em relação a essa notação, é bom observar que classificamos as funções de Θ em faces para permitir que uma mesma variável de estado b^j possa, se for conveniente, ser atualizada de modos diferentes em cada uma das diferentes faces da célula.

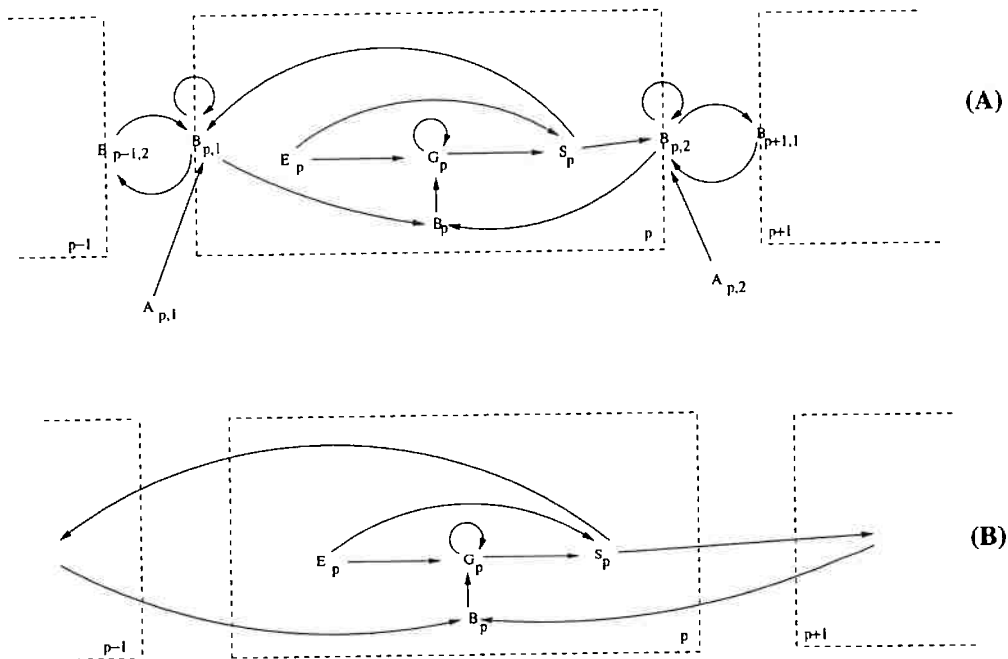


Figura 2.5: Recorte de três células ($p-1$, p e $p+1$) de um reticulado linear retangular. A linha tracejada representa a membrana das células. A célula p neste reticulado tem duas vizinhas: uma à esquerda ($p-1$) e uma à direita ($p+1$). E_p , G_p e S_p denotam, respectivamente, as entradas, o estado dos genes e/ou metabólitos intracelulares, e as saídas da rede de regulação gênica da célula p . As setas representam as relações de influência entre as variáveis de estado. (A): Acima, na arquitetura de *J-System* onde há estrutura de membrana explicitamente definida, $B_{p,i}$ denota o vetor de sinalizadores B da célula p na face i , e, similarmente, $A_{p,i}$ denota o vetor de sinais ambientais A da célula p na face i . (B): Abaixo, na arquitetura de *J-System* onde não há estrutura de membrana explicitamente definida, os sinalizadores B têm origem na rede intracelular das células vizinhas.

As funções $\theta_f^j : \mathbb{S}^{\tau+1} \times (\mathbb{B}_1^{\tau+1} \cup \dots \cup \mathbb{B}_{|\mathcal{F}|}^{\tau+1}) \times \mathbb{B}_f^{\tau+1} \times \mathbb{A}_f^{\tau+1} \rightarrow \mathbb{B}$ são aqui chamadas de

funções de transição das redes de membrana e são utilizadas para atualizar os sinalizadores $b_{p,f}^j$, da seguinte forma:

$$b_{p,f}^j(t+1) = \theta_f^j \left(s_p^k(t-x), \dots, s_p^l(t-y), \right. \\ b_{z,u}^m(t-x), \dots, b_{w,v}^n(t-y), \\ b_{p,f}^m(t-x), \dots, b_{p,f}^n(t-y), \\ \left. a_{p,f}^q(t-x), \dots, a_{p,f}^r(t-y) \right),$$

sendo que:

- $1 \leq k, l \leq |\mathcal{S}|$, onde, lembremos, $|\mathcal{S}|$ é o número saídas da rede de regulação gênica consideradas;
- $1 \leq q, r \leq |\mathcal{A}_f|$, onde, lembremos, $|\mathcal{A}_f|$ é o número de sinais ambientais associados à face f da membrana;
- $1 \leq m, n \leq |\mathcal{B}_f|$, onde, lembremos, $|\mathcal{B}_f|$ é o número de sinalizadores posicionados na face f da membrana;
- $z, w \in V(p) = \{v : v \text{ é vizinha de } p \text{ em } \mathcal{R}\}$, ou seja, z e w são células vizinhas à célula p ;
- $1 \leq u, v \leq |\mathcal{F}|$;
- $0 \leq x, y \leq \tau$, onde τ corresponde ao máximo recuo no tempo utilizado pela função θ_f^j .

Desse modo, atualizar o vetor $B_{p,f}$ no instante t , significa atualizar as variáveis de estado $b_{p,f}^j$, $1 \leq j \leq |\mathcal{B}_f|$, no instante t , por uma função θ_f^j definida em termos dos:

1. valores das saídas da rede de sinalização intracelular e de regulação gênica da célula p no instante anterior e/ou instantes anteriores (S_p);
2. estados dos sinalizadores justácrinos nas células vizinhas à célula p no instante atual e/ou em instantes anteriores ($B_{V(p)}$);
3. estados dos sinalizadores justácrinos na célula p na face f no instante atual e/ou em instantes anteriores ($B_{p,f}$);

4. valores dos sinais ambientais da célula p na face f no instante atual e/ou em instantes anteriores ($A_{p,f}$).

Ou seja,

$$B_{p,f}[j][t+1] = \theta_f^j \left(S_p[k][t-x], \dots, S_p[l][t-x], \right. \\ B_{z,u}[m][t-x], \dots, B_{w,v}[n][t-x], \\ B_{p,f}[m][t-x], \dots, B_{p,f}[n][t-x], \\ \left. A_{p,f}[q][t-x], \dots, A_{p,f}[r][t-x] \right).$$

A Figura 2.5 ilustra as variáveis de estado e suas relações numa célula (p) considerando suas vizinhas ($p-1$ e $p+1$) para o caso de reticulado linear de células retangulares.

2.5 Definição das Condições Iniciais

O quarto componente de um J -System corresponde ao conjunto \mathcal{I} das condições iniciais, a partir das quais a evolução do sistema ocorre. O conjunto \mathcal{I} é definido como sendo o valor que cada variável, em cada célula de \mathcal{R} e em cada face (se houver estrutura de membrana explicitamente definida), assume no instante inicial.

Podemos vislumbrar a evolução de um J -System de duas formas distintas: através de uma estratégia progressiva ou retrocedente. No primeiro caso, o sistema evolui a partir do conjunto \mathcal{I} de condições iniciais através da aplicação direta das funções de transição, de modo que \mathcal{I} representa o estado inicial do sistema e a cada estado corresponde um único estado sucessor. No segundo caso, o sistema evolui a partir de \mathcal{I} de modo a obtermos os estados predecessores a ele, e, da mesma forma, obtemos os predecessores dos predecessores e assim por diante até obtermos todos os estados que convergem ao estado representado pelas condições iniciais \mathcal{I} . Esse tipo de evolução é possível apenas para J -Systems que sejam sistemas dinâmicos discretos finitos (ver Capítulo 3).

2.6 Modelos Estocásticos em J -Systems

Em J -Systems é possível definir tanto modelos determinísticos quanto estocásticos para sistemas de sinalização justácrina. Denominamos uma instância de J como sendo

um modelo determinístico se a cada variável do modelo estiver associada apenas uma função de transição. Isso quer dizer que uma variável sempre é atualizada por uma mesma função.

Se o modelo for estocástico, em vez de definirmos uma função para cada variável, definimos uma lista de funções para cada variável e associamos a cada uma das funções desta lista um número de probabilidade. Isso implica que, na definição de um modelo estocástico, é preciso definir um conjunto finito de funções F e uma distribuição de probabilidades P_F em F . Uma função aleatória f é um par (F, P_F) e as realizações de f são escolhas aleatórias em F de acordo com P_F . Isso quer dizer que uma mesma variável pode ser atualizada por diferentes funções em diferentes momentos.

2.7 Classificação de *J-Systems*

Os *J-Systems* são uma classe de sistemas dinâmicos bastante genérica; no entanto, dependendo do tipo de estudo que se deseja desenvolver, pode ser conveniente focarmos em subclasses mais ou menos restritivas de *J-Systems*, como, por exemplo, fazemos no Capítulo 3. Nesse sentido, propomos uma denominação para algumas das possíveis subclasses de *J-Systems* que podem ser definidas a partir de restrições simples.

- Dizemos que um *J-System* é de *memória homogênea* se a memória de todas as suas variáveis é a mesma.
- Dizemos que um *J-System* é de *memória heterogênea* se existem pelo duas variáveis do modelo com diferentes memórias.
- A *memória* de um *J-System* é a maior memória do modelo. Obviamente, a memória de um *J-System* de memória homogênea é igual à memória de suas variáveis.
- Dizemos que um *J-System* é *livre de entrada* se $\mathcal{E} = \emptyset$ para toda célula do reticulado, isto é, se não há sinais de entrada associados à rede intracelular.
- Uma entrada \mathcal{E} da rede intracelular é dita ser *estacionária* se as entradas $e^k \in \mathcal{E}$ assumem valores $e^k(t)$ que não se alteram no tempo, isto é, se $e^k(t) = e^k(t+1)$ para todo instante t considerado. Dizemos que um *J-System* é de *entrada estacionária* se a entrada da rede intracelular \mathcal{E} é estacionária em toda célula do reticulado.

- Uma *configuração de entrada estacionária* é um particular conjunto de valores $e^k(t)$ que as entradas e^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{E}|$, podem assumir. Por exemplo, para o caso Booleano temos $2^{|\mathcal{E}|}$ possíveis configurações de entrada estacionária. Dizemos que um *J-System* é de *entrada estacionária homogênea* se ele é de entrada estacionária e se há uma mesma configuração de entrada estacionária para toda célula do reticulado. Dizemos que um *J-System* é de *entrada estacionária heterogênea* se ele é de entrada estacionária e se há diferentes configurações de entrada estacionária em células distintas.
- Dizemos que um *J-System* é *livre de sinais ambientais* se $\mathcal{A} = \emptyset$ para toda célula do reticulado, isto é, se o *J-System* tem estrutura de membranas explicitamente definida e se não há sinais ambientais associados às redes de membrana.
- Um estado de sinalização ambiental \mathcal{A}_f da rede de membrana é dito ser estacionário se os sinais ambientais $a_f^k \in \mathcal{A}_f$ assumem valores $a_f^k(t) \in \mathbb{A}_f$ que não se alteram no tempo, isto é, se $a_f^k(t) = a_f^k(t + 1)$ para todo instante t considerado. Dizemos que um *J-System* é de *estado ambiental estacionário* se há estrutura de membranas explicitamente definida e se o estado de sinalização ambiental \mathcal{A}_f é estacionário em todo segmento de membrana em todas as células do reticulado.
- Uma *configuração de sinal ambiental estacionário* é um particular conjunto de valores $a_f^k(t)$ que os sinais ambientais a_f^k , $1 \leq k \leq |\mathcal{A}_f|$, podem assumir. Por exemplo, para o caso Booleano aqui também temos $2^{|\mathcal{A}_f|}$ possíveis configurações de sinais ambientais. Dizemos que um *J-System* é de *sinalização ambiental homogênea* se ele é de estado ambiental estacionário e se há uma mesma configuração de sinal ambiental estacionário para toda face em toda célula do reticulado. Dizemos que um *J-System* é de *sinalização ambiental heterogênea* se ele é de estado ambiental estacionário e se há diferentes configurações de sinal ambiental estacionário em faces e células distintas.

Capítulo 3

Identificação de Padrões Celulares por Cálculo de Atratores em *J-Systems*

Neste capítulo propomos um método para identificação de padrões celulares, modulados por interações justácrinas, através da computação de atratores em *J-Systems*. Para tornar seu entendimento mais fácil, convém neste momento antecipar a informação de que estendemos a interpretação de que tipos celulares correspondem a bacias de atração (KAUFFMAN, 1993; WUENSCH, 1998b, 2004) de redes intracelulares, de modo a conceber os padrões celulares como atratores globais em *J-Systems*. Mais detalhes relativos a esta interpretação são fornecidos na Seção 5.1.

Um *sistema dinâmico discreto* consiste em um espaço de estados X e um mapeamento $f : X \rightarrow X$ tal que f define a evolução no tempo do sistema, ou seja, depois de t passos discretos de tempo o sistema estará no estado $f^t(x^0)$, supondo que o estado inicial foi x^0 .

Definimos como sendo a *órbita* $O(x)$ (ou *trajetória*) do estado $x \in X$ o conjunto $O(x) = \{f^t(x) : t \geq 0\}$. Dizemos que $x \in X$ é um *atrator pontual* (ou *ponto atrator* ou *estado estacionário*) se $f(x) = x$. Se existe algum $n \geq 1$ tal que $f^n(x) = x$, então dizemos que x é *periódico* e denominamos o conjunto $\{x, f^1(x), f^2(x), \dots, f^n(x)\}$ de *atrator periódico* (ou *período/ciclo atrator*). Quando usarmos a palavra atrator sozinha estaremos nos referindo a um ponto atrator ou a um ciclo atrator. Definimos o *comprimento* de um atrator como sendo o seu número de estados: atratores periódicos têm comprimento maior do que 1 e atratores pontuais têm comprimento igual a 1. Além disso, dizemos que $x \in X$ é *transiente* se existe $n, m \geq 1$ tal que $f^{m+n}(x) = f^m(x)$.

Um *sistema dinâmico discreto finito* (SDF) é um sistema dinâmico discreto (X, f)

onde X é finito. Se X é finito, então todo estado $x \in X$ é um estado transiente ou pertence a um atrator, de modo que toda órbita $O(x)$ consiste em uma parte transiente e uma parte que está em um atrator.

Denominamos de *dinâmica* de um SDF (X, f) ao conjunto de todas as órbitas $O(x)$, a qual pode ser naturalmente representada por um grafo dirigido $G_f = (V, E)$ chamado *grafo do espaço de estados* onde $V = X$ e $(x, y) \in E$ se e somente se $f(x) = y$.

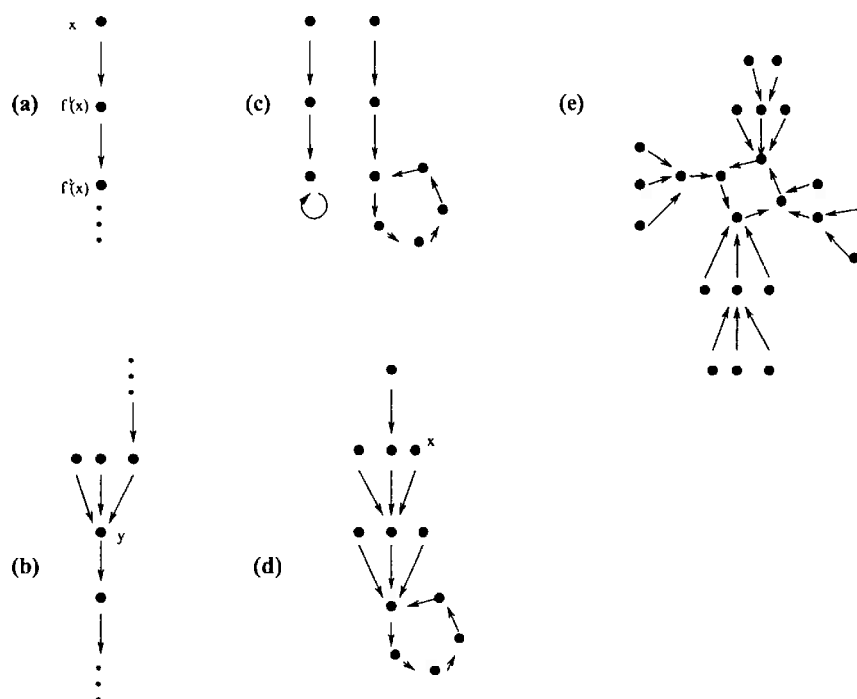


Figura 3.1: (a): Parte de uma órbita $O(x)$ em um espaço de estados X , onde $f^2(x)$ é o *sucessor* de $f^1(x)$ e x é a *pré-imagem* (ou *predecessor*) de $f^1(x)$. (b): O estado y tem grau de entrada 3. (c): Exemplo de atrator pontual (à esquerda) e periódico (à direita); (d): Exemplo de atrator periódico com uma de suas árvores transientes. O estado x é um exemplo de estado do tipo *jardim do Éden*. (e): Exemplo de bacia de atração.

Dado um estado $x \in X$, dizemos que $f^2(x)$ é o *sucessor* de $f^1(x)$ e x é a *pré-imagem* (ou *predecessor*) de $f^1(x)$. Um estado pode ter mais do que uma pré-imagem, sendo o número total de pré-imagens de um estado o seu *grau de entrada*. Os estados que são pré-imagem podem ter suas próprias pré-imagens e assim por diante. Se um estado não tem pré-imagens ele é dito ser um estado *jardim do Éden*. Em SDFs as trajetórias sempre levam a atratores, que podem ser pontuais (contendo um estado) ou periódicos (contendo dois ou mais estados); o comprimento (ou período) de um atrator é o seu número de estados e a parte de uma trajetória que está fora do atrator é chamada parte transiente. Tome um estado de um atrator e as suas pré-imagens, excluindo a pré-imagem que está no próprio atrator; agora considere as pré-imagens destas pré-imagens e assim por diante

até que os estados do tipo jardim do Éden sejam alcançados; a parte do grafo do espaço de estados que contém estes estados é uma árvore transiente enraizada no estado que está no atrator. Considere os estados de um atrator e suas correspondentes árvores transientes; o grafo contendo todos estes estados é chamado de *bacia de atração*, sendo que podem existir bacias de atração sem as árvores transientes, ou seja, apenas com os estados do atrator. Agora considere o grafo contendo o conjunto de todas as bacias de atração de um espaço de estados; este grafo é chamado *campo atrator* e o seu número de vértices é igual ao número de estados do espaço de estados. A Figura 3.1 ilustra essas definições e termos associados à dinâmica de SDFs.

3.1 Atratores em Redes Dinâmicas Discretas

Uma típica aplicação de SDFs é na descrição da evolução de um número finito de elementos (variáveis) conectados entre si e que têm seus estados internos atualizados por funções que representam suas interações. Em outras palavras, seja um conjunto de variáveis x_1, x_2, \dots, x_n que assumem valores num conjunto finito X e sejam as funções f_1, f_2, \dots, f_n tal que a função $f_i : X^n \rightarrow X$ determina o estado da variável x_i . Não é difícil ver que o espaço de estados X^n e a função $f : (f_1, \dots, f_n) : X^n \rightarrow X^n$ correspondem a um SDF e que sua dinâmica pode ser representada pelo grafo do espaço de estados $G_f = (V, E)$. Chamaremos este tipo de aplicação de *Rede Dinâmica Discreta* (RDD).

Uma questão importante nesse tipo de SDF é: dado uma RDD (X^n, f) é possível prever sua dinâmica G_f ? Esta importância deriva do fato de que RDDs podem ser aplicadas na modelagem de sistemas em várias áreas, da física à biologia. A dinâmica de RDDs depende de suas conexões e das regras lógicas que atualizam cada elemento, que podem comportar grandes e complexas redes de conexão, o que torna tais sistemas difíceis de tratar analiticamente; daí que o seu estudo e análise geralmente passam por simulações numéricas.

A identificação de uma bacia de atração a partir de um dado estado não é um problema trivial. Métodos enumerativos, em geral, requerem o teste exaustivo do espaço de estados inteiro, o que evidentemente os torna impraticáveis para RDDs de tamanho relativamente grande. Alguns trabalhos (JEN, 1989, 1987; MARTIN; ODLYZKO; WOLFRAM, 1998) mostraram que, para classes especiais de RDDs com regras de transição e estrutura algébrica simples, métodos mais eficientes podem ser formulados.

Wuensche (WUENSCHÉ, 1998a) propôs um algoritmo capaz de computar diretamente todos os predecessores de um dado estado ou computar diretamente que ele é um estado do tipo jardim do Éden, o que permite que uma bacia de atração inteira seja computada a partir de um estado qualquer, numa estratégia *retrocedente* (“*backward running*”). Usando este algoritmo, o próprio Wuensche desenvolveu um método para construir a bacia de atração a partir de um dado estado (chamado *estado semente*), que pode ser assim resumido:

1. A rede é iterada de forma *progressiva* (“*forward running*”) a partir do estado semente até que um ciclo atrator seja encontrado (identificado pela repetição de um estado já computado anteriormente);
2. Uma vez que o atrator é conhecido, os seus estados são tomados como as raízes das árvores transientes que estão enraizadas no atrator. Usando o procedimento retrocedente, as pré-imagens de cada estado do atrator são computadas, excluindo aquelas que pertencem ao próprio atrator.
3. O procedimento retrocedente é reaplicado em cada uma das pré-imagens obtidas no passo anterior, e assim por diante, até que todos os estados do tipo jardim do Éden sejam alcançados. Estes estados são folhas nas árvores transientes e não têm pré-imagens.

Para construir o campo atrator inteiro é preciso dispor de uma tabela de marcação, um vetor de $|X|^n$ *bits* onde cada *bit* representa um estado no espaço de estados X^n . A primeira bacia de atração é construída tomando como semente o estado representado pelo primeiro *bit* da tabela, e na medida em que ela vai sendo construída, os seus estados vão sendo marcados na tabela. Quando esta bacia está completa, o próximo estado disponível (não marcado na tabela) é usado como semente para a próxima bacia. Assim fazemos até que não restem mais estados não marcados na tabela. Este procedimento para construção de campos atratores é chamado de algoritmo Reverso.

Para computar o campo atrator inteiro, o algoritmo Reverso consome tempo proporcional a $|X|^n$, o que, evidentemente, o torna impraticável para RDDs relativamente grandes. Como alternativa, há métodos estatísticos que têm sido usados em vários trabalhos (GUTWITZ, 1991; KAUFFMAN, 1993) para o estudo da estrutura de bacias de atração. A idéia central desses métodos pode ser assim resumida:

1. Escolha aleatoriamente um estado em X que será o estado semente.

2. A rede é iterada de forma progressiva a partir do estado semente até que um ciclo atrator seja encontrado (identificado pela repetição de um estado já computado anteriormente);
3. Repita os passos (1) e (2) até que uma boa amostra de X seja obtida.

A frequência com que os atratores são alcançados indica o tamanho relativo das bacias de atração. Além disso, outros dados são extraídos como, por exemplo, o número de bacias de atração, o tamanho das árvores transientes e o tamanho do períodos dos atratores. Vamos chamar o método baseado nessa estratégia de *ReversoAleatório*.

3.2 Atratores em Redes Intracelulares de *J-Systems*

Definimos uma *rede intracelular* R de um *J-System* como sendo uma estrutura constituída de dois componentes: $R = (\mathcal{G}, \Psi)$, onde $\mathcal{G} = [g^1, g^2, \dots, g^{|\mathcal{G}|}]$ são as variáveis de estado intracelulares e $\Psi = [\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_{|\mathcal{G}|}]$ suas correspondes funções de transição.

Se numa rede intracelular não existissem outros sinais além daqueles representados pelos valores das variáveis em \mathcal{G} , bastaria tomar a RDD $(\mathbb{G}^{|\mathcal{G}|}, \Psi)$ e nela aplicar diretamente o algoritmo *Reverso* para que pudéssemos conhecer a dinâmica associada à rede intracelular R . Entretanto, além dos sinais intracelulares (valores das variáveis em \mathcal{G}), numa rede intracelular operam também sinais independentes da própria rede. Isso nos permite classificar os sinais presentes numa rede intracelular em dois tipos:

- (a) Os *sinais localmente independentes* (SLI), que são aqueles não influenciados por qualquer outro sinal com origem na própria rede intracelular; eles podem ser sinais de entrada e/ou sinais externos, sendo que os *sinais externos* correspondem aqui àqueles sinais oriundos da membrana da própria célula ou das células vizinhas; isto é, os sinais localmente independentes podem ser representados pelos valores de três tipos de variáveis: 1) as variáveis de entrada da própria célula, 2) os sinalizadores de membrana da própria célula, caso a arquitetura do *J-System* seja com membranas (ver Figura 3.6, página 77) e 3) as variáveis de saída das células vizinhas, caso a arquitetura do *J-System* seja sem membranas (ver Figura 3.3, página 60).
- (b) Os *sinais localmente regulados* (SLR), que são aqueles que dependem de ao menos um outro sinal com origem na própria rede intracelular; eles são representados pelos

valores das variáveis de estado da rede intracelular da própria célula, tenha ou não o *J-System* em questão uma arquitetura com membranas.

Dada a classe dos SLI, é possível caracterizá-los com relação ao tipo de influência que podem exercer sobre uma rede intracelular. Há duas situações básicas:

- Os SLI incidem sobre uma variável da rede intracelular não regulada localmente, ou seja, uma variável sobre a qual não incide qualquer outro sinal oriundo de alguma outra variável de estado da própria rede intracelular.

Vale observar que se o SLI que incide sobre uma variável da rede intracelular não regulada localmente torna-se estacionário (ou periódico), então o estado da variável que é alvo do sinal também torna-se estacionário (ou periódico), pois estamos supondo que as funções de transição são invariantes no tempo e os modelos são determinísticos.

Tipicamente, usamos SLI (do tipo sinais de entrada estacionários) para representar a expressão constitutiva de genes.

- Os SLI incidem sobre uma variável da rede intracelular regulada localmente, ou seja, uma variável sobre a qual incide pelo menos um sinal oriundo de alguma outra variável de estado da própria rede intracelular.

Nesse caso, se o SLI tornar-se estacionário (ou periódico), isso não implica, necessariamente, que o estado da variável alvo também torna-se estacionário (ou periódico), pois, lembremos, além dos SLI, sobre as variáveis localmente reguladas, também incidem sinais oriundos de outras variáveis de estado pertencentes à própria rede intracelular.

Tipicamente, usamos sinais de entrada incidindo sobre variáveis localmente reguladas para representar o nocaute ou super-expressão de genes.

Se excluirmos de uma rede intracelular os seus SLI e os seus sinais de saída, obteremos uma estrutura similar à uma RDD, pois uma RDD pode ser vista como um caso particular de *J-System* onde o reticulado tem apenas uma célula e onde $\mathcal{E} = \mathcal{S} = \mathcal{A} = \mathcal{B} = \emptyset$. Portanto, redes intracelulares em *J-Systems* são como RDDs às quais são acrescentados sinais localmente independentes (os sinais de entrada e os sinais externos) e os sinais de saída.

Para que possamos computar as bacias de atração de uma rede intracelular R considerando a presença de seus sinais localmente independentes:

1. Construímos uma extensão de R definida pelos seguintes procedimentos:

- Incorporamos ao conjunto das variáveis de estado intracelulares uma variável para cada um dos sinais independentes que incidem sobre a rede intracelular. Denotamos estas variáveis por b^i , sendo que há um variável b^i para cada função de vizinhança ou membrana (ver Seção 2.4.1);
- Definimos para as variáveis de estado incorporadas funções de transição constantes. Isso porque, como veremos adiante, estas variáveis representam sinais independentes que são constantes quando o sistema está em estado estacionário ou quando o sistema está num atrator periódico cujas saídas da rede intracelular são constantes.

2. Aplicamos na RDD associada à rede intracelular expandida o algoritmo **Reverso**.

Na Figura 3.2 ilustramos os tipos de sinais em uma rede intracelular simples e o seu processo de expansão, e no Procedimento 1 (chamado de **ReversoLocal**) descrevemos mais precisamente o processo de identificação de bacias de atração em redes intracelulares.

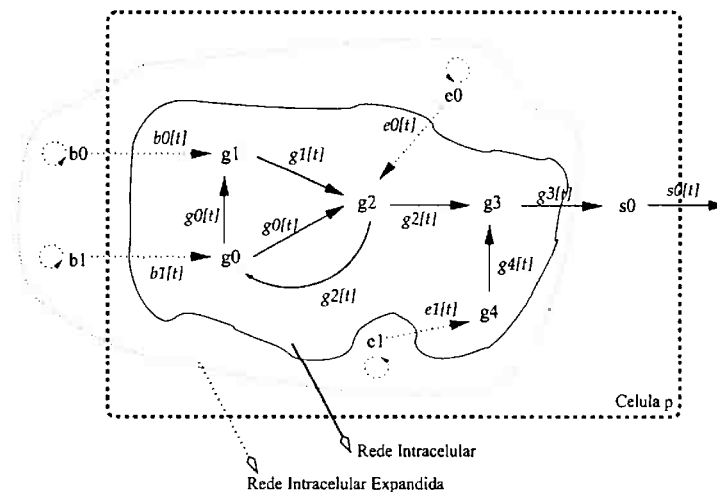


Figura 3.2: Nesse exemplo de rede intracelular, os sinais $b_0[t]$, $b_1[t]$, $e_0[t]$, $e_1[t]$ são localmente independentes e os sinais $g_0[t]$, $g_1[t]$, $g_2[t]$ e $g_3[t]$ e $g_4[t]$ são localmente regulados. Na rede intracelular expandida é incorporada uma variável para cada sinal localmente independente e é definida uma função de transição do tipo constante para cada uma.

Para facilitar a compreensão do Procedimento 1, vale lembrar que \mathbb{B} (linha 3) denota o domínio de valores dos sinalizadores externos. Vale notar também que se a rede intracelular expandida for grande ao ponto de tornar a computação do seu campo atrator através

Procedimento 1 : ReversoLocal. Calcula o campo atrator local da rede intracelular

Entrada: uma rede intracelular $R = (\mathcal{G}, \Psi)$

Saída: o campo atrator local (CAMPO)

- 1: **for** cada sinal localmente independente $b^i[t]$ presente em R **do**
 - 2: $\mathcal{G} \leftarrow \mathcal{G} \cup \{b^i\}$
 - 3: $\psi_{b^i} \leftarrow \{(x, y) \in \mathbb{B} \times \mathbb{B} : x = y\}$
 - 4: $\Psi \leftarrow \Psi \cup \{\psi_{b^i}\}$
 - 5: **end for**
 - 6: **for** cada sinal localmente independente $e^i[t]$ presente em R **do**
 - 7: $\mathcal{G} \leftarrow \mathcal{G} \cup \{e^i\}$
 - 8: $\psi_{e^i} \leftarrow \{(x, y) \in \mathbb{E} \times \mathbb{E} : x = y\}$
 - 9: $\Psi \leftarrow \Psi \cup \{\psi_{e^i}\}$
 - 10: **end for**
 - 11: CAMPO \leftarrow Reverso($(\mathbb{G}^{|\mathcal{G}|}, \Psi)$) {ou ReversoAleatório($(\mathbb{G}^{|\mathcal{G}|}, \Psi)$)}
-

de Reverso inviável, podemos utilizar um método estatístico (ReversoAleatório) para fazê-lo, conforme mencionado na Seção 3.1.

3.3 Atratores em Redes de Membrana de *J-Systems*

Definimos uma *rede de membrana* de uma face f (segmento de membrana) como sendo uma estrutura constituída de dois componentes: $M = (\mathcal{B}_f, \Theta_f)$, onde $\mathcal{B}_f = [b_f^1, b_f^2, \dots, b_f^{|\mathcal{B}_f|}]$ são os sinalizadores de membrana e $\Theta_f = [\theta_f^1, \theta_f^2, \dots, \theta_f^{|\mathcal{B}_f|}]$ são suas correspondes funções de transição.

De modo similar às redes intracelulares, nas redes de membrana também operam sinais localmente independentes e localmente regulados, de modo que se delas excluirmos estes sinais, também obteremos RDDs. Logo, redes de membrana em *J-Systems* também são como RDDs às quais são acrescidos os sinais localmente independentes, no caso os sinais oriundos das saídas da rede intracelular da própria célula, aqueles oriundos da membrana da face oposta da célula vizinha (ver Figura 3.6, página 77) e aqueles oriundos de sinalizadores ambientais. Sendo assim, podemos aplicar o mesmo procedimento usado nas redes intracelulares (algoritmo ReversoLocal), com ligeiras modificações, para calcular os campos atratores das redes de membrana. O procedimento 2 detalha estas modificações.

Aqui também vale notar que, igualmente ao caso de ReversoLocal, se a rede de membrana expandida for demasiado grande para o uso de Reverso, podemos utilizar um método estatístico para computar seu campo atrator (ver Seção 3.1).

Procedimento 2 : ReversoLocalModificado. Calcula o campo atrator local de uma rede de membrana

Entrada: uma rede de membrana $M = (\mathcal{B}_f, \Theta)$

Saída: o campo atrator local (CAMPO)

- 1: **for** cada sinal localmente independente $s^i[t]$ presente em M **do**
 - 2: $\mathcal{B}_f \leftarrow \mathcal{B}_f \cup \{s^i\}$
 - 3: $\theta_{s^i} \leftarrow \{(x, y) \in \mathbb{S} \times \mathbb{S} : x = y\}$
 - 4: $\Theta \leftarrow \Theta \cup \{\theta_{s^i}\}$
 - 5: **end for**
 - 6: **for** cada sinal localmente independente $b_g^i[t]$, $g \neq f$, presente em M **do**
 - 7: $\mathcal{B}_f \leftarrow \mathcal{B}_f \cup \{b_g^i\}$
 - 8: $\theta_{b_g^i} \leftarrow \{(x, y) \in \mathbb{B}_f \times \mathbb{B}_f : x = y\}$
 - 9: $\Theta \leftarrow \Theta \cup \{\theta_{b_g^i}\}$
 - 10: **end for**
 - 11: **for** cada sinal localmente independente $a_f^i[t]$ presente em M **do**
 - 12: $\mathcal{B}_f \leftarrow \mathcal{B}_f \cup \{a_f^i\}$
 - 13: $\theta_{a_f^i} \leftarrow \{(x, y) \in \mathbb{A} \times \mathbb{A} : x = y\}$
 - 14: $\Theta \leftarrow \Theta \cup \{\theta_{a_f^i}\}$
 - 15: **end for**
 - 16: CAMPO \leftarrow Reverso($(\mathbb{B}_f^{|\mathcal{B}_f|}, \Theta)$) {ou ReversoAleatório($(\mathbb{B}_f^{|\mathcal{B}_f|}, \Theta)$)}
-

3.4 Algumas Definições, Nomenclatura e Notação

Quando usarmos a expressão ‘*rede local*’ estaremos nos referindo a uma rede intracelular ou a uma rede de membrana. Dada a dinâmica CAMPO (última linha dos Procedimentos 1 e 2) associada a uma rede local, denominamos: a) *atrator local* qualquer elemento de CAMPO que é um atrator, b) *ponto atrator local* (ou *estado estacionário local*) qualquer elemento de CAMPO que é um ponto atrator e c) *período atrator local* (ou *ciclo atrator local*) qualquer elemento de CAMPO que é um período atrator.

Um *atrator global* em *J-Systems* é, como sugere o nome, um atrator da dinâmica associada ao SDF que envolve todas as variáveis em cada uma das células e segmentos de membrana do reticulado. Se este atrator é periódico, dizemos que ele é um *período atrator global*, e se ele é pontual, dizemos que ele é um *ponto atrator global* (ou *estado estacionário global*).

É conveniente identificar algumas propriedades relacionadas à dinâmica das redes locais, representadas pelas bacias de atração fornecidas pelos procedimentos ReversoLocal ou ReversoLocalModificado, que posteriormente serão utilizadas na definição do escopo do método:

1. Se a rede local (intracelular ou de membrana) entra em estado estacionário, então

certamente a correspondente configuração de saída torna-se estacionária, mas o inverso não é verdadeiro; ou seja, se a saída tornar-se estacionária, isso não significa, necessariamente, que a rede local atingiu um **ponto** atrator. A rede pode estar em um **ciclo** atrator ou mesmo em um estado transiente e, ainda assim, apresentar saída constante. Isso porque, mesmo que as funções de saída em Φ sejam todas do tipo *identidade*, pode ocorrer a seguinte situação: as variáveis em \mathcal{G} (ou em \mathcal{B}_f) não estão todas estacionárias, mas há um subconjunto delas que está (isso pode ocorrer) e as funções em Φ têm como “entradas” justamente variáveis neste subconjunto.

Uma observação a fazer é que, se admitíssemos que as funções de saída em Φ não seriam todas do tipo *identidade*, poderíamos definí-las de tal modo que, embora as variáveis em \mathcal{G} (ou em \mathcal{B}_f) que servem de “entrada” para as funções em Φ pudessem não estar estacionárias, ainda assim as funções de saída em Φ as tornariam estacionárias;

2. Diferentes pontos atratores locais podem estar associados a uma mesma configuração de saída estacionária.
3. Um ponto atrator local está associado a uma única configuração de saída estacionária.
4. Diferentes ciclos atratores locais podem estar associados a uma mesma saída, que pode ser estacionária (pontual) ou periódica.
5. Um ciclo atrator local está associado a uma única saída, que pode ser estacionária (pontual) ou periódica.

Da primeira propriedade acima deriva que os atratores periódicos locais podem ser de dois tipos: atrator periódico de saída pontual (ou estacionária) ou atrator periódico de saída periódica; ou seja, todos os atratores pontuais certamente têm saídas pontuais, mas podem existir alguns (possivelmente nenhum) atratores periódicos com saídas pontuais.

Seja $A = \{a_1, a_2, \dots, a_n\}$ o conjunto dos atratores locais da dinâmica associada à rede intracelular num *J-System*, para os quais adotaremos uma representação em vetor. Se um atrator local $a_j \in A$ é do tipo pontual, ele será representado por um vetor unidimensional

$$a_j[1..|\mathcal{G}|],$$

isto é, $a_j[k]$, $1 \leq k \leq |\mathcal{G}|$, denota o valor da variável de estado g^k quando a rede intracelular

está no ponto atrator local a_j . Se a_j é um atrator local periódico, ele será representado por um vetor bidimensional

$$a_j[1..|\mathcal{G}||[1..|a_j|],$$

onde $|a_j|$ denota o comprimento do atrator periódico a_j ; ou seja, $a_j[k][i]$ denota o valor da variável de estado g^k , quando a rede intracelular está no estado i do ciclo atrator a_j .

Seja $\mathcal{V} = \{g^k \in \mathcal{G} : \text{sobre } g^k \text{ incide algum sinal externo}\}$. O conjunto $\mathcal{V}, \mathcal{V} \subset \mathcal{G}$, opera como uma “porta” através da qual entram os sinais externos na rede intracelular (ver Figura 3.3, página 60). Os valores das variáveis de estado em \mathcal{V} , no atrator a_j , também terão uma representação em vetor, a qual será denotada por

$$V^{a_j}[1..|\mathcal{V}|],$$

se o atrator é do tipo pontual; ou seja, $V^{a_j}[k]$ denota o valor da variável de estado g^k , $g^k \in \mathcal{V}$, quando a rede intracelular está no ponto atrator a_j . Caso o atrator a_j seja do tipo periódico, a representação pode ser em uma dimensão, como acima, ou em duas dimensões, a qual denotaremos por

$$V^{a_j}[1..|\mathcal{V}||[1..m],$$

sendo que m , $m \leq |a_j|$, denota o comprimento do período determinado apenas pelos elementos de V^{a_j} . Essas duas representações derivam do fato de que $\mathcal{I}(\mathcal{V})$ é um subconjunto de \mathcal{G} , ou seja, podem existir diferentes estados em a_j tal que para eles o valor das variáveis de estado em \mathcal{V} mantém-se constante.

Seja $\mathcal{I}(\mathcal{V}) = \{g^k \in \mathcal{G} : \text{o sinal produzido por } g^k \text{ incide sobre algum elemento de } \mathcal{V}\}$ e

$$I^{a_j}[1..|\mathcal{I}(\mathcal{V})|],$$

a representação em vetor dos valores das variáveis de estado em $\mathcal{I}(\mathcal{V})$, quando a rede intracelular está no ponto atrator a_j . Similarmente a \mathcal{V} , caso o atrator a_j seja do tipo periódico, a representação pode ser em uma dimensão, como acima, ou em duas dimensões, que denotaremos por

$$I^{a_j}[1..|\mathcal{I}(\mathcal{V})||[1..m],$$

sendo que m , $m \leq |a_j|$, denota o comprimento do período determinado pelos elementos

de I^{a_j} , como no caso anterior.

Denotamos por S^{a_j} a representação em vetor do valor das saídas associadas ao atrator local a_j . Se a_j é unidimensional (um ponto atrator), então certamente S^{a_j} também o é, e será denotado por

$$S^{a_j}[1..|S|],$$

isto é, $S^{a_j}[k]$ denota o valor da variável de saída s^k quando a rede intracelular está no ponto atrator a_j . Se a_j é bidimensional (um período atrator), então S^{a_j} pode ser bidimensional, caso a_j seja de saída periódica, ou unidimensional, caso a_j seja de saída pontual. Se S^{a_j} é bidimensional, então ele será denotado por

$$S^{a_j}[1..|S|][1..m],$$

sendo que $m \leq |a_j|$ denota o comprimento do período determinado pelos elementos de S .

Adotaremos uma notação para a representação dos atratores locais de membrana. Seja $B = \{b_1, b_2, \dots, b_n\}$ o conjunto dos atratores locais da dinâmica associada à rede de membrana num *J-System*, para os quais adotaremos uma representação em vetor. Se um atrator local $b_j \in B_f$ é do tipo pontual, ele será representado por um vetor unidimensional

$$b_j[1..|\mathcal{G}_f|],$$

isto é, $b_j[k]$, $1 \leq k \leq |\mathcal{B}_f|$, denota o valor da variável de estado b^k quando a rede de membrana está no ponto atrator local b_j . Se b_j é um atrator local periódico, ele será representado por um vetor bidimensional

$$b_j[1..|\mathcal{B}_f|][1..|b_j|],$$

onde $|b_j|$ denota o comprimento do atrator periódico b_j ; ou seja, $b_j[k][i]$ denota o valor da variável de estado b^k , quando a rede de membrana está no estado i do ciclo atrator b_j .

Seja $\mathcal{VB}_f = \{b^k \in B_f : \text{sobre } b^k \text{ incide algum sinal externo}\}$. O conjunto $\mathcal{VB}_f, \mathcal{VB}_f \subset B_f$, opera como uma “porta” através da qual entram os sinais externos na rede de membrana (ver Figura 3.6, página 77). Os valores das variáveis de estado em \mathcal{VB}_f , no atrator b_j , também terão uma representação em vetor, a qual será denotada por

$$V^{b_j}[1..|\mathcal{B}_f|],$$

se o atrator é do tipo pontual; ou seja, $V^{b_j}[k]$ denota o valor da variável de estado b^k , $b^k \in \mathcal{VB}_f$, quando a rede intracelular está no ponto atrator b_j . Caso o atrator b_j seja do tipo periódico, a representação pode ser em uma dimensão, como acima, ou em duas dimensões, a qual denotaremos por

$$V^{b_j}[1..|\mathcal{VB}_f|][1..m],$$

sendo que $m \leq |b_j|$ denota o comprimento do período determinado apenas pelos elementos de V^{b_j} . Essas duas representações derivam do fato de que \mathcal{VB}_f é um subconjunto de \mathcal{B}_f , ou seja, podem existir diferentes estados em b_j tal que para eles o valor das variáveis de estado em \mathcal{VB}_f mantém-se constante.

Seja $\mathcal{I}(\mathcal{VB}_f) = \{b^k \in \mathcal{B}_f : \text{o sinal produzido por } b^k \text{ incide sobre algum elemento de } \mathcal{VB}_f\}$ e

$$I^{b_j}[1..|\mathcal{I}(\mathcal{VB}_f)|],$$

a representação em vetor dos valores das variáveis de estado em $\mathcal{I}(\mathcal{VB}_f)$, quando a rede de membrana está no ponto atrator b_j . Similarmente a $\mathcal{I}(\mathcal{V})$, caso o atrator b_j seja do tipo periódico, a representação pode ser em uma dimensão, como acima, ou em duas dimensões, a qual denotaremos por

$$I^{b_j}[1..|\mathcal{I}(\mathcal{VB}_f)|][1..m],$$

sendo que $m \leq |b_j|$ denota o comprimento do período determinado pelos elementos de I^{b_j} , como no caso anterior.

Denotamos por S^{b_j} a representação em vetor do valor das saídas associadas ao atrator de membrana local b_j . Se b_j é unidimensional (um ponto atrator), então certamente S^{b_j} também o é, e será denotado por

$$S^{b_j}[1..|S|],$$

isto é, $S^{b_j}[k]$ denota o valor da variável de saída $s^k \in \mathcal{SB}_f$ (ver Figura 3.6) quando a rede de membrana está no ponto atrator b_j . Se b_j é bidimensional (um período atrator), então S^{b_j} pode ser bidimensional, caso b_j seja de saída periódica, ou unidimensional, caso b_j seja de saída pontual. Se S^{b_j} é bidimensional, então ele será denotado por

$$S^{b_j}[1..|\mathcal{SB}_f|][1..m],$$

sendo que $m \leq |b_j|$ denota o comprimento do período determinado pelos elementos de \mathcal{SB}_f .

3.5 Atratores Globais em *J-Systems*

Nesta Seção propomos um método para computação de atratores globais em *J-Systems*, o qual opera sob algumas restrições, a saber:

- O *J-System* deve ser de memória homogênea igual a 1, ou seja, $\tau = 1$ para todas as variáveis do modelo.
- O *J-System* deve ser de entrada estacionária, caso tenha variáveis de entrada.
- O *J-System* deve ser de estado ambiental estacionário, caso tenha sinalizadores de ambiente.
- O *J-System* deve ser determinístico e síncrono.
- O domínio das variáveis de estado deve ser discreto e finito.

O método opera com duas arquiteturas de *J-Systems* distintas: *J-Systems* sem Sinalizadores de Membrana e *J-Systems* com Sinalizadores de Membrana. Para facilitar sua descrição vamos tratá-las separadamente. A idéia geral do método para identificação de atratores globais em *J-Systems* pode ser resumida, grosso modo, nos seguintes itens:

- (i) Primeiro calculamos as bacias de atração da rede intracelular do *J-System* para cada uma das configurações estacionárias nas entradas e nos sinais externos. Em seguida, usamos estas bacias para construir o campo atrator da rede intracelular. Isso pode ser feito através do algoritmo `ReversoLocal`, descrito no Procedimento 1.
- (ii) Depois calculamos as bacias de atração das redes de membrana para cada uma das faces (segmentos de membrana) da célula, caso a arquitetura do *J-System* contenha sinalizadores de membrana. Isso pode ser feito através do Procedimento 2 (algoritmo `ReversoLocalModificado`).
- (iii) Em seguida, arranjamos, em agrupamentos de células vizinhas do reticulado, os atratores presentes no campo atrator da rede intracelular e da rede de membrana (caso exista) de modo a obter nesses agrupamentos combinações de atratores locais

tal que as saídas e as entradas das células sejam compatíveis (na Seção 3.6.3 definiremos precisamente o significado que estamos atribuindo à noção de compatibilidade). Como em sinalização justácrina o processo de comunicação intercelular está baseado no contato célula-célula, podemos tomar esses arranjos como unidades de formação dos atratores globais.

- (iv) Por fim, preenchemos o reticulado encaixando esses arranjos nas posições definidas por suas células.

3.6 Primeiro caso: *J-Systems* sem Sinalizadores de Membrana

Nessa arquitetura os SDFs associados às membranas são vazios ($\mathcal{B} = \emptyset$), ou seja, as funções de vizinhança Δ (Seção 2.4.1) nos sinais de saída da rede intracelular de uma célula incidem diretamente sobre o estado da rede intracelular das células vizinhas (ver Figura 3.3). Isso implica que, nesse caso, será preciso “sintonizar” atratores de RDDs idênticas, pois as RDDs intracelulares, em toda célula do reticulado, são réplicas da mesma rede intracelular. Para tanto, as funções de transição (Ψ) da rede intracelular e as funções de vizinhança Δ que atualizam as variáveis em \mathcal{V} devem “combinar” os sinais de saída das células vizinhas quando atualizam esses componentes intracelulares. Lembremos que \mathcal{V} opera como uma “porta” através da qual entram os sinais externos na rede intracelular.

O campo atrator local fornecido por `ReversoLocal` é o mesmo para toda célula do reticulado, pois as entradas e a rede intracelular são as mesmas em todas células, que são conectadas simetricamente, às células vizinhas, através das saídas, que também são as mesmas em todas as células.

Se o campo atrator local é o mesmo em toda célula, então obviamente os atratores (periódicos e pontuais) locais também são os mesmos em todas as células do reticulado. Daí, podemos estabelecer que um atrator global corresponde a uma combinação de atratores locais, tal que:

1. a(s) configuração(ões) de saída proporcionada(s) por um atrator local de uma célula p deve(m) ser compatível(eis) com a(s) configuração(ões) dos sinais externos dos atratores locais das células vizinhas à célula p .
2. a(s) configuração(ões) de saída proporcionada(s) pelos atratores locais das células

vizinhas à célula p deve(m) ser compatível(eis) com a(s) configuração(ões) do(s) sinal(is) externo(s) requerida(s) pelo atrator da célula p .

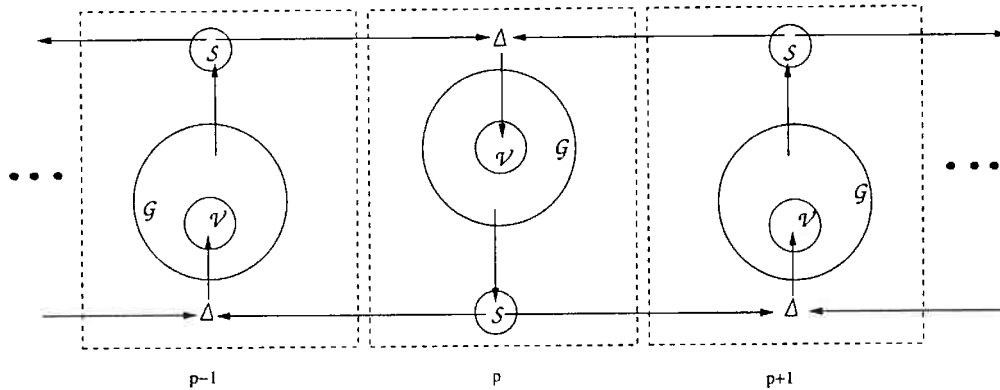


Figura 3.3: Recorte de um reticulado linear de células retangulares contendo as células $p - 1$, p e $p + 1$ (as linhas tracejadas representam os limites das células) na arquitetura de *J-System* onde não há variáveis de estado associadas às membranas das células, isto é, onde temos $\mathcal{B} = \emptyset$. Nesse caso os sinais externos, oriundos das funções de vizinhança Δ na saídas S das células vizinhas, incidem diretamente sobre um subconjunto \mathcal{V} das variáveis de estado da rede intracelular, que representa a “porta” de entrada dos sinais externos.

Vamos denominar de *propriedades de sintonia* essas duas restrições, que serão utilizadas na identificação de arranjos compatíveis de atratores locais em agrupamentos de células vizinhas.

Para facilitar a análise dessas combinações entre atratores locais de células vizinhas entre si, vamos classificá-las nos seguintes casos: (i) ponto atrator de uma célula p combinado com ponto atrator das células vizinhas à célula p ; (ii) ponto atrator de uma célula p combinado com ciclo atrator das células vizinhas à célula p ; (iii) ciclo atrator de uma célula p combinado com ponto atrator das células vizinhas à célula p ; (iv) ciclo atrator de uma célula p combinado com ciclo atrator das células vizinhas à célula p ; (v) ponto atrator de uma célula p combinado com ciclo atrator e ponto atrator das células vizinhas à célula p e (vi) ciclo atrator de uma célula p combinado com ciclo atrator e ponto atrator das células vizinhas à célula p .

Dadas as classes de combinação entre atratores de células vizinhas acima, temos que cada uma delas que envolve pelo menos um ciclo atrator (ii, iii, iv, v e vi) pode ser dividida em dois grupos: aquele onde os atratores são de saída pontual e aquele onde os atratores são de saída periódica.

O método para identificação de atratores globais em *J-Systems* que estamos propondo opera apenas para atratores locais cuja saídas sejam pontuais.

3.6.1 Combinação de Atratores Locais Pontuais

Uma primeira situação a considerar é aquela onde temos apenas **pontos** atratores a combinar. Se a rede intracelular atingiu um ponto atrator local então certamente o seu estado (local) corresponde a um estado estacionário local (EEL). Se a rede intracelular está em EEL, então seus sinais de saída são estacionários. Em um *J-System* que está em estado estacionário global (EEG) as “réplicas” da rede intracelular, em todas as células, estão em EEL. Isso implica que os sinais de saída da rede intracelular, em todas as células do reticulado, são todos estacionários. Nessa arquitetura, *J-Systems* sem Sinalizadores de Membrana, os sinais de saída de rede intracelular de uma célula incidem diretamente sobre o estado da rede intracelular das células vizinhas. Daí, temos que se o *J-System* está em EEG, então as saídas da rede intracelular e os sinais externos, em todas as células, são todos estacionários. Como estamos assumindo que o *J-System* é de entrada estacionária, então se o *J-System* está em EEG, então temos que toda célula p do reticulado apresenta sinais de entrada e sinais externos ambos estacionários.

Como a rede intracelular é replicada em todas células do reticulado, o campo atrator local associado a cada uma delas é o mesmo, então obviamente os pontos atratores locais associados às células também são os mesmos, para todas elas. Daí, podemos concluir que um ponto atrator global (ou estado estacionário global - EEG) corresponde a uma distribuição (arranjo) de pontos atratores locais entre as células do reticulado tal que:

1. a configuração de saída proporcionada por um ponto atrator local de uma célula p deve ser compatível com a configuração dos sinais de externos requerida pelos pontos atratores locais das células vizinhas à célula p ;
2. as configurações de saída proporcionadas pelos pontos atratores locais das células vizinhas à célula p devem ser compatíveis com a configuração do sinal externo requerida pelo ponto atrator da célula p .

Ou seja, um **ponto** atrator global (ou EEG) equivale a um arranjo de **pontos** atratores locais entre as células do reticulado que obedece às propriedades de sintonia.

3.6.2 Combinação de Atratores Locais Periódicos

Se um arranjo de atratores locais entre as células do reticulado que obedece às propriedades de sintonia contém apenas atratores pontuais, então o arranjo sintônico equivale a um EEG. Entretanto, se ao invés de termos apenas **pontos** atratores locais, tivermos também **ciclos** atratores locais (desde que de saída pontual), ainda assim teremos que um atrator global corresponde a um arranjo de atratores locais que satisfazem às propriedades de sintonia. Isso porque, como a comunicação intercelular em *J-Systems* está baseada nas variáveis de saída, os atratores periódicos locais de saída pontual comportam-se, do ponto de vista da interação com as células vizinhas, como se fossem pontos atratores locais. Daí que, durante a identificação de atratores globais em *J-Systems*, podemos arranjar **ciclos** atratores locais de saída pontual como se fossem **pontos** atratores locais .

Atratores globais construídos a partir desse tipo de arranjo não correspondem a EEGs, pois se existir no arranjo de atratores locais usado para compor o atrator global um único **ciclo** atrator local (mesmo que de saída pontual) em alguma célula do reticulado, a cada diferente estado deste ciclo atrator local corresponderá um diferente estado global. Se o arranjo de atratores locais contém uma única célula na qual está colocado um ciclo atrator local a_i , então temos que o ciclo atrator global associado a este arranjo tem comprimento igual ao comprimento do período atrator local, no caso $|a_i|$. Se o arranjo de atratores locais contém duas células nas quais estão colocados dois ciclos atratores locais a_i e a_j (não necessariamente diferentes), então o comprimento do ciclo atrator global associado a este arranjo é $|a_i| * |a_j|$. Generalizando, se o arranjo de atratores locais contém os ciclos atratores locais a_0, a_1, \dots, a_{n-1} colocados em diferentes células, então o comprimento do período atrator global associado a este arranjo é $|a_0| * |a_1| * \dots * |a_{n-1}|$. Estamos assumindo, lembremos, que os ciclos atratores locais são de saída pontual (estacionária).

Embora do ponto de vista teórico seja interessante identificar exatamente os ciclos atratores globais, a interpretação de que uma bacia de atração corresponde a um tipo celular (ver Seção 5.1) nos permite afirmar que o mais importante na compreensão da dinâmica do sistema, à luz dessa interpretação, é a identificação dos arranjos que obedecem às propriedades de sintonia, pois esses equivalem aos padrões celulares estáveis.

Além disso, é razoável supor que a ocorrência de atratores periódicos de saída pontual seja relativamente freqüente, visto que geralmente a comunicação intercelular é realizada através de poucas variáveis de saída, tipicamente três ou menos.

3.6.3 Sintonia entre Atratores Locais Posicionados em Células Vizinhas

Vamos denominar de *arranjo sintônico global* um arranjo de atratores locais (pontuais ou periódicos), desde que de saída pontual, que cobre todas as células do reticulado e que satisfaz às propriedades de sintonia. Um *padrão celular estável*, abreviadamente *padrão* (ou *pattern*), corresponde a um arranjo sintônico global e para descrever como encontrá-los é preciso antes definir mais formalmente o significado que estamos atribuindo à noção de compatibilidade usada na descrição das propriedades de sintonia.

Dadas a geometria e as dimensões de um reticulado \mathcal{R} e uma célula $p \in \mathcal{R}$, denotamos por $V(p)$ o conjunto das células vizinhas à célula p e por P o conjunto formado por p e suas vizinhas, isto é, $P = \{p\} \cup V(p)$. Além disso, denotamos por $V(P) = \{q \in \mathcal{R} : q \in V(r) - \{q\}, \forall r \in V(p)\}$ o conjunto das células vizinhas das vizinhas de p . Evidentemente, $V(p)$ e $V(P)$ variam de reticulado para reticulado. A Figura 3.4 ilustra essas definições.

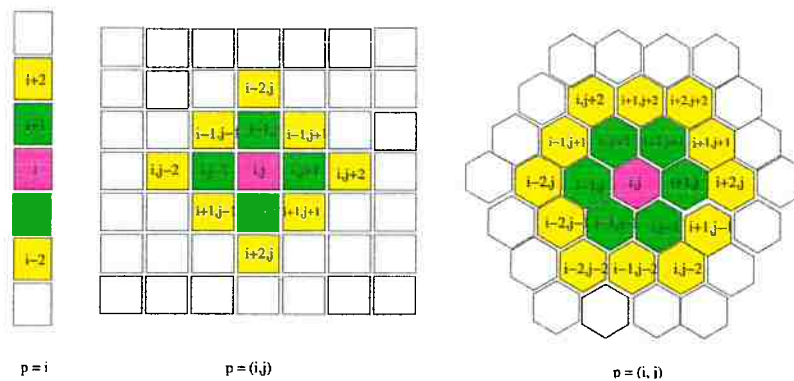


Figura 3.4: Exemplos de vizinhança em reticulados linear e planar. À esquerda, num reticulado linear quadrado, se $p = i$ temos que $V(p) = \{i-1, i+1\}$ e que $V(P) = \{i-2, i+2\}$. Ao centro, num reticulado planar quadrado, se $p = (i, j)$ temos que $V(p) = \{(i, j-1), (i-1, j), (i, j+1), (i+1, j)\}$ e que $V(P) = \{(i, j-2), (i-1, j-1), (i-2, j), (i-1, j+1), (i, j+2), (i+1, j+1), (i+2, j), (i+1, j-1)\}$. À direita, num reticulado planar hexagonal, se $p = (i, j)$ temos que $V(p) = \{(i-1, j), (i, j+1), (i+1, j+1), (i+1, j), (i, j-1), (i-1, j-1)\}$ e que $V(P) = \{(i-2, j), (i-1, j+1), (i, j+2), (i+1, j+2), (i+2, j+2), (i+2, j+1), (i+2, j), (i+1, j-1), (i, j-2), (i-1, j-2), (i-2, j-2), (i-2, j-1)\}$.

Consideremos um *J-System* sem sinalizadores de membrana e suponhamos que no seu campo atrator local o conjunto A dos atratores locais de saída pontual contém n elementos, denotados aqui por a_0, a_1, \dots, a_{n-1} . Dizemos que $a_j \in A$ posicionado na célula p *sintoniza* com $a_x, \dots, a_y \in A$ posicionados, respectivamente, nas células $u, \dots, v \in V(p)$,

se as seguintes condições são satisfeitas:

- $V_p^{a_i}[k] = \psi_k(I_p^{a_i}[h..i], E_p^{a_i}[q..r], B_p^{a_i}[c..e]), \forall g^k \in \mathcal{V};$
- $V_u^{a_x}[k] = \psi_k(I_u^{a_x}[h..i], E_u^{a_x}[q..r], B_u^{a_x}[c..e]), \forall g^k \in \mathcal{V};$
- \vdots
- $V_v^{a_y}[k] = \psi_k(I_v^{a_y}[h..i], E_v^{a_y}[q..r], B_v^{a_y}[c..e]), \forall g^k \in \mathcal{V};$

sendo que:

- $B_p^{a_i}[c..e] = \Delta(S_u^{a_x}[m..n], \dots, S_v^{a_y}[m..n]),$ onde $\Delta,$ lembremos, são as funções de vizinhança ou membrana que atualizam os sinais externos,
- $B_u^{a_x}[c..e] = \Delta(S_p^{a_i}[m..n], \dots, S_v^{a_y}[m..n], S^{a_w}[m..n], \dots, S^{a_z}[m..n]),$ para algum $a_w, \dots, a_z \in A$ posicionados em $V(u) - ((V(u) \cap V(p)) \cup \{p\}),$
- \vdots
- $B_v^{a_y}[c..e] = \Delta(S_u^{a_x}[m..n], \dots, S_p^{a_i}[m..n], S^{a_w}[m..n], \dots, S^{a_z}[m..n]),$ para algum $a_w, \dots, a_z \in A$ posicionados em $V(v) - ((V(v) \cap V(p)) \cup \{p\}).$

Com relação a essas condições, vale a seguinte notação:

- $V_p^{a_i}[k]$ denota o valor da variável de estado $g^k, g^k \in \mathcal{V},$ quando a rede intracelular, na célula $p,$ está no atrator local $a_i.$
- $E_p^{a_i}[q..r]$ denota o valor estacionário das entradas $e^q, \dots, e^r \in \mathcal{E}$ quando a rede intracelular, na célula $p,$ está no atrator local $a_i.$
- $S_p^{a_i}[m..n]$ denota o valor estacionário das saídas $s^m, \dots, s^n \in \mathcal{S}$ quando a rede intracelular, na célula $p,$ está no atrator local $a_i.$
- $B_p^{a_i}[c..e]$ denota o valor das variáveis do tipo sinal externo b^c, \dots, b^e quando a rede intracelular, na célula $p,$ está no atrator local $a_i.$
- $I_p^{a_i}[h..i]$ denota os valores das variáveis de estado $g^h, \dots, g^i \in \mathcal{I}(\mathcal{V}),$ quando a rede intracelular, na célula $p,$ está no atrator local $a_i,$ sendo que supomos g^h, \dots, g^i estacionárias, isto é, $I_p^{a_i}[h..i]$ denota o valor estacionário de $g^h, \dots, g^i.$

Ou seja, dizemos que a_j em p é *sintônico* (ou sintoniza) com a_x, \dots, a_y posicionados em $u, \dots, v \in V(p)$, respectivamente, para algum a_w, \dots, a_z posicionados em $b, \dots, d \in V(P)$, respectivamente, se as condições acima forem satisfeitas. Denotaremos esse fato por

$$(a_j, p) \rightleftharpoons [(a_x, u), \dots, (a_y, v)] \rightleftharpoons [(a_w, b), \dots, (a_z, d)].$$

3.6.4 Identificação de Agrupamentos Sintônicos

Dadas a geometria e as dimensões de um reticulado \mathcal{R} e uma célula $p \in \mathcal{R}$, denominamos o conjunto $\mathcal{V}_p = \{p\} \cup V(p) \cup V(P) \subset \mathcal{R}$ de *agrupamento* (ou *cluster*) de células com centro em p . Dados os atratores $a_j, a_x, \dots, a_y, a_w, \dots, a_z \in A$ e as células $p, u, \dots, v, w, \dots, z \in \mathcal{V}_p$, denotamos por $[(a_j, p), (a_x, u), \dots, (a_y, v), (a_w, b), \dots, (a_z, d)]$ o arranjo tal que: a) a_j está posicionado em p ; b) a_x, \dots, a_y estão posicionados em u, \dots, v , respectivamente e c) a_w, \dots, a_z estão posicionados em w, \dots, z , respectivamente.

Se existe $a_j, a_x, \dots, a_y, a_w, \dots, a_z \in A$ e $p, u, \dots, v, w, \dots, z \in \mathcal{V}_p$ tal que

$$(a_j, p) \rightleftharpoons [(a_x, u), \dots, (a_y, v)] \rightleftharpoons [(a_w, b), \dots, (a_z, d)],$$

dizemos que $[(a_j, p), (a_x, u), \dots, (a_y, v), (a_w, b), \dots, (a_z, d)]$ é um *agrupamento sintônico* (ou *cluster sintônico*).

Dados um agrupamento de células \mathcal{V}_p e um conjunto A de atratores locais, podemos ter vários agrupamentos sintônicos. Para identificá-los, podemos usar o Procedimento 3.

Procedimento 3 : ClustersInTune. Calcula o conjunto dos agrupamentos sintônicos

Entrada: um agrupamento de células \mathcal{V}_p e um conjunto A dos atratores locais

Saída: o conjunto CLUSTERS dos agrupamentos sintônicos

- 1: CLUSTERS $\leftarrow \emptyset$
 - 2: **for** cada arranjo $[(a_j, p), (a_x, u), \dots, (a_y, v), (a_w, b), \dots, (a_z, d)]$ **do**
 - 3: **if** $(a_j, p) \rightleftharpoons [(a_x, u), \dots, (a_y, v)] \rightleftharpoons [(a_w, b), \dots, (a_z, d)]$ **then**
 - 4: CLUSTERS \leftarrow CLUSTERS $\cup \{[(a_j, p), (a_x, u), \dots, (a_y, v), (a_w, b), \dots, (a_z, d)]\}$
 - 5: **end if**
 - 6: **end for**
-

Vale notar que se não existir pelos menos um atrator local de saída pontual em A , seja ele estacionário ou cíclico, então não será possível compor *clusters* sintônicos. Além disso, há também a possibilidade de termos um *J-System* que proporciona um conjunto de atratores locais de saída pontual não vazio, mas que, ainda assim, não permite a composição de *clustes* sintônicos. Se não houver *clusters* sintônicos (CLUSTERS = \emptyset), então

não existirão arranjos sintônicos globais, isto é, não haverá também padrões celulares estáveis, e, por conseguinte, não existirão pontos atratores globais. Isso não quer dizer que inexistem atratores globais no *J-System* em questão. Eles existem, porém não serão constituídos de arranjos de atratores locais com saída pontual, mas serão constituídos de atratores locais periódicos de saída periódica, não podendo, portanto, ser detectados pelo presente método.

Uma observação importante a fazer com relação ao Procedimento 3 é que ele é enumerativo e que existem $|A|^{|\mathcal{V}_p|}$ arranjos $[(a_j, p), (a_x, u), \dots, (a_y, v), (a_w, b), \dots, (a_z, d)]$, o que o torna impraticável para conjuntos de atratores modestamente “grandes” em certos tipos de reticulado, apesar de $|\mathcal{V}_p|$ ser fixo para um dado tipo reticulado (ver Seção 3.8).

Para atenuar essa restrição, podemos adotar filtros manuais no conjunto de atratores a fim de reduzi-lo, os quais são geralmente baseados no significado biológico do atrator e podem ser definidos a partir do *software* que foi desenvolvido para dar suporte aos *J-Systems* (ver Seção 4.3). Além disso, propomos um procedimento para cálculo de *clusters* sintônicos que realiza alguma economia de computação, através da exploração de algumas características das funções de vizinhança Δ . Esse é procedimento descrito a seguir.

3.6.4.1 Cálculo de *Clusters* Sintônicos por Partes

O cálculo de *clusters* sintônicos por partes pode ser dividido em três momentos: i) dado um conjunto de atratores A e um agrupamento de células $\{p\} \cup V(p)$ (ver Figura 3.4, página 63) formado pela célula p e suas vizinhas, identificamos os arranjos de atratores posicionados em $\{p\} \cup V(p)$ tal que o atrator posicionado em p e aqueles posicionados em $V(p)$ têm valores nos sinalizadores externos b^i e nas saídas s^i compatíveis entre si, segundo as funções de vizinhança Δ . Chamamos esses arranjos de *microclusters pré-sintônicos*, que são armazenados para uso posterior; ii) em seguida tomamos o “*slote*” formado pelo agrupamento de células \mathcal{V}_p e identificamos arranjos de atratores posicionados em \mathcal{V}_p tal que os atratores posicionados em $V(p)$ e em $V(P)$ têm valores nos sinalizadores externos b^i e nas saídas s^i compatíveis entre si, segundo as funções de vizinhança Δ . Chamamos esses arranjos de *clusters pré-sintônicos*. Para fazê-lo usamos os *microclusters* pré-sintônicos calculados no passo anterior e iii) testamos se os arranjos identificados no passo anterior satisfazem as propriedades de sintonia.

A noção de compatibilidade usada na identificação dos *microclusters* pré-sintônicos (passo i) explora o fato de que as funções Δ de vizinhança ou membrana são definidas de

modo que não consideram a posição relativa dos sinais de saída que têm origem nas células vizinhas e que nelas incidem. Isso permite representá-las em termos das quantidades de tipos desses sinais de saída. Por exemplo, considere a uma função Booleana δ_1 num reticulado planar quadrado que atualiza o sinalizador externo b^1 na célula (i, j) definida por

$b_{i,j}^1$	$s_{i,j-1}^1$	$s_{i-1,j}^1$	$s_{i,j+1}^1$	$s_{i+1,j}^1$
0	0	0	0	0
0	0	0	0	1
0	0	0	1	0
0	0	0	1	1
0	0	1	0	0
0	0	1	0	1
0	0	1	1	0
1	0	1	1	1
0	1	0	0	0
0	1	0	0	1
0	1	0	1	0
1	1	0	1	1
0	1	1	0	0
1	1	1	0	1
1	1	1	1	0
1	1	1	1	1

Como δ_1 não diferencia de quais vizinhas vêm os sinais de saída, ela pode ser representada de forma compacta por

$b_{i,j}^1$	Qtidade de 1's	Qtidade de 0's
0	0	4
0	1	3
0	2	2
1	3	1
1	4	0

Para definir mais formalmente a noção de compatibilidade mencionada acima, suponhamos: a) um modelo com sinalizadores externos b^1, \dots, b^n e suas correspondentes funções de vizinhança $\delta^1, \dots, \delta^n$ representadas na forma compacta; b) um atrator $a_j \in A$ posicionado em p com seus sinalizadores externos b^1, \dots, b^n assumindo os valores $b_{a_j}^1, \dots, b_{a_j}^n$, respectivamente, e suas saídas s^1, \dots, s^n assumindo os valores $s_{a_j}^1, \dots, s_{a_j}^n$, respectivamente e c) os atratores $a_x, \dots, a_y \in A' \subset A$ posicionados em $V' \subset V(p)$, cada um deles com seus sinalizadores externos b^1, \dots, b^n assumindo os valores $b_{a_x}^1, \dots, b_{a_x}^n, \dots, b_{a_y}^1, \dots, b_{a_y}^n$, respectivamente, e suas saídas s^1, \dots, s^n assumindo os valores $s_{a_x}^1, \dots, s_{a_x}^n, \dots, s_{a_y}^1, \dots, s_{a_y}^n$, respectivamente.

Dizemos que a colocação/inserção do atrator $a_k \in A$ na célula $q \in V(p) - V'$ é *compatível segundo as funções de vizinhança* com os atratores a_j, a_x, \dots, a_y (já posicionados em p e em V') se as seguintes condições forem satisfeitas:

- a) para todo sinalizador externo b^i de a_j vale: o conjunto $\{s_{a_x}^i, \dots, s_{a_y}^i, s_{a_k}^i\}$ tem uma quantidade de valores $z, \dots, w \in \mathbb{S}$ coerente com a quantidade de valores z, \dots, w

previstos nas representações compactas das funções δ_i para que b^i assuma o valor $b_{a_j}^i$.

- b) para todo sinalizador externo b^i de a_k vale: o conjunto $\{s_{a_u}^i, \dots, s_{a_v}^i, s_{a_j}^i\}$ tem uma quantidade de saídas com valores $z, \dots, w \in \mathbb{S}$ coerente com a quantidade de valores z, \dots, w previstos nas representações compactas das funções δ_i para que b^i assuma o valor $b_{a_k}^i$, sendo que os atratores a_u, \dots, a_v estão posicionadas em V' em células que são vizinhas da célula q .

Se essas duas condições são satisfeitas dizemos, de modo abreviado, que a colocação/inserção de a_k em q é *válida*. Um fato importante a mencionar é que se a inserção de a_k em q é não válida, então podemos descartar o arranjo onde temos a_j em p , a_x, \dots, a_y em V' e a_k em q . Isso pode ser feito mesmo que ainda não tenhamos testado outros atratores nas demais células posicionadas em $V(p) - V'$.

Para ilustrar, tomemos o seguinte exemplo: suponha um modelo Booleano com apenas um sinalizador externo b^1 e a função de vizinhança definida pela tabela da página 67, um agrupamento de células $\{p\} \cup V(p)$ e um conjunto de atratores A . Suponha também que $a_j, a_x, a_k \in A$ têm b^1 com valores $b_{a_j}^1 = 1$, $b_{a_x}^1 = 0$, $b_{a_k}^1 = 0$ e a saída s^1 com os valores $s_{a_j}^1 = 1$, $s_{a_x}^1 = 1$, $s_{a_k}^1 = 1$. Agora suponha que a_j já está posicionado em p , que a_x já está posicionado em $r \in V' \subset V(p)$ (neste momento $V' = \{r\}$) e que vamos posicionar a_k em $q \in V(p) - V'$. Isso só pode ser feito se:

- a) a quantidade de saídas de valor 1 em $\{s_{a_x}^1, s_{a_k}^1\}$ for maior ou igual a 3 e a quantidade de saídas de valor 0 em $\{s_{a_x}^1, s_{a_k}^1\}$ for menor ou igual a 1 (veja a representação compacta de δ_1);
- b) a quantidade de saídas de valor 1 em $\{s_{a_j}^1\}$ (observe que neste exemplo de reticulado a única vizinha de q em $V(p) \cup \{p\}$ é p) for maior ou igual a 3 e a quantidade de saídas de valor 0 em $\{s_{a_j}^1\}$ for menor ou igual a 1;

Como no exemplo temos $\{s_{a_x}^1, s_{a_k}^1\} = \{1, 1\}$ e $\{s_{a_j}^1\} = \{1\}$, poderíamos posicionar a_k em q .

Vale observar que, para explorar o fato de que as funções de vizinhança Δ podem ser representadas de forma compacta e que esta representação fornece um critério de compatibilidade entre atratores, criamos uma estrutura de controle que armazena e atualiza essas quantidades na medida em que atratores são testados e inseridos em células vizinhas. Se a colocação de um atrator a_k numa célula q for possível, devemos atualizar essa estrutura

de controle de modo que essa propriedade possa ser testada novamente, numa próxima tentativa de inserção em outra posição, considerando as inserções já realizadas.

A identificação dos *microclusters* pré-sintônicos (passo i) pode ser descrito, em linhas gerais, da seguinte forma:

1. Posicione um atrator a_x de A no centro p do agrupamento de células $\{p\} \cup V(p)$.
2. Com a_x fixado em p , teste a validade de inserção de cada um dos atratores de A em cada uma das células de $V(p)$. Se a inserção de um atrator $a_k \in A$ numa célula $q \in V(p)$ não é válida, descarte o arranjo que contém a_k posicionado em q , mesmo que as demais posições de $V(p)$ ainda não tenham sido testadas.
3. Repita os passos (1) e (2) até que todos os atratores sejam posicionados/testados em p .

A identificação de *microclusters* pré-sintônicos, como descrita acima, proporciona economia de computação porque os arranjos descartados (mesmo que neles ainda não tenham sido testadas todas as células de $V(p)$), pelo critério de compatibilidade das funções de vizinhança, não precisam ser avaliados no que diz respeito à verificação das propriedades de sintonia. Para melhor visualizar essa economia, é interessante pensarmos a representação das possíveis seqüências de teste e inserção de atratores através de uma árvore de possibilidades. Quando a inserção de um atrator é inválida, o arranjo m que o contém e todos os outros arranjos que dele derivam (representados na árvore de possibilidades como uma subárvore enraizada em m) podem ser descartados. A Figura 3.5 ilustra essa representação.

O próximo momento (passo ii) do cálculo de *clusters* sintônicos por partes opera de modo muito similar ao cálculo dos *microclusters* pré-sintônicos (passo i), diferindo basicamente nas posições (células) onde a validade de inserção de atratores é testada. Com o conjunto MC de *microclusters* pré-sintônicos, o agrupamento de células $\mathcal{V}_p = \{p\} \cup V(p) \cup V(P)$ (ver Figura 3.4) e o conjunto A de atratores em mãos, fazemos:

1. Posicione um *microcluster* pré-sintônico $m \in MC$ em $\{p\} \cup V(p)$.
2. Com m fixado em $\{p\} \cup V(p)$, teste a validade de inserção de cada um dos atratores de A em cada uma das células de $V(P)$. Se a inserção de um atrator $a_k \in A$ numa célula $q \in V(P)$ não é válida, descarte o arranjo que contém a_k posicionado em q , mesmo que as demais posições de $V(P)$ ainda não tenham sido testadas.

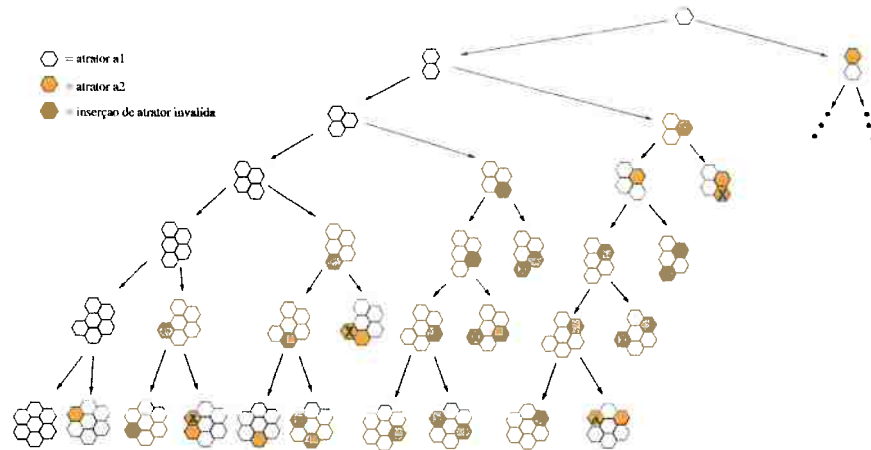


Figura 3.5: Um exemplo de árvore de possibilidade para teste e inserção de dois atratores (a_1 e a_2) num reticulado planar de células hexagonais. Suponha que o atrator a_2 quando inserido duas vezes no agrupamento de células torna o arranjo inválido. Todos os arranjos que contém uma inserção inválida (marcadas com X) e todos aqueles que dele derivam (subárvores neles enraizadas) podem ser descartados.

3. Repita os passos (1) e (2) até que todos os *microclusters* pré-sintônicos sejam posicionados em p .

Similarmente ao cálculo de *microclusters* pré-sintônicos (passo i), aqui também realizamos alguma economia de computação pela não necessidade de avaliação dos arranjos descartados segundo o critério de compatibilidade das funções de vizinhança.

Por fim (passo iii), tomamos o conjunto dos *clusters* pré-sintônicos válidos (calculados no passo ii) e testamos para cada um deles as propriedades de sintonia, conforme definidas na Seção 3.6.3.

3.6.5 Montagem de Atratores Globais

Um padrão, lembremos, corresponde a um arranjo sintônico global. A partir da definição das propriedades de sintonia (Seção 3.6.3) e de agrupamento sintônico (Seção 3.6.4), podemos estabelecer de forma mais precisa essa noção. Dado um reticulado \mathcal{R} e um conjunto de atratores A , um padrão é um mapeamento $f : \mathcal{R} \rightarrow A$ que associa cada célula em \mathcal{R} com um atrator em A tal que para todo $(p, a_j) \in f$ vale que

$$(a_j, p) \Leftrightarrow [(a_x, u), \dots, (a_y, v)] \Leftrightarrow [(a_w, b), \dots, (a_z, d)],$$

com $(u, a_x), \dots, (v, a_y), (b, a_w), \dots, (d, a_z) \in f$. Representaremos f por um vetor $R[0..n-1]$, isto é, $R[p] = a_j$ denota que à célula $p \in \mathcal{R}$ está associado o atrator $a_j \in A$.

Como decorrência, podemos estabelecer que um **ponto** atrator global (ou estado estacionário global) em um *J-System* é um caso especial de padrão, conforme definido anteriormente, com a restrição adicional de que os atratores locais $a_j, a_x, \dots, a_y, a_w, \dots, a_z \in A$ são todos atratores pontuais.

O método que propomos para identificação de padrões celulares consiste, grosso modo, na composição de um “mosaico” onde as peças correspondem aos *clusters* sintônicos, que são “encaixados” nos “*slots*” definidos pelos *clusters* de células do reticulado de modo a preencher todo o reticulado. Um encaixe é válido se a seguinte condição for satisfeita: não ocorrência de algum *mismatch* (definido logo adiante) de atratores do *cluster* sintônico que está sendo encaixado com atratores de algum *cluster* já encaixado.

Antes de proceder à montagem de um padrão celular via o encaixe de *clusters* sintônicos no reticulado, pode ser conveniente selecionar no conjunto CLUSTERS de agrupamentos sintônicos, aqueles de maior interesse, seja por razões de significado biológico e/ou desempenho (ver Seção 3.8). Isso também pode ser feito a partir do *software* de suporte aos *J-System* (Seção 4.3). Denotamos por SELECT, $\text{SELECT} \subseteq \text{CLUSTERS}$, o conjunto dos agrupamentos sintônicos selecionados pelo usuário.

Dado um conjunto SELECT de agrupamentos sintônicos e um reticulado \mathcal{R} , é possível definir várias maneiras de promover o encaixe de elementos de SELECT em \mathcal{R} . Definimos, implementamos e testamos duas: por Expansão Aritmética e por Expansão Geométrica. Antes de descrever como operam esses procedimentos de encaixe, convém definir, de modo mais formal, o significado que estamos atribuindo aos termos ‘encaixe’ e ‘*mismatch*’.

Seja um reticulado \mathcal{R} e um conjunto de *clusters* sintônicos $\text{SELECT} = \{C_0, C_1, \dots, C_{m-1}\}$. O *encaixe* de um *cluster* sintônico $C_i = [(a_j, p), (a_x, u), \dots, (a_y, v), (a_w, b), \dots, (a_z, d)] \in \text{SELECT}$ em um agrupamento de células $\mathcal{V}_q \subset \mathcal{R}$ com centro em q é a atribuição

$$R[q] \leftarrow a_j, R[r] \leftarrow a_x, \dots, R[s] \leftarrow a_y, R[c] \leftarrow a_w, \dots, R[e] \leftarrow a_z,$$

sendo que $r, \dots, s \in V(q)$ e $c, \dots, e \in V(Q)$. Vamos denotá-lo por $R[[\mathcal{V}_q]] \leftarrow C_i$.

É direto estabelecer que um encaixe $R[[\mathcal{V}_q]] \leftarrow C_i$ define um mapeamento parcial $f(\mathcal{V}_q, C_i) = \{(q, a_j), (r, a_x), \dots, (s, a_y), (c, a_w), \dots, (e, a_z)\}$ em \mathcal{R} que cobre apenas as células em \mathcal{V}_q .

Dados um padrão parcial formado por $f(\mathcal{R}_p, C_k) \cup \dots \cup f(\mathcal{V}_q, C_i)$ e um encaixe $R[[\mathcal{V}_r]] \leftarrow C_i$, dizemos que há um *mismatch* de atratores entre eles se as seguintes condições são

satisfeitas:

- $(\mathcal{V}_p \cup \dots \cup \mathcal{V}_q) \cap \mathcal{V}_r \neq \emptyset$;
- $R[i] \neq R[j]$ para algum $i \in \{(\mathcal{V}_p \cup \dots \cup \mathcal{V}_q)\}$ e algum $j \in \mathcal{V}_r$;
- as células na intersecção do encaixe continuam compatíveis (em sintonia) com suas vizinhas.

3.6.5.1 Montagem por Expansão Aritmética

O procedimento para montagem de padrões através do encaixe de agrupamentos sintônicos por Expansão Aritmética pode ser descrito em linhas gerais pelos seguintes passos: i) escolhemos aleatoriamente um agrupamento sintônico em SELECT e o encaixamos numa célula arbitrária $p \in \mathcal{R}$, ii) escolhemos novamente um agrupamento sintônico em SELECT e o encaixamos nas bordas do padrão parcial definido pelo encaixe anterior, caso ele não produza algum *mismatch* com algum atrator já encaixado e iii) repetimos o passo anterior até que o padrão parcial cubra todo o reticulado ou atinja um limite de expansão definido pela seqüência de encaixes e pelas dimensões do reticulado. O Procedimento 4 descreve de modo mais detalhado essa idéia.

A função ‘ladeia’ (linha 8 do Procedimento 4) recebe uma célula $r \in \text{BORDA}$ e devolve um segmento de borda (uma aresta da borda) cujo tamanho é igual ao tamanho do lado do *cluster*. Quando encaixamos um *cluster* sintônico nas bordas do padrão parcial (MANCHA) é preciso atualizar a borda da mancha de modo que ela reflita a inclusão do *cluster* (linha 13 do Procedimento 4); para isso usamos a função ‘interior’ que recebe um segmento de células e o devolve sem as duas células posicionadas nas suas extremidades.

É conveniente notar que ao realizarmos uma escolha aleatória (função ‘random’) em SELECT ou em BORDA, tipicamente estamos assumindo que os elementos em SELECT e em BORDA são equiprováveis.

3.6.5.2 Montagem por Expansão Geométrica

O procedimento para montagem de padrões através do encaixe de agrupamentos sintônicos por Expansão Geométrica pode ser descrito em linhas gerais pelos seguintes passos: i) igualmente à expansão aritmética, escolhemos aleatoriamente um agrupamento sintônico em SELECT e o encaixamos numa célula arbitrária $p \in \mathcal{R}$, ii) aqui também como

Procedimento 4 : ArithmeticExpansion. Monta padrões por expansão aritmética.

Entrada: um reticulado \mathcal{R} , um conj. SELECT de *clusters* sintônicos e uma célula p

Saída: um padrão $R[0..n-1]$.

```

1:  $C_i \leftarrow \text{random}(\text{SELECT})$  { escolhe por sorteio um cluster em SELECT }
2:  $R[[\mathcal{V}_p]] \leftarrow C_i$ 
3:  $\text{MANCHA} \leftarrow \mathcal{V}_p$  { MANCHA denota o conj. das células cobertas pelo padrão parcial }
4:  $\text{BORDA} \leftarrow V(P)$  { BORDA denota o conj. das células que estão na borda de MANCHA }
5: while ( $\text{MANCHA} \neq \mathcal{R}$ ) and ('MANCHA não atingir limite de expansão') do
6:    $C_i \leftarrow \text{random}(\text{SELECT});$ 
7:    $r \leftarrow \text{random}(\text{BORDA})$  { escolhe por sorteio uma célula na borda da mancha }
8:    $\text{ARESTA} \leftarrow \text{ladeia}(r)$  { ARESTA é um pedaço da borda do tam. de um lado do cluster }
9:    $p \leftarrow t \in (\mathcal{R} - \text{MANCHA}) : V(T) \cap \text{BORDA} = \text{ARESTA}$ 
10:  if não há mismatch entre  $R[[\text{MANCHA}]]$  e  $f(\mathcal{V}_p, C_i)$  and intersecção permanece sintônica then
11:     $R[[\mathcal{V}_p]] \leftarrow C_i$ 
12:     $\text{MANCHA} \leftarrow \text{MANCHA} \cup \mathcal{V}_p$ 
13:     $\text{BORDA} \leftarrow (\text{BORDA} \cup V(P)) - (\text{interior}(\text{BORDA} \cap V(P)))$ 
14:  end if
15: end while
16: if MANCHA não cobriu 100% do reticulado  $\mathcal{R}$  then
17:    $\text{RetoqueMancha}(\text{MANCHA}, \text{SELECT})$ 
18: end if

```

no caso da expansão aritmética, escolhemos novamente um agrupamento sintônico em SELECT e o encaixamos nas bordas do padrão parcial definido pelo encaixe anterior, caso ele não produza algum *mismatch* com algum atrator já encaixado, iii) tomamos uma cópia do padrão formado pelo encaixe anterior e a encaixamos nas bordas do padrão original, caso não haja formação de algum *mismatch* com algum atrator já encaixado e iv) repetimos o passo anterior até que o padrão parcial cubra todo o reticulado ou atinga um limite de expansão definido pela seqüência de encaixes e pelas dimensões do reticulado. O Procedimento 5 descreve de modo mais detalhado essa idéia.

A função 'MaxLado' (linha 6 do Procedimento 5) recebe a borda da mancha e devolve um segmento de células que corresponde ao lado da borda de maior tamanho; este segmento de borda será utilizado depois como "guia" para o próximo encaixe. A função 'espelhamento' (linha 7 do Procedimento 5) recebe o conjunto de células do reticulado coberto pelo padrão parcial (MANCHA) e devolve um subconjunto de \mathcal{R} , diferente de MANCHA, que é simétrico à MANCHA em relação à DOBRA. A função 'replica' (linha 8 do Procedimento 5) recebe a mancha e constrói uma estrutura, independente de \mathcal{R} , equivalente ao mapeamento $R[[\text{MANCHA}]]$, ou seja, constrói um superagrupamento de células sintônico que é equivalente a $R[[\text{MANCHA}]]$.

Procedimento 5 : GeometricExpansion. Monta padrões por expansão geométrica.

Entrada: um reticulado \mathcal{R} , um conj. de *clusters* sintônicos SELECT e uma célula p

Saída: um padrão $R[0..n - 1]$.

```

1:  $C_i \leftarrow \text{random}(\text{SELECT})$  { escolhe por sorteio um cluster em SELECT }
2:  $R[[\mathcal{V}_p]] \leftarrow C_i$ 
3: MANCHA  $\leftarrow \mathcal{V}_p$ 
4: BORDA  $\leftarrow V(P)$ 
5: while (MANCHA  $\neq \mathcal{R}$ ) and ('MANCHA não atingir limite de expansão') do
6:   DOBRA  $\leftarrow \text{MaxLado}(\text{BORDA})$  { DOBRA recebe o lado de BORDA de maior tamanho }
7:   IMAGEM  $\leftarrow \text{espelhamento}(\text{MANCHA}, \text{DOBRA})$ 
8:   SUPERCLUSTER  $\leftarrow \text{replica}(\text{MANCHA})$ 
9:   if não há mismatch entre  $R[[\text{MANCHA}]]$  e  $f(\text{IMAGEM}, \text{SUPERCLUSTER})$  then
10:      $R[[\text{IMAGEM}]] \leftarrow \text{SUPERCLUSTER}$ 
11:     MANCHA  $\leftarrow \text{MANCHA} \cup \text{IMAGEM}$ 
12:     BORDA  $\leftarrow (\text{BORDA} \cup \text{IMAGEM}) - (\text{interior}(\text{BORDA} \cap \text{IMAGEM}))$ 
13:   end if
14: end while
15: if MANCHA não cobriu 100% do reticulado  $\mathcal{R}$  then
16:    $\text{RetoqueMancha}(\text{MANCHA}, \text{SELECT})$ 
17: end if

```

3.6.5.3 Limites de Expansão

Se não existirem *clusters* sintônicos ($\text{CLUSTERS} = \emptyset$), então certamente não haverá padrões. Por outro lado, dado um reticulado \mathcal{R} e um conjunto CLUSTERS não vazio, não implica, necessariamente, que haverá padrões, pois a existência de um padrão dependerá das dimensões e da quantidade de células em \mathcal{R} e da disposição dos atratores nos *clusters* sintônicos.

Relacionado a esse fato, há uma situação que pode ocorrer no processo de montagem dos padrões por expansão aritmética e geométrica e que não está explicitamente tratada na forma como descrevemos os Procedimentos 4 e 5, a saber: vamos preenchendo o reticulado de modo que a mancha vai expandindo até que chegamos em um ponto onde as células ainda não cobertas pela mancha (provavelmente uma pequena porção do reticulado) não podem ser cobertas por novos encaixes, pois elas não constituem bom “*slots*” para estes. Se durante a expansão de uma mancha isso ocorrer, diremos que ela atingiu o Limite de Expansão.

No caso de expansão aritmética, o critério que usamos para fazer a detecção dos limites de expansão é: dado uma MANCHA com o conjunto de células que constituem sua borda (BORDA) e o conjunto de clusters (SELECT), se repetirmos $|\text{SELECT}| \times |\text{BORDA}|$ vezes a tentativa de encaixe de um novo *cluster* em alguma posição da borda e o tamanho da

mancha não se alterar, então diremos que a mancha atingiu seu limite de expansão.

Quando o limite de expansão de uma mancha é alcançado, as escolhas aleatórias dos *clusters* em SELECT e das posições em BORDA onde eles serão encaixados pára e uma última tentativa de expansão é realizada pelo teste enumerativo de todas os *clusters* em SELECT em todas as posições de BORDA. Isso é descrito mais detalhadamente no Procedimento 6.

Procedimento 6 : *RetoqueMancha*. Testa o limite de expansão da mancha

Entrada: um padrão parcial MANCHA e um conjunto CLUSTERS de *clusters*

Saída: um padrão parcial MANCHA.

```

1: for all cluster  $C_i \in \text{CLUSTERS}$  do
2:   for all célula  $r \in \text{BORDA}$  do
3:     ARESTA  $\leftarrow$  ladeia( $r$ ) { ARESTA é um pedaço da borda do tam. de um lado do
       cluster}
4:      $p \leftarrow t \in (\mathcal{R} - \text{MANCHA}) : V(T) \cap \text{BORDA} = \text{ARESTA}$ 
5:     if (não há mismatch entre  $R[[\text{MANCHA}]]$  e  $f(\mathcal{V}_p, C_i)$ ) then
6:        $R[[\mathcal{V}_p]] \leftarrow C_i$ 
7:        $\text{MANCHA} \leftarrow \text{MANCHA} \cup \mathcal{V}_p$ 
8:     end if
9:   end for
10: end for
```

No caso de expansão geométrica, o critério que usamos para fazer a detecção dos limites de expansão é: dada uma MANCHA, se ela cobriu mais do que 50% do reticulado, então diremos que ela atingiu seu limite de expansão. Quando o limite de expansão de uma mancha obtida por expansão geométrica é alcançado, invocamos o procedimento de expansão aritmética para cobrir o restante do reticulado.

3.6.5.4 Expansão e Retração de Manchas

Diferentes execuções do processo de montagem por expansão podem levar a diferentes manchas com diferentes limites de expansão ou a diferentes padrões (caso a mancha cubra todo o reticulado), pois a cada uma delas pode corresponder uma diferente seqüência de encaixes.

Para identificar diferentes manchas (ou padrões), a partir de uma mesma célula p , adotamos a seguinte estratégia: expandimos uma mancha até o limite de expansão e a armazenamos, depois a recortamos (a partir da borda) até que ela seja reduzida a um percentual X (definido a *priori*) da mancha original; por fim, reiniciamos o processo de expansão a partir da mancha “recortada” até que ela atinga novamente o limite de expansão. No Procedimento 7 descrevemos com mais detalhes esse processo.

Procedimento 7 : PulsaMancha. Computa manchas (padrões) a partir de uma célula p

Entrada: um reticulado \mathcal{R} , um conjunto SELECT de *clusters*, uma célula p e um número real X .

Saída: um conjunto de manchas (ou padrões)

```

1: repeat
2:   PADRAO ← ArithmeticExpansion(p, SELECT,  $\mathcal{R}$ ) { ou GeometricExpansion}
3:   armazena (PADRAO)
4:   while |MANCHA| > (|\mathcal{R}| - X)/100 do
5:     q ← random(BORDA)
6:     p ← t ∈ MANCHA : q ∈ V(P)
7:     MANCHA ← MANCHA - (MANCHA ∩  $\mathcal{V}_p$ )
8:     reparar(BORDA)
9:   end while
10: until haja um sinal de parada externo

```

Como dito anteriormente, diferentes seqüências de encaixes realizadas a partir de uma mesma célula podem levar a diferentes manchas ou a diferentes padrões. Além disso, vale observar também que no caso de reticulados não periódicos, uma mesma seqüência de encaixes realizada a partir de células diferentes pode levar a diferentes (embora muito parecidos) limites de expansão ou padrões. Caso seja de interesse detectar alguns destes padrões, cuja fonte de variação está na posição da célula a partir da qual inicia-se o processo de expansão, poderíamos executar o Procedimento 7 a partir de um célula arbitrária – de modo a memorizar a seqüência de encaixes realizada – e depois sortear células em \mathcal{R} e a partir delas reproduzir a seqüência de encaixes.

Quando recortamos a mancha excluindo dela um *cluster* \mathcal{V}_p com centro na célula p , é preciso recompor a borda da mancha nas posições que correspondem à parte interna do *cluster* que foi retirado. Esta recomposição é feita pela função ‘reparar’ (linha 8 do Procedimento 7), a qual, basicamente, implementa a operação

$$\text{BORDA} \leftarrow (\text{BORDA} - (\text{BORDA} - (V(P) \cap \text{BORDA}))) \cup (V(P) - \text{BORDA}).$$

3.7 Segundo caso: *J-Systems* com Sinalizadores de Membrana

Nesta arquitetura os SDFs associados às membranas não são vazios, isto é, temos que $\mathcal{B} \neq \emptyset$, de modo que as funções de vizinhança Δ nos sinais de saída da rede intracelular de uma célula não incidem diretamente sobre as variáveis de estado da rede intracelular das

células vizinhas, como ocorre no Primeiro Caso (Figura 3.3). Em vez disso, aqui os sinais de saída da rede intracelular de uma célula incidem sobre os sinalizadores de membrana da própria célula e estes, por sua vez, incidem sobre as variáveis de estado da rede intracelular e sobre os sinalizadores de membrana das células vizinhas (ver Figura 3.6).

No que diz respeito ao cálculo do campo atrator da rede intracelular, não existe diferença em relação ao Primeiro Caso (Seção 3.6), pois não há distinção entre sinais externos oriundos da membrana da própria célula e da rede intracelular das células vizinhas. Logo, aqui também usamos o Procedimento 1 (ReversoLocal) para fazê-lo. Para calcular o campo atrator das redes de membrana, usamos o Procedimento 2 (ReversoLocalModificado).

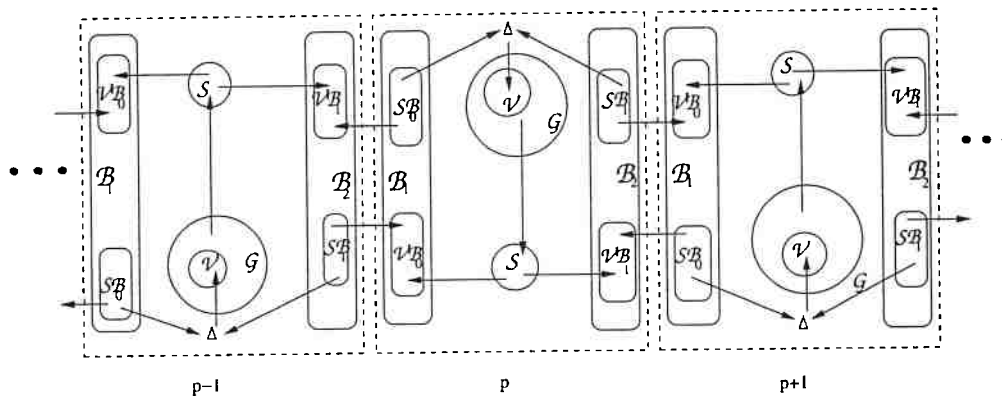


Figura 3.6: Recorte de um reticulado linear de células retangulares contendo as células $p-1$, p e $p+1$ (as linhas tracejadas representam os limites das células) na arquitetura onde há sinalizadores de membrana explicitamente definidos. Nesse caso, os sinais de saída da rede intracelular (S) incidem sobre os sinalizadores de membrana (B_0 e B_1 nessa geometria de célula) através de VB_0 e VB_1 , com $VB_0 \subset B_0$ e $VB_1 \subset B_1$, os quais representam a “porta de entrada” dos sinais externos que operam nos sinalizadores de membrana. Sobre VB_0 e VB_1 também incidem os sinais de saída das redes de membranas das faces opostas e adjacentes das células vizinhas, que são representados SB_0 e SB_1 . Os sinais de saída S da rede intracelular também incidem sobre VB_0 e VB_1 e as funções de vizinhança Δ nos sinais de saída das redes de membrana (SB_0 e SB_1) incidem sobre V , o qual, por sua vez, representa a “porta de entrada” da rede intracelular.

Muito provavelmente a rede intracelular será diferente da rede de membrana, o que implica que terão campos atratores diferentes. Isso significa que no momento de realizar a montagem do atrator global por expansão sintônica será preciso “sintonizar” pontos atratores de RDDs diferentes, o que quer dizer que teremos de adaptar as propriedades de sintonia de modo a comportar a presença das redes de membrana. Nesse sentido, rede-

finimos agora o conceito de ponto atrator global como sendo uma distribuição (arranjo) de pontos atratores locais (intracelulares e de membrana) entre células e segmentos de membrana tal que:

1. a configuração de saída proporcionada por um ponto atrator local intracelular de uma célula p deve ser compatível com a configuração dos sinais externos requerida pelos pontos atratores locais da rede de membrana da própria célula p ;
2. as configurações de saída proporcionadas pelos pontos atratores locais da rede de membrana nas faces da célula p devem ser compatíveis com a configuração do sinal externo requerida pelo ponto atrator da célula p .

Ou seja, um **ponto** atrator global (ou EEG) equivale a um arranjo de **pontos** atratores locais entre as células e segmentos de membrana do reticulado que obedece às propriedades de sintonia. Aqui, similarmente ao caso anterior, podemos também arranjar **ciclos** atratores locais de saída pontual como se fossem **pontos** atratores locais.

3.7.1 Sintonia entre Rede Intracelular e Rede de Membrana

A redefinição de atrator global feita logo acima exige algumas adaptações na definição precisa das propriedades de sintonia. Lembremos que, para cada tipo de reticulado, existe um conjunto finito $\mathcal{F} \subset \mathbb{N}$ de segmentos representando as faces (segmentos de membrana) das células. Dadas a geometria e as dimensões de um reticulado \mathcal{R} e uma célula $p \in \mathcal{R}$, vamos denotar por \mathcal{F}_p o conjunto de faces da célula p . Dada uma face $f \in \mathcal{F}_p$, denotamos por f' a face oposta e adjacente à f que está posicionada em $V(p)$. A Figura 3.7 ilustra essas definições.

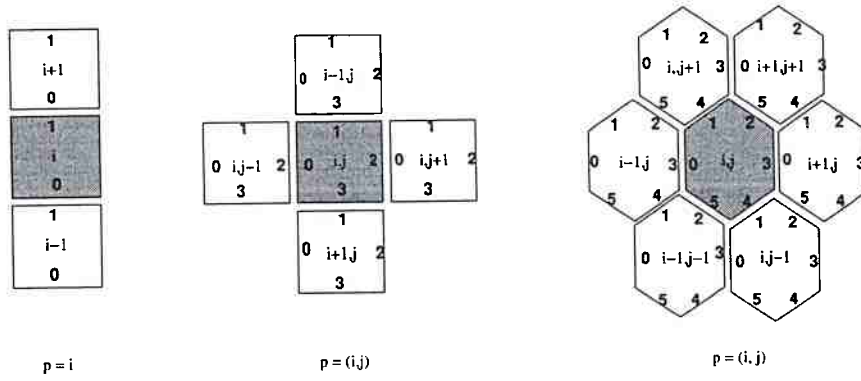


Figura 3.7: À esquerda, num reticulado linear quadrado, se $p = i$ temos que $\mathcal{F}_p = \{0, 1\}$ e que, por exemplo, para $f = 0$ na célula i , temos $f' = 1$ na célula $i + 1$. Ao centro, num reticulado planar quadrado, se $p = (i, j)$ temos que $\mathcal{F}_p = \{0, 1, 2, 3\}$ e que, por exemplo, para $f = 1$ na célula (i, j) , temos $f' = 3$ na célula $(i - 1, j)$. À direita, num reticulado planar hexagonal, se $p = (i, j)$ temos que $\mathcal{F}_p = \{0, 1, 2, 3, 4, 5\}$ e que, por exemplo, para $f = 2$ na célula (i, j) , temos $f' = 5$ na célula $(i + 1, j + 1)$.

Agora consideremos um *J-System* com sinalizadores de membrana e suponhamos que no seu campo atrator local intracelular o conjunto A dos atratores locais de saída pontual contém n elementos, denotados aqui por a_0, a_1, \dots, a_{n-1} e que no seu campo atrator local de membrana o conjunto B dos atratores locais de saída pontual contém m elementos, denotados aqui por b_0, b_1, \dots, b_{m-1} . Dizemos que $a_j \in A$ posicionado na rede intracelular da célula p *sintoniza* com $b_x, \dots, b_y \in B$ posicionados, respectivamente, nas faces $u, \dots, v \in \mathcal{F}_p$, se as seguintes condições forem satisfeitas:

- $V_p^{a_j}[k] = \psi_k(I_p^{a_j}[h..i], E_p^{a_j}[q..r], B_p^{a_j}[c..e]), \forall g^k \in \mathcal{VI};$
- $V_u^{b_x}[k] = \theta_k(I_u^{b_x}[h..i], A_u^{b_x}[q..r], S_p^{a_j}[d..f], S_u^{b_x}[c..e]), \forall b^k \in \mathcal{VB};$
- $V_v^{b_y}[k] = \theta_k(I_v^{b_y}[h..i], A_v^{b_y}[q..r], S_p^{a_j}[d..f], S_v^{b_y}[c..e]), \forall b^k \in \mathcal{VB};$

sendo que:

- $B_p^{a_j}[c..e] = \Delta(S_u^{b_x}[m..n], \dots, S_v^{b_y}[m..n])$, onde Δ , lembremos, são as funções de vizinhança ou membrana que atualizam os sinais externos da rede intracelular, onde:
 - $B_p^{a_j}[c..e]$ denota o valor das variáveis do tipo sinal externo b^c, \dots, b^e quando a rede intracelular, na célula p , está no atrator local a_j ,

- $S_u^{b_x}[m..n]$ denota o valor estacionário das saídas $s^m, \dots, s^n \in \mathcal{SB}$ quando a rede de membrana, na face u , está no atrator local b_x .

Com relação a essas condições, vale ainda a seguinte notação:

- $V_p^{a_i}[k]$ denota o valor da variável de estado g^k , $g^k \in \mathcal{VI}$, quando a rede intracelular, na célula p , está no atrator local a_i .
- $V_u^{b_x}[k]$ denota o valor da variável de estado b^k , $b^k \in \mathcal{VB}$, quando a rede de membrana, na face u , está no atrator local b_x .
- $V_w^{b_y}[k]$ denota o valor da variável de estado b^k , $b^k \in \mathcal{VB}$, quando a rede de membrana, na face oposta e adjacente à face u , está no atrator local b_y .
- $I_p^{a_i}[h..i]$ denota os valores das variáveis de estado $g^h, \dots, g^i \in \mathcal{I}(\mathcal{VI})$, quando a rede intracelular, na célula p , está no atrator local a_i , sendo que supomos g^h, \dots, g^i estacionárias, isto é, $I_p^{a_i}[h..i]$ denota o valor estacionário de g^h, \dots, g^i .
- $I_u^{b_x}[h..i]$ denota os valores das variáveis de estado $b^h, \dots, b^i \in \mathcal{I}(\mathcal{VB})$, quando a rede de membrana, na face u , está no atrator local b_x , sendo que supomos b^h, \dots, b^i estacionárias, isto é, $I_u^{b_x}[h..i]$ denota o valor estacionário de b^h, \dots, b^i .
- $E_p^{a_i}[q..r]$ denota o valor estacionário das entradas $e^q, \dots, e^r \in \mathcal{E}$ quando a rede intracelular, na célula p , está no atrator local a_i .
- $A_u^{b_x}[q..r]$ denota o valor estacionário dos sinalizadores ambientais $a^q, \dots, a^r \in \mathcal{A}$ quando a rede de membrana, na face u , está no atrator local b_x .
- $S_p^{a_i}[d..f]$ denota o valor estacionário das saídas $s^d, \dots, s^f \in \mathcal{SI}$ quando a rede intracelular, na célula p , está no atrator local a_i .
- $S_w^{b_y}[c..e]$ denota o valor estacionário das saídas $s^c, \dots, s^e \in \mathcal{SB}$ quando a rede de membrana, na face oposta e adjacente à face u , está no atrator local b_w .

Ou seja, dizemos que a_j em p é *sintônico* (ou sintoniza) com b_x, \dots, b_y posicionados em $u, \dots, v \in \mathcal{F}_p$, respectivamente, para algum b_w, \dots, b_z posicionados em u', \dots, v' , respectivamente, se as condições citadas são satisfeitas. Denotaremos esse fato por

$$(a_j, p) \rightleftarrows [(b_x, u), \dots, (b_y, v)] \rightleftarrows [(b_w, u'), \dots, (b_z, v')].$$

3.7.2 Identificação de Células Sintônicas

Dadas a geometria e as dimensões de um reticulado \mathcal{R} e uma célula $p \in \mathcal{R}$, dados também o atrator local intracelular $a_j \in A$ e os atratores locais de membrana $b_x, \dots, b_y, b_w, \dots, b_z \in B$, denotamos por $[(a_j, p), (b_x, u), \dots, (b_y, v), (b_w, u'), \dots, (b_z, v')]$ o arranjo tal que: a) a_j está posicionado em p ; b) b_x, \dots, b_y estão posicionados em $u, \dots, v \in \mathcal{F}_p$, respectivamente e c) b_w, \dots, b_z estão posicionados em u', \dots, v' , respectivamente.

Se existe $a_j \in A$ e $b_x, \dots, b_y, b_w, \dots, b_z \in B$ e $u, \dots, v \in \mathcal{F}_p$ tal que

$$(a_j, p) \Leftrightarrow [(b_x, u), \dots, (b_y, v)] \Leftrightarrow [(b_w, u'), \dots, (b_z, v')],$$

dizemos que $[(a_j, p), (b_x, u), \dots, (b_y, v), (b_w, u'), \dots, (b_z, v')]$ é um *arranjo local sintônico*, que torna a célula p uma *célula sintônica*.

Dadas uma célula p , um conjunto A de atratores locais intracelulares e um conjunto B de atratores locais de membrana, podemos ter vários arranjos locais sintônicos. Para identificá-los podemos usar o Procedimento 8.

Procedimento 8 : CellInTune. Calcula os conjunto dos arranjos locais sintônicos

Entrada: uma célula p , um conjunto A dos atratores locais intracelulares e um conjunto B dos atratores locais de membrana

Saída: o conjunto LOCAL dos arranjos locais sintônicos

- 1: LOCAL $\leftarrow \emptyset$
 - 2: **for** cada arranjo $[(a_j, p), (b_x, u), \dots, (b_y, v), (b_w, u'), \dots, (b_z, v')]$ **do**
 - 3: **if** $(a_j, p) \Leftrightarrow [(b_x, u), \dots, (b_y, v)] \Leftrightarrow [(b_w, u'), \dots, (b_z, v')]$ **then**
 - 4: LOCAL \leftarrow LOCAL $\cup \{[(a_j, p), (b_x, u), \dots, (b_y, v), (b_w, u'), \dots, (b_z, v')]\}$
 - 5: **end if**
 - 6: **end for**
-

Como o Procedimento 8 é enumerativo, então aqui, similarmente ao primeiro caso (Seção 3.6.4.1), também usamos um procedimento para o cálculo de células sintônicas que realiza alguma economia de computação através da exploração de algumas características das funções de membrana Δ . Chamamos este procedimento de cálculo de células sintônicas por partes, que opera de modo muito parecido com primeiro caso:

- i) Dados os conjuntos de atratores A (intracelulares) e B (de membrana) e uma célula p , identificamos os arranjos de atratores tal que o atrator posicionado em p e aqueles posicionados em \mathcal{F}_p têm valores nos sinalizadores externos b^i e nas saídas s^i compatíveis entre si segundo as funções de vizinhança e de membrana Δ , do mesmo modo

como descrito na Seção 3.6.4.1. Chamamos estes arranjos de *células pré-sintônicas*, os quais são armazenados para uso posterior.

- ii) Em seguida, com o conjunto \mathcal{C} de células pré-sintônicas (calculado no passo anterior) em mãos, identificamos arranjos de atratores tal que os atratores posicionados nas faces $f \in \mathcal{F}_p$ e aqueles posicionados nas correspondentes faces opostas e adjacentes f' em $V(p)$ têm valores nos sinalizadores externos b^i e nas saídas s^i compatíveis entre si segundo as funções de membrana Δ . Para fazê-lo usamos, basicamente, a mesma técnica utilizada no primeiro caso (Seção 3.6.4.1).
- iii) Por fim, testamos se os arranjos identificados no passo anterior satisfazem as propriedades de sintonia, conforme definidas na Seção 3.7.1.

3.7.3 Montagem de Atratores Globais

Aqui, no caso de arquitetura *J-System* que prevê a presença de membranas, a identificação de padrões ocorre de forma similar à adotada no primeiro caso (Seção 3.6.5): realizamos a composição de um “mosaico” onde as “peças” correspondem aos arranjos locais sintônicos, que são “encaixados” nos “slots” definidos pelas células, suas faces e pelas faces adjacentes e opostas a estas.

Similarmente ao primeiro caso, a composição do “mosaico” é feita através de encaixes de arranjos locais sintônicos nas posições definidas pelas células e faces do reticulado, de modo a construir mapeamentos que associam a cada célula e a cada face do reticulado um atrator local. O processo de montagem dos padrões é realizado seguindo as mesmas idéias adotadas nos procedimentos de expansão aritmética (Seção 3.6.5.1) e geométrica (Seção 3.6.5.2).

3.8 Considerações Relativas a Desempenho e Eficiência

Um *J-System* pode ser visto como uma RDD cujo espaço de estados contém $|\mathbb{G}|^{|\mathcal{G}||\mathcal{R}|}$ estados, o que, evidentemente, torna um algoritmo enumerativo no número de estados globais do modelo impraticável mesmo para instâncias de *J-Systems* muito pequenas.

Suponha que a versão expandida de uma rede intracelular $R = (\mathcal{G}, \Psi)$ de um *J-System* tenha n variáveis e que elas assumam valores num conjunto finito \mathbb{G} . O espaço de estados associado a R contém $|\mathbb{G}|^n$ estados, portanto o algoritmo `ReversoLocal` (Procedimento 1,

página 52) consome tempo proporcional a $|\mathbb{G}|^n$ para computar o campo atrator de R . Como o método proposto para computação de atratores globais em *J-Systems* calcula uma única vez a dinâmica local através de uma única execução do algoritmo `ReversoLocal`, é direto ver que ele consumirá, nesta etapa, tempo $O(|\mathbb{G}|^n)$. Evidentemente, isso implica que, ainda assim, caso queiramos conhecer a dinâmica completa das redes intracelulares em *J-Systems* teremos de restringir o seu número de variáveis intracelulares e o seus domínios. Se a quantidade de variáveis intracelulares e seus domínios forem grandes o suficiente a ponto de inviabilizar a aplicação de `ReversoLocal`, resta como alternativa o uso de um método estatístico, conforme mencionado na Seção 3.1.

Outro ponto crítico para o método proposto no que diz respeito ao desempenho, é o momento da identificação dos *clusters* sintônicos através do Procedimento 3 (`ClustersInTune`, página 65). Dado um agrupamento de células \mathcal{V}_p com n células e um conjunto de atratores locais de saída pontual A , existem $|A|^n$ arranjos $[(a_j, p), (a_x, u), \dots, (a_y, v), (a_w, b), \dots, (a_z, d)]$ tal que $a_j, a_x, \dots, a_y, a_w, \dots, a_z \in A$ e $p, u, \dots, v, w, \dots, z \in \mathcal{V}_p$. Isso implica que o Procedimento 3 consome tempo $O(|A|^n)$, o que o inviabiliza para conjuntos de atratores “grandes”. Embora o número de células em \mathcal{V}_p seja fixo para cada tipo de reticulado, para o caso hexagonal planar temos $|\mathcal{V}_p| = n = 19$, o que torna a computação rapidamente impraticável para $|A| > 4$.

Como já descrito na Seção 3.6.4.1, podemos amenizar essa restrição adotando o cálculo de *clusters* sintônicos por partes. Nesse procedimento, para um conjunto A de atratores e um agrupamento $V(p)$ de células com centro em p , existem $|A|$ árvores de possibilidades (ver Figura 3.5, página 70), uma para cada atrator. Estas árvores são $|A|$ -árias com profundidade constante $|V(p)|$. As podas que nelas são feitas correspondem à economia de computação que é realizada, sendo que há uma poda para cada inserção inválida de atratores que é detectada. Uma inserção inválida pode ser detectada numa folha da árvore de possibilidades (nesse caso, não há economia de computação) ou em um nódo mais próximo à sua raiz. O tamanho e a quantidade dessas podas dependem da definição adotada para as funções de vizinhança Δ .

Um fato que pode ser explorado, a fim de obter um pouco mais de economia de computação, está relacionado à possibilidade de identificação de classes de *microclusters* e *clusters* pré-sintônicos via a rotação das folhas nas árvores de possibilidades. Por exemplo, dado um agrupamento $V(p)$ de células com centro em p , quando identificamos um *microcluster* pré-sintônico válido (uma folha da árvore de possibilidades), seus atratores em $V(p)$ podem ser permutados em torno do eixo imaginário definido pelo centro p (ver

o exemplo da Figura 3.5) de modo a obter, para cada permutação, outro *microcluster* pré-sintônico válido, cuja computação poderia ser evitada.

No que diz respeito ao processo de expansão aritmética (Procedimento 4), se desprezarmos a contagem das células em que há *matching* a cada novo encaixe que é realizado, o conjunto MANCHA cresce no número de células segundo a seqüência

$$1|\mathcal{V}_p|, 2|\mathcal{V}_p|, 3|\mathcal{V}_p|, \dots, (\lfloor |\mathcal{R}|/|\mathcal{V}_p| \rfloor)|\mathcal{V}_p|, \quad (3.1)$$

de modo que temos $O(\lfloor |\mathcal{R}|/|\mathcal{V}_p| \rfloor)$ encaixes para cobrir todo o reticulado \mathcal{R} . O custo de execução de uma operação de detecção do limite de expansão é $O(|\text{SELECT}| \times |\text{BORDA}|)$, sendo que o conjunto BORDA cresce, no pior caso de encaixe, segundo a progressão

$$|V(P)|, (|V(P)| + c), (|V(P)| + c + c), \dots, |V(P)| + (\lfloor |\mathcal{R}|/|\mathcal{V}_p| \rfloor - 1)c \quad (3.2)$$

sendo que c e $V(P)$ são constantes para cada tipo de reticulado, onde c denota a diferença entre $|V(P)|$ e o número de células onde há *matching* no encaixe. Para cada elemento da seqüência 3.1 existe um elemento na progressão 3.2, sendo que no pior caso, para cada elemento da progressão 3.2 realizamos uma operação de detecção de limite de expansão, de modo que executamos essa operação

$$|\text{SELECT}||V(P)| + |\text{SELECT}||V(P)| + c + \dots + |\text{SELECT}||V(P)| + (\lfloor |\mathcal{R}|/|\mathcal{V}_p| \rfloor - 1)c$$

vezes, o que nos permite afirmar que o custo relativo à operação de detecção de limite de expansão é

$$O(|\text{SELECT}||V(P)|(|\mathcal{R}|/|\mathcal{V}_p|)^2).$$

No caso do processo de expansão geométrica (Procedimento 5), se desprezarmos a contagem das células em que há *matching* a cada novo encaixe que é realizado, o conjunto MANCHA cresce no número de células segundo a seqüência

$$1|\mathcal{V}_p|, 2|\mathcal{V}_p|, 4|\mathcal{V}_p|, 8|\mathcal{V}_p|, \dots, \lfloor |\mathcal{R}|/2 \rfloor, \quad (3.3)$$

de modo que realizamos $O(\log(|\mathcal{R}|))$ encaixes para cobrir 50% do reticulado \mathcal{R} , sendo que o custo da operação de detecção do limite de expansão é constante. Como a outra metade do reticulado é preenchida por expansão aritmética, para ela a análise é similar ao caso anterior.

Capítulo 4

Implementação

Com o objetivo de dar suporte à construção, simulação, análise e refinamento de modelos em *J-Systems*, implementamos um *software*, denominado *Juxtacrine Signaling Simulator* (JSS), constituído de quatro módulos (ver Figura 4.1) :

- a) Um ambiente de modelagem para definição de modelos em *J*; os principais componentes deste módulo são uma interface para edição e visualização de modelos e um sistema para verificação da consistência dos modelos;
- b) Um simulador progressivo de modelos para sistemas de sinalização justácrina em *J*;
- c) Um simulador regressivo de modelos para sistemas de sinalização justácrina em *J*;
- d) Um ambiente para visualização e análise de simulações e resultados, contendo vários componentes como, por exemplo, interfaces gráficas para visualização de padrões celulares e relatórios e gráficos descritivos do comportamento e evolução do estado dos modelos.

Nas seções seguintes, descrevemos brevemente cada um destes módulos.

4.1 Ambiente de Modelagem

O primeiro recurso deste módulo é um conjunto de componentes gráficos, do tipo navegador em *wizards*, isto é, aplicações encadeadas que conduzem o usuário aos próximos passos de seu funcionamento, cujo objetivo é permitir a criação e edição de *J-Systems* de

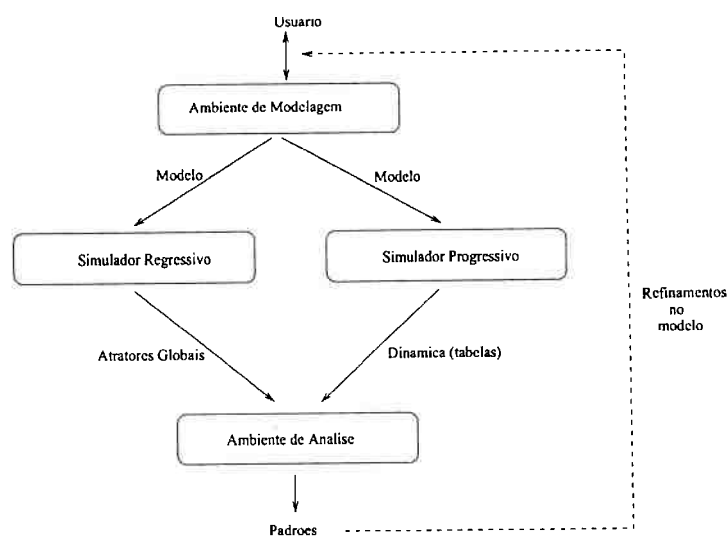


Figura 4.1: Arquitetura global do *software* JSS.

modo amigável e facilitado. Este *Wizard* é dividido em duas partes: a) criação e edição de modelos e b) criação e edição de parâmetros de simulação.

Na primeira parte descrevemos e editamos instâncias de J , o que, dadas as características dos J -*Systems* (Capítulo 2), significa:

- Definir um reticulado, isto é, o seu tamanho (número de células), suas dimensões (1D, 2D ou 3D), suas condições de contorno (linear ou periódico) e a geometria de sua células.
- Definir o nome de cada um dos conjuntos de variáveis \mathcal{E} , \mathcal{G} e \mathcal{S} do modelo; se houver estrutura de membranas, definir também o nome das variáveis \mathcal{A}_f e \mathcal{B}_f , $\forall f \in \mathcal{F}$. Além disso, definir os domínios \mathbb{E} , \mathbb{G} , \mathbb{S} , \mathbb{A}_f e \mathbb{B}_f , $\forall f \in \mathcal{F}$, dessas variáveis.
- Definir a representação de \mathcal{E} , \mathcal{G} , \mathcal{S} , \mathcal{A}_f e \mathcal{B}_f , isto é, definir o tamanho de cada um dos vetores E , G , S , A_f e B_f , $\forall f \in \mathcal{F}$. Isso significa:
 - Definir os tamanhos vertical (número $|\mathcal{E}|$ de entradas) e horizontal (a memória τ_E) para E ;
 - Definir os tamanhos vertical (número $|\mathcal{G}|$ de genes) e horizontal (a memória τ_G) para G ;
 - Definir os tamanhos vertical (número $|\mathcal{S}|$ de saídas) e horizontal (a memória τ_S) para S ;
 - Definir os tamanhos vertical (número $|\mathcal{A}_f|$ de sinais ambientais) e horizontal (a memória τ_{A_f}) para A_f , $\forall f \in \mathcal{F}$;

- Definir os tamanhos vertical (número $|\mathcal{B}_f|$ de sinalizadores) e horizontal (a memória τ_{B_f}) para $B_f, \forall f \in \mathcal{F}$;
- Definir o tipo do modelo (determinístico ou estocástico).
- Se o modelo for determinístico, definir as funções de transição \mathcal{T} , isto é, definir exatamente como são cada uma das funções de Ψ, Φ, Δ e Θ , de modo que cada variável é atualizada por apenas uma função de transição.
- Se o modelo for estocástico, a definição de \mathcal{T} exige a definição de um conjunto finito de funções F e uma distribuição de probabilidades em F , conforme descrito na Seção 2.6, para cada uma das variáveis do modelo.

Na Figura 4.2 há um exemplo de janela/aplicação da primeira parte do *Wizard*. Os modelos criados ou editados são gravados em arquivos XML (eXtensible Markup Language) (BRAY et al., 2000), com uma raiz e *tags* hierárquicas.

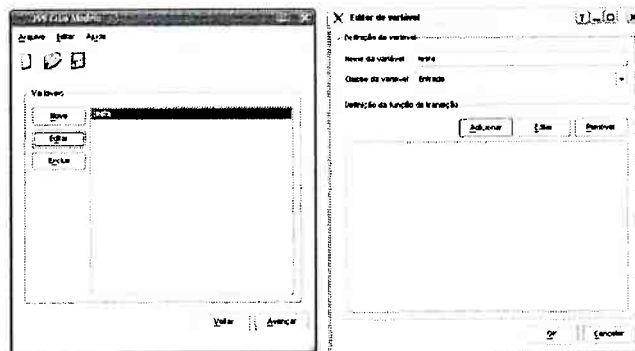


Figura 4.2: Exemplo de janelas da aplicação do *Wizard* responsável pelo cadastro de variáveis e funções.

Aqui convém observar que a linguagem escolhida para fazer a descrição das regras de transição foi Lua (LUA, 2006; LERUSALIMSCHY; FIGUEIREDO; CELES, 2006). Lua foi inteiramente projetada, implementada e desenvolvida por uma equipe da PUC do Rio de Janeiro. Lua é a única linguagem de programação reconhecida internacionalmente e que foi desenvolvida fora do primeiro mundo. Ela foi criada para aplicações embarcadas e aplicações que requerem acesso a habilidades de *scripting*, provendo APIs de acesso direto a um interpretador de menos de 300KB, geralmente embutido direto na aplicação em forma de uma biblioteca. Lua é uma linguagem rápida, extremamente portátil e embutível. É uma linguagem de aprendizado extremamente rápido e livre (de código aberto).

Na segunda parte do *Wizard* descrevemos e editamos alguns parâmetros de simulação, que foram incorporados com objetivo de proporcionar maior agilidade no momento da experimentação dos modelos. Estes parâmetros são: a) o identificador da simulação, b) o número de passos de tempo que o usuário deseja realizar na simulação, c) os tipos de arquivos de *Log* (um “*handle*” para sinais de aborto ou término inesperado, opções de gravação de dados intermediários, etc) que devem ser gerados e d) as condições iniciais, ou seja, os valores iniciais de todos os elementos de E , G , S , A_f e B_f , em todas as células e em cada uma de suas faces. Os parâmetros de simulação também são gravados em arquivos XML.

Embora tenhamos definido o conjunto das condições iniciais como um componente do modelo (Seção 2.5), optamos por implementá-lo no JSS como um parâmetro de simulação. Isso faz com que o JSS permita a realização de várias simulações de um mesmo modelo a partir de condições iniciais diferentes de um modo mais prático. Esse recurso é útil também na experimentação de modelos estocásticos, pois para um mesmo conjunto de condições iniciais pode-se ter evoluções diferentes do sistema.

O segundo componente deste módulo, o sistema responsável por verificar a consistência dos modelos, opera quando a descrição do modelo é concluída. Ele, basicamente, verifica se as restrições que definem a classe dos *J-Systems* são observadas.

4.2 Simulador Progressivo

O Simulador Progressivo é o módulo responsável por realizar a evolução de um modelo numa estratégia progressiva (“*forward running*”) através da aplicação direta de suas funções de transição. Ele é organizado do seguinte modo:

- a) Há um componente Carregador, responsável pela carga dos arquivos contendo a descrição do modelo e os parâmetros de simulação nas estruturas de dados que os representarão em memória. Este componente também abriga um sistema que verifica a consistência entre os dados que descrevem o modelo e aqueles que descrevem os parâmetros de simulação: como é possível mapear um mesmo modelo em vários conjuntos de parâmetros de simulação, convém fazer essa checagem para evitar que alguma inconsistência possa ser injetada acidentalmente. Esse componente também é responsável por descarregar em disco os resultados da simulação em arquivos no formato XML.

- b) Há um componente Integrador que “gerencia” a computação das regras de transição. Ele opera, basicamente, do seguinte modo: para cada variável do modelo, em cada célula, no momento de aplicar uma regra de transição sobre uma variável, ele sorteia a função (caso o modelo seja estocástico), passa a função (como uma *string*) para o interpretador Lua que devolve o resultado.
- c) O outro componente é o interpretador Lua.

Na Figura 4.3 há um diagrama que ilustra a organização do Simulador Progressivo.

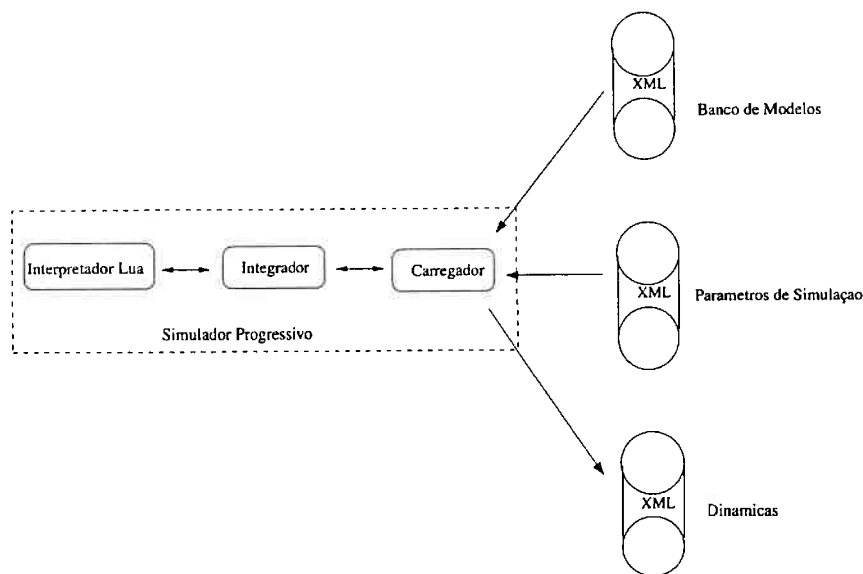


Figura 4.3: Organização do Simulador Progressivo.

4.3 Simulador Regressivo

O Simulador Regressivo é o módulo responsável pela identificação dos padrões celulares, segundo o método descrito no Capítulo 3. Nele estão incorporados os procedimentos para cálculo de bacias de atração local, identificação dos *clusters* sintônicos e montagem de atratores globais por expansão aritmética e geométrica. A organização deste módulo está representada na Figura 4.4, cujos componentes podem ser assim descritos:

1. Um componente Carregador, o qual abriga um procedimento responsável por fazer a carga do modelo e outro por fazer uma checagem da consistência do modelo em relação às restrições e ao escopo definidos para o método descrito no Capítulo 3, por exemplo, verificando se o modelo é determinístico.

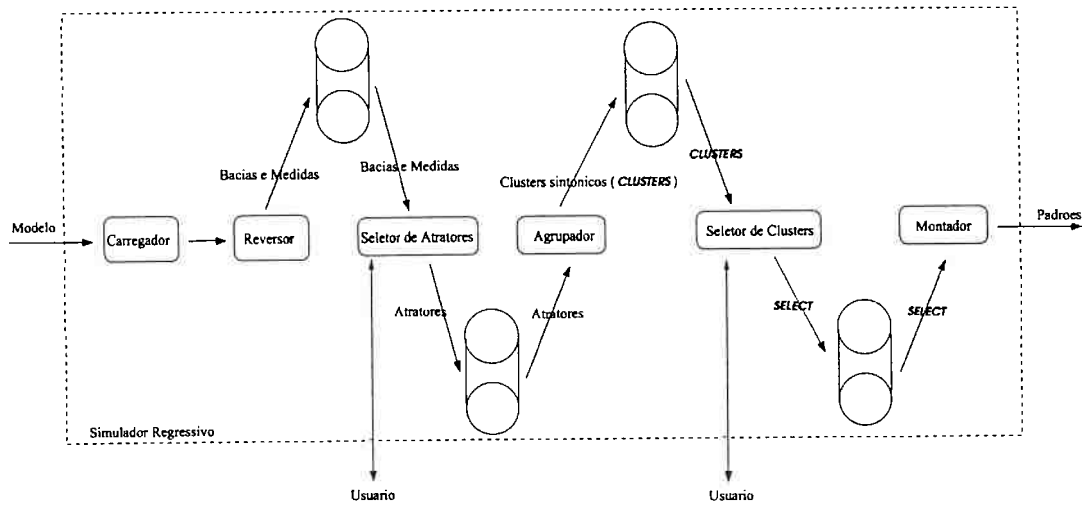


Figura 4.4: Organização do Simulador Regressivo.

- Um Reversor, que contém os procedimentos para cálculos de bacias de atração local. Ele implementa os Procedimentos 1 (ReversoLocal, página 52) e 2 (ReversoLocalModificado, página 53) e um Medidor que é usado para registrar algumas medidas relativas às bacias como, por exemplo, o número de estados das bacias, o tamanho dos períodos atratores, o número de estados que são do tipo jardim do Éden, etc. O Reversor grava as bacias e as suas medidas para uso posterior. O diagrama da Figura 4.5 ilustra o fluxo no componente Reversor.

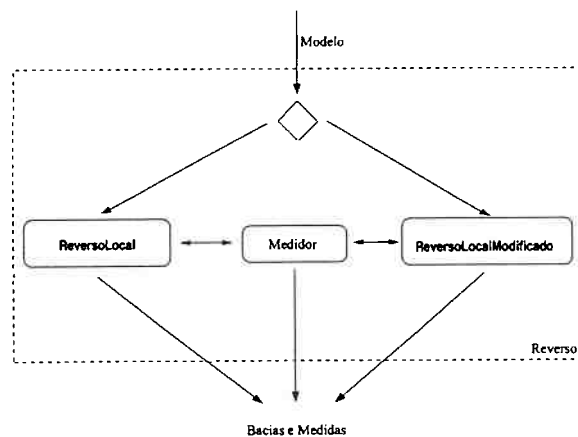


Figura 4.5: Fluxo no componente Reversor.

- Um componente Seletor de Atratores, que recebe as bacias e as medidas produzidas pelo Reversor. Ele abriga um filtro que isola os atratores de suas bacias, descarta aqueles que não são de saída pontual e os apresenta ao usuário via uma interface para que este possa escolher aqueles que melhor convêm aos experimentos, seja por

razões de significado biológico e/ou desempenho. O diagrama da Figura 4.6 ilustra o fluxo no componente Seletor de Atratores.

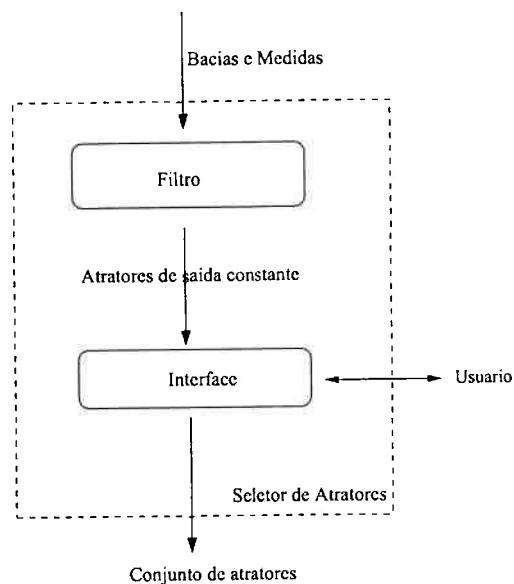


Figura 4.6: Fluxo no componente Seletor de Atratores.

- Um componente Agrupador, que recebe os atratores selecionados no Seletor de Atratores. Ele calcula os *clusters* sintônicos ou as células sintônicas através dos procedimentos de cálculo de *clusters* sintônicos por partes (aqui denominado *ClustersInTune* e descrito na Seção 3.6.4.1) ou de identificação de células sintônicas (*CellInTune*, descrito na Seção 3.7.2). As células ou *clusters* sintônicos são armazenados para uso posterior. O diagrama da Figura 4.7 ilustra o fluxo no componente Agrupador.

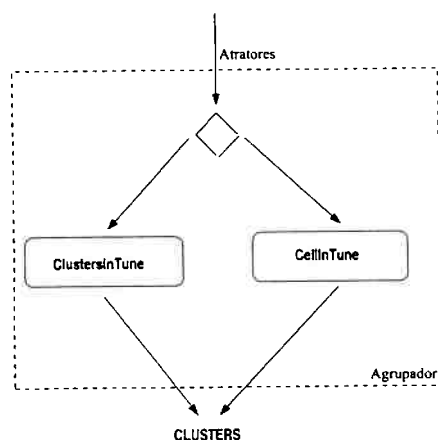


Figura 4.7: Fluxo no componente Agrupador.

5. Uma Interface para seleção de *clusters* ou células sintônicas. Como os *clusters* (ou células) sintônicos correspondem às unidades de formação dos padrões globais, pode ser conveniente, antes de proceder à montagem de um padrão celular por expansão aritmética ou geométrica, selecionar no conjunto CLUSTERS (saída dos procedimentos ClustersInTune ou CellInTune) aqueles que são de maior interesse. Esta interface tem como propósito facilitar tal escolha. Para manter coerência com a notação adotada no Capítulo 3, denotamos por SELECT o conjunto dos *clusters* selecionados.
6. Um componente Montador, que recebe o conjunto SELECT de células ou *clusters* sintônicos e implementa os procedimentos de encaixe por expansão aritmética (ArithmeticExpansion, página 73) e geométrica (GeometricExpansion, página 74) descritos no Capítulo 3. O diagrama da Figura 4.8 ilustra o fluxo no componente Montador.

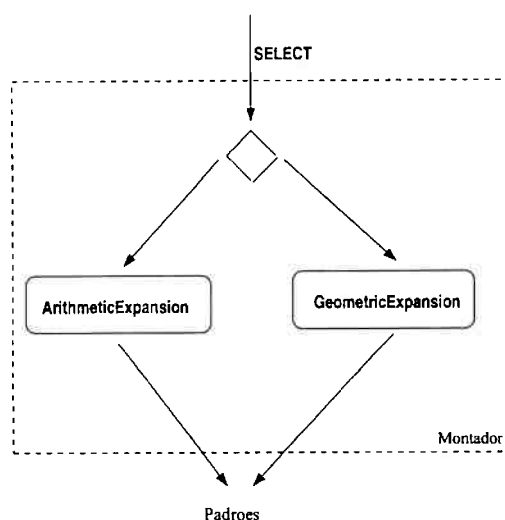


Figura 4.8: Fluxo no componente Montador.

4.4 Ambiente de Análise

A dinâmica (tabelas) gerada pelo Simulator Progressivo e os padrões (tabelas) produzidas pelo Simulator Regressivo são armazenados em arquivos padrão XML. Estes arquivos são interpretados pelo módulo Ambiente de Análise que provê, basicamente, três recursos para visualização e análise: a) um Projetor, que traduz os dados fornecidos pelos simuladores Progressivo e Regressivo em uma representação gráfica do reticulado, de modo a fornecer uma apresentação dos padrões celulares (Figura 4.9), b) um componente

com relatórios e gráficos e c) um visualizador “passo-a-passo” dos valores das variáveis de estado para as dinâmicas obtidas.

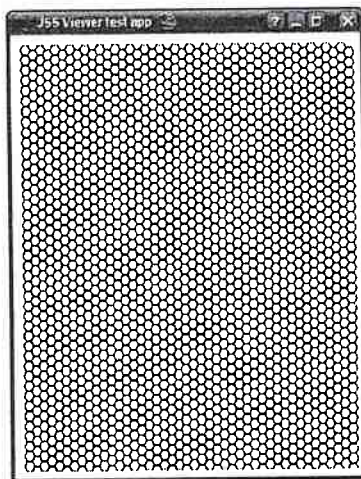


Figura 4.9: Exemplo de reticulado hexagonal planar na representação do Projetor.

4.5 *J-Systems* e SBML

SBML (*Systems Biology Markup Language*) (SBML, 2007) é uma linguagem para descrição de modelos de sistemas biológicos baseada em XML e UML (*Unified Modeling Language*) (UML, 2002) que ganhou grande popularidade nos últimos anos, sendo atualmente suportada por aproximadamente 100 diferentes *softwares*, de tal forma que se tornou um importante padrão para troca e intercâmbio de modelos entre pacotes e ferramentas de simulação/análise.

SBML está sendo desenvolvida em níveis, sendo que cada novo nível estende, de modo compatível, as características da linguagem presentes no nível anterior. A versão final da SBML Level 1 (HUCKA et al., 2001) apresenta os recursos e fundamentos básicos para representação de modelos não espaciais de redes bioquímicas. A versão final da SBML Level 2 (FINNEY; HUCKA, 2003) também já foi definida e incorporou facilidades que ajudam na representação de algumas características presentes nos modelos em *J* como, por exemplo, a capacidade de definição de “*delay functions*” e “*discrete events*”.

No entanto, a classe *J-Systems* contém modelos que não podem ser codificados em SBML Level 2, pois este não suporta modelos dependentes espacialmente nos quais cada entidade biológica é univocamente identificada e individualmente definida. Várias propostas de extensão da SBML Level 2 já foram apresentadas (ver em (SBML, 2007)), as

quais, provavelmente, serão adotadas na SBML Level 3. As principais características que a comunidade planeja incorporar à SBML Level 3 que são importantes ao processo de codificação de modelos em *J* no formato SBML são: a) *arrays* de espécies, compartimentos e reações, b) mecanismos para descrever as conexões entre itens de um *array* e c) facilidades para descrever a geometria dos compartimentos em espaços 2D e 3D.

Algumas características dos modelos em *J* já poderiam ser mapeadas para entidades descritas em propostas de extensão da SBML Level 2, por exemplo: a) uma variável de estado em *J* poderia ser mapeada para uma *Specie* em SBML; b) uma função de transição em *J* poderia ser mapeada para uma *Reaction* em SBML, c) uma célula em *J* poderia ser mapeada para um *Compartment* em SBML e d) um reticulado em *J* poderia ser mapeado para um *Array* de *Compartment* em SBML. Nossa intenção é futuramente construir um *parser* (que seria integrado ao *software* JSS) capaz de fazer a tradução de modelos no formato *J-System* para o formato SBML. A capacidade do *software* JSS operar com o padrão XML facilita esta tarefa; entretanto, acreditamos que não é conveniente construí-lo até que a versão final da SBML Level 3 esteja definida.

Capítulo 5

Aplicações

Devido à sua generalidade, os *J-Systems* podem ter várias aplicações no contexto de sinalização justácrina, como por exemplo:

- na modelagem e análise de formação de padrões em sinalização justácrina;
- no estudo de métodos de engenharia reversa de redes de sinalização celular no contexto de sinalização justácrina;
- na estudo de métodos de identificação de unidades de vias metabólicas e de sinalização induzidas por sinais ambientais;
- no simulação de redes de regulação e sinalização celular justácrina;
- na reconstrução e na análise estrutural e dinâmica de redes de sinalização justácrina.

Nas seções seguintes discutimos algumas interpretações biológicas e mostramos a aplicação de *J-Systems* na modelagem dos elementos e interações básicas que participam da segregação de neuroblastos em *D. melanogaster*.

5.1 Interpretações Biológicas

Visto que atratores são estados discretos auto-estabilizantes, eles naturalmente capturam a estabilidade dos perfis de expressão gênica associados com os tipos celulares. Portanto, eles permitem explicar como células podem assumir fenótipos distintos determinados por complexos perfis de expressão gênica. Dada essa propriedade, o campo

atrator pode, em princípio, ser visto como uma base matemática e molecular para o *vale de Waddington* (WADDINGTON, 1957), uma metáfora usada para explicar a observação de que tipos celulares se parecem com formas robustas e estáveis.

Tipos celulares são interpretados como bacias de atração (KAUFFMAN, 1993; WUENSCH, 1998b, 2004) da rede de regulação gênica, dentro das quais a dinâmica celular estabiliza-se a partir de vários estados iniciais. Essa visão permite explicar, do ponto de vista do modelo (abstração) das redes de regulação, o fato de que um mesmo genoma pode criar e manter uma variedade de tipos e sub-tipos celulares.

Em um padrão de expressão gênica de um determinado tipo celular, um dado gene pode manter-se ou não estável em certo nível de ativação. Se em determinado padrão de expressão gênica uma grande porção dos genes está alterando seus níveis de expressão (dinâmica desordenada ou caótica), então o tipo celular associado a esse padrão torna-se instável. Por outro lado, dinâmicas que estabelecem um padrão onde uma grande porção dos genes está permanente num mesmo nível de ativação implicam em tipos celulares demasiado inflexíveis para que possam apresentar capacidade de adaptação.

Células precisam, a todo momento, adaptar seus padrões de expressão gênica em resposta a uma variedade de estímulos, como, por exemplo, hormônios, fatores de crescimento, etc. Segundo a interpretação acima, um tipo celular é provavelmente um conjunto “proximal” de padrões de expressão gênica, não aqueles determinados apenas pelo atrator, mas sim aqueles determinados pela bacia de atração, de modo a permitir certa flexibilidade comportamental. Se um estado de referência particular (um padrão de ativação) sofre uma perturbação, a dinâmica pode saltar para outra subárvore na mesma bacia ou pode saltar para outra bacia, isto é, outro tipo celular.

Uma célula deve ser capaz de sofrer perturbações no seu padrão de expressão gênica e, ainda assim, voltar ao seu estado estável; deve também ser flexível ao ponto de permitir que uma perturbação possa fazê-la saltar para outra bacia de atração (outro tipo celular). Estabilidade requer alta probabilidade de retorno à mesma bacia de atração; adaptabilidade ou diferenciação requerem saltos apropriados para outras bacias em resposta à sinais específicos. A conjectura é que a evolução conduziu as dinâmicas das redes de regulação para um delicado equilíbrio entre regiões estáveis (regime ordenado) e instáveis (regime caótico) de modo a obter estabilidade e adaptabilidade nos padrões de regulação gênica que definem os tipos celulares (WUENSCH, 2004).

As bacias de atração fornecem um modelo para homeostase celular em resposta às

mutações e às perturbações no estado padrão de ativação dos genes. Entretanto, se a modificação/mutação ocorrer na rede propriamente (representação do genótipo), ela pode implicar em alterações no campo atrator, que é a representação do fenótipo. Já foi demonstrado (KAUFFMAN, 1993; WUENSCHÉ, 1994) que em modelos de regulação baseados em redes Booleanas aleatórias (RBN, do inglês *random Boolean network*), em geral os campos atratores são estáveis a pequenas modificações no esquema de ligação entre os nós ou na definição das regras de transição.

Se um tipo celular é um atrator, então o processo de diferenciação é a passagem de um atrator para outro, provocada por sinais exógenos ou pela distribuição assimétrica dos constituintes celulares durante a divisão; ou seja, a trajetória levando de uma bacia de atração para outra corresponde à via de diferenciação em questão. Dado um tipo celular representado por um padrão de atividade na rede de regulação e um conjunto fixo (geralmente minimal) de perturbações neste padrão, existe um conjunto restrito de novos tipos celulares que podem ser induzidos a partir deste tipo inicial e destas perturbações. Se fizermos o mesmo para os novos tipos e assim sucessivamente, obteremos uma *árvore de diferenciação*, que representa as possíveis vias de diferenciação. Ou seja, segundo essa modelagem, um particular tipo celular pode diferenciar em vários tipos celulares, mas de modo restrito àqueles tipos determinados pelos ramos da árvore de diferenciação. Isto sugere um modelo que organiza ontogenia em termos dos ramos desta árvore de diferenciação.

Propomos uma extensão para a interpretação descrita nos parágrafos acima de modo a conceber as bacias de atração global em *J-Systems* como padrões celulares: um tipo celular corresponde a uma bacia de atração local da rede intracelular e um padrão celular corresponde a uma bacia de atração global, que é composta por um arranjo de bacias locais posicionadas em células vizinhas tal que as saídas e as entradas das dinâmicas locais em cada célula e em cada segmento de membrana são compatíveis.

Do mesmo modo que no caso anterior, aqui também temos que se um tecido – representado por um padrão estável na atividade de todos os componentes moleculares em todas as células e membranas – sofre uma perturbação há duas possibilidades: a) ele pode ser lançado para alguma árvore transitente enraizada no mesmo padrão de atividade estável (o atrator global), de modo que sistema tende estabilizar-se nele novamente; ou b) ele pode ser lançado para outra bacia de atração global, que representa outro tipo de padrão/arranjo celular. Sendo assim, aqui também temos um modelo para a estabilidade e a adaptatividade/flexibilidade da estrutura tecidual, sendo que adaptabilidade/flexibilidade

aqui deve ser entendida como a capacidade da estrutura tecidual migrar de um padrão celular para outro, ou seja, a passagem de um atrator global para outro corresponde ao processo de padronização celular.

As bacias de atração global fornecem um modelo para a estabilidade dos padrões celulares em resposta às perturbações no padrão de atividade de seus componentes moleculares. No entanto, se a modificação ocorrer não na dinâmica, mas sim nas redes intracelulares, nas redes de membrana ou nas funções de vizinhança, então teremos modificações no campo atrator global.

Além disso, podem existir perturbações que fazem o sistema saltar de uma bacia de atração para outra, caso consideremos a rede intracelular isoladamente. Entretanto, na presença de sinais justácrinos, as mesmas perturbações na dinâmica intracelular podem levar o sistema para algum ponto da dinâmica global que “empurra” a dinâmica local de volta para a mesma bacia de atração local. O inverso também pode ocorrer, isto é, podem existir perturbações para as quais a rede intracelular se mantém estável caso ela seja considerada isoladamente, mas que pode transportá-la para outra bacia local, caso tenhamos a presença de sinais justácrinos.

5.2 A Via do Notch

A via Notch é uma via de sinalização crucial, presente em vários eventos do desenvolvimento de diversos organismos, como, por exemplo, na neurogenesis em *Drosophila* (CASTRO et al., 2005), no desenvolvimento anterior de vertebrados (LEWIS, 1996, 1998; WHITFIELD; HADDON; LEWIS, 1997) e na formação de nervuras em asas de *Drosophila* (HUPPERT; JACOBSON; MUSKAVITCH, 1997). Sinalização do tipo célula-célula, mediada através da via Notch, é um mecanismo que opera em várias situações onde há definições de destino celular. Notch é particularmente efetivo no estabelecimento de distinção binária entre duas ou mais células adjacentes ou vizinhas, o que ocorre basicamente em três configurações gerais: a) inibição lateral, onde uma única célula inibe suas vizinhas de seguirem o destino por ela adotado (PARKS; HUPPERT; MUSKAVITCH, 1997); b) comunicação de linhas justapostas de células onde cada linha adota um destino diferente (BESSHO; KAGEYAMA, 2003) e c) escolha (binária) de destino entre células irmãs em divisões assimétricas (KIM et al., 1996).

Vamos descrever brevemente as características moleculares principais (esquemmatizadas

Componente	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	Mamíferos
Ligante	LAG-2 APX-1 ARG-2 F16B12.2	Delta Serrate	Delta-like1 Delta-like2 Delta-like3 Jagged 1 Jagged 2
Receptor	LIN-12 GLP-1	Notch	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4
Fator de Transcrição (CSL)	LAG-1	Su(H)	CBF1/RBPJk RBPL

Tabela 5.1: Elementos moleculares essenciais da via do Notch e organismos onde já foram identificados.

na Figura 5.1) da via do Notch. Seus elementos essenciais são um ligante do tipo Delta, um receptor do tipo Notch e um fator de transcrição da família CSL (CBF1, Su(H) ou LAG1).

Os elementos essenciais da via do Notch são altamente conservados e estão presentes em diversas espécies. A Tabela 5.2 resume a presença destes elementos em diversas espécies nas quais já foram identificados e estudados (LAI, 2004).

As proteínas Delta e Notch são proteínas transmembrana que contêm um domínio extracelular constituído de sequências de repetições de EGF (fator de crescimento epidérmico). Repetições específicas de EGF medeiam a interação entre o ligante e o receptor. A ativação de Notch por seu correspondente ligante provoca duas clivagens proteolíticas do Notch: uma no seu domínio extracelular e outra no seu domínio intracelular. O domínio intracelular (Notch_intra) migra da membrana para o núcleo onde ativa o fator de transcrição (CSL). Na ausência de Notch_intra, o CSL associa-se a um co-repressor formando um complexo que inibe a expressão dos genes alvos do Notch. Na presença de Notch_intra, o CSL associa-se a um co-ativador formando um complexo que leva a ativação dos genes alvo do Notch. Na Figura 5.1 há uma representação esquemática desse mecanismo.

5.2.1 Delta-Notch e Neurogenesis em *D. melanogaster*

Um dos mais bem conhecidos exemplos onde opera a via do Notch está relacionado à formação do sistema nervoso em *Drosophila*, mais especificamente aos processos de

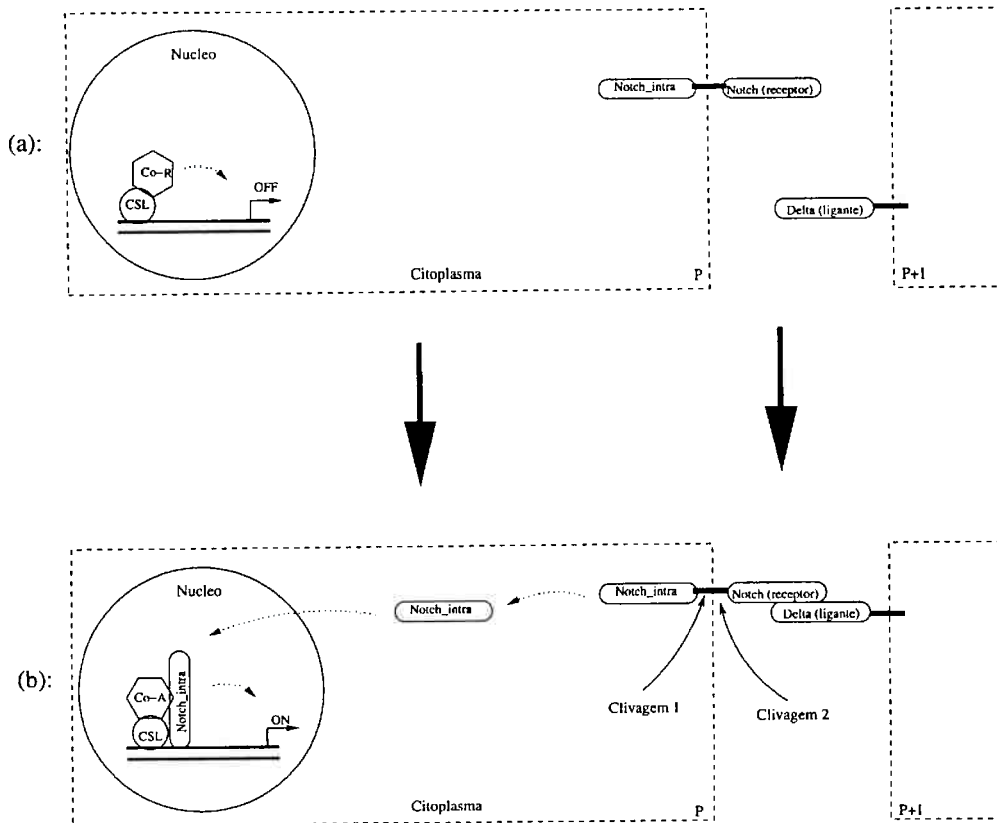


Figura 5.1: Elementos básicos da via do Notch. (a): Na ausência de Notch_intra no núcleo, os fatores de transcrição da família CSL associam-se com um complexo co-repressor (Co-R) e reprimem a transcrição dos genes alvos do Notch. (b): A interação entre o ligante Delta e o domínio extracelular de Notch leva a clivagens em Notch que liberam o domínio intracelular de Notch (Notch_intra), o qual migra para o núcleo onde associa-se com um co-ativador (Co-A). O complexo formado por Notch_intra e Co-A desfaz a ligação entre Co-R e CSL e ativam a transcrição dos genes alvos do Notch.

segregação de neuroblastos e determinação de células precursoras de órgãos sensoriais (que dão origem às cerdas sensoriais da epiderme). Logo após a gastrulação, as células da região neurogênica (uma região de aproximadamente 1900 células ectodérmicas formada por duas faixas longitudinais de células ao longo do eixo antero-posterior do embrião, em uma posição ligeiramente dorsal em relação à mesoderme ventral) assumem caráter bipotencial: elas podem tornar-se neuroblastos — precursoras de células neurais — ou epidermoblastos, que são as precursoras da epiderme. A distribuição dos neuroblastos e epidermoblastos na região neurogênica, depois que cada célula assumiu sua identidade, depende de elementos de regulação intracelular e interações tipo célula-célula.

Numa descrição mais geral, temos que os chamados genes proneurais (principalmente do complexo *achaete-scute*) conferem às células ectodérmicas o potencial para tornarem-se precursores neurais. Na região neurogênica, células expressando estes genes formam agru-

pamentos de células (chamados de agrupamentos pró-neurais). Nem todas as células de um agrupamento neural tornam-se neuroblastos e o processo que leva à sua especificação envolve inibição lateral: logo após a formação dos agrupamentos, todas as suas células têm potencial para tornarem-se neuroblastos, até que uma delas (o futuro neuroblasto) começa a expressar – por meio de um evento aleatório – genes do complexo *achaete-scute* em níveis mais elevados do que as demais. Isso implica que esta célula produz um sinal, transmitido através de interações justácrinas entre Delta e Notch, que inibe as suas vizinhas de também tornarem-se neuroblastos, fazendo com que apenas ela torne-se um precursor neural e o restante das células do agrupamento tornando-se células epiteliais epidérmicas.

Se tentarmos olhar mais detalhadamente para as interações moleculares que modulam a expressão de Delta e Notch, veremos que muitos estudos (LAI, 2004; BAILEY; POSAKONY, 1995; MEIR et al., 2002; PAROUSH; WAINWRIGHT; ISH-HOROWICZ, 1997) sugerem que vários genes e proteínas podem participar da transmissão e do ajuste dos sinais Notch. No entanto, vamos nos restringir à descrição dos componentes e conexões mais bem estabelecidos, os quais chamaremos de “rede neurogênica canônica” ou simplesmente “rede canônica”. A arquitetura desta rede de regulação, seus componentes e suas interações estão esquematizadas na Fig. 5.2. Suas principais características são:

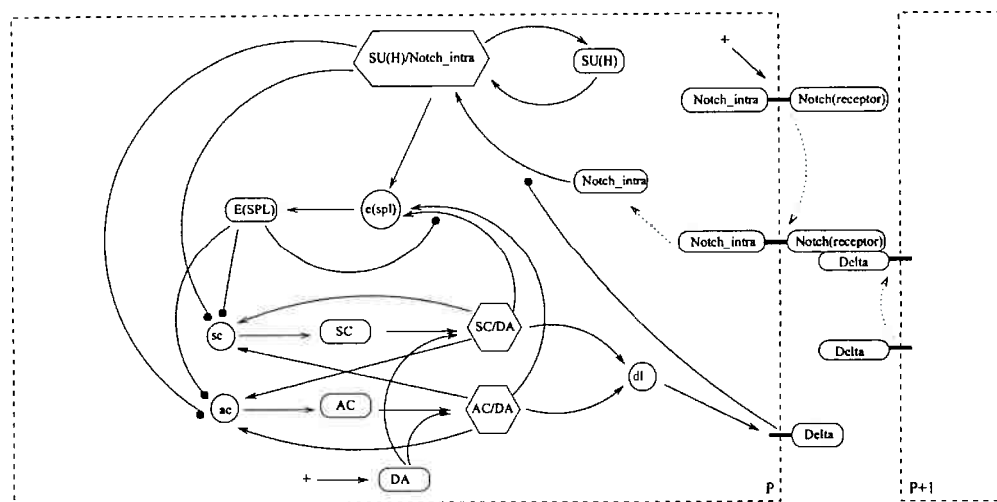


Figura 5.2: Aqui elipses representam mRNAs, retângulos representam proteínas, hexágonos representam complexos proteicos. Notch e DA têm expressão constitutiva, representadas por ‘+ → Notch’ e ‘+ → DA’, respectivamente. ‘X → Y’ denota que X ativa Y e ‘X -• Y’ denota que X inibe Y.

- Delta é o ligante para o receptor Notch.

- Os genes para Notch e DA (cofator *Daughterless*) têm expressão constitutiva.
- Quando Delta ativa Notch, o domínio intracelular de Notch (Notch_intra) liga-se ao fator de transcrição *Suppressor of Hairless* (SU(H)), que é da família CSL.
- O dímero SU(H)/N ativa a transcrição dos genes do complexo *Enhancer of split* (e(spl)) que codificam para o repressor transcripcional E(SPL).
- E(SPL) reprime a transcrição dos genes proneurais *achaete* (ac) e *scute* (sc), que são os determinantes primários do destino neural: células com altas concentrações dos produtos AC e SC tornam-se neuroblastos; AC e SC são fatores de transcrição que contêm uma região conservada do tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH). Eles usam o domínio bHLH para dimerizar com outros fatores, tornando-se ativos como dímeros.
- AC e SC ligam-se cada um deles ao cofator *Daughterless* (DA) e, na condição de heterodímeros (AC/DA e SC/DA), ativam a transcrição de ambos a si próprios e um ao outro (ver a Figura 5.2).
- AC/DA e SC/DA também ativam a transcrição do gene dl (que codifica para o ligante Delta) e do gene e(spl), cujo produto (E(SPL)), como já dissemos, reprime a transcrição de ac e sc.
- Desse modo, um laço é formado: um evento aleatório ativa ac e/ou sc numa célula do agrupamento proneural. Eles ativam dl, cujo produto (Delta) ativa Notch nas células vizinhas, nas quais, através do complexo SU(H)/N, e(spl) é ativado que, por sua vez, reprime ac e sc.
- Delta reprime a atividade de Notch na própria célula.
- e(spl) também promove autorepressão.

5.3 Modelo de Três Níveis em J para Padronização de Neuroblastos

Com base na arquitetura sugerida pela rede canônica (representada pela Fig. 5.2) construímos um novo modelo de três níveis para padronização de precursores neuronais, que é um J -System. Ele é um modelo de estados formulado em termos dos níveis de atividade (baixo/padrão/alto) dos mRNAs, das proteínas e dos complexos envolvidos.

Seu propósito é capturar propriedades qualitativas da arquitetura e da dinâmica da rede neurogênica e das interações justácrinas no processo de padronização de precursores neuronais. Embora um modelo Booleano fosse mais simples de analisar, optamos por formular um de três níveis devido ao mecanismo — já consolidado na literatura — de amplificação e consolidação de pequenas diferenças entre células vizinhas que, geralmente, opera quando há inibição ou indução lateral. No caso específico da segregação de neuroblastos, este mecanismo se manifesta mais claramente nos níveis de expressão de *ac* e *sc*: todas as células de um agrupamento neural na região neurogênica mantêm níveis equivalentes de expressão de *ac* e *sc* enquanto as células estão em estado bipotente, sendo que diferentes níveis de expressão (para mais e para menos em relação ao estado bipotente) determinam o destino neural; um modelo Booleano não capturaria essas diferenças de expressão em relação ao nível bipotente de modo tão explícito como um modelo de três níveis. Além disso, dependendo do modo como o modelo Booleano fosse construído e devido ao fato de que proteínas são traduzidas depois da transcrição do correspondente mRNA, talvez fosse necessário assumir que as proteínas não seriam expressas no estado inicial, o que poderia ser contestável do ponto de vista do biológico.

5.3.1 Suposições do Modelo

As suposições que assumimos no modelo J para padronização de neuroblastos proposto podem ser divididas em suposições gerais, relativas à transcrição, relativas à tradução e aquelas relativas à formação de complexo intracelulares. As suposições gerais deste modelo são:

- a) O estado de cada componente pode ser 0, 1 ou 2, os quais representam, respectivamente, 0: ausência ou presença da correspondente substância em níveis de concentração abaixo dos valores de referência; 1: presença da correspondente substância em níveis padrões de concentração, isto é, dentro dos valores de referência e 2: presença da correspondente substância em níveis de concentração acima dos valores de referência.
- b) As regras de transição são todas funções lógicas multivaloradas de três valores (0, 1 ou 2) nas combinações dos estados dos componentes em instantes anteriores e seus operadores serão restritos ao 'AND'¹ e ao 'OR'².

¹denotamos ' x .AND. y ' por ' $x \wedge y$ '

²denotamos ' x .OR. y ' por ' $x \vee y$ '

Suposições Relativas à Transcrição

Com relação ao processo de transcrição, assumimos que:

- i) A regra de transição associada à transcrição de um gene é representada por uma função lógica multivalorada do estado de seus ativadores e inibidores.
- ii) Transcrição de um gene não ocorre (ou ocorre em baixas taxas) se seus inibidores estão em alto estado de atividade (representando que estão presentes em altas concentrações), independente do estado de seus ativadores. Isso implica que o efeito dos inibidores de transcrição são dominantes em relação aos ativadores.
- iii) Transcrição de um gene ocorre em altas taxas se seus ativadores estão em alto estado de atividade (representando que estão presentes em altas concentrações) e seus inibidores estão em baixo estado de atividade (representando que não estão presentes ou estão presentes em baixas concentrações).
- iv) Transcrição de um gene ocorre em taxas padrões nas demais situações não enquadradas nos dois itens anteriores.
- v) O efeito dos ativadores de transcrição não são aditivos.
- vi) Transcrição é uma função no estado de seus ativadores e inibidores que define três níveis de regulação: baixa, padrão e alta, assim descritas:
 - Se transcrição está baixa, mRNAs não são transcritos, os já existentes degradam e seus níveis de concentração vão a 0 (para isso se mantém em 0 ou caem até 0) em um passo de tempo.
 - Se transcrição está alta, mRNAs são transcritos em altas taxas e seus níveis de atividade vão para 2 (sobem ou se matém) em um passo de tempo.
 - Se transcrição está padrão, mRNAs são transcritos em taxas padrões e seus níveis de atividade vão (sobem ou caem ou se mantém) para 1 em um passo de tempo.

Suposições Relativas à Tradução

Com relação ao processo de tradução, assumimos que:

- i) A regra de transição associada à tradução de uma proteína é representada por uma função lógica multivalorada no estado do correspondente mRNA.

- ii) Tradução de uma proteína não ocorre (ou ocorre em baixas taxas) se seu correspondente mRNA está em baixo estado de atividade, representando que não está presente ou está presente em baixa concentração.
- iii) Tradução de uma proteína ocorre em alta taxa se seu correspondente mRNA está em alto estado de atividade, representando que está presente em alta concentração.
- iv) Tradução de uma proteína ocorre em taxa padrão se seu correspondente mRNA está em estado de atividade padrão.
- v) Tradução é uma função no estado do correspondente mRNA que define três níveis de regulação: baixa, padrão e alta, assim descritas:
 - Se tradução está baixa, proteínas não são traduzidas, as já existentes degradam e seus níveis de concentração vão a 0 (para isso se mantém em 0 ou caem até 0) em um passo de tempo.
 - Se tradução está alta, proteínas são traduzidas em altas taxas e seus níveis de concentração vão para 2 (sobem ou se matém) em um passo de tempo.
 - Se tradução está padrão, proteínas são traduzidas em taxa padrão e seus níveis de concentração vão (sobem ou caem ou se mantém) para 1 em um passo de tempo.

Suposições Relativas à Formação de Complexos Proteicos

Com relação à formação de complexos via o acoplamento de proteínas, assumimos que:

- i) A regra de transição associada à formação de um complexo é representada por uma função lógica multivalorada no estado das proteínas que serão acopladas.
- ii) Formação de um complexo não ocorre (ou ocorre em baixas taxas) se alguma das proteínas em questão está em baixo estado de atividade, representando que não está presente ou está presente em baixa concentração.
- iii) Formação de um complexo ocorre em altas taxas se todas as proteínas a serem acopladas estão em alto estado de atividade, representando que estão presentes em alta concentração.
- iv) Formação de um complexo ocorre em taxa padrão nas demais situações não enquadradas nos dois itens anteriores.

v) Formação de complexos é uma função no estado da proteínas em acoplamento que define três taxas de formação: baixa, padrão e alta, assim descritas:

- Se os complexos estão em baixa taxa de formação, não há acoplamento entre proteínas, os complexos já formados degradam e seus níveis de concentração vão a 0 (para isso se mantêm em 0 ou caem até 0) em um passo de tempo.
- Se os complexos estão em alta taxa de formação, proteínas são acopladas em altas taxas e os níveis de concentração dos complexos que são formados vão para 2 (sobem ou se matém) em um passo de tempo.
- Se complexos estão em taxas padrão de formação, proteínas são acopladas em taxas padrões e seus níveis de concentração vão (sobem ou caem ou se mantém) para 1 em um passo de tempo.

5.3.2 Representação da Região Neurogênica e dos Componentes e Mecanismos Moleculares

Mapeamos as células da região neurogênia num reticulado \mathcal{R} definido como planar 60×33 e com condições de contorno do tipo limite periódico e contendo 1980 células hexagonais.

No que diz respeito às variáveis de estado, pelo fato de se tratar de um modelo de três níveis, adotamos o domínio $\{0, 1, 2\}$ para todas elas. Com relação aos nomes das variáveis, para mantermos aderência à nomenclatura e notação da Figura 5.2, definimos o estado \mathcal{G} da rede intracelular como $\mathcal{G} = \{Notch_intra, SUHNotch_intra, espl, ESPL, ac, sc, AC, SC, ACDA, SCDA, dl, DA, SUH, Delta, Notch, Notch_Delta\}$, onde cada variável em \mathcal{G} denota o nível de atividade do correspondente componente molecular homônimo, por exemplo, $Notch_intra = 0/1/2$ denota que $Notch_intra$ (domínio intracelular do Notch) está em nível de atividade baixo/padrão/alto. No Apêndice A detalhamos essa notação para cada um dos componentes moleculares da rede neurogênica. Adotamos duas variáveis e^0 e e^1 na entrada da rede intracelular, que usamos para representar o nocaute e a superexpressão de sc e ac , respectivamente. Adotamos também uma variável de saída s^0 da rede intracelular, que recebe o nível de atividade de $Delta$. Além disso, assumimos que o modelo é livre de sinais ambientais.

Assumimos o modelo como sendo determinístico e em relação às funções de transição, fizemos:

- $DA_p[t] = 1$.

A expressão constitutiva de DA é representada fazendo DA receber um sinal independente em toda célula p .

- $Notch_p[t] = 1$.

Do mesmo modo, a expressão constitutiva de Notch livre, em toda célula p , é representada fazendo Notch receber um sinal independente.

- $Notch_intra_p[t] = Notch_Delta_p[t - 1]$.

Indica que o nível de atividade do domínio intracelular de Notch, na célula p , é atualizado pelo nível de atividade dos complexos Delta/Notch da própria célula p no instante anterior ($t - 1$).

- $SUHNotch_intra_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{se } Delta_p[t - 1] = 2 \vee Notch_intra_p[t - 1] = 0 \\ 2, & \text{se } (Notch_intra_p[t - 1] = 2 \wedge (SUH_p[t - 1] \geq 1)) \wedge \\ & (Delta_p[t - 1] \leq 1) \\ 1, & \text{caso contrário.} \end{cases}$

Indica que o nível de atividade de SU(H)/Notch_intra, na célula p , é atualizado por uma função nos níveis de atividade de SU(H), Delta e Notch_intra, na célula p , no instante anterior.

- $SUH_p[t] = SUHNotch_intra_p[t - 1]$.

Indica que o nível de atividade de SU(H), na célula p , é atualizado pelo nível de atividade de SU(H)/Notch_intra na célula p , no instante anterior.

- $espl_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{se } ESPL = 2 \\ 2, & \text{se } SUHNotch_intra_p[t - 1] = 2 \wedge ACDA_p[t - 1] = 2 \wedge \\ & SCDA_p[t - 1] = 2 \wedge ESPL_p[t - 1] = 0 \\ 1, & \text{caso contrário.} \end{cases}$

Indica que o nível de atividade de e(spl), na célula p , é atualizado por uma função no nível de atividade de SU(H)/Notch_intra, ACDA, SCDA e E(SPL) na célula p , no instante anterior.

- $ESPL_p[t] = espl_p[t - 1]$.

Indica que o nível de atividade do fator de transcrição E(SPL), na célula p , é atualizado pelo nível de expressão do gene e(spl) na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad ac_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{se } ESPL[t-1] = 2 \vee SUHNotch_intra_p[t-1] = 2 \\ 2, & \text{se } ESPL_p[t-1] = 0 \wedge SUHNotch_intra_p[t-1] = 0 \wedge \\ & ACDA_p[t-1] = 2 \wedge SCDA_p[t-1] = 2 \\ 1, & \text{caso contrário.} \end{cases}$$

Indica que o nível de ativação do gene ac , na célula p , é atualizado por uma função no nível de atividade de E(SPL), SU(H)/Notch_intra, AC/DA e SC/DA, na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad sc_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{if } ESPL_p[t-1] = 2 \vee SUHNotch_intra_p[t-1] = 2 \\ 2, & \text{if } ESPL_p[t-1] = 0 \wedge SUHNotch_intra_p[t-1] = 0 \wedge \\ & ACDA_p[t-1] = 2 \wedge SCDA_p[t-1] = 2 \\ 1, & \text{caso contrário.} \end{cases}$$

Indica que o nível de ativação do gene sc , na célula p , é atualizado por uma função no nível de atividade de E(SPL), SU(H)/Notch_intra, AC/DA e SC/DA, na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad AC_p[t] = ac_p[t-1].$$

Indica que o nível de atividade de AC, na célula p , é atualizado pelo nível de expressão do gene ac na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad SC_p[t] = sc_p[t-1].$$

Indica que o nível de atividade de SC, na célula p , é atualizado pelo nível de expressão de sc na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad ACDA_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{se } AC_p[t-1] = 0 \wedge DA_p[t-1] = 1 \\ 2, & \text{se } AC_p[t-1] = 2 \wedge DA_p[t-1] = 1 \\ 1, & \text{caso contrário.} \end{cases}$$

Indica que o nível de atividade de AC/DA, na célula p , é atualizado por uma função no nível de atividade de AC e DA, na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad SCDA_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{se } SC_p[t-1] = 0 \wedge DA_p[t-1] = 1 \\ 2, & \text{se } SC_p[t-1] = 2 \wedge DA_p[t-1] = 1 \\ 1, & \text{caso contrário.} \end{cases}$$

Indica que o nível de atividade de SC/DA, na célula p , é atualizado por uma função no nível de atividade de AC e DA, na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad dl_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{se } SCDA_p[t-1] = 0 \wedge ACDA_p[t-1] = 0 \\ 2, & \text{se } SCDA_p[t-1] = 2 \wedge ACDA_p[t-1] = 2 \\ 1, & \text{caso contrário.} \end{cases}$$

Indica que o nível de expressão do gene dl , na célula p , é atualizado por uma função no nível de atividade de AC/DA e SC/DA, na célula p , no instante anterior.

$$\bullet \quad Delta_p[t] = dl_p[t-1].$$

Indica que o nível de atividade de Delta livre, em toda célula p , no instante t , é atualizado pelo nível de atividade do gene dl na célula p o instante anterior.

$$\bullet \quad Notch_Delta_p[t] = \begin{cases} 0, & \text{se } Notch_p[t-1] = 0 \vee b_p^0[t-1] = 0 \\ 2, & \text{se } (Notch_p[t-1] = 1 \vee Notch_p[t-1] = 2) \wedge b_p^0[t-1] = 2 \\ 1, & \text{caso contrário,} \end{cases}$$

sendo que

$$b_p^0[t] = \delta_0(s_v^0[t]) = \begin{cases} 0, & \text{se } \sum_{v \in V(p)} s_v^0[t] \leq 4 \\ 2, & \text{se } \sum_{v \in V(p)} s_v^0[t] \geq 8 \\ 1, & \text{caso contrário,} \end{cases}$$

onde δ_0 é a função de vizinhança que atualiza o sinalizador externo b^0 , $V(p)$ denota o conjunto das células vizinhas à célula p e s_v^0 denota a saída s^0 da rede intracelular da célula $v \in V(p)$.

Indica que o nível de atividade dos complexos Delta/Notch, na célula p , é atualizado por uma função no nível de atividade, na célula p , de Notch livre e do sinalizador externo b^0 , o qual representa a influência das células vizinhas ($V(p)$), expressa através da função de vizinhança δ_0 nas saídas da rede intracelular das células vizinhas.

$$\bullet \quad s_p^0[t] = Delta_p[t-1].$$

Indica que a saída (no caso única) da rede intracelular, na célula p , é atualizada pelo nível de expressão de Delta na célula p , no instante anterior.

5.3.3 Simulações e Resultados

Para construir modelos para sistemas de sinalização justácrina, adotamos a seguinte metodologia de modelagem:

1. Inicialmente partimos da topologia e das relações entre os componentes moleculares já estabelecidos na literatura para construir uma primeira versão das redes intracelulares e de membrana (caso exista), das funções de vizinhança e das características do reticulado.
2. Em seguida, iteramos de modo progressivo o modelo a partir de padrões já conhecidos e estabelecidos e comparamos com o comportamento esperado do sistema. Refinamos e iteramos o modelo sucessivamente, do mesmo modo, até atingir um grau de coerência razoável com o comportamento esperado.
3. Depois de obter um modelo razoavelmente consistente usando apenas simulações progressivas, realizamos simulações regressivas a fim de obter os campos atratores locais e os padrões celulares estáveis (atratores globais).

5.3.3.1 Simulações Progressivas

Refinado o modelo até um ponto que pôde ser considerado como “correto”, uma das primeiras questões a responder é relativa a quais padrões de atividade nos componentes moleculares do sistema – em todas as células da região neurogênica – definem os tipos selvagens correspondentes a: i) configuração onde todas as células são bipotentes e ii) configuração onde os neuroblastos estão segregados. Nesse sentido, realizamos algumas simulações progressivas onde assumimos que há dois estados de interesse: o estado inicial definido pela configuração (i) e o estado final definido pela configuração (ii).

Para representar o estado inicial atribuímos valor lógico ‘1’ no instante inicial ($t = 0$) para todos os componentes do modelo em toda célula do reticulado, indicando que assumimos que todos esses componentes, em toda a região neurogênica, têm níveis de atividade padrão (dentro dos valores de referência) nessa configuração.

Simulamos progressivamente o modelo e observamos que o sistema se mantém em estado estacionário em relação às condições iniciais (células bipotentes), ou seja, essa configuração corresponde a um atrator global, portanto ela é um padrão celular estável e assim permanecerá até que algum sinal externo possa perturbar seu equilíbrio dinâmico. Como próximo passo natural testamos se o estado do sistema evolui a partir das condições iniciais para outro atrator que corresponde à configuração (ii). Para isso, nós promovemos – via sinais independentes – várias flutuações no estado de alguns componentes do modelo. Usamos estas flutuações com o objetivo de reproduzir *in silico* os

comportamentos mais bem estabelecidos na literatura e alguns experimentos de bancada clássicos.

No primeiro experimento escolhemos algumas células arbitrárias da região neurogênica e nelas incrementamos (fizemos assumir o valor lógico '2'), a partir das condições iniciais, os níveis de atividade de sc e ac . Com o tempo, o sistema migrou para outro estado estacionário assim caracterizado:

1. Nas células onde a atividade de sc e ac foi incrementada a atividade da rede neurogênica estabilizou seus níveis de atividade no seguinte padrão³:

17	16	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0

2. Nas células vizinhas das células onde sc e ac foram incrementados a atividade da rede neurogênica estabilizou seus níveis de atividade no seguinte padrão:

17	16	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2

3. As demais células da região neurogênica mantiveram seu padrão de atividade inalterado em relação às condições iniciais.

O comportamento esperado é que a célula que se torna um neuroblasto, com o tempo inibe suas vizinhas de também sê-lo (COLLIER et al., 1996; LUTHI et al., 1998), o que sugere que o primeiro padrão (observado nas células onde sc e ac foram incrementados) corresponde à configuração nos níveis de atividade de todos os componentes da rede neurogênica que corresponde aos precursores neuronais.

Num segundo experimento, dividimos a região neurogênica (reticulado de dimensões 60×33) em três faixas idênticas de dimensões 60×11 cada uma. A partir das condições iniciais (i) flutuamos (para cima), em instantes de tempo aleatórios, os níveis de atividade de sc e ac em cada uma destas faixas do seguinte modo: a) na faixa mais dorsal flutuamos a atividade de sc e ac em 15% das células, b) na faixa mediana flutuamos a atividade de sc e ac em 24% das células e c) na faixa mais ventral flutuamos a atividade de sc e ac em 50% das células. Esse experimento teve como objetivo simular um gradiente dos ativadores de sc e ac na região neurogênica, sendo que os resultados que obtivemos foram: a) na

³Para facilitar o enquadramento na página dos padrões de atividade numa forma tabular, adotamos uma indexação nos nomes das variáveis de estado do sistema Delta-Notch, a qual está definida na Tabela 5.2.

Nome da variável	Identificador inteiro
b^0	18
<i>Notch</i>	17
<i>DA</i>	16
e^0	15
e^1	14
<i>Delta</i>	13
<i>dl</i>	12
<i>ACDA</i>	11
<i>SCDA</i>	10
<i>AC</i>	9
<i>SC</i>	8
<i>ac</i>	7
<i>sc</i>	6
<i>ESPL</i>	5
<i>espl</i>	4
<i>SUH</i>	3
<i>SUHNotch_intra</i>	2
<i>Notch_intra</i>	1
<i>Notch_Delta</i>	0

Tabela 5.2: As variáveis da rede intracelular são identificadas por inteiros 18, 17, ..., 0. Além de variáveis para os componentes moleculares próprios de sistema Delta-Notch, incluímos – na versão expandida da rede intracelular – as variáveis de entrada e^0 e e^1 e o sinalizador externo b^0 .

faixa mais dorsal 15% das células tornaram-se neuroblastos, b) na faixa mediana 24% das células tornaram-se neuroblastos e c) na faixa mais ventral 33% das células tornaram-se neuroblastos. Além disso, verificamos que quando o sistema entrou em estado estacionário tivemos: 1) inibição lateral completamente observada (não existiram dois neuroblastos vizinhos um do outro) e 2) do total de células, 24% tornaram-se precursores neuronais, o que é compatível com os resultados esperados (WOLPERT, 2002; LAI, 2004; CASTRO et al., 2005; LEWIS, 1998). Lembremos que, segundo a interpretação proposta na Seção 5.1, este estado estacionário global também é um padrão celular estável e nele permanecerá até que alguma perturbação externa o retire de sua estabilidade. Na Figura 5.3 mostramos uma representação do padrão celular obtido.

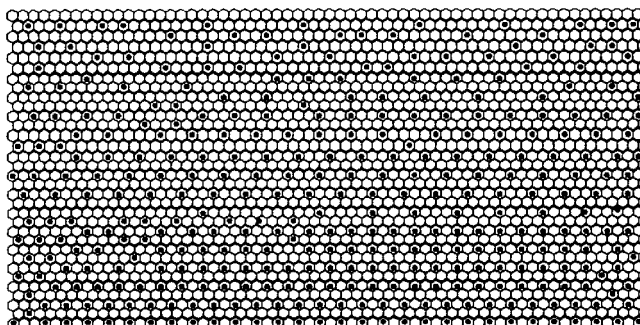


Figura 5.3: Exemplo de padronização de precursores neuronais onde verificamos a ocorrência de inibição lateral. As células pintadas de branco correspondem aos epidermoblastos e as de preto aos neuroblastos.

Em seguida, simulamos a existência de falhas na via de sinalização do Notch no orga-

nismo através da inibição (fizemos assumir o valor lógico '0') do *Notch* num grupo conexo de células escolhido arbitrariamente. Como resultado, obtemos que todas as células escolhidas adotaram o seguinte padrão de expressão:

17	16	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0

o qual caracteriza os precursores proneurais (alto nível de atividade de *sc* e *ac*), indicando que houve excesso de formação de neuroblastos, resultado compatível com padrões observados em mutantes *Notch* (LEWIS, 1998; LAI, 2004).

Também testamos os efeitos da presença de altos níveis de atividade de *Notch* no modelo. Para isso, fizemos *Notch* assumir o valor lógico '2' num grupo conexo de células escolhido arbitrariamente. Como resultado obtemos que todas as células escolhidas adotaram o seguinte padrão de expressão:

17	16	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

indicando, segundo o modelo, que atividade constitutiva ou alta atividade de *Notch* reprime a diferenciação neural (em nenhuma das células tivemos alta atividade de *sc* ou *ac*).

Em outro experimento, aferimos o comportamento do modelo mediante o nocaute de *sc* e *ac*. Para isso, escolhemos algumas células arbitrárias da região neurogênica e nelas inibimos (fizemos assumir o valor lógico '0'), a partir das condições iniciais, os níveis de atividade de *sc* e *ac*. Com o tempo, o sistema migrou para outro estado estacionário assim caracterizado:

1. Nas células onde *sc* e *ac* foram silenciados a atividade da rede neurogênica estabilizou seus níveis de atividade no seguinte padrão:

17	16	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2

2. Nas células vizinhas daquelas onde *sc* e *ac* foram silenciados a atividade da rede neurogênica estabilizou seus níveis de atividade no seguinte padrão:

17	16	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0

Esses resultados indicam um excesso de neuroblastos, resultado também compatível com padrões observados em mutantes *ac* e *sc* (LEWIS, 1996).

5.3.3.2 Simulações Regressivas

Para obter a dinâmica intracelular completa do modelo J para o sistema Delta-Notch, usamos o Procedimento 1 (ReversoLocal), que operou com uma versão expandida da rede neurogênica representada pela Figura 5.4. Os sinais de entrada $\mathcal{E} = \{e^0, e^1\}$ foram utilizados para representar o nocaute e/ou superexpressão de ac e sc e o sinalizador b^0 foi utilizado para representar o sinal externo correspondente à presença de *Delta* nas células vizinhas.

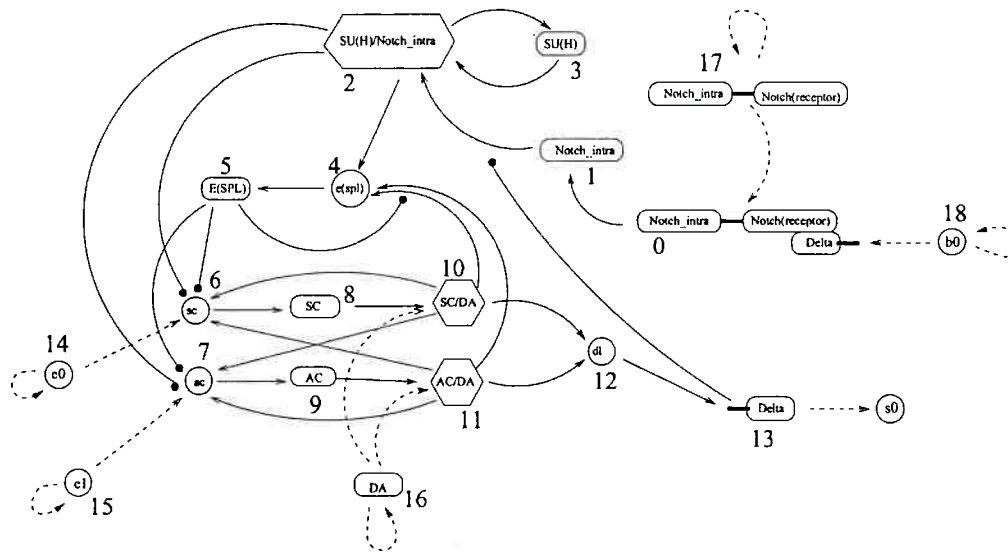


Figura 5.4: Rede intracelular expandida do sistema Delta-Notch.

O procedimento `ReversoLocal` computou uma dinâmica com um total de 1162261467 estados, sendo identificadas 44 bacias de atração com atratores que imprimem expressão constitutiva para *Notch* e *DA*, as quais somam 129140163 estados. Os atratores dessas bacias podem ser vistos no Apêndice B.

Algumas das medidas da dinâmica de uma rede intracelular incluem o número de atratores, o tamanho dos períodos atratores, o tamanho das bacias (número total de estados) e a altura das árvores transientes. Uma boa e simples medida da convergência do fluxo dinâmico no espaço de estado é a *densidade* G , que é a fração de estados que são do tipo jardim do Éden, sendo que alta convergência indica dinâmica de regime ordenado e baixa convergência indica regime caótico (WUENSCH, 1998a). No Apêndice C apresentamos algumas destas medidas para o caso da dinâmica intracelular do sistema Delta-Notch.

Com relação à simulação do processo de padronização, primeiramente tomamos o

seguinte atrator local:

18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

que representa o estado da rede neurogênica nas condições iniciais. Com ele realizamos a primeira padronização da região neurogênica. Para isso, aplicamos o método de montagem do atrator global por expansão aritmética e geométrica (fazendo dez execuções para cada), sendo que em ambos os casos o padrão celular obtido foi o mesmo adotado para a região neurogênica nas condições iniciais (Seção 5.3.3.1) com 100% de cobertura do reticulado nos dois casos.

Em seguida, tomamos o seguinte par de atratores locais da rede expandida:

18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2

O primeiro atrator corresponde ao padrão de atividade dos neuroblastos e o segundo ao padrão dos epidermoblastos, como encontrado na Seção 5.3.3.1. Aqui também simulamos o processo de padronização por montagem de atratores globais via expansão aritmética e geométrica, com dez execuções para cada caso. Nas dez execuções usando expansão aritmética, obtivemos cobertura de 100% do reticulado em seis delas e média de 99,4% nas demais, sendo que nas áreas cobertas (nas dez execuções) o padrão celular observado foi de 33% de neuroblastos segregados (todos eles não vizinhos entre si) e 67% de epidermoblastos. Nas dez execuções usando expansão geométrica obtivemos cobertura de 100% do reticulado em três delas e média de 98,6% nas demais, sendo que nas áreas cobertas o padrão celular observado também foi de 33% de neuroblastos segregados e 67% de epidermoblastos nas dez execuções.

Em outro experimento, testamos a geração de padrões em presença de três atratores locais da rede expandida:

18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2

Estes atratores correspondem aos padrões de expressão da rede neurogênica para três tipos celulares: células bipotentes, neuroblastos e epidermoblastos. Aqui também aplicamos os

métodos de montagem de atratores globais por expansão aritmética e geométrica com 10 execuções cada. No caso de expansão aritmética, obtivemos 100% de cobertura do reticulado em sete das execuções e média de 99,5% nas demais, sendo que nas áreas cobertas os padrões celulares observados foram de 46% de células bipotentes, 18,5% de neuroblastos e 35,5% de epidermoblastos em média. No caso de expansão geométrica, obtivemos 100% de cobertura do reticulado em três das execuções e média de 97,9% nas demais, sendo que nas áreas cobertas os padrões celulares observados foram praticamente os mesmos: 46% de células bipotentes, 17,5% de neuroblastos e 34,5% de epidermoblastos em média.

5.3.4 Discussão

Verificamos bons índices (em média 99,7%) de cobertura do reticulado nos padrões obtidos nas simulações regressivas. Isso nos diz que, de modo geral, o método fornece boas aproximações para os atratores globais do modelo. Contudo, é bom lembrar que os padrões identificados pelo método e que não cobrem o reticulado totalmente não representam uma solução do problema do ponto de vista matemático, pois eles não correspondem a atratores globais genuínos. Por outro lado, cabe ressaltar que do ponto de vista do significado biológico isto pode não ser tão relevante, visto que podem existir algumas células, em especial aquelas localizadas na borda da região neurogênica, cujos padrões de expressão não se enquadram perfeitamente dentro daqueles previstos para os tipos celulares em questão.

Em alguns dos padrões (dois casos) obtidos através de montagem por expansão aritmética e que não cobriram 100% do reticulado, observamos que as células cobertas não corresponderam a um conjunto convexo. Isso deriva da seqüência de escolhas aleatórias das posições da BORDA nas quais os *clusters* sintônicos são encaixados (linha 7 do Procedimento 4, página 73). Talvez isso não seja uma propriedade desejável para o método, então como alternativa implementamos uma variante do Procedimento 4 onde as posições da BORDA nas quais os *clusters* sintônicos são encaixados não são sorteadas, mas sim escolhidas linearmente no reticulado.

Os padrões celulares obtidos com as simulações realizadas são compatíveis com os resultados esperados, visto que reproduziram características já bem estabelecidas e documentadas dos padrões em questão, tal como número de neuroblastos variando entre 15% e 33% das células da região neurogênica e ocorrência de inibição lateral. Isso sugere

que o modelo atingiu um bom nível de consistência, entretanto, acreditamos que novos refinamentos e ajustes precisam ser feitos com base nos demais atratores locais que não foram considerados nas simulações regressivas que foram realizadas.

Capítulo 6

Conclusões

Possuir uma estrutura semelhante à dos modelos normalmente utilizados pela comunidade de biólogos, característica desejável em um bom modelo para SSJ, foi perseguida em *J-Systems* através da organização que adotamos para o metamodelo. Esperamos que a estrutura do reticulado (onde cada célula é uma entidade autônoma com os mesmos componentes) representando os tecidos, o agrupamento das variáveis de estado em intracelulares e de membrana e as restrições impostas nas regras de transição (distingüindo a representação dos eventos que ocorrem na membrana daqueles que ocorrem no meio intracelular), possam ter oferecido a semelhança que almejamos.

Os modelos formais para sistemas de sinalização justácrina até então desenvolvidos são modelos focados nos eventos de acoplamento entre ligantes e receptores que ocorrem nas membranas das células que estão em processo de comunicação. Isso porque eles “encapsulam” a atividade e as interações entre as diversas espécies moleculares intracelulares envolvidas em funções de retroalimentação, cujos parâmetros são basicamente a quantidade de complexos ligante/receptor formados na membrana. Ou seja, são modelos que não tratam explicitamente a participação dos diversos componentes intracelulares envolvidos no processo de sinalização justácrina, em especial aqueles relacionados aos mecanismos de regulação gênica.

Os *J-Systems* são capazes de representar a participação dos componentes intracelulares mencionados acima, o que estende o poder de representação dos modelos atuais para sinalização justácrina, no sentido de permitir a representação mais detalhada das diversas estruturas (de membrana e intracelulares) e interações presentes nas vias de sinalização, em especial aquelas relacionadas aos processos de regulação gênica envolvidos na formação de padrões modulados por interações justácrinas.

A capacidade de operar com diferentes escalas de tempo, outra característica desejável em um bom modelo para SSJ, é garantida em *J-Systems* através da construção de ciclos de atraso (“delays”) que são modelados nas memórias do sistema. Para isso, é preciso definir, para o específico modelo em questão, sua unidade de tempo, que corresponde a um passo de tempo discreto. Esta unidade pode ser definida como sendo, por exemplo, o intervalo de tempo do mais rápido evento molecular considerado. A “quantidade de tempo” dos demais eventos considerados será sempre proporcional (maior ou igual) à unidade estabelecida.

Bons modelos de sinalização justácrina devem ser capazes de tratar a distribuição não homogênea de ligantes e receptores nas membranas, pois ela influi em eventos de polarização como, por exemplo, em polarização dorsoventral em olhos de *Drosophila* (BRAY, 2000). Nesse sentido, a divisão da membrana em segmentos (faces) adotada em *J-Systems* é importante para permitir a representação do acúmulo localizado de proteínas, o que pode ocorrer por síntese localizada, transporte ativo de reservatórios intracelulares e degradação seletiva (STRUTT, 2002).

A representação das interações moleculares em SSJ através de RDDs interconectadas fornece aos *J-Systems* um modelo do tipo “entrada e saída” que permite a representação modular de SSJ com relativa facilidade. Além disso, técnicas e métodos de análise de resposta modular (BRUGGERMAN et al., 2002) podem ser adaptadas a fim de obter representações reduzidas e modulares de redes intracelulares em *J-Systems*. Isso o torna capaz de comportar/suportar diferentes modelos, com diferentes “granulosidades”, para um mesmo sistema de sinalização.

Os *J-Systems* podem “emular” outros modelos formais de sinalização justácrina, desde que esses sejam originalmente concebidos com o tempo e o espaço discretos ou que possam ser convertidos para uma aproximação discreta. Sabemos que alguns métodos numéricos de resolução de equações diferenciais correspondem a conversões deste tipo; além disso, muitos sistemas de equações diferenciais podem ser aproximados por um sistema de equações de diferenças (MONTEIRO, 2002), daí concluímos que os *J-Systems* podem ser aplicados na emulação de uma ampla gama de modelos, o que reforça sua generalidade.

Deficiências naturais dos *J-Systems* são aquelas relacionadas à modelagem discreta. Além disso, a suposição de que as regras de transição nas diferentes células do reticulado são aplicadas de forma síncrona pode ser considerada uma restrição por demais simplificada.

Desenvolvemos um método para identificação de padrões celulares modulados por interações moleculares justácrinas e intracelulares através da computação de atratores globais em *J-Systems*. Para isso, estendemos a interpretação de que tipos celulares correspondem a bacias de atração (KAUFFMAN, 1993; WUENSCH, 1998b, 2004) de SDFs, de modo a conceber os padrões celulares como bacias de atração global em *J-Systems* que são SDFs.

Um algoritmo enumerativo para computação de atratores globais em *J-Systems* é impraticável mesmo para instâncias de *J-Systems* muito pequenas, pois seu espaço de estados contém $|\mathbb{G}|^{|\mathcal{G}||\mathcal{R}|}$ estados, onde $|\mathbb{G}|$ denota o domínio das variáveis de estado, $|\mathcal{G}|$ denota o número de variáveis de estado do modelo e $|\mathcal{R}|$ denota o número de células do reticulado. O método que desenvolvemos explora algumas propriedades que caracterizam os *J-Systems* como, por exemplo, a replicação das redes intracelulares e de membrana nas células do reticulado e a possibilidade de representação compacta das funções de vizinhança e membrana, de modo a tornar o método viável para uma gama de modelos significativamente maior.

Desenvolvemos um *software*, o JSS, cujo propósito é facilitar a construção, simulação, análise e refinamento de modelos em *J-Systems*. Ele integra recursos como uma interface de modelagem, um simulador de modelos em *J*, uma implementação do método para computação de padrões celulares e um ambiente para visualização e análise de simulações e resultados.

Construímos um novo modelo de três níveis em *J* para a padronização de precursores neuronais em *D. melanogaster*. Com ele reproduzimos *in silico* os mais bem estabelecidos e documentados experimentos envolvendo os elementos moleculares chave do sistema Delta-Notch, em especial o nocaute e a superexpressão de *ac*, *sc* e Notch. Essas simulações permitiram a identificação, segundo esse modelo, dos padrões de expressão/atividade de todos os componentes moleculares constituintes da rede neurogênica canônica para os três tipos celulares presentes no processo: células bipotentes, neuroblastos e epidermoblastos. Além disso, aplicamos o método de identificação de padrões celulares por cálculo de bacias de atração em *J-Systems* neste modelo, sendo que os padrões celulares obtidos foram compatíveis com os resultados esperados, visto que reproduziram características já bem estabelecidas e documentadas dos padrões em questão, tal como número de neuroblastos variando entre 15% e 33% das células da região neurogênica e ocorrência de inibição lateral.

Esses resultados sugerem não apenas que o modelo para a padronização de precursores neuronais atingiu um bom nível de consistência, como sugere também a validade dos *J-Systems* como ferramenta de modelagem de sistemas de sinalização justácrina e a validade do método de identificação de padrões celulares via o cálculo de atratores globais em *J-Systems*.

Com relação a perspectivas e possíveis trabalhos que podem ser desenvolvidos a partir do que já foi apresentado, vemos que há várias possibilidades, dentre as quais podemos citar:

1. Um primeiro trabalho, que quase naturalmente daria seguimento a este, seria um estudo de experimentação intensiva do modelo proposto (ou de uma extensão dele) para segregação de neuroblastos a fim de explorar as propriedades da rede neurogência em presença de sinais justácrinos. Embora os mecanismos e elementos participantes desse processo sejam bem estabelecidos, acreditamos que novas hipóteses possam levantadas mediante a flutuação no nível de atividade de componentes ainda não avaliados experimentalmente.
2. Uma outra possibilidade bastante natural, seria a aplicação dos *J-Systems* na modelagem e análise de outros sistemas de sinalização justácrina em outros eventos biológicos como, por exemplo, na geração de polaridade planar em ommatídias (BRAY, 2000). Isso serviria para reforçar a validade e a generalidade dos *J-Systems*.
3. As simulações mostraram que, apesar do procedimento de cálculo de *clusters* sintônicos por partes (Seção 3.6.4.1) mostrar-se bem mais rápido do que o procedimento enumerativo (Procedimento 3, página 65), ainda assim seu desempenho não é prático para conjuntos de atratores grandes ($|A| > 6$) em modelos com reticulados hexagonais, como comentamos na Seção 3.8. Isso sugere que a rotação de *microclusters* e *clusters* pré-sintônicos na árvore de possibilidades deve ser explorada como uma alternativa de melhoria de desempenho. Sugere também que o desenvolvimento de um método estatístico para a identificação de *clusters* sintônicos é uma alternativa importante que deve ser desenvolvida. Este método estatístico poderia explorar alguns dados do campo atrator local, por exemplo, o tamanho relativo das bacias de atração poderia ser utilizado para estimar uma distribuição de probabilidades no conjunto dos atratores locais.
4. Uma possibilidade bastante interessante diz respeito à relação entre *J-Systems* e o formalismo proposto por Thomas (THOMAS, 1991), costumeiramente referido como

Redes Lógicas Generalizadas, que permite a modelagem de redes de regulação onde transições de estados são aplicadas assincronamente. Se fosse possível mapear as redes locais dos *J-Systems* no formalismo de Thomas, então seria possível usar os conceitos de laços de retroalimentação e estados característicos (SNOUSSI; THOMAS, 1993, 1995) para prever propriedades e características da dinâmica intracelular dos *J-Systems*, e, a partir delas, estudar a relação entre dinâmica local e global em *J-Systems*. Estudo similar poderia também ser feito envolvendo os formalismos conhecidos como grafos regulatórios e grafos dinâmicos (REMY et al., 2003; CHAOUIYA et al., 2003) e os *J-Systems*.

5. Com relação ao *software* JSS, embora ele esteja funcional, alguns ajustes de interface ainda são necessários antes de sua disponibilização. Além disso, precisamos também elaborar os manuais de desenvolvedor e de usuário.

Por fim, podemos resumir as principais contribuições deste trabalho em três itens: a) o desenvolvimento de um *framework* de modelagem discreta de sistemas de sinalização justácrina (os *J-Systems*) que contempla algumas características desejáveis, tais como: 1) similaridade estrutural com modelos biológicos normalmente utilizados, 2) capacidade de representação modular de sistemas de sinalização, 3) capacidade de operar em diferentes escalas de tempo e 4) capacidade de tratar explicitamente tanto os eventos e elementos moleculares que ocorrem na membrana, quanto aqueles que ocorrem no meio intracelular e que estão envolvidos no processo de sinalização justácrina ; b) o desenvolvimento de um método para identificação de padrões celulares modulados por interações justácrinas através do cálculo de atratores em *J-Systems* e c) o desenvolvimento de um novo modelo de três níveis para padronização de neuroblastos em *D. melanogaster*, que pode futuramente ser utilizado para levantamento de novas hipóteses acerca do papel dos componentes da rede neurogênica nesse processo.

Referências Bibliográficas

ALBERT, R.; OTHMER, H. G. The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. **J. Theor. Biol.**, v. 223, p. 1–18, 2003.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4th. ed. New York: Taylor & Francis Books, Inc., 2002.

ALLEN, E. E. et al. Algebraic dependency models of protein signal transduction networks from time-series data. **J. Theor. Biol.**, v. 238, p. 317–330, 2006.

BAILEY, A. M.; POSAKONY, J. W. Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to notch receptor activity. **Genes Dev.**, v. 9, p. 2609–2622, 1995.

BESSHO, Y.; KAGEYAMA, R. Oscillations, clocks and segmentation. **Curr. Opin. Genet.**, v. 13, p. 379–384, 2003.

BRAY, S. Planar polarity: out of joint? **Curr. Biol.**, v. 10, p. 155–158, 2000.

BRAY, T. et al. **Extensible markup language (XML) 1.0 (Second Edition)**. Chicago, 2000. W3C Recommendation 6-October-2000. Disponível em: <<http://www.w3.org/TR/1998/REC-xml-19980210>>. Acesso em: 29 jan. 2007.

BRUGGERMAN, F. J. et al. Modular response analysis of cellular regulatory networks. **J. Theor. Biol.**, v. 218, p. 507–520, 2002.

CASTRO, B. et al. Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by suppressor of hairless. **Development**, v. 132, n. 15, p. 3333–3344, 2005.

CHAOUIYA, C. et al. Qualitative analysis of regulatory graphs: a computational tool based on a discrete formal framework. In: 1ST MULTIDISCIPLINARY INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON POSITIVE SYSTEMS: THEORY AND APPLICATIONS. **LNCIS 294**. Berlin: Springer-Verlag, 2003. p. 119–126.

COLLIER, J. R. et al. Pattern formation by lateral inhibition with feedback: a mathematical model of Delta-Notch intercellular signalling. **J. Theor. Biol.**, v. 183, p. 429–446, 1996.

DASSOW, G. von et al. The segment polarity network is a robust developmental module. **Nature**, v. 406, p. 188–192, 2000.

- DASSOW, G. von; ODELL, G. M. Design and constraints of the drosophila segment polarity module: Robust spatial patterning emerges from intertwined cell state switches. **Journal of Experimental Zoology**, v. 294, p. 179–215, 2002.
- FAGOTTO, F.; GUMBINER, B. M. Cell contact dependent signalling. **Dev. Biol.**, v. 180, p. 445–454, 1996.
- FINNEY, A. M.; HUCKA, M. Systems biology markup language: Level 2 and beyond. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 1473–1473, 2003.
- GUBITOSO, M. D. et al. A simulator for gene expression networks. In: **MICROARRAYS: OPTICAL TECHNOLOGIES AND INFORMATICS. SPIE**. San Jose, 2001. p. 248–259.
- GUTWITZ, H. A. Transients, cycles, and complexity in cellular automata. **Physical Review A**, v. 44, n. 12, 1991.
- HUCKA, M. et al. **Systems Biology Markup Language (SBML) level 1: structures and facilities for basic model definitions**. California, 2001. Disponível em: <<http://www.sbml.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2006.
- HUPPERT, S. S.; JACOBSON, T. L.; MUSKAVITCH, M. A. T. Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. **Development**, v. 124, p. 3283–3291, 1997.
- JEN, E. Scaling of preimages in cellular automata. **Complex Systems**, n. 1, p. 1045–1062, 1987.
- JEN, E. Enumeration of preimages of cellular automata. **Complex Systems**, n. 3, p. 421–456, 1989.
- JONG, H. D. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: A literature review. **Journal of Computational Biology**, v. 9, n. 1, p. 67–103, 2002.
- KAUFFMAN, S. A. **The Origins of Order**. New York: Oxford University Press, 1993.
- KIM, J. et al. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila vestigial* gene. **Nature**, v. 382, p. 2269–2277, 1996.
- LAI, E. C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. **Development**, v. 131, p. 965–973, 2004.
- LERUSALIMSCHY, R.; FIGUEIREDO, L. H.; CELES, W. **Lua 5.1 Reference Manual**. Rio de Janeiro, 2006.
- LEWIS, J. Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. **Curr. Op. Neurobiol.**, v. 6, p. 3–10, 1996.
- LEWIS, J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 9, p. 583–589, 1998.
- LUA: Comunidade de Lua. 2006. Disponível em: <<http://www.lua.org/>>. Acesso em: 01 nov. 2006.

- LUTHI, P. O. et al. A cellular automaton model for neurogenesis in *Drosophila*. **Physica D**, v. 118, p. 151–160, 1998.
- MARNELLOS, G. et al. Delta-Notch lateral inhibitory patterning in the emergence of ciliated cells in *Xenopus*: experimental observations and a gene network model. In: PACIFIC SYMPOSIUM ON BIOCOMPUTING. PSB 2000. Island of Oahu, Hawaii, 2000. v. 5, p. 326–337.
- MARNELLOS, G.; MJOLSNESS, E. A gene network approach to modeling early neurogenesis in *Drosophila*. In: PACIFIC SYMPOSIUM ON BIOCOMPUTING. PSB 1998. Maui, Hawaii, 1998. v. 3, p. 30–41.
- MARTIN, O.; ODLYZKO, A. M.; WOLFRAM, S. Algebraic properties of cellular automata. **Comm. Math. Phys.**, v. 93, p. 219–258, 1998.
- MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor- α : a model for membrane-anchored growth factors. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 21393–21396, 1990.
- MASSAGUÉ, J.; PANDIELLA, A. Membrane-anchored growth factors. **Annu. Rev. Biochem.**, n. 62, p. 515–541, 1993.
- MEIR, E. et al. Robustness, flexibility, and the role of lateral inhibition in the neurogenic network. **Curr. Biol.**, v. 12, p. 778–786, 2002.
- MJOLSNESS, E.; SHARP, D. H.; REINITZ, J. A connectionist model of development. **J. Theor. Biol.**, v. 152, p. 429–453, 1991.
- MONK, N. A. M. Restricted-range gradients and travelling fronts in a model of juxtacrine cell relay. **Bull. Math. Biol.**, v. 60, p. 901–918, 1998.
- MONTEIRO, L. H. A. **Sistemas Dinâmicos**. São Paulo: Livraria da Física, 2002.
- OWEN, M. R. Waves and propagation failure in discrete space models with nonlinear coupling and feedback. **Physica D**, v. 173, p. 59–76, 2002.
- OWEN, M. R.; SHERRATT, J. A. Mathematical modelling of juxtacrine cell signalling. **Math. Biosci.**, v. 152, p. 125–150, 1998.
- OWEN, M. R.; SHERRATT, J. A.; MYERS, S. R. How far can a juxtacrine signal travel? **Proc. R. Soc. Lond.**, B 266, p. 579–585, 1999.
- OWEN, M. R.; SHERRATT, J. A.; WEARING, H. J. Lateral induction by juxtacrine signalling is a new mechanism for pattern formation. **Dev. Biol.**, v. 217, p. 54–61, 2000.
- PAPIN, J. A. et al. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. **Nature**, v. 6, p. 99–111, 2005.
- PARKS, A. L.; HUPPERT, S. S.; MUSKAVITCH, M. A. The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in *Drosophila melanogaster*. **Mech. Dev.**, v. 63, p. 61–74, 1997.
- PAROUSH, Z.; WAINWRIGHT, S. M.; ISH-HOROWICZ, D. Torso signalling regulates terminal patterning in drosophila by antagonising groucho-mediated repression. **Development**, v. 124, p. 3827–3834, 1997.

- REMY, E. et al. A description of dynamical graphs associated to elementary regulatory circuits. **Bioinformatics (Suppl. 2)**, v. 19, p. ii172–ii178, 2003.
- ROZANTE, L. C. S.; GUBITOSO, M. D.; MATIOLI, S. R. A framework for discrete modeling of juxtacrine signaling systems. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 821–845, 2007.
- SBML: Comunidade SBML. 2007. Disponível em: <<http://www.sbml.org/>>. Acesso em: 22 jan. 2007.
- SNOUSSI, E. H.; THOMAS, R. Logical identification of all steady states: The concept of feedback loop characteristic states. **Bull. Math. Biol.**, v. 55, n. 5, p. 973–991, 1993.
- SNOUSSI, E. H.; THOMAS, R. Dynamical behaviour of biological regulatory networks - I. biological role of feedback loops and practical use of the concept of the loop-characteristic state. **Bull. Math. Biol.**, v. 57, n. 2, p. 247–276, 1995.
- STRUTT, D. I. The asymmetric subcellular localisation of components of the planar polarity pathway. **Sem. Cell Dev. Biol.**, v. 13, p. 225–231, 2002.
- THOMAS, R. Boolean formalization of genetic control circuits. **J. Theor. Biol.**, v. 42, p. 563–585, 1973.
- THOMAS, R. Regulatory networks as asynchronous automata: A logical description. **J. Theor. Biol.**, v. 153, p. 1–23, 1991.
- UML: Object management group. 2002. Disponível em: <<http://www.omg.org/uml/>>. Acesso em: 22 jan. 2007.
- WADDINGTON, C. H. **The strategy of the genes**. London: Allen and Unwin, 1957.
- WEARING, H. J.; OWEN, M. R.; SHERRATT, J. A. Mathematical modelling of juxtacrine patterning. **Bull. Math. Biol.**, v. 62, p. 293–320, 2000.
- WEARING, H. J.; SHERRATT, J. A. Nonlinear analysis of juxtacrine patterns. **SIAM J. Appl. Math.**, v. 62, p. 283–309, 2001.
- WEBB, S. D.; OWEN, M. R. Intra-membrane ligand diffusion and cell shape modulate juxtacrine patterning. **J. Theor. Biol.**, v. 230, p. 99–117, 2004.
- WEBB, S. D.; OWEN, M. R. Oscillations and patterns in spatially discrete models for developmental intercellular signalling. **J. Math. Biol.**, v. 48, p. 444–476, 2004.
- WHITFIELD, T.; HADDON, C.; LEWIS, J. Intercellular signals and cell-fate choices in the developing inner ear: origins of global and of fine-grained pattern. **Sem. Cell Dev. Biol.**, v. 8, p. 239–247, 1997.
- WOLPERT, L. **Principles of Development**. 2nd. ed. Oxford: Oxford Press, 2002.
- WUENSCHÉ, A. **The Ghost in the Machine**. Santa Fe Institute Studies in the Sciences of Complexity: C. G. Langton, Addison-Wesley, 1994.
- WUENSCHÉ, A. Discrete dynamical networks and their attractor basins. In: **COMPLEX SYSTEMS '98**. Sydney, Australia, 1998.

WUENSCHÉ, A. Genome regulation modeled as a network with basins of attraction. **Complexity**, v. 4, n. 3, p. 47–66, 1998.

WUENSCHÉ, A. Basins of attraction in network dynamics: A conceptual framework for biomolecular networks. In: MODULARITY IN DEVELOPMENT AND EVOLUTION. Chicago: G.Schlosser and G.P.Wagner, 2004. p. 288–311.

Apêndice A

Representação dos Componentes Moleculares da Rede Neurogênica

- $Notch_intra = 0/1/2$ denota que Notch (domínio intracelular) está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $SUHNotch_intra = 0/1/2$ denota que o complexo proteico SU(H)/Notch_intra está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $espl = 0/1/2$ denota que o gene e(spl) está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $ESPL = 0/1/2$ denota que a proteína E(SPL) está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $ac = 0/1/2$ denota que o gene ac está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $sc = 0/1/2$ denota que o gene sc está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $AC = 0/1/2$ denota que a proteína AC está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $SC = 0/1/2$ denota que a proteína AC está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $ACDA = 0/1/2$ denota que o o complexo heterodímero AC/DA está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $SCDA = 0/1/2$ denota que o o complexo heterodímero SC/DA está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
- $dl = 0/1/2$ denota que o gene para Delta está em nível de atividade baixo/padrão/alto.

-
- $DA = 0/1/2$ denota que o o cofator Daughterless (DA) está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
 - $SUH = 0/1/2$ denota que o o produto gênico SU(H) está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
 - $Delta = 0/1/2$ denota que a proteína Delta (ligante livre) está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
 - $Notch = 0/1/2$ denota que a proteína Notch (receptor livre) está em nível de atividade baixo/padrão/alto.
 - $Notch_Delta = 0/1/2$ denota que os os complexos Notch/Delta de membrana estão em nível de atividade baixo/padrão/alto.

Apêndice B

Atratores de Rede Intracelular do Sistema Delta-Notch

	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
a ₀	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
a ₁	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
a ₂	0	1	1	0	2	1	1	0	2	0	2	0	2	0	0	1	1	0	0
a ₃	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
a ₄	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
a ₅	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	0	1	0	1	0	0
	0	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
	0	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	0	1	1	1	0	0
a ₆	0	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	0	0	1	0	0	0
	0	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	0	1	0	1	0	0
a ₇	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
a ₈	0	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	0	0	1	1	0	0
a ₉	0	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	0	0	0	1	0	0
	0	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0
	0	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	0	0	1	1	0	0
a ₁₀	0	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0
	0	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	0	0	1	0	0
a ₁₁	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
a ₁₂	0	1	1	2	0	1	1	2	0	2	0	2	0	0	1	1	1	0	0
a ₁₃	0	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	0	1	1	1	0	0
a ₁₄	0	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	0	1	0	1	0	0
	0	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	0	0	1	0	0	0
	0	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	0	1	1	0	0
a ₁₅	0	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	0	0	1	0	0	0
	0	1	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	0	1	0	1	0	0
a ₁₆	0	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
a ₁₇	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
a ₁₈	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
a ₁₉	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
a ₂₀	1	1	1	0	2	1	1	0	2	0	2	0	2	1	0	1	1	1	1
a ₂₁	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
a ₂₂	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
a ₂₃	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	0	1	1	1	1
a ₂₄	1	1	1	2	0	1	1	2	0	2	0	2	0	1	1	1	1	1	1
a ₂₅	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1
a ₂₆	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	1	1
a ₂₇	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	2	2
a ₂₈	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	2	2
	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2	2	2
a ₂₉	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2
a ₃₀	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	2	2
a ₃₁	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2	2	2
	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	2	2
a ₃₂	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2
a ₃₃	2	1	1	0	2	1	1	0	2	0	2	0	2	2	0	1	1	2	2
a ₃₄	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	2	2
a ₃₅	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2	2	2
	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	2	2
a ₃₆	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	2	2
a ₃₇	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	2	2
a ₃₈	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2	2	2
	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	2	2
a ₃₉	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2
a ₄₀	2	1	1	1	2	1	1	0	2	0	2	0	2	2	0	1	1	2	2
a ₄₁	2	1	1	2	0	1	1	2	0	2	0	2	0	2	1	1	1	2	2
a ₄₂	2	1	1	2	1	1	1	2	0	2	0	2	0	2	1	1	1	2	2
a ₄₃	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2	2

Tabela B.1: Lista de atratores da rede intracelular. Nas linhas estão representados os atratores a_0, a_1, \dots, a_{43} e nas colunas as variáveis da rede, as quais são identificadas pelos inteiros $18, 17, \dots, 0$.

Apêndice C

Medidas da Dinâmica da Rede

Intracelular do Sistema Delta-Notch

	Período	Estados	Espaço	j. Éden	Densidade G	Máx. Altura	Máx. Grau Incidência
a ₀	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₁	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	8	378
a ₂	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₃	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	8	378
a ₄	1	4608000	3,568216032%	4528560	0.983	8	378
a ₅	3	172800	0,133808101%	165647	0.959	8	378
a ₆	3	2160	0,001672601%	2003	0.927	8	189
a ₇	1	9	6,96917E-06%	8	0.889	1	9
a ₈	1	4608000	3,568216032%	4528560	0.983	7	378
a ₉	3	172800	0,133808101%	165647	0.959	7	378
a ₁₀	3	2160	0,001672601%	2003	0.927	7	189
a ₁₁	1	9	6,96917E-06%	8	0.889	1	9
a ₁₂	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₁₃	1	4608000	3,568216032%	4528560	0.983	7	378
a ₁₄	3	172800	0,133808101%	165647	0.959	7	378
a ₁₅	3	2160	0,001672601%	2003	0.927	7	189
a ₁₆	1	9	6,96917E-06%	8	0.889	1	9
a ₁₇	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₁₈	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₁₉	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	8	378
a ₂₀	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₂₁	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	8	378
a ₂₂	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	10	378
a ₂₃	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	10	378
a ₂₄	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₂₅	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	10	378
a ₂₆	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₂₇	1	4761108	3,686775585%	4710572	0.989	7	378
a ₂₈	2	21852	0,016921149%	21359	0.977	7	324
a ₂₉	1	9	6,96917E-06%	8	0.889	1	9
a ₃₀	1	4761108	3,686775585%	4675013	0.982	8	378
a ₃₁	2	21852	0,016921149%	21197	0.97	8	324
a ₃₂	1	9	6,96917E-06%	8	0.889	1	9
a ₃₃	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₃₄	1	4761108	3,686775585%	4675013	0.982	8	378
a ₃₅	2	21852	0,016921149%	21197	0.97	8	324
a ₃₆	1	9	6,96917E-06%	8	0.889	1	9
a ₃₇	1	4761108	3,686775585%	4675013	0.982	10	378
a ₃₈	2	21852	0,016921149%	21197	0.97	8	324
a ₃₉	1	9	6,96917E-06%	8	0.889	1	9
a ₄₀	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	10	378
a ₄₁	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378
a ₄₂	1	4782969	3,703703704%	4696218	0.982	10	378
a ₄₃	1	4782969	3,703703704%	4731939	0.989	7	378

Tabela C.1: Nas linhas estão as bacias a_0, a_1, \dots, a_{43} e nas colunas, da esquerda para a direita: tamanho do período atrator, total de estados na bacia, percentagem do espaço de estados (considerando apenas os estados de saída constante e com expressão de DA e Notch constitutivas) ocupado pela bacia, número de estados que são do tipo jardim do Éden na bacia, a densidade dos estados do tipo jardim do Éden na bacia, máximo nível (altura) nas árvores transientes presentes na bacia e máximo grau de incidência encontrado na bacia.

Apêndice D

Tipos de Sinalização Celular

Em sinalização *autócrina*, as células sinalizadoras podem enviar sinais para células do mesmo tipo, o que implica que podem enviar sinais para si mesmas. Ou seja, neste tipo de sinalização uma célula libera moléculas sinalizadoras que podem atuar sobre os seus próprios receptores, tornando a célula sinalizadora, ao mesmo tempo, uma célula-alvo. Este tipo de sinalização é muito observado durante o desenvolvimento, quando, por exemplo, uma célula assume uma via de diferenciação e secreta sinais autócrinos para reforçar esta “decisão” de desenvolvimento.

Em sinalização *parácrina*, os ligantes secretados pela célula sinalizadora atuam em células-alvo proximamente localizadas, isto é, atuam em sua vizinhança. Este comportamento ocorre porque os sinais neste tipo de sinalização não difundem por grandes distâncias, o que é garantido por três razões: os ligantes ou são “capturados” e retidos pelas células-alvo vizinhas, ou são rapidamente degradados por enzimas extracelulares ou são imobilizados na matriz extracelular.

Em sinalização *endócrina*, os ligantes (denominados *hormônios*) são secretados pelas células sinalizadoras (chamadas de células endócrinas), na corrente sanguínea (no caso de animais) ou na seiva (no caso de plantas) e atingem células-alvo localizadas a grande distância da célula sinalizadora. Este tipo de sinalização é relativamente lento, pois depende de difusão e do fluxo sanguíneo.

Em sinalização *sináptica* os neurônios enviam impulsos elétricos (potenciais de ação) através dos axônios. Quando os impulsos atingem as extremidades dos axônios, estimulam suas terminações a secretarem um sinal denominado neurotransmissor.

Junções celulares especializadas ocorrem em vários pontos do contato célula-célula e

célula-matriz extracelular (CM) em todos os tecidos. Geralmente elas são classificadas em três grupos funcionais: a) *junções bloqueadoras*, que cuidam de selar as células unidas numa camada epitelial; b) *junções ancoradoras*, responsáveis por conectar mecanicamente as células (e os citoesqueletos) à CM e às células adjacentes e c) *junções comunicantes*, responsáveis pela passagem de sinais elétricos e químicos entre duas células adjacentes.

Um tipo de junção comunicante que nos interessa é a chamada *junção de fenda* (do inglês *gap junction*). Ela é encontrada em grande quantidade na maioria das espécies e tecidos animais e é constituída de uma fenda estreita e uniforme que separa as membranas próximas e justapostas de duas células adjacentes. Ela é entremeada por moléculas proteicas formando um canal, que permite a passagem direta de íons inorgânicos e outras pequenas moléculas (açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas) do citoplasma de uma célula para o citoplasma da outra. Esta conexão direta entre os citoplasmas acopla as células elétrica e quimicamente.

Na sinalização via junções de fenda as moléculas sinalizadoras atuam sobre as células adjacentes, levando a crer que estes sinais operam apenas nas células imediatamente vizinhas. No entanto, grupos de células podem acoplar-se por junções de fenda, de modo que os sinais podem ser propagados de célula para célula neste grupo através dos canais destas junções.