

NILSON JUNE LIMA

**MODELOS MATEMÁTICOS DO CICLO
CELULAR**



**DEPARTAMENTO DE MATEMÁTICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
2016**

NILSON JUNE LIMA

**MODELOS MATEMÁTICOS DO CICLO
CELULAR**



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Matemática*

SUPERVISOR: PROF. DOUTOR JOÃO NUNO TAVARES (FCUP)

DEPARTAMENTO DE MATEMÁTICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
2016

À minha querida mãe Vitória Maria Lima

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Basília dos Santos Lopez e à memória de Cândido Maria Lopes que mostraram ser para mim como verdadeiros pais. À memória da minha avó Maria Rosa Lima e do meu Benvindo Lima que foram pessoas que recordo com grande carinho. Aos meus irmãos Maria Helena, Fidel Lima, Amandio Lima, Marisia Lima, Patrício Lima e Danielson Lima pelos quais tenho grande amor. Ao meu supervisor João Nuno Tavares que me sugeriu este fascinante tema e me deu todo o apoio necessário para que essa tese pudesse ser bem sucedida. Ao meu grande professor e amigo da primária Celso Silva pelo qual aprendi muita coisa e que sempre me incentivou a avançar. Ao meu tio Henrique Lima que sempre gostou muito de mim. À Vera Mota, Joaquim Mota, Alcindo Lopes, Amílcar Lopes, Natália Lopes, Nelson Lopes, Samira Lopez, Nélida Lopes e Cátia Lopes que sempre foram pessoas importantes na minha vida. Á meu irmão Délson Neves que sempre foi um grande amigo e irmão. Aos Meus grandes Amigos Paulo Val-Martins , sua esposa Débora e também Alfredo amigos pelos quais me apeguei mais que a um irmão.

Resumo

Introdução: O ciclo celular é talvez o mecanismo mais importante e complexo da vida. Entender bem o ciclo celular pode revolucionar as ciências da vida e aumentar significativamente a qualidade de vida da humanidade. Visto que doenças como o cancro, a velhice, doenças auto-imunes; acontecem no ciclo celular entender bem este ciclo pode avançar significativamente o tratamento dessas doenças.

Trabalho: Esta tese tem como objetivo principal o estudo de dois métodos matemáticos para análise do ciclo celular – sistemas dinâmicos (teoria qualitativa de equações diferenciais ordinárias), e redes booleanas.

Resultados: Na parte quantitativa (i.e. EDO) chegamos a conclusão que o ciclo celular é um sistema regulado por ciclinas através duma interação com os seus antagonistas e adjuvantes. A regulação do ciclo celular é feita pelos ciclinas e os seus inibidores através de uma competição do tipo Antagonismo mútuo. Durante o avanço de fase o inibidor dessa fase vence a competição e na transição de fase a ciclina promotora de mudança de fase nessa fase vence a competição. O tipo de antagonismo é mutuamente exclusivo quer dizer que em fase estacionária ou está a ciclina ou está o seu inibidor de forma exclusiva. O tipo de antagonismo leva que o modelo booleano seja um excelente alternativa aos modelos quantitativos, visto que em estado estacionário as espécies ou estão ativos (1) ou inativos (0).

Contribuições: Todos os resultados foram reproduzidos por mim e o meu supervisor, exceto o resultado na Figura 4.17

Palavras-chave: cinética Bioquímica; pontos de Equilíbrio (Estados Estacionários); análise no plano de Fase; ciclos-limite; análise de bifurcação; checkpoints e regulação do ciclo celular; bi-estabilidade; transições irreversíveis no ciclo celular; interruptor da anáfase; Modelo Booleano do ciclo celular; modelo de Fauré, Naldi Chaouiya e Thieffry;

Abstract

Background: The cell cycle is maybe the most important and complex mechanism of life. Understanding well the cell cycle could revolutionize life sciences and significantly increase the quality of life of mankind. Since diseases such as cancer, aging, autoimmune diseases, happens in the cell cycle, well understand that cycle can significantly advance the treatment of these diseases.

Work: This thesis aims to study two mathematical methods for cell cycle analysis - Dynamic systems (qualitative theory of ordinary differential equations), and Boolean networks.

Results: In the quantitative part (i.e. ODE) came to the conclusion that the cell cycle is a system regulated by cyclins through an interaction with their antagonists and adjuvants. The regulation of the cell cycle is made by cyclins and their inhibitors by a competition type mutual antagonism. During the phase advance, phase inhibitor wins the competition and in the phase transition, phase change promoter cyclin wins the competition at that stage. The type of antagonism is mutually exclusive means that in steady state or is cyclin or is its inhibitor exclusively. The type of antagonism leads to the Boolean model as an excellent alternative to quantitative models, as steady-state species or are active (1) or inactive (0).

Contributions: All results were reproduced by me and my supervisor, except the result in Figure 4.17

Keywords: biochemical kinetics; equilibrium points (steady state); phase plane analysis; limit cycle; bifurcation analysis; checkpoints; regulation of cell Cycle; by-stability; irreversible transitions in the cell cycle; anaphase switch; Boolean model of cell cycle; model of Fauré, Naldi Chaouiya and Thieffry;

Conteúdo

1	Introdução	1
2	Modelação de Redes de Reações (Bio)Químicas	4
2.1	Redes de Reações Químicas	5
2.1.1	Redes Abertas e Fechadas	5
2.2	Comportamento Dinâmico das Redes de Reações	6
2.2.1	A Lei de Ação Massa	7
2.3	Cinética Bioquímica	8
2.3.1	Cinética Enzimática	8
2.3.2	Regulação da Atividade Enzimática	14
3	Análise Qualitativa de Modelos Matemáticos de Sistemas Dinâmicos	19
3.1	Pontos de Equilíbrio (Estados Estacionários)	19
3.2	Análise no Plano de Fase	19
3.2.1	Nulclinas	21
3.3	Estabilidade	22
3.3.1	Estabilidade dos estados estacionários	25
3.3.2	Estabilidade para sistemas não lineares (linearização)	28
3.4	Oscilações de Ciclo-Limite	30
3.5	Análise de bifurcação	32
4	O Ciclo Celular	35
4.1	Introdução	35
4.2	Fases ordenadas do ciclo celular	36
4.3	<i>Checkpoints</i> e regulação do ciclo celular	38
4.4	Um modelo muito simples (Nasmyth)	46
4.5	Bi-estabilidade no ciclo celular	49
4.6	Transições irreversíveis no ciclo celular	51
4.7	Dois estados alternativos	53
4.8	A transição G2/M	54
4.9	Interruptor da anáfase	55
5	Modelos Booleanos do ciclo celular	59
5.1	Introdução	59
5.2	Dois exemplos	61
5.3	Modelo Booleano do Ciclo Celular	61
5.4	Modelo de Fauré, Naldi, Chaouiya e Thieffry	67

5.5 Apêndice – Álgebra Booleana	71
6 Conclusão	73
Glossário	74
Bibliografia	76
Índice	78

Lista de Figuras

2.1	Diagrama de processos de uma rede de reação	4
2.2	Rede de reação fechada	5
2.3	Rede de reação aberta	6
2.4	Modelo de Lotka-Volterra	9
2.5	Diagrama de reação substrato único- enzima	10
2.6	Simulação modelo de Michaelis-Menten	11
2.7	Gráfico da lei de Michaelis-Menten	12
2.8	Diagrama de reação de dois substratos – enzima e ordem compulsória . . .	14
2.9	Diagrama SBGN de reação com inibição competitiva	15
2.10	Simulação do modelo com inibição competitiva	16
2.11	Lei de velocidade para a inibição competitiva	17
2.12	Diagrama SBGN da regulação alostérica	18
2.13	Lei de velocidade para a regulação alostérica	18
3.1	Diagrama de inibição alostérica	20
3.2	Simulação do modelo de inibição alostérica	21
3.3	Campo de direções para o modelo de inibição alostérica	22
3.4	Nulclinas para o modelo de inibição alostérica	23
3.5	Rede SBGN com antagonismo mútuo	24
3.6	Simulação de modelo de antagonismo mútuo com inibição assimétrica . . .	24
3.7	Simulação de modelo de antagonismo mútuo com inibição simétrica	25
3.8	Gráfico da aproximação linear de uma função real de variável real	28
3.9	Gráfico da aproximação linear de uma função de duas variáveis	29
3.10	Diagrama SBGN de reação auto-catalítica	31
3.11	Simulação de modelo auto-catalítico com não-linearidade forte	32
3.12	Diagrama de continuação para modelo de regulação alostérica	33
3.13	Diagrama de bifurcação para modelo de antagonismo mútuo	34
4.1	Ciclo celular eucariótico. <i>Lewin's Cells</i> [8]	35
4.2	Fases do ciclo celular sidebyside gap	37
4.3	Prófase	37
4.4	Prometáfase	38
4.5	Metáfase	38
4.6	Anáfase	38
4.7	Telófase	39
4.8	Citocinese	39
4.9	Ciclo celular eucariótico com os <i>checkpoints</i> (Tyson e Novak, 2013) [12] . .	40

4.10 Mecanismo de regulação de um complexo CDK:ciclina	41
4.11 Motivo Síntese/Degradação com resposta linear	42
4.12 Motivo Ativação/Desativação com resposta hiperbólica	43
4.13 Motivo Ativação/Desativação com resposta sigmoidal	44
4.14 Motivos ativação mútua e antagonismo mútuo	45
4.15 Ciclo celular com os <i>checkpoints</i> (Nasmith)	46
4.16 Diagrama de fase para o modelo de Nasmith	48
4.17 Diagrama de bifurcação para o modelo de Nasmith	49
4.18 Interação CycB:CDK1	52
4.19 Mecanismo de controlo molecular da levedura	53
4.20 Dois estados alternativos	54
4.21 <i>Checkpoint</i> G2/M	55
4.22 <i>Checkpoint</i> da anáfase	57
5.1 Modelo simples de rede Booleana	62
5.2 Um outro modelo de rede Booleana	63
5.3 Modelo Booleano 1 do ciclo celular	63
5.4 Grafo do modelo Booleano 1 do ciclo celular	64
5.5 Modelo Booleano 2 do ciclo celular	65
5.6 Grafo do modelo Booleano 2 do ciclo celular	66
5.7 Modelo de Fauré et al sidebyside gap	67
5.8 Grafo com alguns estados do modelo de Fauré	69

Lista de Tabelas

4.1	Valor dos parâmetros para os modelos	46
4.2	Actividade de alguns componentes do ciclo celular	50
4.3	Valor dos parâmetros para a interação CycB e Cdh1	51
4.4	Valor dos parâmetros para o modelo Wee1-CycB-Cdc25	55
4.5	Valor dos parâmetros para o modelo Mad2-Cdc20	56
4.6	Componentes Moleculares do ciclo celular	58
5.1	Modelo Booleano Vs Modelo Cinético contínuo	61
5.2	Atratores para o modelo da Figura 5.3	64
5.3	Atratores para o modelo na Figura 5.5	66
5.4	Atratores para o modelo da Figura 5.7	70
5.5	Álgebra Booleana	71

1 Introdução

Os matemáticos têm revelado um interesse crescente pela biologia. O reflexo desta cooperação, cada vez mais ativa, é a criação de um novo ramo científico chamado *Systems Biology*, que traduzimos por *Teoria de Sistemas em Biologia* (TSB). De facto, o objetivo deste ramo é modelar os processos moleculares e celulares de uma maneira análoga à que desde há muito acontece em engenharia, na área conhecida por Engenharia de Sistemas.

A Teoria de Sistemas em Biologia é um novo paradigma metodológico que transformou a investigação em Biologia, no século XXI, sobretudo em dois aspetos principais: por um lado, disponibiliza ferramentas computacionais para análise, integração e interpretação de hipóteses e dados biológicos. Por outro lado, induziu a formulação de novos conceitos teóricos e a aplicação dos existentes, tais como conceitos da teoria de sistemas dinâmicos, teoria de controlo, análise de ruído molecular, robustez e sensibilidade dos sistemas dinâmicos, redes complexas de interações e muitos outros, a novas questões,

A abordagem sistémica em biologia não é nova, mas recentemente ganhou novo impulso sobretudo devido ao avanço notável dos métodos experimentais e computacionais, cada vez mais engenhosos e poderosos. Tem como suporte, o conhecimento biológico acumulado, cada vez mais detalhado, a criação de novas técnicas experimentais em genómica e proteómica, a tradição da modelação matemática de processos biológicos, e o poder exponencialmente crescente do computador (como pré-requisito para a criação de enormes bases de dados e análise de sistemas de grande escala).

Nos anos recentes o ciclo celular (CC) tem sido alvo de intensa investigação por parte de várias comunidades científicas - biólogos, clínicos e ainda matemáticos e informáticos. O ciclo de divisão celular é um processo fundamental da biologia celular e uma compreensão pormenorizada do sua função, regulação e outros mecanismos subjacentes é fundamental para muitas aplicações em biotecnologia e medicina. A possibilidade de perceber como controlar o ciclo celular para obter uma certa resposta, poderá representar um avanço revolucionário em técnicas clínicas que permitirão idealmente retardar a velhice ou, pelo menos, retardar doenças degenerativas, obter cura para o cancro e doenças auto-imunes, reforçar as defesas naturais contra qualquer tipo de doenças, etc. De facto, sendo o desenvolvimento do cancro associado a uma perda de controlo sobre o sistema de regulação do ciclo celular, o estudo da mecanismos e funções do ciclo celular eucariótico ganhou maior atenção nas últimas décadas. Uma compreensão detalhada dos mecanismos de crescimento do tumor subjacente, da reparação de danos do ADN, da sinalização intercelular e outros processos relacionados do ciclo celular, é, portanto, de suma importância para o diagnóstico, tratamento e prognóstico de cancro.

O sistema de regulação subjacente do CC tem um grau de complexidade enorme, so-

bretudo devido aos múltiplos agentes e processos bioquímicos em jogo: (i). um grande número de enzimas e proteínas estão envolvidas no ciclo celular; (ii). um grande número de interações existem entre as proteínas e enzimas; (iii). as proteínas e enzimas interagem de maneiras diferentes, realizando funções ativadoras, inibidoras ou outras formas de modulação dos processos envolvidos.

Esta grande complexidade torna a caracterização deste sistema muito difícil. Uma vez que uma análise abrangente dos mecanismos moleculares envolvidos no ciclo celular é demasiado complexa para ser realizada de forma intuitiva, as técnicas de modelação matemática e computacional são essenciais. Uma abordagem matemática e computacional para a compreensão do ciclo celular tem dois grandes objetivos. Primeiro, fornecer um modelo explicativo, qualitativo e quantitativo, que descreva o funcionamento do mecanismo de regulação do ciclo celular. As simulações em computador são um auxiliar insubstituível confrontando observações experimentais com o comportamento esperado obtido a partir de um modelo teórico. O segundo objetivo refere-se a modelos preditivos capazes de extrapolar, a partir de um dado estado da célula, qual o comportamento futuro das suas componentes.

Nesta tese faremos uma revisão e análise de duas das abordagens recentes na tentativa de modelar a regulação do ciclo celular por meio de redes de interação bioquímica - uma, usando técnicas de teoria de sistemas dinâmicos - (equações diferenciais ordinárias (EDO's) e análise qualitativa do seu comportamento - análise de estabilidade, bifurcação e sensibilidade), e outra, usando Redes Booleanas.

Neste tese usamos duas ferramentas (software) muito úteis: [Cell Designer](#) e [COPASI](#) na modelação, simulação e análise de redes bioquímicas com equações diferenciais ordinárias, e ainda o pacote [BoolNet](#) do [R](#), para Redes Booleanas.

Passamos de seguida a uma curta descrição do conteúdo de cada capítulo. No capítulo 2 descrevemos sumariamente os principais resultados sobre redes de reações bioquímicas, nomeadamente a modelação de alguns processos enzimáticos¹ mais simples, através de EDO's, usando a lei de *ação-massa*. Neste capítulo deduzimos e analisamos ainda algumas leis fundamentais da bioquímica tais como: lei de *Michaelis-Menten* para substrato único, lei de *Michaelis-Menten* para dois substratos, leis da *competição inibidora* e de *regulação alostérica*.

No capítulo 3 fazemos um resumo dos resultados principais sobre análise qualitativa de sistemas dinâmicos (deterministas, modelados com EDO's) para a aplicar à análise de redes de reações. Neste capítulo caracterizamos o sistema no que diz respeito a estabilidade, fazemos a análise no plano de fase e a análise de bifurcação (curva de dose-resposta). Concluímos que, em certas condições, frequentes na prática, as redes bioquímicas conduzem a dois tipos de resposta de longo curso: uma resposta bi-estável que pode ser implementada através de uma ativação mútua (cooperação) ou por um antagonismo mútuo, e um ciclo limite onde as espécies interagem num contraciclo periódico alternando entre um mínimo e um máximo. Visto que as redes celulares são altamente não lineares, descrevemos como

¹os processos celulares são quase na sua totalidade controladas por enzimas, daí a necessidade de entender as formas mais básicas da sua atuação.

esses sistemas podem ser linearizados para estudar os seus pontos de equilíbrio. Os capítulos 2 e 3 foram fortemente inspirados pelo excelente livro de Brian Ingalls “*Mathematical Modeling in Systems Biology: An Introduction*”, MIT Press, 2013[6].

No capítulo 4 modelamos alguns processos e mecanismos de interação das componentes mais importantes do ciclo celular, inspirados sobretudo pelos trabalhos de John Tyson e Béla Novák, indicados na bibliografia. Neste capítulo vemos que a resposta de longo curso é um sistema bi-estável implementado por um antagonismo mútuo (feedback negativo duplo), como no caso **CycB vs CKI**, ou ativação mútua (cooperação), como no caso **CycB vs Cdc25**. Neste capítulo concluímos que os *checkpoints* são os mecanismos mais importantes do ciclo celular. Uma melhor compreensão desses checkpoints, traduzir-se-á em grandes avanços nas aplicações clínicas, em particular, e mais uma vez, nas terapêuticas contra cancro.

Todas as simulações destes três capítulos foram feitas em **COPASI**, e as redes desenhadas usando **Cell Designer** e ainda várias ferramentas *tex*.

Finalmente no quinto e último capítulo modelamos o ciclo celular usando Redes Booleanas. Quando as redes bioquímicas têm centenas ou milhares de espécies, dá-se uma “explosão” de parâmetros cinéticos que as torna praticamente intratáveis, mesmo com métodos de simulação computacional. Como para construir uma rede Booleana, é necessária menos informação, sobretudo sobre os parâmetros cinéticos (rate constants), que surgem nas redes bioquímicas e devido à sua aparente simplicidade, os modelos Booleanos fornecem uma alternativa muito interessante aos modelos de EDO’s. A desvantagem é que estes modelos só dão informação qualitativa e, por isso, são limitados nas conclusões que deles se pode deduzir. Será analisado com detalhe o modelo de Fauré, Naldi, Chaouiya e Thieffry. Neste capítulo as simulações foram feitas com o pacote **BoolNet** do **R**. A tese termina com um pequeno glossário e com a bibliografia utilizada.

2 Modelação de Redes de Reações (Bio)Químicas

Os modelos de interação para fenómenos moleculares em Biologia celular e molecular podem ser representadas por diagramas de interação, como na Figura 2.1. Estes diagramas são em geral do tipo *diagramas de processos*, desenvolvidos pelo projeto SBGN (Systems Biology Graphical Notation. Ver <http://www.sbgm.org/> e [kitano]), implementados em CellDesigner (<http://www.celldesigner.org/>) entre outros. Quando representam redes bioquímicas e genéticas as componentes desses diagramas são *espécies moleculares*, (os nós do grafo), que podem ir das moléculas mais simples, tais como iões, às moléculas complexas tais como enzimas e outras formas proteicas. Um diagrama de interação mostra que espécies existem no sistema e também como elas interagem umas com as outras. As interações são geralmente representadas por diferentes tipos de arcos que podem representar um vasta gama de processos tais como: *ligação*, *separação*, *dissociação*, *catalização*, *inibição*, *ativação*, *desativação*, etc.

A velocidade com que um determinado processo ocorre depende da abundância das espécies moleculares nele envolvidas, e que devem ser explícitas na visualização do diagrama. À medida que o tempo avança, a concentração dessas espécies também muda levando a mudanças na velocidade dos processos. Quando os sistemas são simples podemos entender o comportamento dinâmico de forma intuitiva. Contudo para redes bioquímicas complexas, que em geral envolvem feedback, o diagrama de interação embora seja útil, pois facilita a modelação, não permite deduzir imediatamente a evolução dinâmica das concentrações das espécies nem dos processos envolvidos. Nestes casos uma descrição precisa de como o sistema se comporta só é possível através de uma abordagem quantitativa. A abordagem pode ser determinística, através de sistemas de equações diferenciais, ou estocástica devido a natureza aleatória das reações químicas.

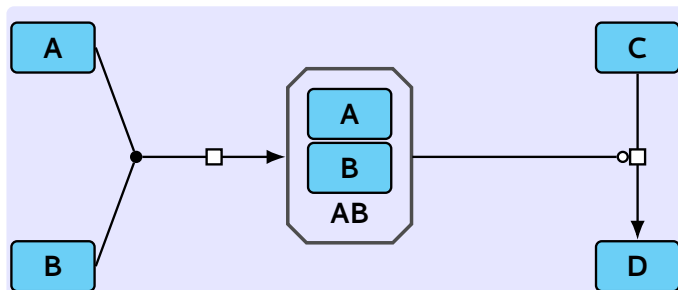


Figura 2.1 Diagrama (de processos) de uma rede de reações onde as espécies A e B juntam-se formando o complexo AB que, por sua vez, catalisa a produção da espécie D a partir da C.

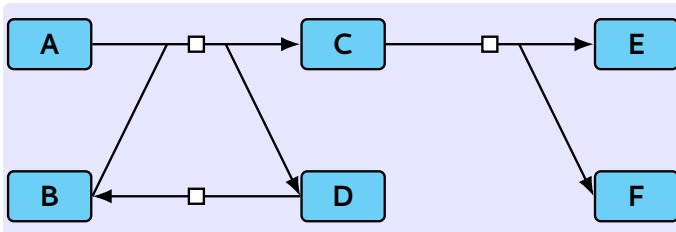
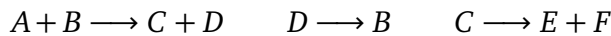


Figura 2.2 Rede de reação fechada.

2.1 Redes de Reações Químicas

Uma rede de reações químicas como o nome indica é um conjunto de reações químicas em que um conjunto de espécies químicas (moléculas distintas) interagem entre si. Um exemplo de uma rede de reações químicas pode ser o seguinte:

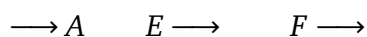


No exemplo acima as reações são *irreversíveis* – as setas apontam num único sentido. A forma como as espécies interagem é chamada uma *arquitetura*. Quando arranjamos as reações na forma de um diagrama de interações (ou de processos, tipo SBGN) a estrutura de rede torna-se aparente. Este diagrama é mostrado na Figura 2.2

2.1.1 Redes Abertas e Fechadas

Uma rede é *fechada*, se os reagentes e produtos das reações estiverem todos "dentro" da rede, isto é, não há trocas com o meio exterior à rede. Para essas redes o comportamento de estado estacionário é o *equilíbrio térmico* – um estado onde, para cada espécie, a soma das velocidades das reações é zero ou seja cada espécie é produzida à mesma taxa que é consumida. A figura 2.2 mostra-nos um exemplo duma rede fechada.

Em contraste, a grande maioria de redes bioquímicas são abertas — elas trocam material com o ambiente envolvente e chegam a um estado de equilíbrio que envolve um fluxo estacionário através da rede ou seja a quantidade de matéria que entra é igual à que sai da rede. Este estado é chamado de *equilíbrio dinâmico*. Um exemplo de rede aberta pode ser obtido adicionando algumas reações à rede anterior, como por exemplo



resultando na rede da Figura 2.3. Estas reações adicionais indicam que existe material que está sendo trocado com o "ambiente exterior" e são chamadas de *reações de troca*.

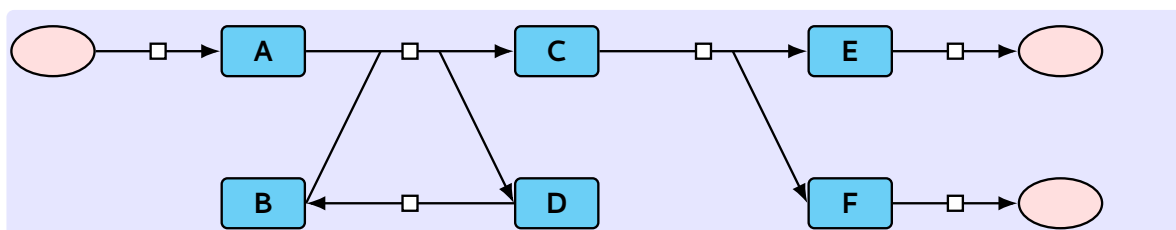


Figura 2.3 Rede de reação aberta. Na rede a oval rosa representa o meio exterior.

2.2 Comportamento Dinâmico das Redes de Reações

Consideremos um compartimento com moléculas de várias espécies que interagem entre si, de acordo com uma certa rede de reações. Por simplicidade supomos que o seu volume é fixo. No início do processo as espécies químicas têm concentrações iniciais especificadas. Se quisermos saber a concentração das espécies num determinado instante, após o início do processo, necessitamos de saber a velocidade com que cada reação da rede ocorre. A velocidade de cada reação depende das concentrações dos reagentes e também das condições físico-químicas (e.g., temperatura, PH, etc.). Iremos supor que o ambiente físico-químico não muda (o que é uma boa aproximação para a célula), o que permitirá utilizar na modelação matemática leis de velocidades que dependem somente das concentrações dos reagentes. Vamos ainda assumir as duas hipóteses suplementares seguintes:

1. O volume onde ocorrem as reações está “bem agitado”, isto é, as espécies estão distribuídas de forma uniforme em todo o volume e, por isso, a velocidade de cada reação é independente da posição no espaço.
2. OS números moleculares iniciais de cada espécie são de tal forma elevados, que podemos descrever a abundância molecular por uma concentração dessa espécie que varia continuamente (em oposição a números moleculares inteiros pequenos).

A primeira destas hipóteses é referida como *homogeneidade espacial*, e tipicamente acontece em experiências laboratoriais (*in silico*). Pode ser considerada como uma boa aproximação do ambiente numa célula, onde a difusão atua rapidamente misturando as componentes moleculares intervenientes.

A segunda hipótese é referida como *hipótese de continuidade*. Permite tratar mudanças discretas no número de moléculas aproximando-as por mudanças contínuas da concentração. Essa premissa é perfeitamente válida quando estão envolvidas quantidades molares de reagentes e é apropriado para espécies com números moleculares acima dos milhares.

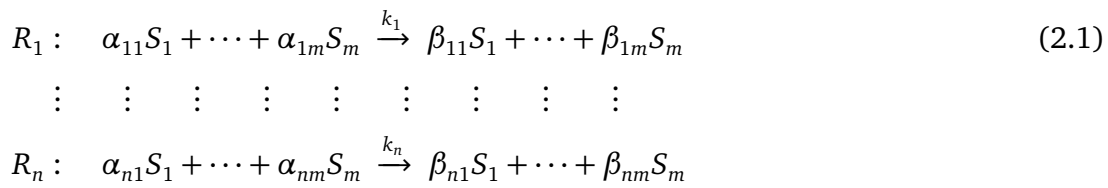
Iremos construir a nossa estrutura de modelação sob estas duas hipóteses.

2.2.1 A Lei de Ação Massa

Num volume fixo, bem agitado e sob a hipótese de continuidade, uma descrição simples das velocidades de reação é dada pela chamada:

Lei de ação massa: a velocidade de uma reação química é proporcional ao produto das concentrações dos reagentes.

Usando S_i para denotar a espécie i , com $i = 1, \dots, m$, $s_i = [S_i]$ para denotar a concentração da espécie i , R_j para denotar a reação j , com $j = 1, \dots, n$, α_{ij} o coeficiente estequiométrico da espécie i como reagente na reação j , β_{ij} o coeficiente estequiométrico da espécie i como produto na reação j , podemos escrever a rede de reações como:



e daqui podemos escrever as velocidades de cada reação como:

$$v_j = k_j \prod_{i=1}^m s_i^{\alpha_{ji}}, \quad j = 1, \dots, n \quad (2.2)$$

Matriz estequiométrica : é uma matriz com m linhas e n colunas onde cada entrada a_{ij} é a diferença dos coeficientes da espécie i como produto na reação j e essa mesma espécie como reagente na mesma reação (i.e. $a_{ij} = \beta_{ij} - \alpha_{ij}$). Então podemos escrever a matriz estequiométrica como :

$$A = \begin{array}{c} S_1 \\ \vdots \\ S_m \end{array} \begin{bmatrix} R_1 & \cdots & R_n \\ a_{11} & \cdots & a_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & \cdots & a_{mn} \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

Sendo $\mathbf{s} = [s_1 \cdots s_m]^T$, o vetor das concentrações das espécies e $\mathbf{v} = [v_1 \cdots v_n]^T$ o vetor das velocidades das reações chegamos ao seguinte sistema de equações diferenciais:

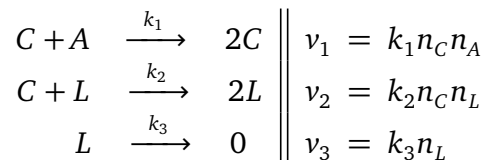
$$\begin{bmatrix} \dot{s}_1 \\ \vdots \\ \dot{s}_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & \cdots & a_{mn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ \vdots \\ v_n \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

Exemplo: Lotka- Volterra

Este sistema consiste de duas espécies em interação: $S_1 = C$ (a preza = Cordeiro) e $S_2 = L$ (o predador = Lobo). O alimento A está disponível para a preza C que se reproduz

a uma taxa constante k_1 , depois de ter comido uma unidade de A. Um encontro entre um Lobo L e um Cordeiro C, resulta no desaparecimento do Cordeiro C e uma replicação do Lobo L, a uma taxa constante k_2 . Esta é a única forma do Cordeiro C morrer, enquanto que os Lobos L têm uma morte natural a uma taxa constante k_3 . Supõe-se que o alimento A se renova permanentemente, de tal forma que o número de unidades n_A , se mantém constante durante o tempo de observação do sistema.

Sejam $n_C(t)$ e $n_L(t)$, respetivamente, o número de Cordeiros e Lobos, no instante t . A rede de reações e taxas de conversão, de acordo com a lei de ação-massa, são



Focando o nosso interesse apenas em $S_1 = C$ e $S_2 = L$, a matriz estequiométrica \mathbf{S} e o vetor taxa de conversão, \mathbf{v} , são respetivamente

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{v} = \begin{bmatrix} k_1 n_C n_A \\ k_2 n_C n_L \\ k_3 n_L \end{bmatrix}$$

As equações diferenciais ordinárias (EDOs) que governam a dinâmica de n_C e n_L são

$$\begin{cases} \frac{dn_C}{dt} = (k_1 n_A - k_2 n_L) n_C \\ \frac{dn_L}{dt} = (k_2 n_C - k_3) n_L \end{cases} \quad (2.5)$$

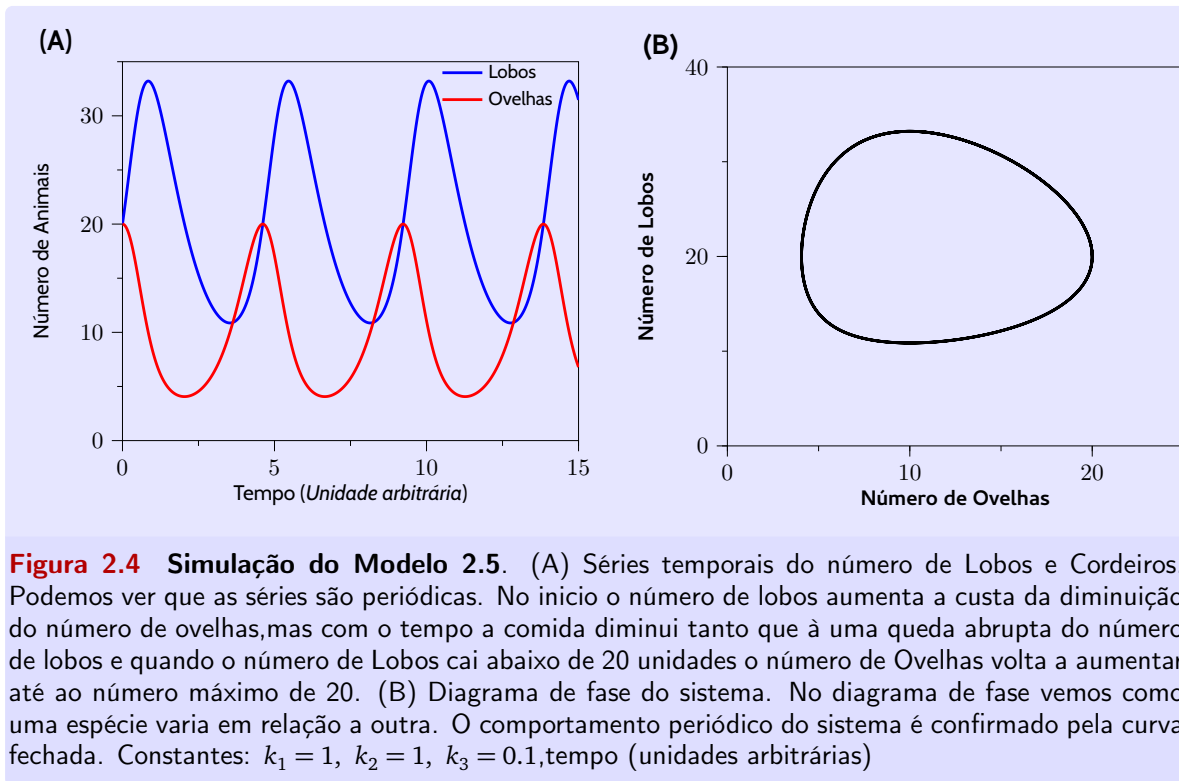
Uma simulação deste modelo é mostrada na Figura 2.4. A simulação mostra um comportamento periódico do número de espécies e confirma que não há extinção de espécies no modelo de Lotka-Volterra.

2.3 Cinética Bioquímica

O estudo das velocidades das reações químicas é chamado *Cinética Química*. Na secção anterior nós usamos a lei de ação massa para estabelecer a velocidade de reações químicas. Nesta secção iremos desenvolver outras leis de velocidade aplicáveis, em certas circunstâncias, a processos bioquímicos.

2.3.1 Cinética Enzimática

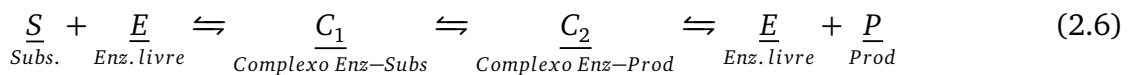
A grande maioria das reações que ocorrem dentro da célula são catalisadas por enzimas (que são proteínas). Enzimas catalisam as reações ao ligarem-se aos reagentes, chamados *substratos*, deste modo facilitando a sua conversão nos *produtos* da reação. A catálise enzimática reduz a barreira energética, ou *energia de ativação*, associada à reação.



Cinética de Michaelis-Menten

Nesta secção vamos usar redução do modelo por *separação de escalas temporais* para formular uma lei de velocidade que descreve reações catalisadas por enzimas. A primeira descrição foi feita em 1913 por Leonor Michaelis e Maud Menten. A lei resultante é chamada de *cinética de Michaelis-Menten*. Do ponto de vista computacional, para realizar a separação de escalas temporais simulamos o modelo completo no software Copasi e depois executamos a tarefa de separação de escalas temporais por um dos 3 métodos implementados nessa ferramenta.

Os eventos químicos individuais envolvidos numa reação com um único substrato catalisado seguem o seguinte esquema:



Na nossa análise inicial iremos fazer duas simplificações. Primeiro, iremos juntar os dois complexos C_1 e C_2 , assumindo que o tempo de conversão $C_1 \leftrightarrow C_2$ é pequeno, quando comparado com os tempos de associação e dissociação. Segundo, iremos supor que o produto P nunca se liga a enzimas livres. A representação SBGN, em CellDesigner é a seguinte

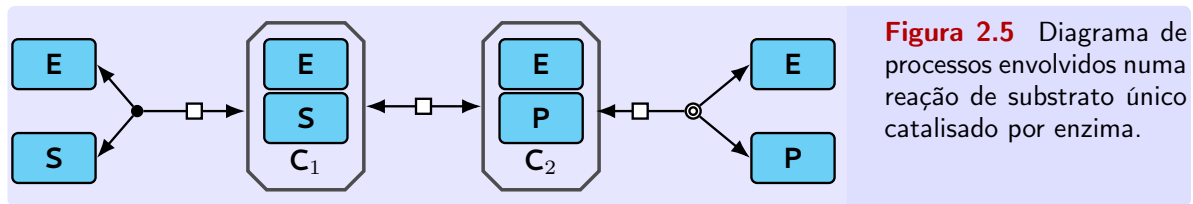


Figura 2.5 Diagrama de processos envolvidos numa reação de substrato único catalisado por enzima.

Essas duas premissas conduzem à rede simplificada



A constante k_2 é chamada *constante catalítica enzimática* (às vezes denotada por k_{cat}).

Aplicando a lei de ação massa e usando letras minúsculas para simbolizar concentrações, obtemos o seguinte sistema de equações diferenciais para o modelo:

$$\begin{cases} \dot{s} = -k_1 s e + k_{-1} c \\ \dot{e} = -k_1 s e + k_{-1} c + k_2 c \\ \dot{c} = k_1 s e - k_{-1} c - k_2 c \\ \dot{p} = k_2 c \end{cases} \quad (2.8)$$

Representemos por e_T a concentração total de enzima: $e_T = e + c$. Como a enzima não é consumida no processo, e_T é constante — a enzima é uma quantidade conservada. Escrevendo $e(t) = e_T - c(t)$, podemos usar essa lei de conservação para eliminar a equação diferencial para $e(t)$, ficando

$$\begin{cases} \dot{s} = -k_1 s (e_T - c) + k_{-1} c \\ \dot{c} = k_1 s (e_T - c) - k_{-1} c - k_2 c \\ \dot{p} = k_2 c \end{cases} \quad (2.9)$$

Mostramos uma simulação desse modelo na figura 2.6A. O gráfico da evolução temporal mostra uma separação de escalas temporais. Na escala temporal rápida, o substrato S e a enzima livre E associam-se de forma quase instantânea para formar o complexo C . Na escala temporal lenta, S é convertida em P . Essa separação de escalas temporais é tanto mais evidente quanto maior for a concentração de substrato em comparação com a concentração de enzima. Iremos usar essa separação de escalas temporais para redução do modelo. Michaelis e Menten aplicaram uma aproximação de equilíbrio rápido para a reação associação/dissociação ($S + E \leftrightarrow C$). Nós iremos usar o software Copasi e usar a tarefa "time scale separation" pelo método ILDM (Deuffhard) para fazer a redução do modelo.

A separação de escalas temporais, evidente na figura 2.6A, tem duas fontes. A primeira é uma diferença das constantes temporais (tempos característicos) das reações individuais — $(1/(k_1 + k_{-1}))$ para a associação/dissociação $S + E \leftrightarrow C$, e $1/k_2$ para a síntese de produto

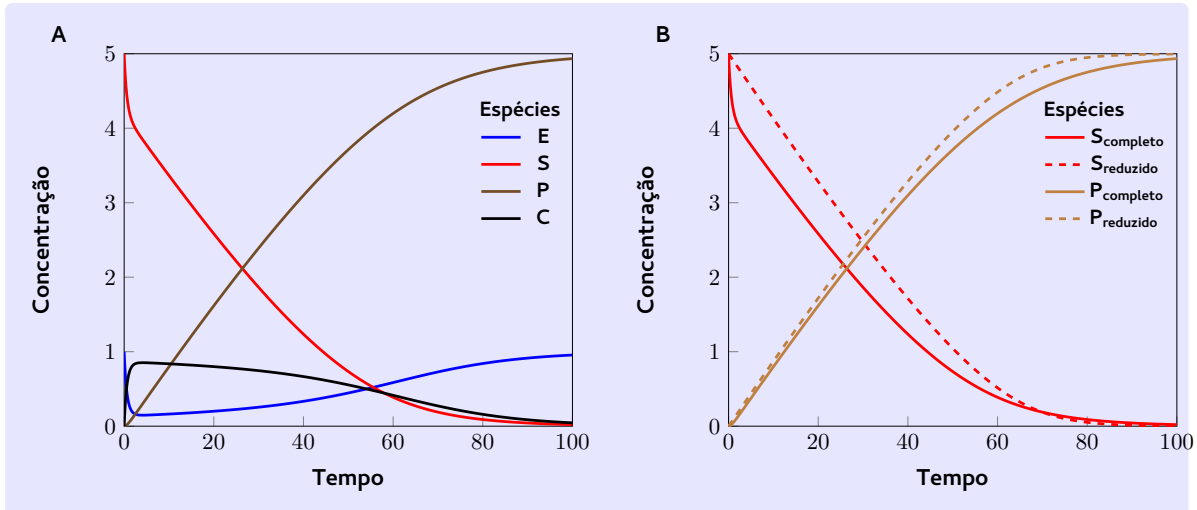


Figura 2.6 (A) Simulação de catálise enzimática. Uma separação de escala temporal é evidente. Na escala temporal rápida o complexo C atinge um estado quasi-estacionário. A reação $S \rightarrow P$ prossegue na escala temporal lenta. (B) Aproximação de Michaelis-Menten de uma reação catalisada por enzima $S \rightarrow P$. O Modelo completo é simulado como em (A), usando a lei de ação massa, em B comparamos o gráfico das espécies no modelo completo (ação massa) e no modelo reduzido (Michaelis-Menten). O modelo reduzido fornece uma boa aproximação. Foram utilizadas as mesmas constantes e condições iniciais em ambos os modelos. Constantes: $k_1 = 0.3$ (concentração⁻¹ · tempo⁻¹), $k_{-1} = 0.1$ (tempo⁻¹), $k_2 = 0.1$ (tempo⁻¹). As unidades são arbitrárias.

$C \rightarrow P$). A segunda é uma diferença nas concentrações iniciais de substrato e enzima. Na maior parte das reações celulares, o substrato é de longe mais abundante do que a enzima ($s \gg e_T$). Conseqüentemente, o complexo enzima-substrato rapidamente entra em equilíbrio relativamente ao *substrato mais abundante*. o complexo C pode pois ser considerado em estado quasi-estacionário.

No estado quasi-estacionário a variável $c(t) = c^{qss}$ deixa de seguir uma lei diferencial e passa a relacionar-se com as outras variáveis do sistema de acordo com

$$0 = k_1 s (e_T - c^{qss}) - k_{-1} c^{qss} - k_2 c^{qss}$$

Resolvendo em ordem a $c^{qss}(t)$, encontramos

$$c^{qss}(t) = \frac{k_1 e_T s(t)}{k_{-1} + k_2 + k_1 s(t)}$$

Substituindo esta expressão em (2.9) obtemos

$$\begin{cases} \dot{s} = -\frac{k_2 k_1 e_T s}{k_{-1} + k_2 + k_1 s} \\ \dot{p} = \frac{k_2 k_1 e_T s}{k_{-1} + k_2 + k_1 s} \end{cases} \quad (2.10)$$

Este modelo reduzido descreve $S \rightarrow P$ como uma única reação (não elementar)¹. A respetiva lei da velocidade é chamada **lei de Michaelis-Menten**. A figura 2.6B mostra o comportamento desse modelo reduzido em comparação com o modelo completo (2.9).

Definimos agora $V_{\max} = \lim_{s \rightarrow \infty} \dot{p} = k_2 e_T$, como a velocidade limite (ou máxima) da reação, e $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ como a *constante de Michaelis* (ou constante de *semi-saturação*), o que nos permite escrever a lei de Michaelis-Menten na forma

$$V_{S \rightarrow P} = \frac{k_2 k_1 e_T s}{k_{-1} + k_2 + k_1 s} = \frac{V_{\max} s}{K_m + s} \quad (2.11)$$

Esta lei de velocidades é chamada *hiperbólica* porque a curva é uma hipérbole, como se pode ver na figura 2.7

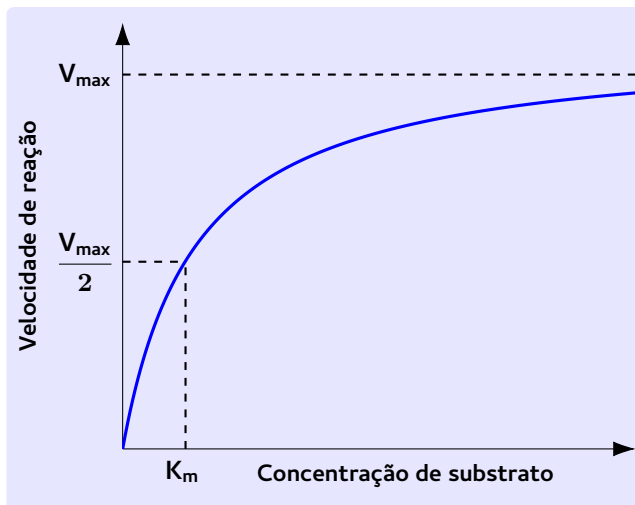


Figura 2.7 Lei de velocidade de Michaelis-Menten para a reação de substrato único catalisado por enzima. A velocidade da reação aproxima-se da velocidade máxima V_{\max} , à medida que a concentração de substrato aumenta. A constante de Michaelis K_m é a concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é metade da velocidade máxima.

Ordem cinética. A ordem cinética de um reagente, quando a velocidade da reação é dada pela lei de ação massa, é a potência à qual a concentração desse reagente está elevada na lei de velocidade. Esta noção pode ser generalizada como se segue. Se s é a concentração de um substrato, numa reação cuja velocidade é $v(s)$, então a ordem cinética de s é

$$\text{Ordem cinética} = \frac{s}{v} \frac{dv}{ds} \quad (2.12)$$

Usando esta definição, a ordem cinética do substrato s na lei de velocidade de Michaelis-Menten é

$$\frac{s}{\frac{V_{\max} s}{K_m + s}} \cdot \frac{d}{ds} \left(\frac{V_{\max} s}{K_m + s} \right) = \frac{K_m + s}{V_{\max} s} \cdot \frac{V_{\max}(K_m + s) - V_{\max} s}{(K_m + s)^2} = \frac{K_m}{K_m + s} \quad (2.13)$$

Em contraste com a ação-massa, essa ordem cinética varia com a concentração de substrato. Em particular, quando a concentração é muito pequena, quando comparada com

¹reações elementares são governadas pela lei de ação massa

K_m : $s \ll K_m$, a ordem cinética é aproximadamente 1 (porque $K_m + s \approx K_m$); nesse caso a curva cresce de uma forma quase linear e diz-se que a enzima está operando em *primeira ordem*. Reciprocamente, quando $s \gg K_m$, a ordem cinética é aproximadamente 0; neste caso a curva é praticamente horizontal, a enzima passa a estar saturada e diz-se que a enzima está operando em *ordem zero*. Estas considerações estão em pleno acordo com a Figura 2.7

Reações com Dois Substratos

A maioria das reações catalisadas por enzima envolve mais do que um substrato. Para descrever a catálise enzimática dessas reações, necessitamos de generalizar a nossa descrição anterior sobre cinética de Michaelis-Menten.

A catálise de uma reação irreversível de dois substratos $A + B \rightarrow P + Q$ envolve dois eventos de associação distintos: cada substrato necessita de se ligar à enzima catalisadora. (Não consideramos colisões trimoleculares nas quais ambos os substratos se ligam à enzima em simultâneo, por serem muito raras e portanto negligenciáveis). O processo catalítico pode seguir caminhos diversos incluindo os seguintes:

Ordem compulsória – O substrato A liga-se à enzima livre, formando o complexo EA . O substrato B liga-se ao complexo EA , formando um complexo ternário (i.e., trimolecular) EAB . Este complexo é então convertido no complexo EPQ do qual saem os produtos.

Ordem aleatória – Qualquer um dos substratos pode ligar-se primeiro à enzima. Os produtos são libertados do complexo EPQ .

Deslocamento duplo – (ou *ping-pong*) – Neste caso o substrato A liga-se à enzima livre formando o complexo EA . A enzima é então modificada (e.g., por ganhar um grupo funcional de A), e então o produto P é libertado. A enzima modificada E^* liga-se então ao substrato B , formando o complexo E^*B . A enzima recupera o seu estado original ao converter B em Q . Finalmente o produto Q é libertado.

Iremos usar o mecanismo de ordem compulsória para desenvolver uma lei de Michaelis-Menten com dois substratos. Consideremos o seguinte esquema de reações:



Como no caso de substrato único, podemos deduzir uma lei de velocidade, assumindo que os complexos atingem um estado quasi-estacionário. Mais uma vez usamos o Copasi para fazer a separação de escalas temporais, o que nos leva a assumir que os complexos $C_1 = EA$, e $C_2 = EAB$ atingem um estado quasi-estacionário. Isto é justificado quando os substratos forem muito mais abundantes do que a enzima. As equações diferenciais para os complexos C_1 e C_2 são os seguintes:

$$\begin{cases} \dot{c}_1 = k_1ea - k_{-1}c_1 - k_2c_1b + k_{-2}c_2 \\ \dot{c}_2 = k_2c_1b - k_{-2}c_2 - k_3c_2 \end{cases}$$

Mais uma vez a enzima é uma quantidade conservada ($e(t) = e_T - c_1(t) - c_2(t)$). Aplicando uma aproximação de estado quasi-estacionário a ambos os complexos, obtemos a velocidade de reação

$$V_{A+B \rightarrow P+Q} = k_3 c_2^{\text{qss}} = \frac{k_3 e_T a b}{k_{-1} \frac{k_{-2} + k_3}{k_1 k_2} + \frac{k_{-2} + k_3}{k_2} a + \frac{k_3}{k_1} b + a b} \quad (2.15)$$

o que pode ser escrito na forma mais sucinta

$$V_{A+B \rightarrow P+Q} = \frac{V_{\text{max}} a b}{K_{AB} + K_B a + K_A b + a b} \quad (2.16)$$

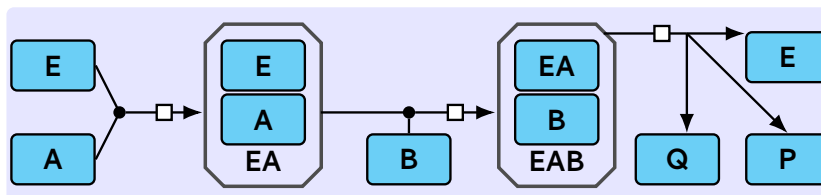


Figura 2.8 Diagrama SBGN (CellDesigner) de reação de dois substratos catalisada por enzima com ordem compulsória.

2.3.2 Regulação da Atividade Enzimática

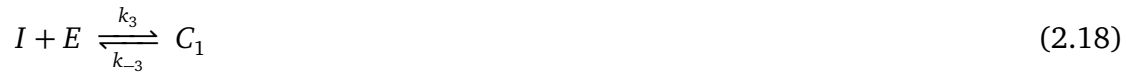
A regulação da atividade enzimática é muito importante pois um descontrolo na concentração de enzimas pode levar a doenças sérias (e.g., hiper e hipo-tiroidismo, etc.). Geralmente o descontrolo na concentração de enzimas é causado por efeitos genéticos que frequentemente acontecem na escala temporal lenta dos processos genéticos (minutos a horas). A regulação da atividade enzimática pode ser conseguida através de vários mecanismos. Um meio rápido de controlo da atividade enzimática pode ser conseguido por modificação bioquímica das moléculas individuais de enzimas. Iremos considerar dois mecanismos pelo qual a atividade enzimática pode ser alterada bioquimicamente: *inibição competitiva* e *regulação alostérica*.

Inibição Competitiva

Um inibidor competitivo é uma molécula que imita um substrato enzimático mas não sofre uma reação, conforme se ilustra na figura 2.9. Essa molécula liga-se ao sítio ativo da enzima criando assim um obstáculo à reação da enzima com o seu substrato, isto é, inativando a enzima para a reação catalítica. Um exemplo familiar é o fármaco aspirina que se liga ao sítio ativo da enzima cicloxigenase, desta forma inibindo a produção de prostaglandinas envolvidas nos mecanismos de dor e produção de muco estomacal.

Vamo-nos basear no esquema de reações (2.18), abaixo indicado, para derivar uma lei de velocidade para a inibição competitiva. O esquema envolve o processo de catalização quando a enzima consegue ligar-se ao substrato, e inibição quando o inibidor se liga ao

sítio ativo da enzima, deste modo inibindo a taxa de conversão do substrato em produto.



onde I é o inibidor e C_1 é o complexo enzima-inibidor. Vamos usar a aproximação de estado quasi-estacionário para os dois complexos. Representando, como habitualmente, por c e c_1 as concentrações dos complexos C e C_1 , respetivamente, temos (lei de ação massa)

$$\begin{cases} \dot{c} = k_1se - k_{-1}c - k_2c \\ \dot{c}_1 = k_3ie - k_{-3}c_1 \end{cases}$$

A concentração do inibidor é considerada fixa, o que se justifica pelo facto de que, em geral, o inibidor é muito mais abundante do que a enzima, $i \gg e$, de tal forma que a formação de C_1 não muda i consideravelmente). Aplicando agora a aproximação de estado quasi-estacionário aos dois complexos, e usando a lei de conservação $e(t) = e_T - c(t) - c_1(t)$, obtemos

$$c = \frac{e_T s}{\frac{iK_m}{K_i} + s + K_m} \quad (2.19)$$

onde $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, e K_i é a constante de dissociação para a ligação ao inibidor: $K_i = k_{-3}/k_3$. A lei de velocidade pode pois ser escrita na forma

$$V_{S \rightarrow P} = k_2 c = \frac{V_{\max} s}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) + s}$$

onde a velocidade máxima é dada por $V_{\max} = k_2 e_T$.

Mostramos um esboço dessa lei para vários níveis de inibidor na figura 2.10. Podemos ver que a inibição competitiva não influencia a velocidade máxima da reação V_{\max} . Quando o substrato é muito mais abundante que o inibidor, a inibição tem um efeito negligenciável

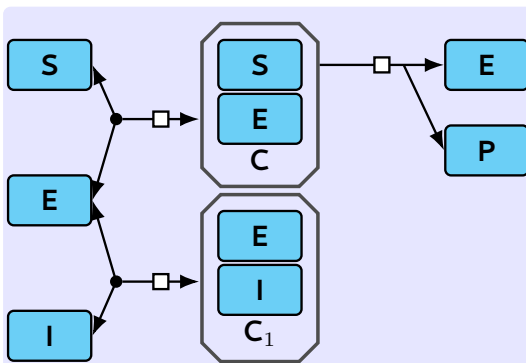
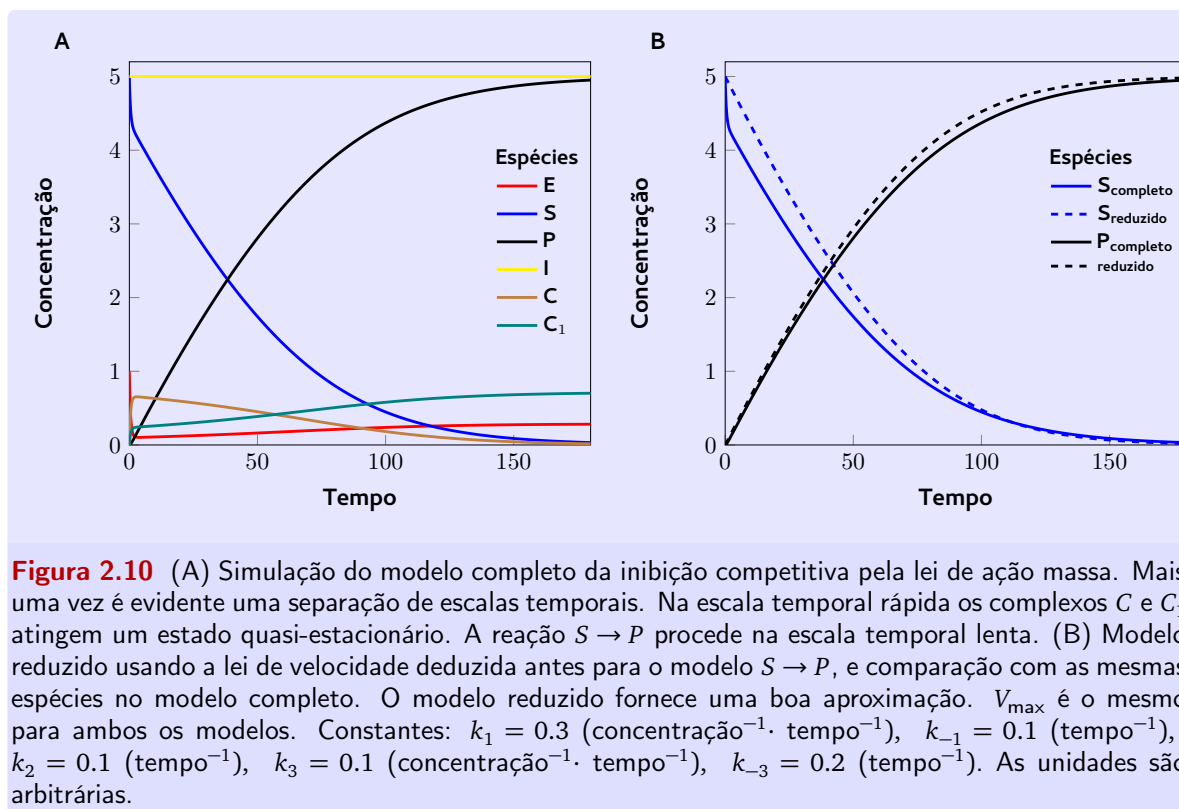


Figura 2.9 Diagrama SBGN (CellDesigner) de reação com inibição competitiva. O inibidor I liga-se à enzima livre formando o complexo C_1 deixando a enzima indisponível para a catalisação do substrato.



devido à competição entre inibidor e substrato pela enzima. Contudo, a competição por enzimas afeta a concentração de substrato necessário para ter uma dada velocidade de reação: a constante efetiva de Michaelis da reação inibida, $K_m(1 + i/K_i)$, aumenta com a abundância do inibidor.

Regulação Alostérica

A eficiência catalítica de uma enzima depende da conformação do seu sítio ativo. Essa conformação depende, por sua vez, da configuração proteica global (da sua estrutura terciária, como é tecnicamente conhecida). Esta configuração, e portanto a natureza do seu sítio ativo, pode ser alterada modificando a energia química da proteína (e.g., posição e intensidade das cargas). Estas modificações podem ser conseguidas pela adesão de moléculas à proteína. A este modo de regulação enzimática chama-se *regulação alostérica* e foi proposta por François Jacob em 1961. Em contraste com a inibição competitiva, a molécula reguladora pode não ter qualquer semelhança química com o substrato. Da mesma forma, a parte da enzima onde o regulador liga (chamada *sítio alostérico*) pode ser distinta do sítio ativo, quer na posição quer na forma e estrutura química².

Tipicamente, a ligação dum regulador alostérico a uma proteína invoca uma transição de um estado funcional para um estado não funcional, o que, no caso das enzimas, significa

²O termo alostérico provem do grego: *allo*, que significa outro, e *steros* que significa forma

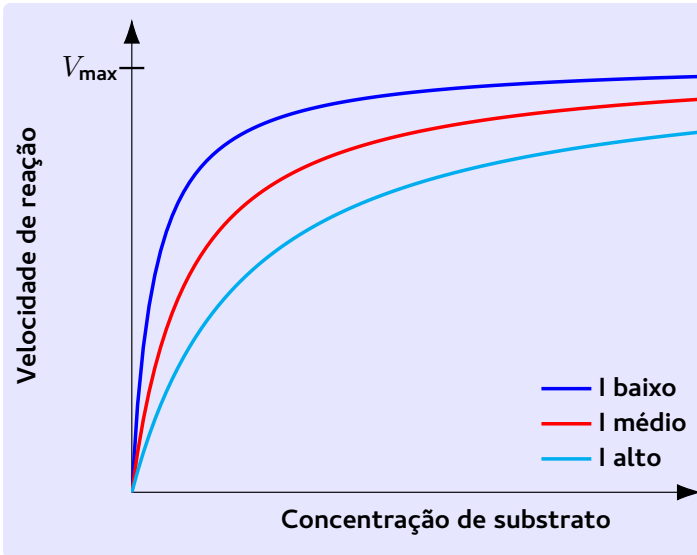


Figura 2.11 Lei de velocidade para catálise enzimática inibida competitivamente. A velocidade máxima da reação, V_{\max} , não é afetada pela presença do inibidor. Pelo contrário, o inibidor aumenta a concentração de substrato necessária para chegar a metade da velocidade máxima.

típicamente uma transição de uma forma catalítica ativa para uma inativa.

Os reguladores alostéricos fornecem uma vasta gama de estratégias para a regulação da atividade enzimática. Por exemplo, mudanças de conformação podem afetar tanto a ligação da enzima ao substrato como a catálise da reação. Para além disso, uma molécula de enzima pode ligar-se simultaneamente a vários reguladores alostéricos cujos efeitos podem ser integrados de diversas maneiras para conseguir o efeito desejado de regulação. Nesta secção, iremos considerar um caso simples que realça as diferenças funcionais entre a inibição alostérica e inibição competitiva.

Consideremos uma enzima que se liga a um único regulador alostérico. Suponhamos que o regulador inibe a catálise enzimática, bloqueando a formação de produto, como mostra a figura 2.12. Por simplicidade, assumiremos que o inibidor não tem qualquer efeito na ligação do substrato com a enzima. O esquema de reações é o que se segue



Assumimos um esquema de *inibição não-competitiva* onde a ligação de substrato e inibidor são independentes.

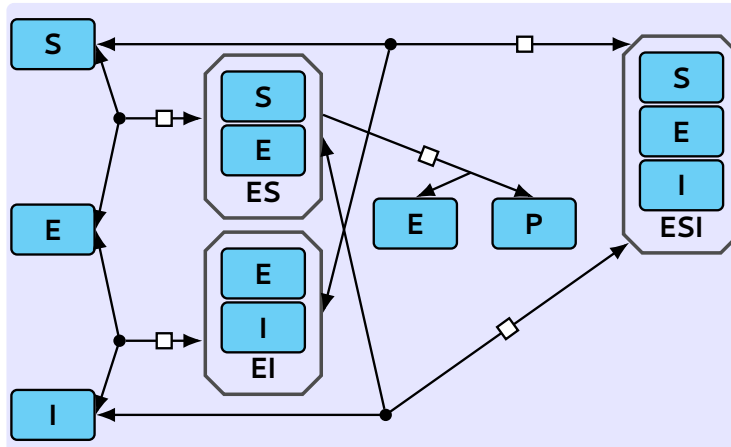


Figura 2.12 Diagrama de uma reação de catálise enzimática regulada alostericamente. A enzima possui duas partes de ligação: o sítio ativo onde o substrato se liga e o sítio alostérico onde o regulador alostérico se liga. Neste exemplo a enzima inibida pode ligar-se ao substrato mas não catalisa a formação de produto.

Para derivar uma lei de velocidade usamos mais uma vez uma separação de escalas temporais no Copasi que indica que uma aproximação quasi-estacionária pode ser aplicada aos complexos ES , EI , e ESI . Juntos com a conservação $e_T = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$, isto leva-nos à seguinte velocidade de reação

$$V_{S \rightarrow P} = k_2[ES] = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{i}{K_i}} \frac{s}{K_m + s} \quad (2.21)$$

onde $V_{\max} = k_2 e_T$, $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, e $K_i = k_{-3}/k_3$. Na figura 2.13 mostramos um esboço dessa lei de velocidades para vários níveis de inibidor. Em contraste com a inibição competitiva, este inibidor alostérico reduz a velocidade limite V_{\max} mas não afeta a concentração de semi-saturação K_m . Podem-se conseguir outros esquemas de inibição alostérica que afetam tanto V_{\max} como K_m .

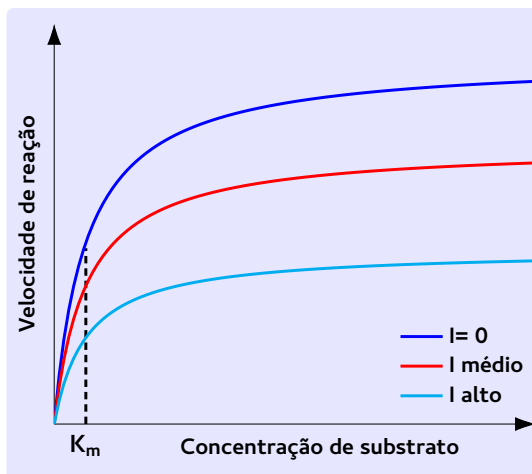


Figura 2.13 Velocidade de reação para uma catálise enzimática inibida alostericamente (inibição não-competitiva). A velocidade limite da reação é reduzida pelo inibidor. Também podemos ver que a concentração de semi-saturação não varia.

3 Análise Qualitativa de Modelos Matemáticos de Sistemas Dinâmicos

No capítulo anterior assumimos que, a longo prazo, as concentrações das espécies intervenientes numa rede de reações (bio)químicas atingem, cada uma, um único estado estacionário, independentemente das condições iniciais. Esta é em geral uma suposição válida no contexto das redes fechadas. Contudo, quando consideramos redes abertas, comportamentos mais interessantes podem ocorrer. Neste capítulo introduziremos técnicas matemáticas para explorar esses comportamentos.

3.1 Pontos de Equilíbrio (Estados Estacionários)

Consideremos o sistema seguinte:

$$\begin{cases} \dot{s}_1 = g_1(s_1, s_2) \\ \dot{s}_2 = g_2(s_1, s_2) \end{cases} \quad (3.1)$$

Os pontos de equilíbrio de 3.1 são os pontos (s_1^*, s_2^*) que satisfazem o sistema de equações (em geral fortemente não lineares) seguinte:

$$\begin{cases} g_1(s_1, s_2) = 0 \\ g_2(s_1, s_2) = 0 \end{cases} \quad (3.2)$$

3.2 Análise no Plano de Fase

Nos capítulos anteriores representamos a evolução temporal das concentrações das espécies em vários exemplos de reações químicas. Uma abordagem alternativa, frequentemente mais útil, é analisar a variação conjunta das concentrações de duas espécies.

Como exemplo concreto desta técnica, consideremos a rede bioquímica que se ilustra na figura 3.1, envolvendo duas espécies, S_1 e S_2 . Suponhamos que a velocidade de cada reação segue a lei de ação massa, e ainda que S_1 é inibida alostericamente por S_2 , presumindo uma ligação cooperativa forte de n moléculas de S_2 . Podemos então escrever

$$v_1 = \frac{k_1}{1 + (s_2/K)^n}, \quad v_2 = k_2, \quad v_3 = k_3 s_1, \quad v_4 = k_4 s_2, \quad v_5 = k_5 s_1,$$

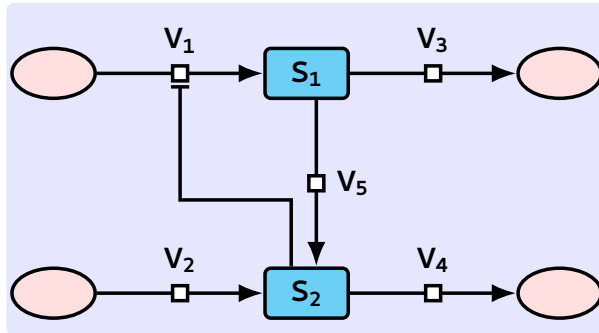


Figura 3.1 Rede de reação bioquímica. A produção de S_1 é inibida por S_2 . As etiquetas v_i indicam as velocidades das reações correspondentes (em vez das constantes de ação massa). Neste diagrama S_2 inibe a produção de S_1 . As ovas rosa representam o meio exterior.

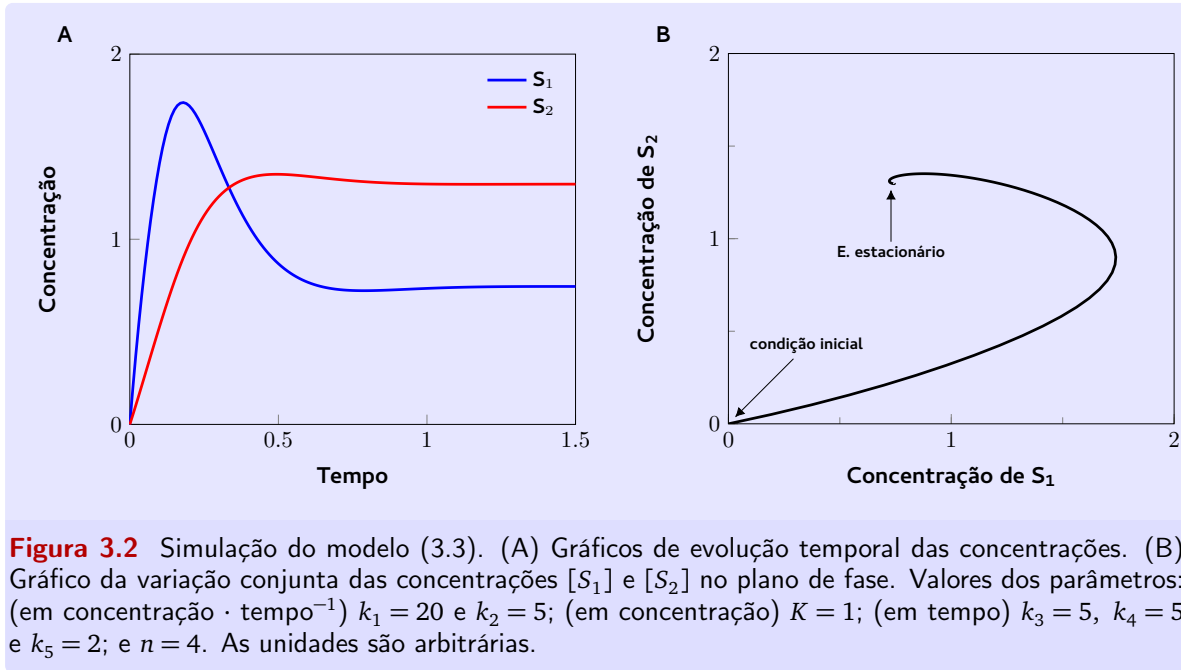
onde $s_1 = [S_1]$ e $s_2 = [S_2]$, de modo que

$$\begin{cases} \dot{s}_1 = \frac{k_1}{1 + \left(\frac{s_2}{K}\right)^n} - k_3s_1 - k_5s_1 \\ \dot{s}_2 = k_2 + k_5s_1 - k_4s_2 \end{cases} \quad (3.3)$$

A figura 3.2A mostra a evolução temporal da concentração de cada espécie, a partir das condições iniciais $s_1(0) = s_2(0) = 0$. Na figura 3.2B, representa-se, no chamado *plano de fase* do sistema (i.e., o plano $s_1 - s_2$), a variação conjunta das concentrações s_1 e s_2 (como função uma da outra). O plano de fase mostra as concentrações começando no estado inicial $(s_1, s_2) = (0, 0)$ e a sua convergência para o estado estacionário. As curvas no plano de fase são chamadas as *trajetórias* do sistema. Comparando com a figura 3.2A, a representação no plano de fase (diagrama de fase) enfatiza a variação da concentração de uma espécie em função da concentração da outra com o passar do tempo, mas não dá ênfase à relação com o tempo. Na realidade, a direção do movimento não é indicada explicitamente pela curva, embora cada ponto $(s_1(t), s_2(t))$ seja a realização do sistema num instante t particular, os únicos instantes que podem ser facilmente identificados no plano de fase são $t = 0$ (onde a curva se inicia) e o comportamento a longo prazo $t \rightarrow \infty$ (onde a curva termina).

O diagrama de fase permite que trajetórias múltiplas (condições iniciais diferentes), sejam descritas de forma útil num único gráfico. Isso é ilustrado na figura 3.3A, que mostra múltiplas evoluções temporais a partir de diferentes condições iniciais. Pode ver-se na figura 3.3 que todas as trajetórias atingem o mesmo estado estacionário, embora o comportamento transitório possa ser muito confuso (ainda mais complicado se aumentarmos o número de trajetórias!). Essas mesmas simulações são mostradas como trajetórias no plano de fase, na figura 3.3B. No plano de fase cada trajetória segue um caminho bem definido e, dessa forma, é mais clara a interpretação do comportamento qualitativo do sistema: as trajetórias seguem uma espiral lenta à medida que se aproximam do estado estacionário.

Por serem bidimensionais, os diagramas de fase não podem mostrar o comportamento do sistema quando há mais que duas espécies envolvidas num sistema. Apesar disso, veremos como são úteis as interpretações obtidas usando análise de diagramas de fase bidimensionais, mesmo quando aplicadas a sistemas mais complexos multidimensional (com várias



variáveis dinâmicas).

Campo de Direções

Um campo de direções no plano de fase de um sistema do tipo (3.1), consiste num conjunto vetores na forma.

$$\mathbf{v}(s_1, s_2) = \lambda \frac{(g_1(s_1, s_2), g_2(s_1, s_2))}{\|(g_1(s_1, s_2), g_2(s_1, s_2))\|}, \quad \lambda > 0$$

(todos com o mesmo comprimento) uma para cada ponto (s_1, s_2) . Cada vetor indica portanto a direção (infinitesimal) da trajetória que passa nesse ponto. Os campos de direções são úteis porque a partir deles podem ser desenhadas trajetórias sem resolver o sistema diferencial, o que, em geral, só é possível aproximadamente usando métodos numéricos. Quando não normalizadas essas setas indicam a velocidade e a direção do movimento em cada ponto do plano de fase (neste caso, é mais habitual referirmos ao campo de vetores do sistema). Na Figura 3.3B, as setas pequenas de cor azul mostram o campo de direções.

3.2.1 Nulclinas

São as curvas definidas pelo

- conjunto de pontos (s_1, s_2) onde $\dot{s}_1 = g_1(s_1, s_2) = 0$ – a chamada *nulclina- s_1* .
- conjunto de pontos (s_1, s_2) onde $\dot{s}_2 = g_2(s_1, s_2) = 0$ – a chamada *nulclina- s_2* .

Representam pois os pontos onde as trajetórias têm direção vertical (pontos da nulclina- s_1) ou horizontal (pontos da nulclina- s_2), ou seja os pontos de viragem de uma concentração

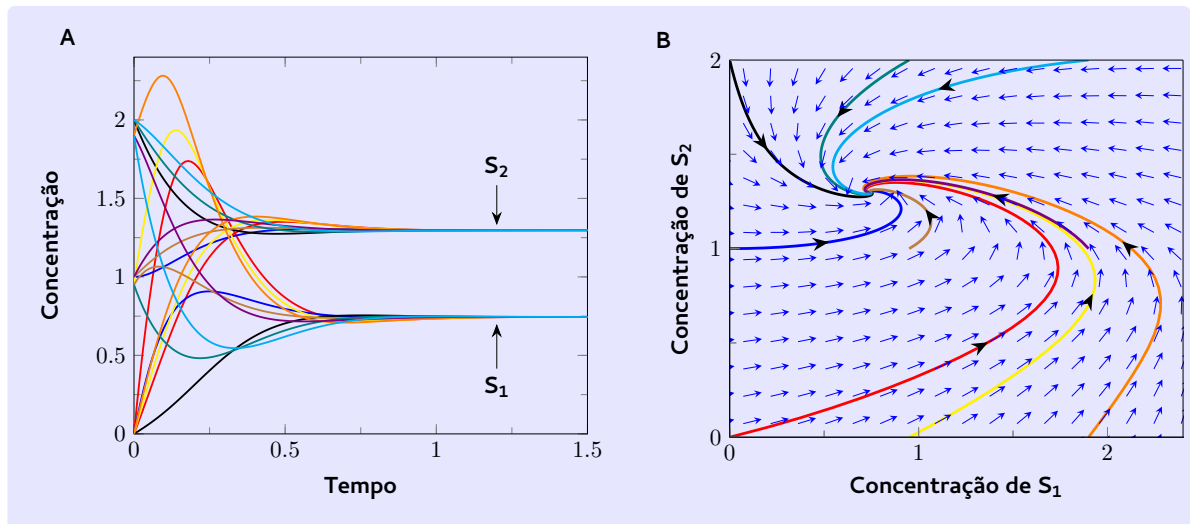


Figura 3.3 Simulação do Modelo (3.3). (A) Evolução temporal múltipla, para diversas CI's, confirmam a convergência das concentrações para o estado estacionário, o comportamento transitório (transiente) não tem muita utilidade. Cada cor representa um PVI (Problema de valor inicial). (B) No plano de fase, as trajetórias individuais fornecem uma imagem unificada do comportamento do sistema. As setas pequenas de cor azul representam o campo de direções. Os parâmetros são os mesmos da Figura 3.2.

em relação a outra numa dada trajetória. Essas curvas são determinadas diretamente do modelo sem necessidade de recorrer ao plano de fase (porque a direção do movimento é especificada pelo modelo). Da definição de ponto de equilíbrio deduzimos que os pontos de equilíbrio (ou estados estacionários) são os pontos de interseção das duas nulclinas.

A figura 3.4B confirma que a nulclina- s_1 tem setas de direção sem componente horizontal (orientada verticalmente), enquanto a nulclina- s_2 possui setas de direção sem componente vertical (orientada horizontalmente). A figura 3.4A mostra o diagrama de fase da 3.3B com as nulclinas. As trajetórias cruzam verticalmente as nulclinas- s_1 , e horizontalmente as nulclinas- s_2 . A figura 3.4B mostra as nulclinas juntamente com o campo de direções. As nulclinas separam o plano de fase em quatro regiões; em cada região, as setas de direção têm a mesma orientação; descer/subir e direita/esquerda (porque as setas mudam de direção somente quando cruzam uma nulclina).

As nulclinas assim como o campo de direções podem ser determinadas sem simulação, a partir do modelo; são as curvas de nível 0 das funções $g_1(s_1, s_2)$ e $g_2(s_1, s_2)$.

3.3 Estabilidade

As redes bioquímicas apresentam dois tipos de comportamento de longo prazo (i.e., assintótico):

- convergência para um estado estacionário ou
- convergência para uma oscilação periódica sustentada, referida como (oscilação de) *ciclo-limite*.

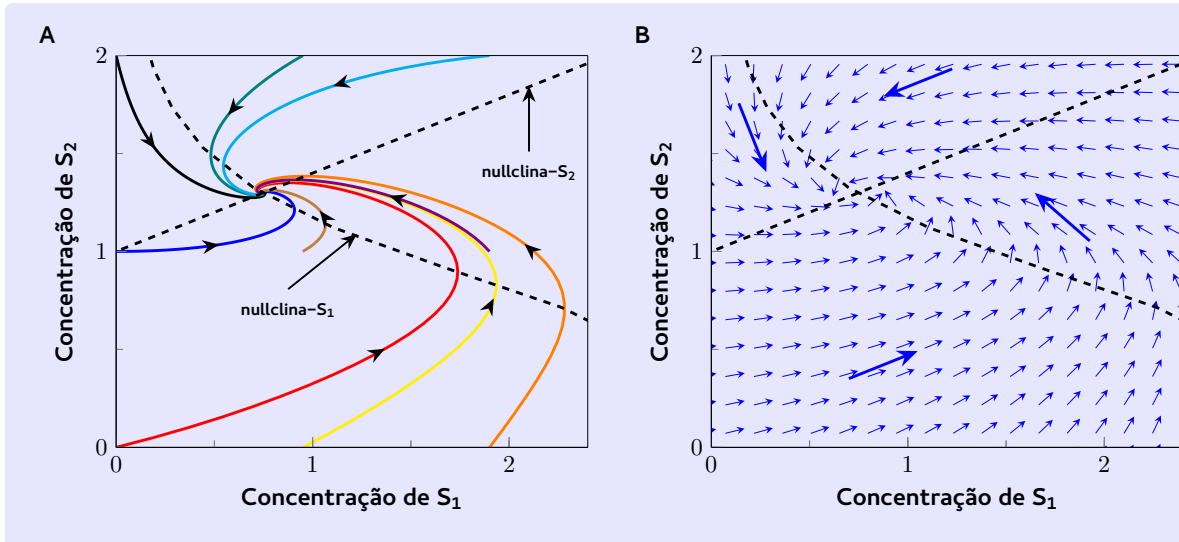


Figura 3.4 Nulclinas para o Modelo (3.3). (A) As trajetórias interseam as nulclinas nos pontos de viragem. Os estados estacionários ocorrem nos pontos de interseção das nulclinas. (B) As nulclinas dividem o plano de fase em quatro regiões. Porque as setas só mudam de direção nas nulclinas, cada região é caracterizada pelo movimento numa direção particular (subir/descer, esquerda/direita), como indicado.

Podem existir outros comportamentos dinâmicos (divergência e caos, por exemplo) mas são mais raros. Para o modelo (3.3), vimos que todas as trajetórias convergem para um único estado estacionário. Isto mostra que flutuações das condições iniciais não afetam o comportamento de longo prazo. Veremos mais à frente que este tipo de estado estacionário é estável. Para explorar outros tipos de comportamento modificamos a rede da figura 3.1 para a que se representa na figura 3.5 – uma rede “simétrica” de reações em que cada espécie inibe alostericamente a produção da outra, resultando num chamado *Antagonismo mútuo*. Este “motivo” desempenha um papel muito relevante no capítulo posterior sobre ciclo celular.

Com inibições alostéricas cooperativas e velocidades de degradação de primeira ordem, o modelo é

$$\begin{cases} \dot{s}_1 = \frac{k_1}{1 + (s_2/K_2)^{n_1}} - k_3 s_1 \\ \dot{s}_2 = \frac{k_2}{1 + (s_1/K_1)^{n_2}} - k_4 s_2 \end{cases} \quad (3.4)$$

Primeiro consideramos um modelo assimétrico no qual $n_1 > n_2$, isto é, S_2 inibe S_1 de forma mais efetiva do que S_1 inibe S_2 . Se todos os outros parâmetros forem simétricos ($k_1 = k_2, K_1 = K_2, k_3 = k_4$), é de esperar que o modelo evolua para um estado estacionário em que a concentração de S_1 é baixa e a concentração de S_2 é alta (a “competição” de antagonismo mútuo é vencida por S_2). Esta intuição é confirmada pela figura 3.6A, que mostra a evolução temporal das concentrações, para condições iniciais diferentes. Independentemente destas condições iniciais, um vez que S_2 tem um maior poder de inibição

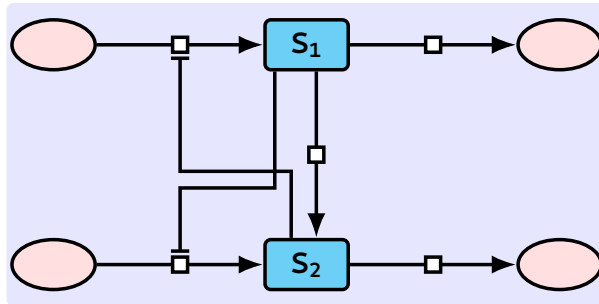


Figura 3.5 Rede com antagonismo mútuo. Cada espécie inibe alostericamente a produção da outra (linhas tracejadas).

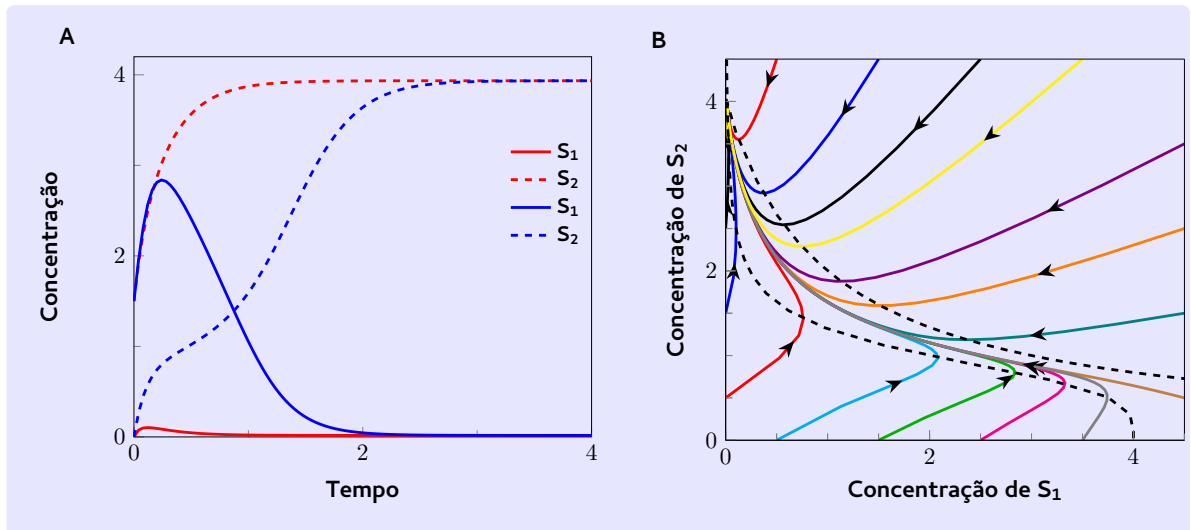


Figura 3.6 Modelo (3.4) com inibição assimétrica. (A) As séries temporais mostram que, independentemente da condição inicial, o sistema converge para um único estado estacionário com a concentração de S_2 alta e a concentração de S_1 baixa. (B) Este diagrama de fase confirma que todas as trajetórias convergem para o mesmo estado estacionário ($[S_2]$ alto, $[S_1]$ baixo), no qual as nulclinas (linhas tracejadas) se interseitam. Valores dos parâmetros: $k_1 = k_2 = 20$ (concentração·tempo⁻¹), $K_1 = K_2 = 1$ (concentração), $k_3 = k_4 = 5$ (tempo⁻¹), $n_1 = 4$, e $n_2 = 1$. As unidades são arbitrárias.

do que S_1 , o sistema converge a longo prazo para o mesmo estado estacionário ($[S_1]$ baixo, $[S_2]$ alto). O diagrama de fase da figura 3.6B confirma isto mesmo.

Todas as trajetórias convergem para o estado estacionário na interseção das nulclinas- s_1 e $-s_2$, no qual S_2 é sempre vencedor.

De seguida, consideramos o caso em que os coeficientes de Hill são iguais: $n_1 = n_2$ – as duas espécies S_1 e S_2 têm um papel perfeitamente simétrico. Porque nenhuma espécie tem vantagem sobre a outra, podemos esperar que o sistema exiba um comportamento simétrico: se as concentrações iniciais forem as mesmas, esse estado irá manter-se indefinidamente (um "jogo empatado"; caso contrário, irá vencer a competição a espécie que tiver maior concentração inicial. O estado estacionário do sistema é ilustrado na figura 3.7. O painel A confirma a nossa intuição mostrando que o comportamento de longo prazo depende das condições iniciais – a espécie que é mais abundante inicialmente mantém a sua dominância. O diagrama de fase no painel B mostra um diagrama de fase simétrico. As

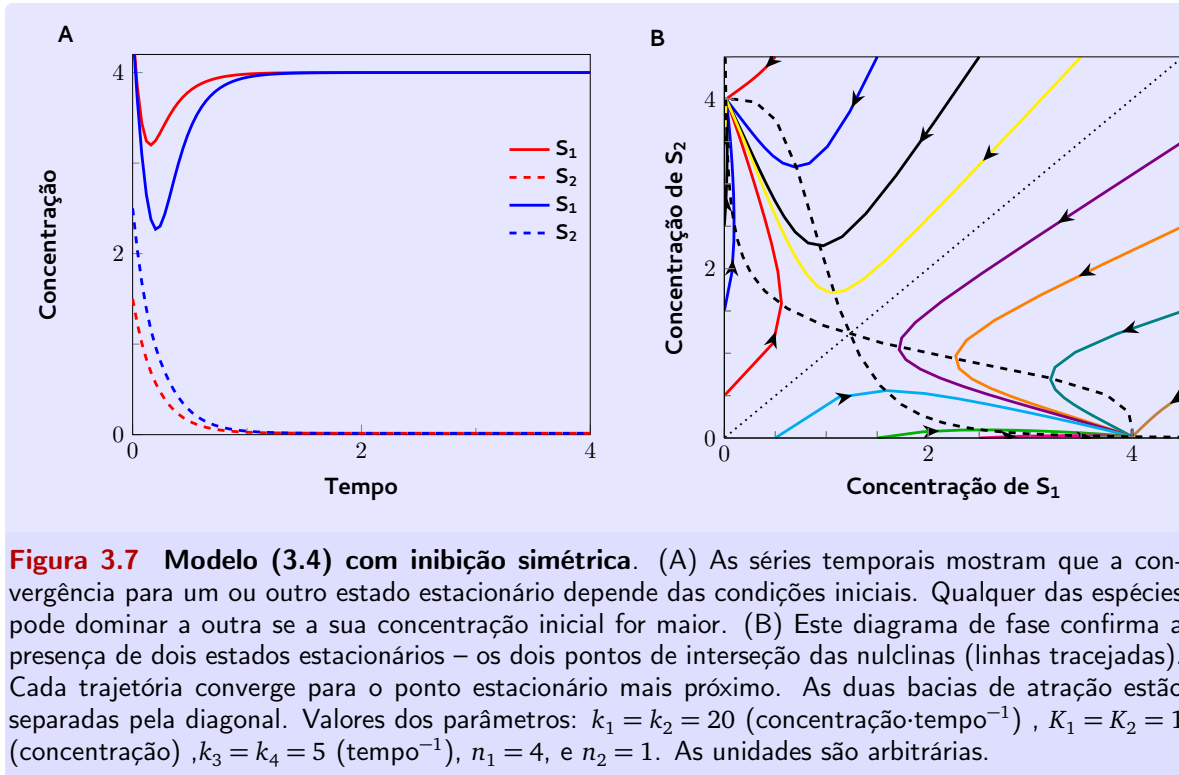


Figura 3.7 Modelo (3.4) com inibição simétrica. (A) As séries temporais mostram que a convergência para um ou outro estado estacionário depende das condições iniciais. Qualquer das espécies pode dominar a outra se a sua concentração inicial for maior. (B) Este diagrama de fase confirma a presença de dois estados estacionários – os dois pontos de interseção das nulclinas (linhas tracejadas). Cada trajetória converge para o ponto estacionário mais próximo. As duas bacias de atração estão separadas pela diagonal. Valores dos parâmetros: $k_1 = k_2 = 20$ (concentração·tempo⁻¹), $K_1 = K_2 = 1$ (concentração), $k_3 = k_4 = 5$ (tempo⁻¹), $n_1 = 4$, e $n_2 = 1$. As unidades são arbitrárias.

trajetórias são atraídas para o estado estacionário mais próximo. A região do plano de fase cujos pontos são condições iniciais de trajetórias que convergem para um mesmo estado estacionário é chamada a *bacia de atração* desse estado estacionário. As curvas que separam bacias de atração são chamadas *separatrizes*. Neste caso perfeitamente simétrico a separatriz é a diagonal.

Um **sistema bi-estável** é um sistema que exhibe dois estados estacionários estáveis distintos. Um **sistema mono-estável** é um sistema que exhibe um único estado estacionário.

A bi-estabilidade é, como veremos mais à frente, uma característica fundamental das redes bioquímicas e genéticas. Duas causas de bi-estabilidade são *não linearidade* e *feedback positivo*. No modelo estudado, a causa para a bi-estabilidade é o feedback positivo que é implementado por um ciclo de duplo feedback negativo – cada espécie inibe a produção da outra e, por isso, inibe a inibição de si própria. Por outras palavras, cada espécie atua aumentando a sua própria produção – feedback positivo, portanto. Já a não linearidade deve-se ao mecanismo de inibição cooperativa, neste caso dada por uma função de Hill.

3.3.1 Estabilidade dos estados estacionários

As nulclinas representadas na figura 3.7B interseccionam-se nos dois estados estacionários descritos antes, e também se interseccionam num terceiro ponto na diagonal. Este ponto simétrico é um estado estacionário do sistema, mas só é conseguido para uma única combinação dos parâmetros e condições iniciais, e portanto raramente observado. Qualquer trajetória pró-

xima desse estado será repelida por ele para um dos dois outros estados estacionários – o que estiver mais próximo. Esse estado estacionário diz-se *instável* porque trajetórias próximas são repelidas por ele. Em contraste, os outros estados estacionários são chamados *estáveis*. Este sistema tem pois dois estados estacionários estáveis (é bi-estável) e um instável. A existência de um estado estacionário intermediário instável é uma característica dos sistemas bi-estáveis.

Estabilidade para sistemas lineares

Para estudar a estabilidade dos estados estacionários de sistemas lineares necessitamos do conceito de valor próprio de uma matriz e de vetor próprio associado. Consideremos uma matriz $\mathbf{A} = [a_{ij}]_{1 \leq i, j \leq n}$. Os valores próprios λ_i , $i = 1, \dots, n$, de \mathbf{A} , são as soluções da equação característica $p(\lambda) = \det(\mathbf{A} - \lambda \mathbb{I}_n) = 0$; se λ é um valor próprio, um vetor próprio associado $\mathbf{v} = (v_1, \dots, v_n)^\top$ é uma solução do sistema $\mathbf{A}\mathbf{v} = \lambda\mathbf{v}$.

Consideremos agora o seguinte sistema diferencial linear:

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = ax_1 + bx_2 \\ \dot{x}_2 = cx_1 + dx_2 \end{cases} \quad (3.5)$$

que pode ser escrito em forma matricial como $\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x}$, em que

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{A} = \begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix}$$

Demonstra-se que

$$\begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} = e^{\lambda_1 t} \begin{bmatrix} v_{11} \\ v_{12} \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} = e^{\lambda_2 t} \begin{bmatrix} v_{21} \\ v_{22} \end{bmatrix}$$

onde λ_i , $i = 1, 2$, são os valores próprios de \mathbf{A} e $\mathbf{v}_i = (v_{i1}, v_{i2})^\top$ é um vetor próprio associado a λ_i , são duas soluções particulares do sistema e formam uma base para o espaço de soluções de 3.5. A solução geral é obtida como combinação linear dos elementos dessa base

$$\begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} = \alpha_1 e^{\lambda_1 t} \begin{bmatrix} v_{11} \\ v_{12} \end{bmatrix} + \alpha_2 e^{\lambda_2 t} \begin{bmatrix} v_{21} \\ v_{22} \end{bmatrix} \quad (3.6)$$

onde as constantes α_i , $i = 1, 2$ são constantes que se determinam a partir das condições iniciais.

O comportamento geral das soluções de (3.5) depende da natureza das funções exponenciais $e^{\lambda_1 t}$ e $e^{\lambda_2 t}$. Para classificar o comportamento dessas soluções, necessitamos de conhecer a natureza dos valores próprios, reais ou complexos. Analisemos os vários casos possíveis.

Caso 1 Os valores próprios são reais. Neste caso, se

- (i) **ambos os valores próprios são negativos**, todas as soluções $(x_1(t), x_2(t)) \rightarrow (0, 0)$ independentemente das constantes α_i . O ponto $(0, 0)$ é pois um estado estacionário estável, chamado *nó estável*. Por outro lado, se
- (ii) **pelo menos um valor próprio positivo**, então pelo menos um dos termos exponenciais cresce para infinito, com isso arrastando a solução geral para infinito, independentemente das constantes α_i . Assim qualquer trajetória próxima do ponto $(0, 0)$ é repelida – $(0, 0)$ diz-se um *nó instável*.

Caso 2 Os valores próprios são complexos conjugados:

$$\lambda_1 = p + iq, \quad e \quad \lambda_2 = p - iq$$

Analisemos um exemplo concreto, para sermos mais explícitos. Consideremos o seguinte sistema diferencial linear, escrito na forma matricial $\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x}$

$$\begin{bmatrix} \dot{x}_1 \\ \dot{x}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ -1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} \quad (3.7)$$

onde $\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ -1 & -1 \end{bmatrix}$. O polinómio caraterístico é $\lambda^2 + \lambda + 1$, e tem como raízes

$$\lambda_1 = -\frac{1}{2} + i\frac{\sqrt{3}}{2} \quad e \quad o \quad seu \quad conjugado \quad \lambda_2 = -\frac{1}{2} - i\frac{\sqrt{3}}{2}$$

Um vetor próprio \mathbf{v}_1 , associado a λ_1 , dado pela equação $\mathbf{A}\mathbf{v} = \lambda_1\mathbf{v}$, é, por exemplo, $\mathbf{v}_1 = (1, (-1 + i\sqrt{3})/2)^T$. Uma solução particular do sistema é pois

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} &= e^{(-\frac{1}{2} + i\frac{\sqrt{3}}{2})t} \begin{bmatrix} 1 \\ -\frac{1}{2} + i\frac{\sqrt{3}}{2} \end{bmatrix} \\ &= e^{-\frac{1}{2}t} \left(\cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) + i \sin\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) \right) \begin{bmatrix} 1 \\ -\frac{1}{2} + i\frac{\sqrt{3}}{2} \end{bmatrix} \\ &= e^{-\frac{1}{2}t} \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) + i \sin\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) \\ -\frac{1}{2} \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) - i\frac{1}{2} \sin\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) + i\frac{\sqrt{3}}{2} \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) \end{bmatrix} \\ &= e^{-\frac{1}{2}t} \underbrace{\begin{bmatrix} \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) \\ -\frac{1}{2} \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) - \frac{\sqrt{3}}{2} \sin\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) \end{bmatrix}}_{Y_1} + i e^{-\frac{1}{2}t} \underbrace{\begin{bmatrix} \sin\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) \\ -\frac{1}{2} \sin\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) + \frac{\sqrt{3}}{2} \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}t\right) \end{bmatrix}}_{Y_2} \end{aligned}$$

É fácil demonstrar que Y_1 e Y_2 são duas soluções particulares reais, linearmente independentes, de (3.7), e que portanto formam uma base para o espaço das soluções de (3.7). Podemos pois escrever a solução geral de (3.7) como $\mathbf{x} = \alpha_1 Y_1 + \alpha_2 Y_2$ em que $\mathbf{x} = (x_1, x_2)^T$.

A situação geral analisa-se de forma análoga e conduz às conclusões seguintes:

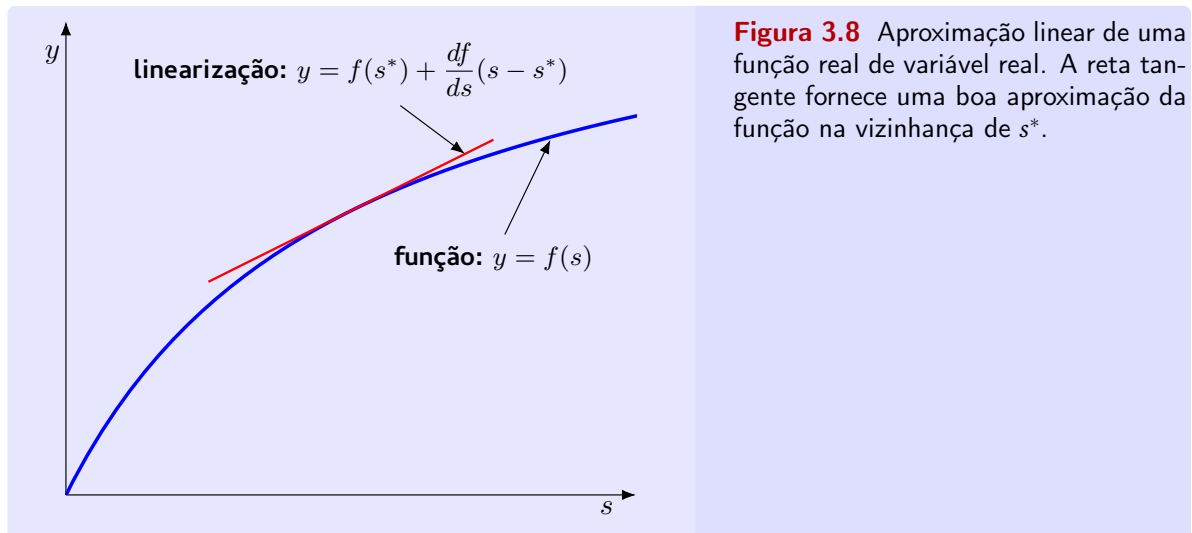


Figura 3.8 Aproximação linear de uma função real de variável real. A reta tangente fornece uma boa aproximação da função na vizinhança de s^* .

- i Se a *parte real* dos valores próprios for *negativa*, então o sistema converge para $(0,0)$ em oscilações cuja amplitude diminui com o tempo – *oscilações amortecidas*. Nesse caso $(0,0)$ é um estado estacionário estável e é chamado um *ponto espiral* ou *foco*.
- ii Se a *parte real* dos valores próprios é *positiva*, então a solução diverge e o estado estacionário $(0,0)$ é instável. O estado estacionário é chamado nesse caso de *ponto espiral instável*.

3.3.2 Estabilidade para sistemas não lineares (linearização)

Como vimos, as redes bioquímicas são fortemente não lineares. O comportamento local das trajetórias, perto de um ponto de equilíbrio, pode ser descrito por um sistema linear, processo chamado *linearização*, que aproxima o comportamento do sistema perto do ponto de equilíbrio e serve ainda para testar a estabilidade desse ponto. Obtém-se através da série de Taylor de (g_1, g_2) nesse ponto.

Linearização Seja $f(s)$ uma função de classe C^1 , de $\mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$. A aproximação linear, próximo de $s = s^*$, é dada por:

$$f(s) \approx f(s^*) + \frac{df}{ds}(s^*) \cdot (s - s^*)$$

A reta de equação $y = f(s^*) + \frac{df}{ds}(s^*) \cdot (s - s^*)$ representa a reta tangente ao gráfico de f , no ponto $(s^*, f(s^*))$, como se ilustra na figura 3.8.

Para funções de duas variáveis, $f(s_1, s_2)$, a linearização centrada no ponto $(s_1, s_2) = (s_1^*, s_2^*)$, é dada por

$$f(s_1, s_2) \approx f(s_1^*, s_2^*) + \frac{\partial f}{\partial s_1}(s_1^*, s_2^*) \cdot (s_1 - s_1^*) + \frac{\partial f}{\partial s_2}(s_1^*, s_2^*) \cdot (s_2 - s_2^*) \quad (3.8)$$

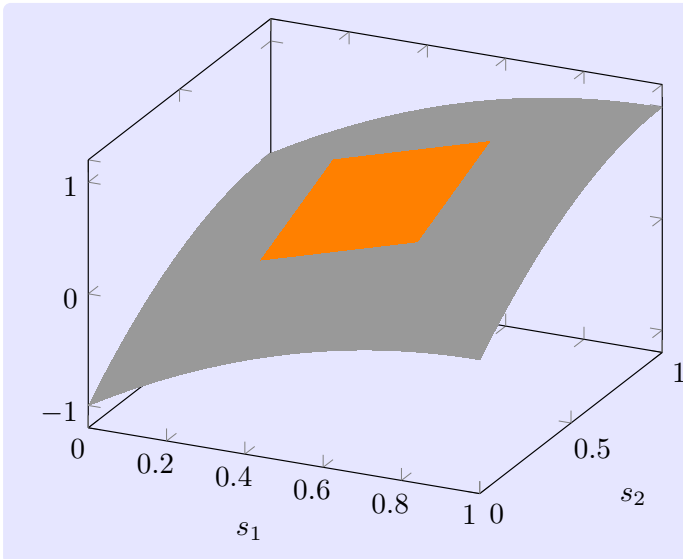


Figura 3.9 Aproximação linear de uma função de duas variáveis. O plano tangente (laranja), centrado em $(s_1, s_2) = (s_1^*, s_2^*)$, fornece uma boa aproximação para a função (superfície cinzenta) próximo de (s_1^*, s_2^*) .

Esta aproximação é válida para (s_1, s_2) próximo do ponto (s_1^*, s_2^*) . Geometricamente, corresponde à aproximação da superfície $z = f(s_1, s_2)$, pelo seu plano tangente no ponto em questão, conforme mostra a figura 3.9.

Consideremos agora um sistema diferencial bidimensional

$$\begin{aligned}\dot{s}_1 &= f_1(s_1, s_2) \\ \dot{s}_2 &= f_2(s_1, s_2)\end{aligned}$$

Usando as linearizações de f_1 e f_2 num estado estacionário (s_1^*, s_2^*) , obtemos

$$\begin{cases} \dot{s}_1 = f_1(s_1, s_2) \approx \frac{\partial f_1}{\partial s_1}(s_1^*, s_2^*) \cdot (s_1 - s_1^*) + \frac{\partial f_1}{\partial s_2}(s_1^*, s_2^*) \cdot (s_2 - s_2^*) \\ \dot{s}_2 = f_2(s_1, s_2) \approx \frac{\partial f_2}{\partial s_1}(s_1^*, s_2^*) \cdot (s_1 - s_1^*) + \frac{\partial f_2}{\partial s_2}(s_1^*, s_2^*) \cdot (s_2 - s_2^*) \end{cases} \quad (3.9)$$

já que $f_1(s_1^*, s_2^*) = 0 = f_2(s_1^*, s_2^*)$. O nosso objetivo é aplicar esta linearização para caracterizar a estabilidade do sistema perto de um estado estacionário. Por isso, estamos particularmente interessados no comportamento das trajetórias cujas condições iniciais estão próximas desse estado estacionário. Se for estável, essas trajetórias irão convergir para ele; se for instável, elas irão divergir. Podemos pensar essas trajetórias como a evolução temporal de pequenas perturbações do estado estacionário do sistema. Para nos focarmos nessas perturbações, introduzimos uma mudança de variáveis que descreve explicitamente os desvios do estado estacionário:

$$x_1 = s_1 - s_1^*, \quad x_2 = s_2 - s_2^*.$$

Uma pequena perturbação do estado estacionário (s_1^*, s_2^*) , corresponde assim a um valor (x_1, x_2) próximo de $(0, 0)$. A dinâmica dessas variáveis é facilmente determinada,

observando que $\dot{x}_1 = \dot{s}_1$ e $\dot{x}_2 = \dot{s}_2$. Substituindo na equação 3.9, obtemos

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = \frac{\partial f_1}{\partial s_1}(s_1^*, s_2^*) \cdot x_1 + \frac{\partial f_1}{\partial s_2}(s_1^*, s_2^*) \cdot x_2 \\ \dot{x}_2 = \frac{\partial f_2}{\partial s_1}(s_1^*, s_2^*) \cdot x_1 + \frac{\partial f_2}{\partial s_2}(s_1^*, s_2^*) \cdot x_2 \end{cases} \quad (3.10)$$

aproximação válida para (x_1, x_2) próximo de $(0, 0)$. Se chamarmos $\mathbf{f}(s_1, s_2) = (f_1(s_1, s_2), f_2(s_1, s_2))$ então (3.10) pode ser escrito na forma matricial $\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{A}\mathbf{x}$ onde

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \mathbf{A} = \mathbf{J}_{\mathbf{f}}(s_1^*, s_2^*) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial s_1}(s_1^*, s_2^*) & \frac{\partial f_1}{\partial s_2}(s_1^*, s_2^*) \\ \frac{\partial f_2}{\partial s_1}(s_1^*, s_2^*) & \frac{\partial f_2}{\partial s_2}(s_1^*, s_2^*) \end{bmatrix}$$

é o **Jacobiano** de \mathbf{f} no ponto (s_1^*, s_2^*) .

Concluindo: fazendo a aproximação linear em torno do estado estacionário e a mudança de variáveis descrita, obtemos um sistema linear em que o estado estacionário após a linearização, $(x_1, x_2) = (0, 0)$, corresponde ao estado estacionário $(s_1, s_2) = (s_1^*, s_2^*)$ do sistema não linear original. Podemos agora aplicar os critérios de estabilidade que descrevemos para um sistema linear.

Critério de Estabilidade Linearizada

- (i) Se ambos os valores próprios do Jacobiano tiverem parte real negativa, então o estado estacionário é estável.
- (ii) Se pelo menos um dos valores próprios tiver parte real positiva então o estado estacionário é instável.

Podíamos também ter discutido o caso em que os valores próprios são imaginários puros (possuem parte real zero), mas estes sistemas não tem interesse para nós, por serem muito raros em redes bioquímicas.

Na nossa análise mostramos como aplicar o critério de estabilidade apenas para duas espécies. No entanto, o critério é válido, independentemente do número de espécies. Em resumo, para aplicar o critério de estabilidade linearizada a um modelo não linear, procedemos como segue:

- (1) identificamos o estado estacionário de interesse,
- (2) calculamos o Jacobiano do sistema nesse ponto (tomando as derivadas parciais apropriadas),
- (3) calculamos os valores próprios do Jacobiano,
- (4) vê o sinal da sua parte real.

3.4 Oscilações de Ciclo-Limite

Para além dos estados estacionários, existe um outro tipo de comportamento de longo prazo em algumas redes bioquímicas – as chamadas *oscilações de ciclo limite*. Sistemas

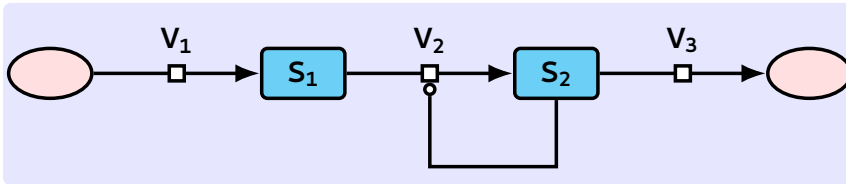


Figura 3.10 Rede de reação bioquímica auto-catalítica. A espécie S_2 ativa a sua própria produção.

com este comportamento entram indefinidamente num regime oscilatório periódico, após um período transitório (fase transitente) mais ou menos rápido.

Este comportamento é diferente do das *oscilações amortecidas*, no qual a amplitude das oscilações decresce progressivamente e o sistema converge para um estado estacionário assintótico. Oscilações de ciclo-limite são *persistentes* (ou *sustentadas*), periódicas e continuam indefinidamente.

Como exemplo de um sistema que apresenta oscilações de ciclo-limite, consideramos a rede representada na figura 3.10. Neste esquema, a espécie S_2 ativa alostericamente a sua própria produção. Este tipo de feedback positivo chamado *autocatálise* é muito comum em biologia. Modelamos a rede através do sistema diferencial seguinte

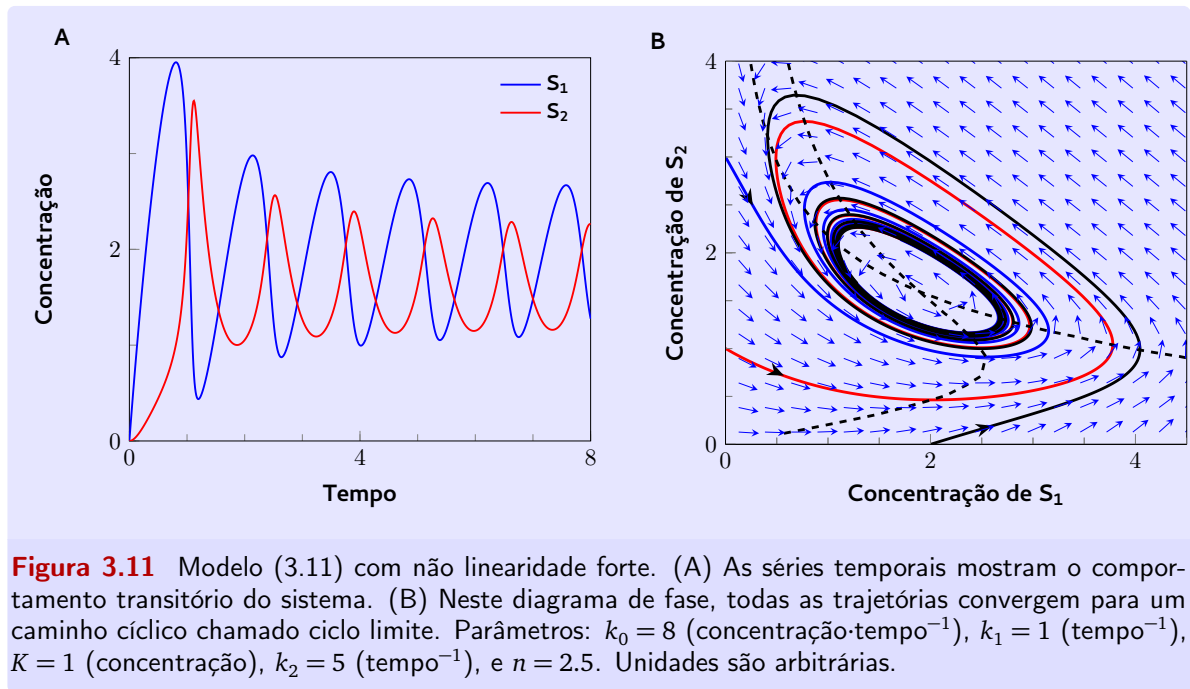
$$\begin{cases} \dot{s}_1 = k_0 - k_1 \left[1 + \left(\frac{s_2}{K} \right)^n \right] s_1 \\ \dot{s}_2 = k_1 \left[1 + \left(\frac{s_2}{K} \right)^n \right] s_1 - k_2 s_2. \end{cases} \quad (3.11)$$

Presume-se que a ativação alostérica seja fortemente cooperativa.

A intuição leva-nos a prever o seguinte processo repetitivo: o feedback positivo de auto-catálise provoca um aumento progressivo da concentração de S_2 , à custa de uma diminuição gradual de S_1 , até que este se esgote. Neste momento S_2 deixará de ser produzido, e a sua produção manter-se-á baixa até que haja S_1 suficiente para retomar a produção (auto-estimulada) de S_2 , completando-se assim um ciclo que se repetirá de forma periódica e indefinidamente.

Consideremos o comportamento do modelo quando o coeficiente de Hill é $n = 2.5$, ilustrado na figura 3.11. Nas séries temporais (painel A), vemos um estado transitório de curta duração, seguido por um comportamento periódico sustentado. O diagrama de fase (painel B) mostra um caminho cíclico, chamado **ciclo limite**, para o qual todas as trajetórias são atraídas.

Ao contrário da bi-estabilidade, que é gerada por feedback positivo e não linearidade, as oscilações de ciclo-limite são geradas por feedback negativo e não-linearidade. Muitos osciladores biológicos podem ser classificados ou como *osciladores retardados (com delay)* ou como *osciladores com relaxação*. O comportamento periódico dos osciladores retardados é causado por um atraso no ciclo de feedback negativo, que provoca voltas repetidas de atividade acumulada. Osciladores com relaxação exibem uma interação entre feedback positivo e negativo. Feedback positivo induz um comportamento quasi-bi-estável, enquanto que o feedback negativo induz uma transferência cíclica entre as duas condições quasi-estáveis.



O modelo (3.11) é um oscilador com relaxação. A ativação alostérica introduz ambos – feedback positivo (aumentando a velocidade de produção de S_2) e feedback negativo (esgotando S_1 e assim fazendo diminuir a produção de S_2). À medida que o grau de cooperação n aumenta, o pulsar do oscilador torna-se cada vez mais pronunciado, com movimentos de mudança brusca Máximo/mínimo, seguidos de períodos longos de baixa concentração.

Na prática é difícil intuir a existência de oscilações de ciclo-limite a partir da estrutura do modelo. No caso especial dos modelos com duas espécies, podemos usar o chamado *teorema de Poincaré-Bendixson*. Este teorema diz o seguinte: se todas as trajetórias são limitadas (i.e., não divergem para infinito) e se o sistema não tem estados estacionários estáveis, então existe um ciclo-limite. A intuição é que as trajetórias têm que estar em algum lugar. Como não podem divergir nem permanecer num estado estacionário, a única opção que lhes resta é convergirem para um ciclo limite.

3.5 Análise de bifurcação

Na maior parte das vezes, a posição dos estados estacionários de um sistema muda, quando mudam os parâmetros do modelo. Por exemplo, a figura 3.12 mostra a concentração estacionária de S_1 como função da variação do parâmetro k_1 no modelo 3.3, que aqui se

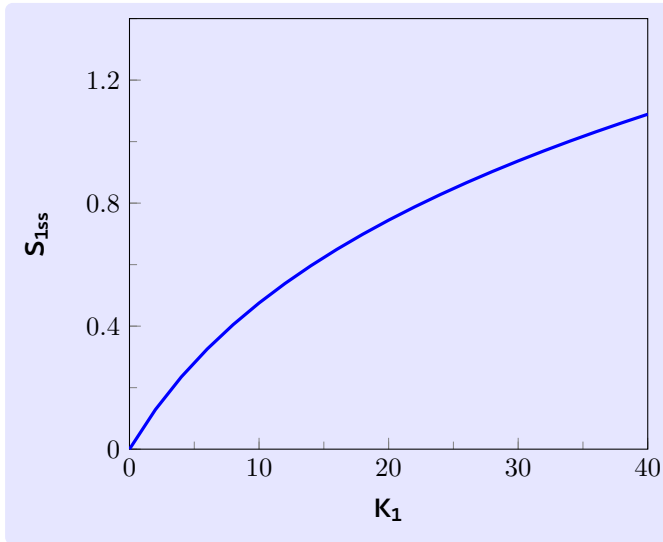


Figura 3.12 Diagrama de continuação. O estado estacionário da espécie S_1 , do modelo (3.3), é mostrado como função do parâmetro k_1 . Os outros valores dos parâmetros são os mesmos da figura 3.2.

recorda

$$\begin{cases} \dot{s}_1 = \frac{k_1}{1 + \left(\frac{s_2}{K}\right)^n} - k_3 s_1 - k_5 s_1 \\ \dot{s}_2 = k_2 + k_5 s_1 - k_4 s_2 \end{cases} \quad (3.12)$$

Num contexto experimental, este gráfico é chamado *curva de dose-resposta*; no contexto de modelação, é chamado *diagrama de continuação*.

A variação dos parâmetros pode levar também a mudanças qualitativas no comportamento de longo prazo (e.g., mudanças no número de estados estacionários ou na estabilidade desses estados). Os valores dos parâmetros nos quais ocorrem essas mudanças são chamadas de *pontos de bifurcação*; um **diagrama de bifurcação** é um diagrama de continuação onde aparecem pontos de bifurcação.

A Figura 3.13 mostra um diagrama de bifurcação para a rede de reações simétrica, modelada por (3.4):

$$\begin{cases} \dot{s}_1 = \frac{k_1}{1 + (s_2/K_2)^{n_1}} - k_3 s_1 \\ \dot{s}_2 = \frac{k_2}{1 + (s_1/K_1)^{n_2}} - k_4 s_2 \end{cases} \quad (3.13)$$

Nessa figura representa-se a variação da concentração estacionária, S_{1ss} , da espécie S_1 , quando o parâmetro k_1 varia. Estas curvas de bifurcação, em forma de S, são características dos sistemas bi-estáveis. Os pontos onde ocorrem bifurcações (em $k_1 = 16.1$ e $k_1 = 29$) são chamados de *bifurcações sela-nó* (porque ocorrem quando um ponto de sela instável e um nó estável se juntam). Entre essas bifurcações coexistem três estados estacionários – dois estáveis e um instável que separa as bacias de atração dos pontos estáveis. Para a esquerda do primeiro ponto de bifurcação e para a direita do segundo o sistema apresenta comportamento mono-estável.

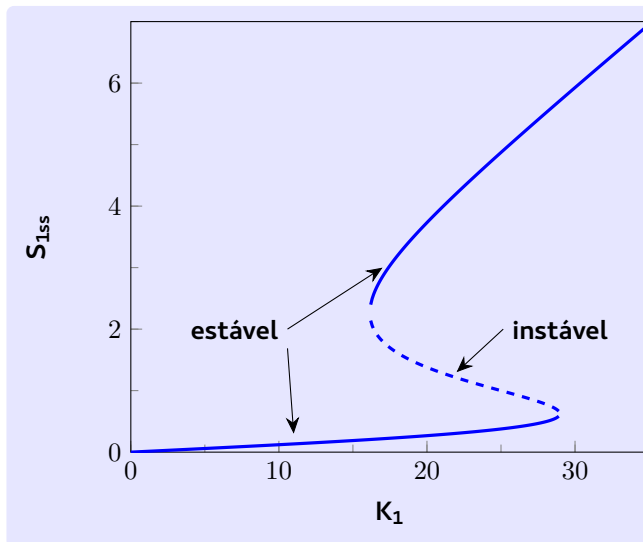


Figura 3.13 Diagrama de bifurcação do modelo (3.4), mostrando a concentração estacionária de S_1 como função do parâmetro k_1 . Para k_1 entre os pontos de bifurcação o sistema apresenta um comportamento bi-estável com dois estados estacionários estáveis (curva sólida) e um estado estacionário instável. Fora do intervalo entre os pontos de bifurcação o sistema apresenta um comportamento mono-estável. Os valores de k_1 onde aparecem ou desaparecem estados estacionários são chamados bifurcações sela-nó. Parâmetros: $k_2 = 20$ (concentração·tempo⁻¹), $K_1 = K_2 = 1$ (concentração), $k_3 = k_4 = 5$ (tempo⁻¹), $n_1 = n_2 = 2$. As unidades são arbitrárias.

Os diagramas de bifurcação fornecem uma visão muito elucidativa sobre a robustez do comportamento de um sistema (um sistema é robusto se o seu comportamento não é significativamente alterado por perturbações) e é talvez a análise mais útil e importante que se pode fazer em modelos bioquímicos. Em muitas situações (farmacológicas, e.g.) pretende-se calcular o valor de um determinado parâmetro que provoca uma resposta desejada (e.g., a partir de que dose de um medicamento se tem uma certa resposta desejada). Um diagrama de bifurcação mostra-nos que se um sistema estiver operando longe de um ponto de bifurcação é improvável que perturbações no sistema produzam uma mudança qualitativa na resposta do sistema; nesse caso o sistema é robusto. Pelo contrário, perto de um ponto de bifurcação, perturbações mínimas podem levar a grandes mudanças qualitativas na resposta do sistema.

Um outro método muito importante de análise de robustez de um sistema é a chamada *análise de sensibilidade* que, no entanto, por limitações de tempo, não vamos abordar nesta tese.

4 O Ciclo Celular

4.1 Introdução

O ciclo celular é a sequência de eventos em que uma célula cresce, reproduz todas as suas partes e divide-as, o mais possível uniformemente, entre duas células filhas, de modo a que as filhas recebam todas as informações e maquinaria necessária para repetir o processo. As componentes mais importantes que precisam de ser replicadas e transferidas para as células filhas são os cromossomas – o material genético da célula. Em células eucarióticas, os processos de transferência e replicação cromossômica são realizadas em fases do ciclo celular distintos:

- S – Síntese do ADN, e
- M – Mitose.

O ciclo celular eucariótico geralmente ocorre em quatro fases (Figura 4.1):

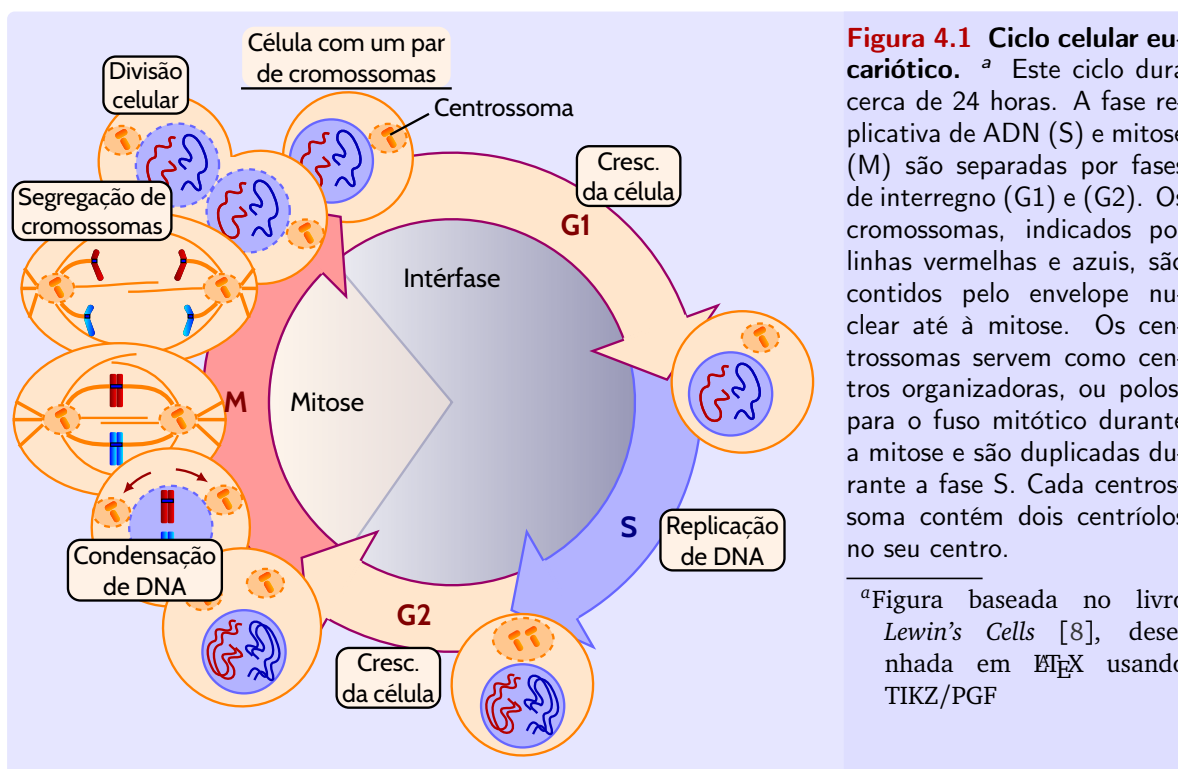
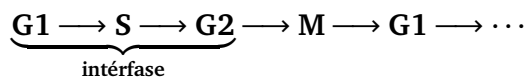


Figura 4.1 Ciclo celular eucariótico. ^a Este ciclo dura cerca de 24 horas. A fase replicativa de ADN (S) e mitose (M) são separadas por fases de interregno (G1) e (G2). Os cromossomas, indicados por linhas vermelhas e azuis, são contidos pelo envelope nuclear até à mitose. Os centríolos servem como centros organizadoras, ou polos, para o fuso mitótico durante a mitose e são duplicadas durante a fase S. Cada centríolo contém dois centríolos no seu centro.

^aFigura baseada no livro *Lewin's Cells* [8], desenhada em \LaTeX usando TIKZ/PGF



A célula cresce continuamente na intérfase, que consiste em três fases: **G1**, **S**, e **G2**. A replicação de **ADN** é restrita à fase **S**. **G1** é o intervalo (gap) entre a fase **M** e a fase **S**, e **G2** o intervalo entre a fase **S** e a fase **M**. Os intervalos (gaps) **G1** e **G2** servem vários propósitos, incluindo

- dar tempo à célula para que cresça (ou seja, sintetize todas as componentes necessárias para duplicar a sua massa) e
- dar tempo para garantir que cada grande evento do ciclo celular (**S** e **M**) seja completado corretamente antes que o próximo se inicie.

A divisão celular não ocorre continuamente. A entrada no ciclo celular é normalmente controlada pelas condições ambientais da célula, que podem gerar sinais, ou de estímulo ou de inibição. Este controlo externo é essencial por várias razões. Por exemplo, as células não devem ser autorizadas a iniciar o ciclo celular quando não estão disponíveis todos os recursos para completar esse ciclo. Igualmente desastroso seria se células fossem autorizadas a dividir-se continuamente, independentemente da atividade das células vizinhas. Os organismos são comunidades de células cooperantes, e esta cooperação inclui controlos estritos sobre quando as células se dividem. As consequências de colapso nestes controlos, mesmo num pequeno número de células, pode ser visto como uma situação de cancro – uma doença caracterizada por divisão celular descontrolada.

4.2 Fases ordenadas do ciclo celular

De seguida descrevemos com mais detalhe as quatro fases do ciclo celular eucariótico (ver a Figura 4.1):

G1: É o primeiro *gap* no ciclo celular, o período em que a célula produz todas as proteínas necessárias para a próxima fase - a fase **S**. Nesta fase a célula também monitoriza o ambiente interior e exterior para ver se todas as proteínas necessárias à síntese de **ADN** estão presentes, e se as condições globais são favoráveis para o avanço para a próxima fase. O *checkpoint* **G1/S** garante que todos os processos nessa fase foram executados de forma adequada e, em caso afirmativo, permite a passagem à próxima fase.

S: Replicação de **ADN**. Durante esta fase todo o **ADN** da célula é duplicado. É a fase mais longa do ciclo celular tomando quase metade do tempo do ciclo celular. Tem o nome **S** porque é nesta fase que o **ADN** é sintetizado.

G2: É o segundo *gap* no ciclo celular. Nesta fase a célula sintetiza as proteínas necessárias para a próxima fase (Mitose) e para a divisão celular (Citocinese). Nessa fase o *checkpoint* **G2/M** garante que a replicação de **ADN** ocorreu de forma adequada e que todas as outras condições (como a produção das proteínas necessárias à próxima fase) ocorreram como esperado antes de permitir a passagem para a Mitose.

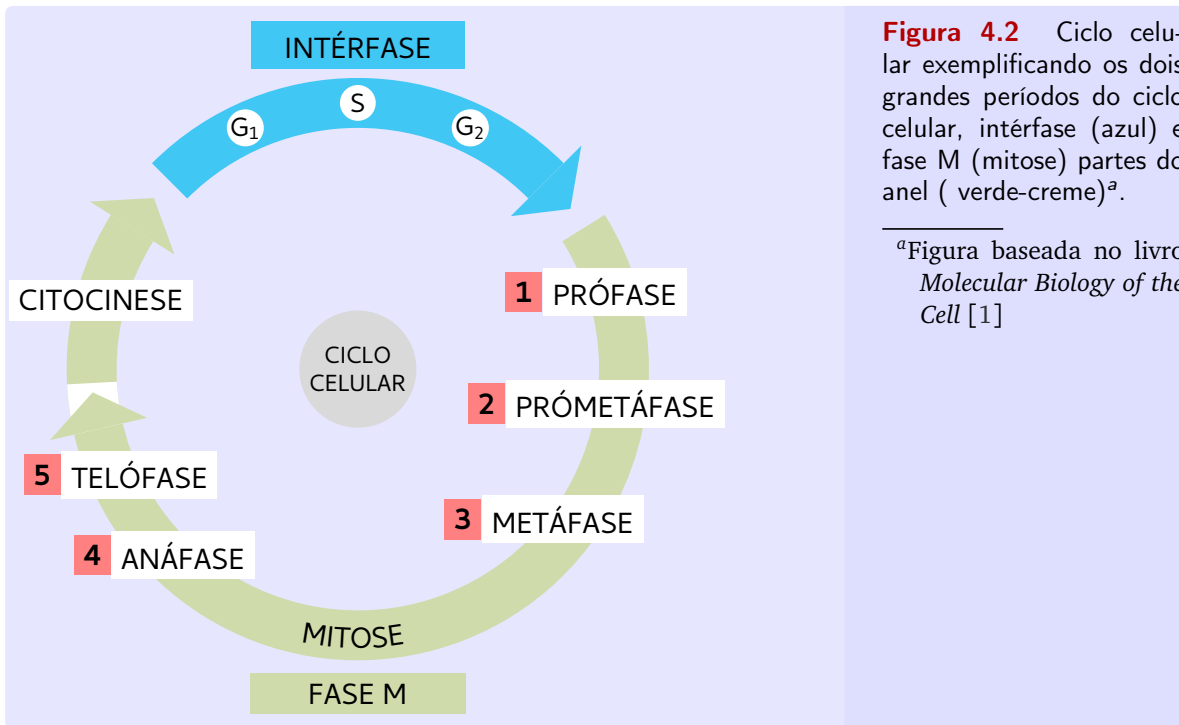


Figura 4.2 Ciclo celular exemplificando os dois grandes períodos do ciclo celular, intérfase (azul) e fase M (mitose) partes do anel (verde-creme)^a.

^aFigura baseada no livro *Molecular Biology of the Cell* [1]

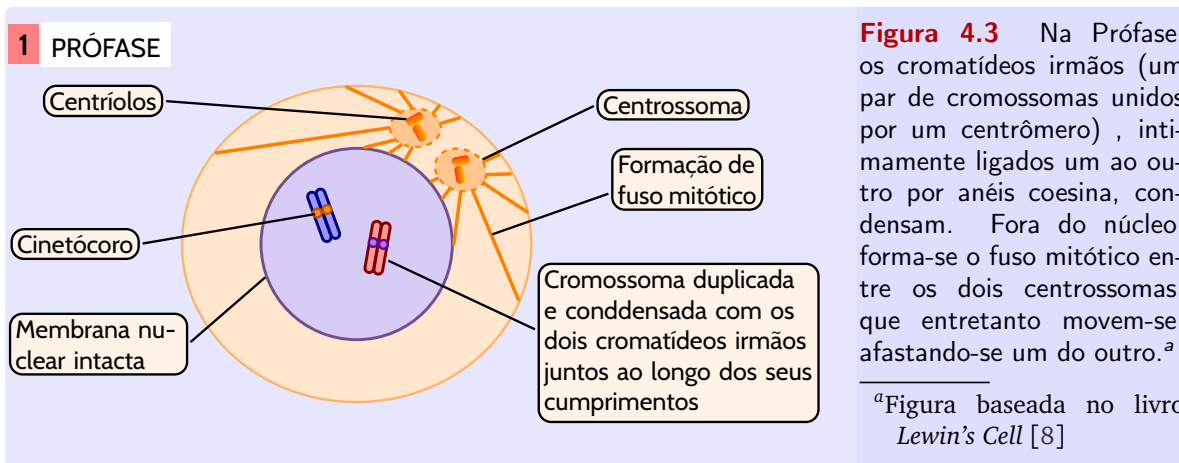


Figura 4.3 Na Prófase, os cromatídeos irmãos (um par de cromossomas unidos por um centrômero), intimamente ligados um ao outro por anéis coesina, condensam. Fora do núcleo, forma-se o fuso mitótico entre os dois centrossomas, que entretanto movem-se, afastando-se um do outro.^a

^aFigura baseada no livro *Lewin's Cell* [8]

M: Na fase **M** acontece uma série de eventos que levam ao alinhamento e separação dos cromatídeos irmãos. Este processo é dividido em cinco sub-fases distintas que foram identificadas através da observação da divisão celular por microscópio eletrônico. Estas sub-fases são a Prófase, Prometáfase, Metáfase, Anáfase e Telófase. Essas sub-fases geralmente levam entre uma a duas horas para a sua conclusão e estão descritas nas legendas das Figuras 4.3 a 4.8.

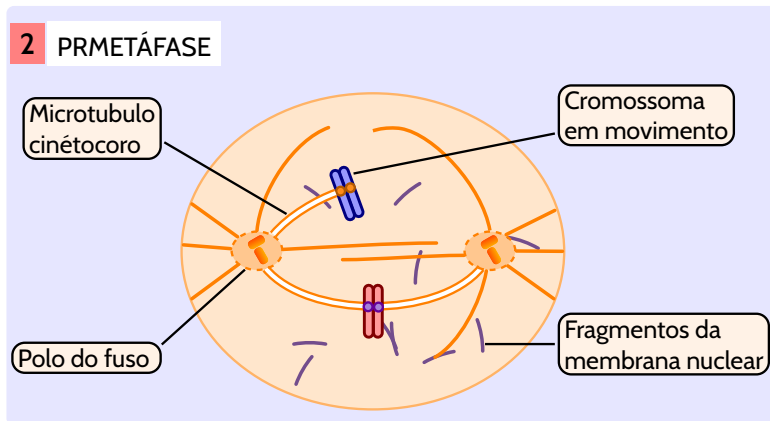


Figura 4.4 Prometáfase começa abruptamente com o rompimento da membrana nuclear. Os cromossomas podem agora ligar-se aos microtúbulos do fuso mitótico, através dos respectivos cinetócoros, começando a mover-se sobre eles.^a

^aFigura baseada no livro *Lewin's Cell* [8]

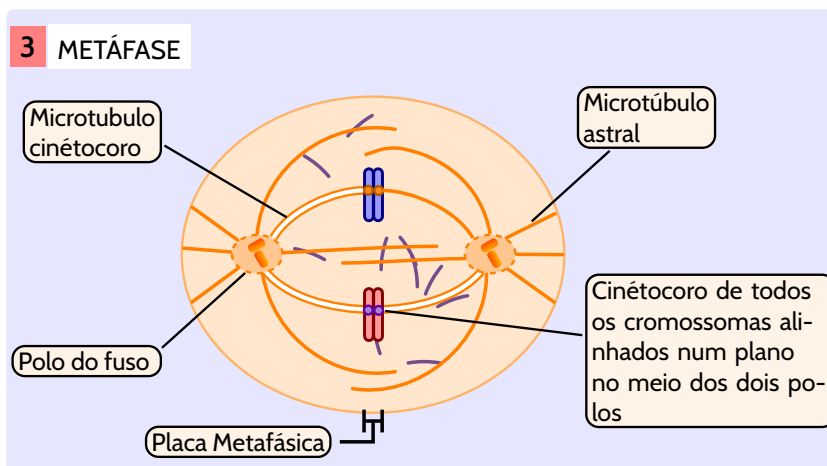


Figura 4.5 Na Metáfase, os cromossomas estão alinhados no plano equador do fuso mitótico, equidistantes dos dois polos do fuso. Os microtúbulos cinetocóricos agarram cada cromatídeo irmão, ligando-o a polos opostos do fuso.^a

^aFigura baseada no livro *Lewin's Cell* [8]

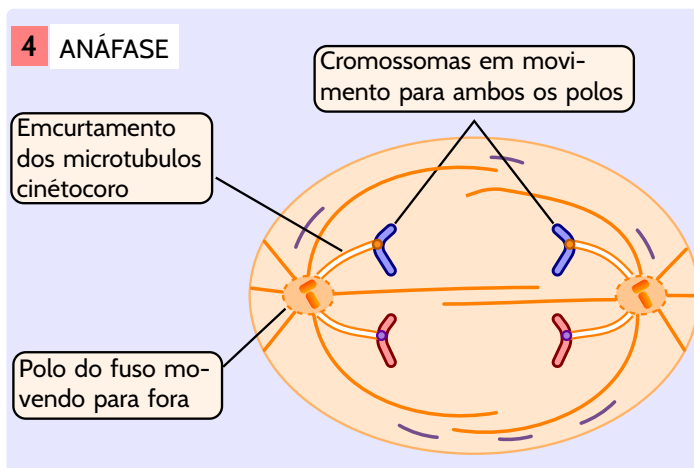
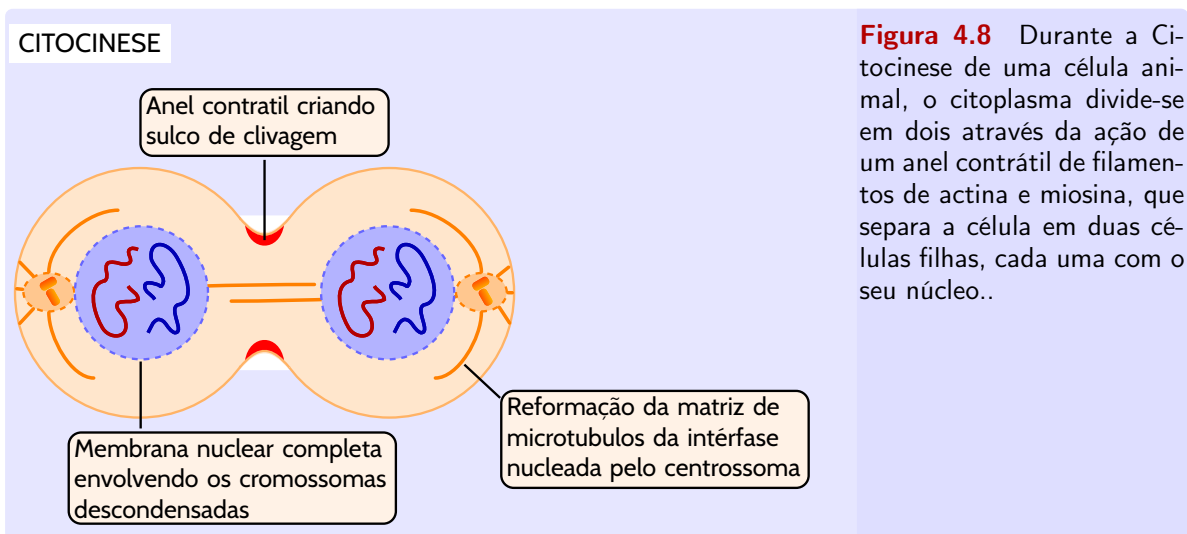
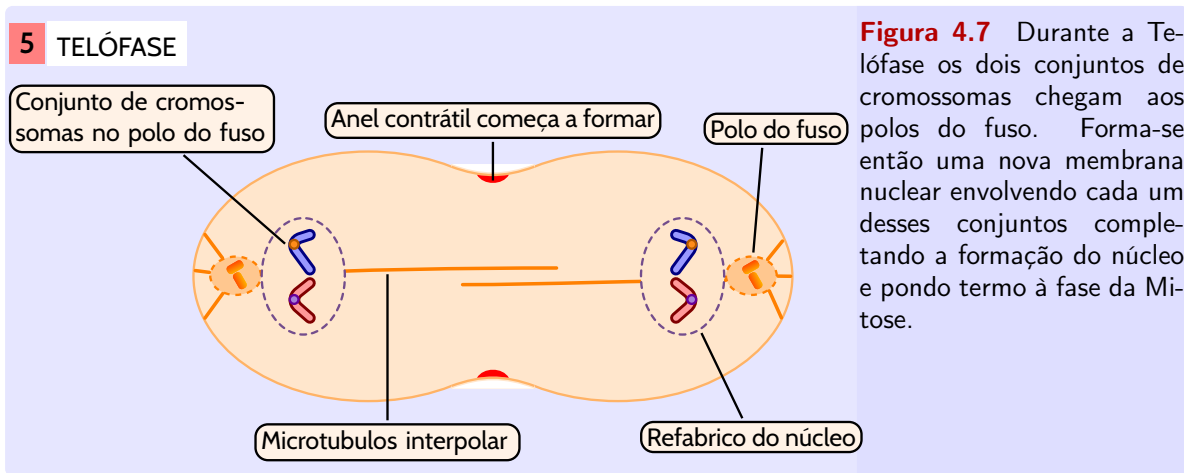


Figura 4.6 Na Anáfase, os cromatídeos irmãos separam-se sincronamente e são puxados lentamente em direção ao pólo a que estão ligados. Os microtúbulos cinetocóricos ficam cada vez mais curtos e os polos do fuso afastam-se um do outro, contribuindo para a segregação cromossômica.^a

^aFigura baseada no livro *Lewin's Cell* [8]

4.3 Checkpoints e regulação do ciclo celular

Os processos que a célula executa durante o seu ciclo celular são altamente regulados para garantir que as células filhas são viáveis e que cada uma contenha uma cópia o mais fiel possível do **ADN** da célula original. Existem muitos *pontos de controlo*, ou *checkpoint*,



durante o ciclo celular. Um *checkpoint* é um mecanismo que garante que cada processo é ativado ou desativado no tempo correto, garantindo assim que os eventos ocorrem na ordem certa, seguindo um fluxo unidirecional e irreversível.

Os *checkpoints* podem, no entanto, mandar executar uma espécie de *back-ups*, recorrendo a um complexo sistema de *feedbacks*, para repetir de novo, se necessário, os processos, caso haja eventos mal executados. Só após as correções de eventuais erros, é que permitem o avanço do ciclo (no caso de células normais).

Concluindo: as quatro transições características do ciclo celular – **G1/S**, **Checkpoint!G2/M**, **Checkpoint!M/A** e **Checkpoint!T/G1** – representam quatro pontos de controlo – *checkpoints* – onde a progressão do ciclo celular pode ser interrompida se a célula deteta qualquer anomalia na conclusão das funções essenciais do estado de pré-transição. A célula passa um *checkpoint* quando a proteína que inibe a transição se degrada (**CKI**, **Wee**, **coesina**, **ciclina B = CycB**, como se ilustra na Figura 4.9).

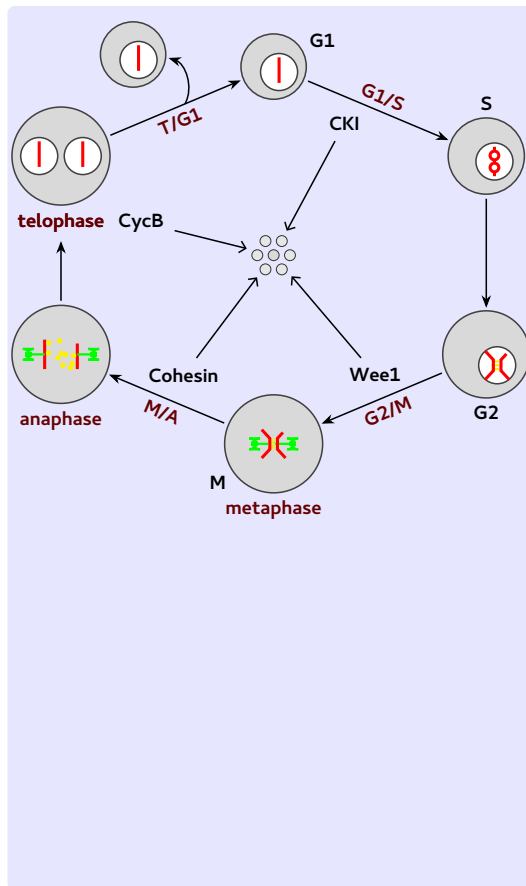


Figura 4.9 Checkpoints do ciclo celular. Cada célula tem uma membrana envolvente que delimita o citoplasma (cinzento), com um compartimento nuclear (branco) contendo um cromossoma representativo (barra vermelha). O cromossoma atravessa quatro fases distintas: **G1**, não replicado; **S**, síntese de **ADN**; **G2**, **ADN** replicado; **M**, Mitose. Durante a fase **G2** os cromátídeos irmãos estão ligados por anéis de coesina (amarelo). A Mitose consiste de sub-fases distintas: Prometáfase (rompimento da envolvente nuclear, condensação de cromossomas, montagem de fuso), Prófase (alinhamento dos cromossomas replicados no fuso), Metáfase (bi-orientação de todos os cromossomas no plano equatorial do fuso), Anáfase (rompimento dos anéis de coesina e separação dos cromátídeos irmãos para polos opostos do fuso), Telófase (reconstituição das membranas envolventes à volta dos núcleos irmãos), divisão celular. As quatro transições características do ciclo celular (**G1/S**, **G2/M**, **M/A**, e **T/G1**) representam quatro pontos de controlo natural (*checkpoints*) onde a progressão do ciclo celular pode ser interrompida se a célula detetar qualquer problema com o completamento de funções essenciais no estado de pré-transição. A célula passa um *checkpoint* quando a proteína que inibe a respetiva transição se degrada (**CKI**, **Wee1**, **Coesina**, **ciclina B = CycB**). Os sete círculos pequenos representam produtos da degradação de proteínas.

Mecanismos moleculares de controlo do ciclo celular

Os eventos do ciclo celular são controlados por uma rede de sinais moleculares, cujas componentes principais são as chamadas **proteínas cinases dependentes de ciclina**, ou apenas **CDKs** (Cyclin-Dependent Kinases).

Como o próprio nome indica, uma **CDK** requer uma **ciclina** parceira, para estar ativa e assim reconhecer e fosforilar (isto é, adicionar um grupo fosfato PO_4) a proteínas-alvo adequadas, envolvidas em eventos do ciclo celular. Sem a ligação à ciclina apropriada as **CDKs** permanecem inativas. O nome **ciclina** deve-se ao facto de que estas proteínas são degradadas ou sintetizadas ciclicamente em pontos específicos do ciclo celular.

O papel de uma **CDK** ativa (emparelhada com uma ciclina) é pois fosforilar certas proteínas-alvo (targets) utilizando **ATP** como dador de fosfato. As proteínas-alvo das **CDKs**, ou melhor dos dímeros **CDK:ciclina**, incluem proteínas envolvidas na replicação do **ADN**, na condensação de cromossomas, na formação do fuso mitótico, e outros eventos do ciclo celular.

Por exemplo, ao fosforilar proteínas ligadas aos cromossomas em certos “pontos de replicação” (sequências específicas de nucleotídeos, onde a replicação do **ADN** pode iniciar-se), as **CDKs** desencadeiam a síntese de **ADN**. Outro exemplo, ao fosforilar histonas (proteínas envolvidas no empacotamento de **ADN**), as **CDKs** iniciam a condensação cromossomática

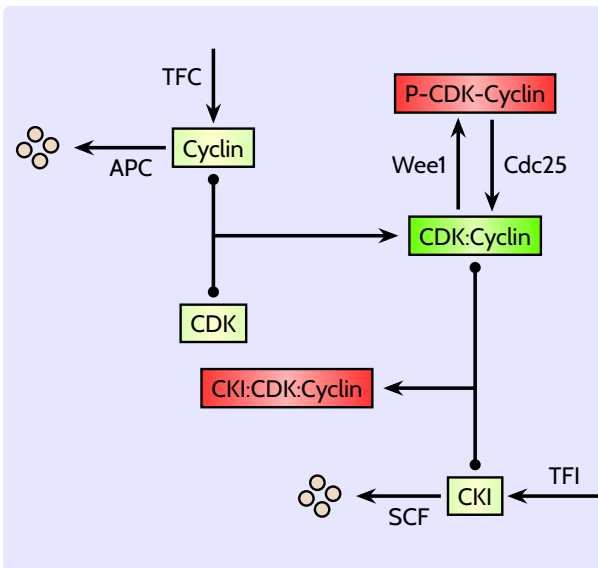


Figura 4.10 Mecanismos de regulação da atividade de um complexo CDK:ciclina. A cinase CDK, está geralmente presente em abundância constante, em excesso relativamente a subunidades de ciclina. A concentração de ciclina é determinada pelas atividades do seu fator de transcrição, **TFC**, e das suas máquinas de degradação **APC** ou **SCF**. Os dímeros **ciclina/CDK** ativos podem ser desativados ligando-se a um inibidor estequiométrico **CKI**, cuja abundância é determinada pelas atividades do respetivo fator de transcrição **TFI** e suas máquinas de degradação **SCF**. Além disso, **CDK** pode ser inativada por fosforilação (cinase = **Wee1**) e reativado por desfosforilação (fosfatase = **Cdc25**). As enzimas **TFC**, **APC**, **TFI**, **SCF**, **Wee1** e **Cdc25** estão todas sujeitas às suas próprias interações regulatórias.

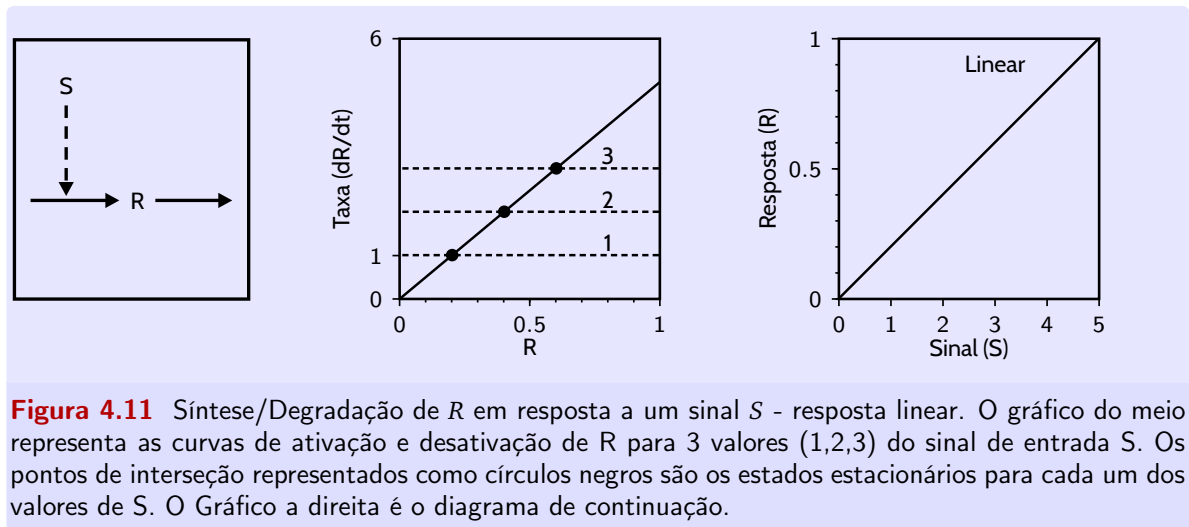
na transição **G2/M**.

Claro que para entender a calendarização dos eventos básicos do ciclo celular, é preciso entender os padrões de ativação e inativação das **CDKs**.

Em princípio, as células poderiam regular a concentração de cada **CDK**. No entanto, isto não é comum. De facto, a maioria das **CDKs** estão presentes em abundância, constante ao longo do ciclo celular. A sua atividade é regulada, em vez disso, de três maneiras (ver Figura 4.10):

- pela disponibilidade de subunidades de ciclina. A abundância de ciclina é determinada pelas respectivas taxas de síntese e degradação, taxas essas que, por sua vez, podem ser reguladas durante o ciclo celular, como veremos.
- pela inibição da formação de dímeros **Ciclina/CDK**, por intervenção de um terceiro parceiro – um inibidor alostérico (ou estequiométrico), em geral, referido como um **CKI (Cyclin-dependent kinase inhibitor)**. Os **CKIs** vêm e vão, porque as suas taxas de síntese e degradação são também reguladas ao longo do ciclo celular.
- por inibição provocada por fosforilação de um resíduo específico de tirosina. O estado de fosforilação da **CDK** varia durante o ciclo celular conforme a variação da atividade da **tirosina-cinase Wee1** e **tirosina-fosfatase Cdc25**.

Concluindo: os instantes de ocorrência dos eventos do ciclo celular dependem de ondas sequenciais de ativação e inativação de **CDKs**. Durante a proliferação da maioria dos tipos celulares, as subunidades catalíticas (**CDK1**, **CDK2**, **CDK4** e **CDK6**) estão presentes em excesso, e as suas atividades dependem da disponibilidade de subunidades regulatórias específicas (**ciclina A**, **ciclina B**, **ciclina D**, **ciclina E**). A abundância de cada tipo de ciclina é controlada pelas taxas de síntese e degradação. A taxa de síntese de ciclina é determinada pela atividade de factores de transcrição específicos, e a taxa de degradação é determinada pela atividade de complexos específicos (**E3 ubiquitina-ligantes: APC** e **SCF**). Moléculas de ciclina são rapidamente degradadas por proteossomas da célula.



Assim, o ciclo celular não é apenas uma “dança” em que as **CDKs** e as **ciclins** mudam de parceiro a um ritmo constante, como alguns diagramas de livros didáticos podem sugerir, mas sim um sistema dinâmico complexo, não linear, de interações entre dímeros **CDK:ciclina** e os seus agentes reguladores: **fatores de transcrição (TFs)**, máquinas de degradação, **CKIs**, e enzimas modificadoras de tirosina.

A nossa tarefa é pois entender os princípios básicos deste sistema dinâmico.

Convenções usadas na modelação

Antes de descrever um modelo simples para o ciclo celular, vamos descrever algumas definições e convenções que serão usadas para construir esse modelo.

- **Síntese/degradação. Lei de ação-massa.** Seja R a concentração de uma espécie molecular que participa numa certa reação, e suponhamos que S (de Sinal) é a concentração de uma substância que regula a síntese de R e ao mesmo tempo que R degrada-se a uma taxa proporcional a sua concentração. A maneira usual de modelar a cinética de R , baseada na lei de ação-massa, é

$$\frac{dR}{dt} = k_0 + k_1 S - k_2 R$$

onde k_0, k_1 e k_2 são os parâmetros cinéticos (taxas constantes ou *rate constants*) respetivamente, da síntese de R na ausência do sinal regulador, da ação da espécie reguladora S e da degradação de R .

- **Ativação/Desativação.** É sabido que a modificação covalente desempenha um método de controlo em muitas reações bioquímicas, incluindo metabolismo, transdução sensorial, contração muscular, síntese de proteínas, etc. O tipo mais frequente de modificação covalente envolve a ligação ou remoção de um grupo fosfato. A **fosforilação** e **desfosforilação** resultantes, são catalizadas por enzimas chamadas **cinases** e **fosfatases**, respetivamente.

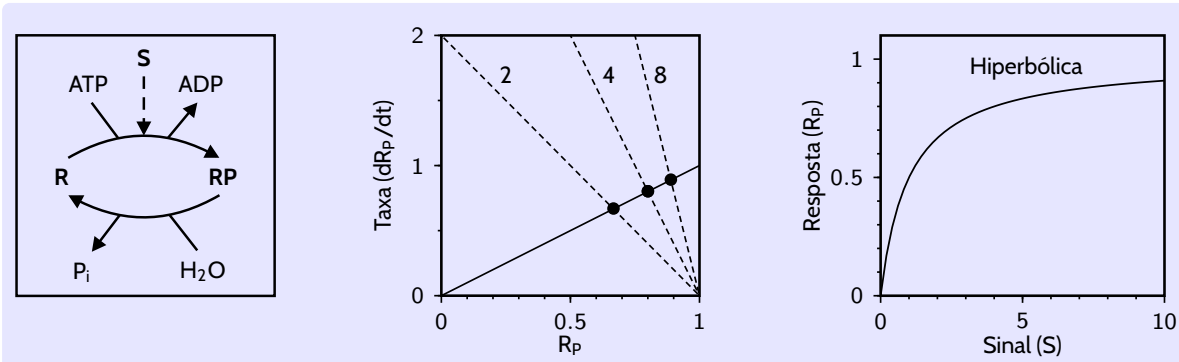


Figura 4.12 Ativação/Desativação (p.ex., desfosforilação/fosforilação) de R em resposta a um sinal S - resposta hiperbólica. O gráfico do meio representa as curvas de ativação e desativação de R_p para 3 valores (2,4,8) do sinal de entrada S . Os pontos de interseção representados como círculos negros são os estados estacionários para cada um dos valores de S . O Gráfico a direita é o diagrama de continuação.

Muitas redes bioquímicas envolvem múltiplas inter-conversões de proteínas entre os estados ativo/inativo (ON/OFF), onde o processo de fosforilação está em geral envolvido. Em alguns casos, a forma fosforilada é a desativa enquanto que a desfosforilada é a ativa (em certos casos, é o oposto). Se representamos por R e R_p as formas ativa (desfosforilada) e inativa (fosforilada), respetivamente, e supondo que todos os processos operam a taxas constantes, então (figura 4.12):

$$\frac{dR_p}{dt} = k_1SR - k_2R_p \quad (4.1)$$

O primeiro termo é a conversão $R \rightarrow R_p$, dependente do sinal (cinase) S , e k_2 é a taxa da reação oposta. A conservação da quantidade total de proteína R_T implica que

$$R_T = R + R_p = \text{constante}$$

No entanto, na prática, ambas - fosforilação e desfosforilação - são reações enzimáticas que requerem a presença de enzimas, respetivamente, cinases e fosfatases, para obter taxas adequadas de inter-conversão. Por isso, estes processos são em geral governados por cinética de tipo Michaelis-Menten, o que nos leva a substituir a equação (4.1) por

$$\frac{dR_p}{dt} = \frac{k_1SR}{K_{m1} + R} - \frac{k_2R_p}{K_{m2} + R_p} \quad (4.2)$$

e, incluindo a lei de conservação $R_T = R + R_p = \text{constante}$, por

$$\frac{dR_p}{dt} = \frac{k_1S(R_T - R_p)}{K_{m1} + (R_T - R_p)} - \frac{k_2R_p}{K_{m2} + R_p} \quad (4.3)$$

O primeiro termo representa a ativação (ou desativação, conforme o contexto) de R quando o estímulo está presente, enquanto que o segundo termo representa desativação (ou ativação, conforme o contexto). Os parâmetros $k_i, K_{mi}, i = 1, 2$ são

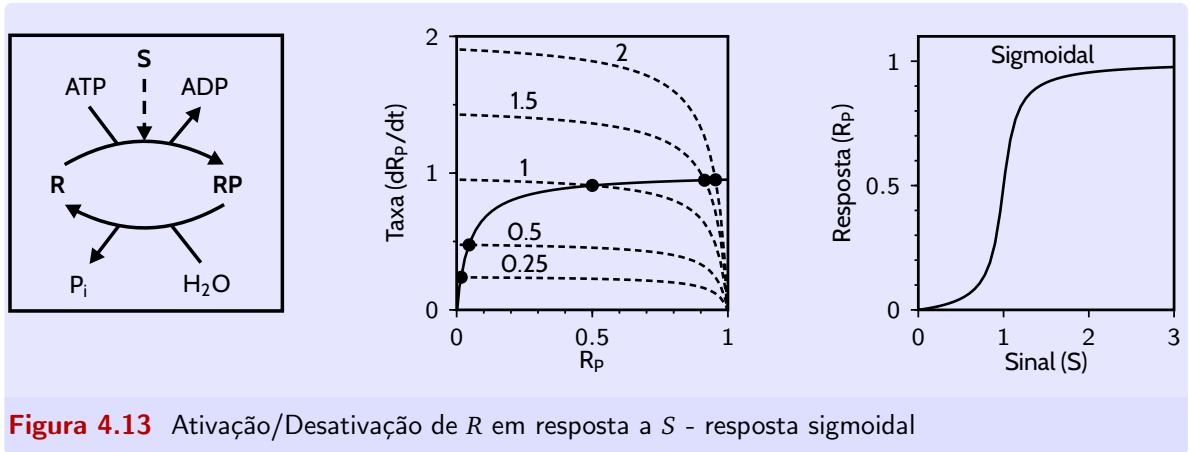


Figura 4.13 Ativação/Desativação de R em resposta a S - resposta sigmoideal

positivos, por agora considerados constantes. Em redes extensas, com muitos elementos que afetam as atividades uns dos outros, esses parâmetros podem depender dos níveis de atividade de outros intervenientes.

Neste caso, a concentração estacionária da forma fosforilada é solução da equação quadrática

$$k_1 S (R_T - R_p) (K_{m2} + R_p) = k_2 R_p (K_{m1} + R_T - R_p)$$

A solução com significado biofísica ($0 < R_p < R_T$) é

$$\frac{R_{pss}}{R_T} = G\left(k_1 S, k_2, \frac{K_{m1}}{R_T}, \frac{K_{m1}}{R_T}\right) \quad (4.4)$$

onde G é a chamada *função de Goldbeter-Koshland*, definida por

$$G(u, v, J, K) = \frac{2uK}{v - u + vJ + uK + \sqrt{(v - u + vJ + uK)^2 - 4(v - u)uK}}$$

Na figura 4.13, coluna 3, vemos o gráfico de R_{pss} como função de S – é uma curva sigmoideal se J e K forem ambos $\ll 1$. Este mecanismo para criar uma curva de resposta de tipo “interruptor” diz-se *ultra-sensibilidade de ordem 0*.

A função de Goldbeter-Koshland, embora de tipo “interruptor” (switch-like), tem características idênticas às curvas lineares e hiperbólicas – são graduais e reversíveis. *Graduais*, significa que a resposta aumenta continuamente com a intensidade do sinal. Um sinal ligeiramente mais forte dá uma resposta um pouco mais forte. *Reversíveis*, no sentido em que, se a intensidade do sinal é alterada de $S_{inicial}$ para S_{final} , a resposta a S_{final} é a mesma, quer o sinal aumente ($S_{inicial} < S_{final}$) quer diminua ($S_{inicial} > S_{final}$).

Uma resposta sigmoideal é abrupta, embora seja contínua e reversível. Como um sinal sonoro (buzzer) ou um ponteiro laser, para ativar a resposta devemos pressionar com força suficiente o botão, e para manter a resposta devemos continuar a pressionar. Quando deixamos de premir o botão, a resposta desliga-se precisamente à mesma intensidade à qual é ligada.

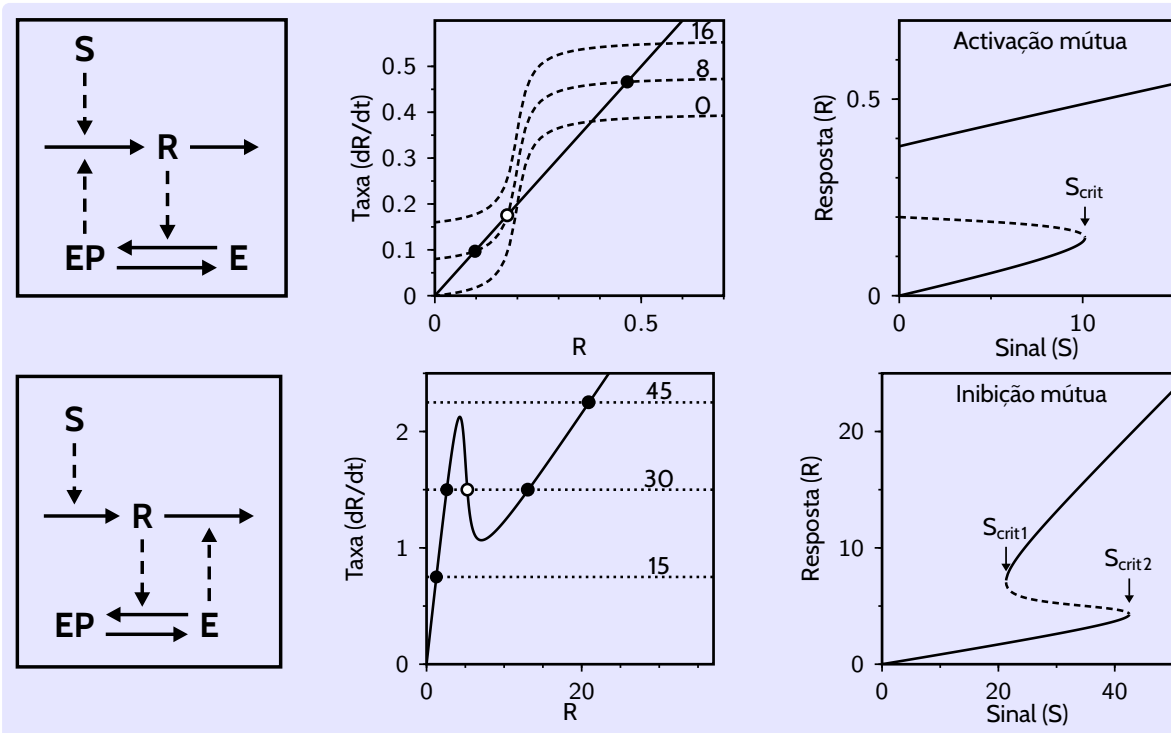


Figura 4.14 Dois tipos de Feedback positivo. No Sistema no topo o feedback positivo é conseguido por ativação mútua enquanto que no sistema no fundo o feedback positivo é conseguido por um antagonismo mútu. Os gráficos do meio representam as curvas de ativação e desativação de R para vários valores de S. Os pontos de interseção negros são os estados estacionários para esses valores para cada valor de S acima das curvas. As curvas da direita são os diagramas de bifurcação com os pontos de bifurcação representados.

- **Feedback positivo. Duplo antagonismo.** Na figura 4.14 o sinal influencia a resposta através de duas vias paralelas que influenciam a resposta em duas direções opostas (um exemplo de *controlo feedforward*).

Alternativamente, algum componente de uma via de resposta pode fazer feedback sobre o sinal.

O feedback pode ser positivo, negativo ou misto. Existem dois tipos de feedback positivo. Na primeira linha da figura 4.14, R ativa a proteína E (por fosforilação), e E_p aumenta a síntese de R. Na segunda linha da mesma figura, R inibe E que, por sua vez, promove a degradação de R; assim, R e E são mutuamente antagónicos.

Em ambos os casos (ativação recíproca ou antagonismo), o feedback positivo resultante pode criar um interruptor descontínuo, o que significa que a resposta celular muda abruptamente e de forma irreversível quando o sinal atinge um determinado valor crítico. Por exemplo, na primeira linha da figura 4.14, à medida que a intensidade do sinal (S) aumenta, a resposta é baixa até que S excede uma intensidade crítica, S_{crit} , altura em que a resposta aumenta abruptamente para um valor alto. Se agora S diminui, a resposta permanece elevada (ou seja, o interruptor é irreversível,

ao contrário de uma resposta sigmoïdal, que é reversível). Observe que, para valores de S entre 0 e S_{crit} , o sistema é **bi-estável** - isto é, tem dois valores de resposta estacionária estáveis (nos ramos superior e inferior - as linhas sólidas) separados por uma resposta estacionária instável (no ramo intermédio - a linha tracejada).

TABELA 4.1 Valor dos parâmetros para os modelos

Figura	Parâmetros
4.11	$k_0 = 0.01, k_1 = 1, k_2 = 5$
4.12	$k_1 = k_2 = 1, R_T = 1$
4.13	$k_1 = k_2 = 1, R_T = 1, k_{m1} = k_{m2} = 0.05$
4.14(A)	$k_0 = 0.4, k_1 = 0.01, k_2 = k_3 = 1, k_4 = 0.2, J_3 = J_4 = 0.05$
4.14(B)	$k_0 = 0, k_1 = 0.05, k_2 = 0.1, k'_2 = 0.5, k_3 = 1, k_4 = 0.2, J_3 = J_4 = 0.05$

4.4 Um modelo muito simples (Nasmyth)

Começamos com um modelo simples criado por de Nasmyth em 1996 ilustrado na Figura 4.15.

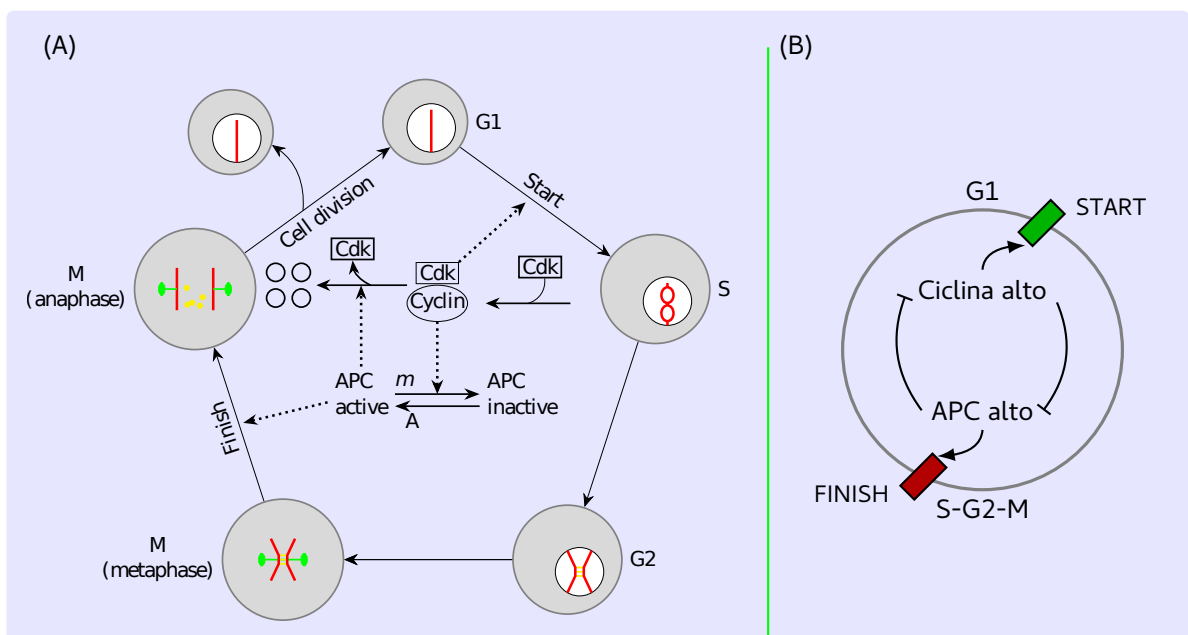


Figura 4.15 O ciclo celular e os seus pontos de controlo (checkpoints) num modelo altamente simplificado. O ciclo prossegue no sentido horário desde o início (START). Um nível de atividade alto de ciclina promove START, enquanto que o seu antagonista, APC, promove a o fim do ciclo (FINISH).

Neste modelo consideram-se dois estados - **G1** e **S-G2-M** - com baixa e alta atividade de **CDK**, respetivamente.

- A atividade de **CDK** é baixa em **G1**, por falta de parceiros adequados de ciclina. Os níveis de ciclina são baixos em **G1** porque é inibida a síntese do **mRNA** da ciclina, e a proteína ciclina é rapidamente degradada.
- No **START**, induz-se a síntese de ciclina e inibe-se a sua degradação, provocando um aumento dramático da atividade de **CDK**, que persiste durante **S**, **G2**, e **M**. O aumento inicial da atividade de **CDK** é suficiente para iniciar a replicação de **ADN**, mas é necessário um novo incremento dessa atividade para conduzir as células à Mitose.
- No **FINISH**, é ativado um grupo de proteínas que compõem o complexo chamado **APC (Anaphase Promoting Complex)**. O **APC** marca certas proteínas-alvo com a etiqueta “DESTRUIR”. Essas proteínas são então degradadas pela maquinaria proteolítica da célula. O **APC** é um complexo com cerca de uma dúzia de polipeptídeos mais duas proteínas auxiliares, **Cdc20** e **Cdh1**, cujos papéis (quando ativos) são aparentemente os de reconhecer proteínas-alvo específicas e apresentá-las ao complexo para rotulagem “DESTRUIR”.
- A ativação de **Cdc20** no **FINISH** é necessária para a degradação de **coesinas** na Anáfase e para ativação de **Cdh1**. Juntos, **Cdc20** e **Cdh1**, marcam as ciclinas para degradação na Telófase, permitindo que o sistema de controlo regresse a **G1**. Devemos distinguir estas duas proteínas auxiliares, porque **Cdc20** e **Cdh1** são controladas de forma diferente por **CDK:ciclina**, que ativa **Cdc20** e inibe **Cdh1**.

Histerese nas interações entre CDK e APC

Mas comecemos por nos focar na rede representada na figura 4.15B – uma rede de antagonismo mútuo. As transições irreversíveis do ciclo celular (**START** e **FINISH**), são consequências de um **ciclo de histerese** que deriva de um antagonismo fundamental entre as componentes centrais **CDK** e **APC** – **APC** inibe a actividade de **CDK**, destruindo as suas ciclinas parceiras, enquanto que os dímeros **CDK:ciclina** inibem a atividade de **APC** por fosforilação **Cdh1**.

Este antagonismo cria dois estados estacionários estáveis alternativos:

- um estado **G1**, com atividade alta de **Cdh1:APC** e atividade baixa de **CDK:ciclina**, e
- um estado **S-G2-M**, com atividade baixa de **Cdh1:APC** e atividade alta de **CDK:ciclina**.

Como se ilustra na parte central da figura 4.15A, o complexo **CDK:ciclina** e **APC** são antagónicos – cada um leva à destruição (ou perda de actividade), do outro. Considerando, por simplicidade, apenas a interação entre estes pares de moléculas, ignorando outros (importantes) detalhes, temos, de acordo com as convenções que vimos atrás:

$$\text{CDK:ciclina} = \text{Cyc} : \quad \frac{dX}{dt} = k_1 - (k'_2 + k''_2 Y) X \quad (4.5)$$

$$\text{Cdh1:APC} : \quad \frac{dY}{dt} = \frac{(k'_3 + k''_3 A)(1 - Y)}{J_3 + 1 - Y} - \frac{k_4 mXY}{J_4 + Y} \quad (4.6)$$

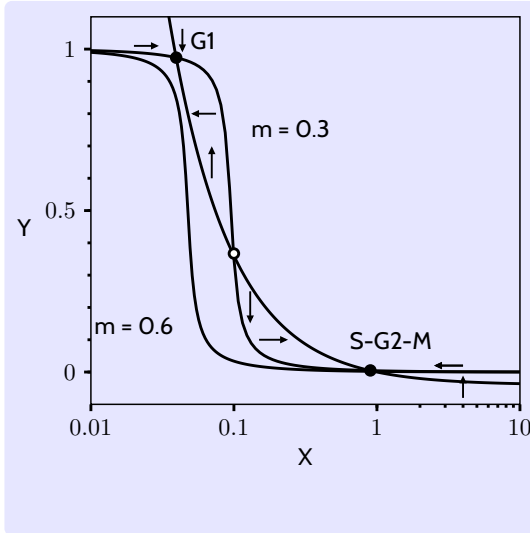


Figura 4.16 Retrato de fase para o par de ODEs não lineares dadas em (4.6). As curvas são nulclinas para $A = 0, m = 0.3$ e 0.6 . As setas indicam a direção campo apenas para $m = 0.3$. Para $m = 0.3$, o sistema tem três estados estacionários: um nó estável (**G1**) em $(X, Y) \approx (0.039, 0.97)$, um ponto de sela próximo de $(0.10, 0.36)$, e um outro nó estável (**S-G2-M**) próximo de $(0.90, 0.0045)$. Suponha que uma célula recém-nascida está na fase **G1** (**Cdh1** ativa e **ciclina** ausente). À medida que a célula cresce (m aumenta), o estado de equilíbrio **G1** desaparece e dá lugar a uma bifurcação sela-nó (em $m \approx 0.53$), e o sistema é forçado a mudar para o estado estacionário **S-G2-M**. Valor dos parâmetros são; taxas constante em (min^{-1}): $k_1 = k'_2 = 0.04$, $k''_2 = k'_3 = 1$, $k''_3 = 10$, $k_4 = 35$, $K'_4 = 2$; constantes de Michaelis sem dimensão: $J_3 = J_4 = 0.04$.

Nestas equações, X e Y representam, respetivamente, as concentrações de dímeros **CDK:ciclina** e complexos ativos **Cdh1:APC**; m é a massa da célula e A representa a concentração de uma proteína que ativa **Cdh1** em FINISH.

Assumimos ainda que as moléculas de ciclina são sintetizadas no citoplasma, onde se combinam rapidamente com um excesso de subunidades de CDK. De seguida, os dímeros resultantes **CDK:ciclina** movem-se para o núcleo, onde a sua concentração efetiva aumenta à medida que a célula cresce. Dentro do núcleo, a atividade de **CDK:ciclina** é proporcional a mX . Também supomos que **APC** está em excesso, e que a concentração total de **Cdh1** é constante e escalada para 1. As constantes k 's e J 's são constantes de Michaelis-Menten.

O plano de fase das equações (4.6) está representado na figura 4.16.

As nulclinas são dadas pelas equações algébricas

$$\text{X-nulclina : } X = \frac{\beta}{J_2 + Y} \quad (4.7)$$

$$\text{Y-nulclina : } X = p \frac{(1 - Y)(J_4 + Y)}{Y(J_3 + 1 - Y)} \quad (4.8)$$

onde $\beta = k_1/k'_2$, $J_2 = k'_2/k''_2$, e $p = (k'_3 + k''_3 A)/(k_4 m)$. a X-nulclina é uma hipérbole simples. Para $J_3 = J_4 \ll 1$, a Y-nulclina é uma sigmóide porque passa em $X = p$ e $Y = 1/2$.

Os estados estacionário (o número de pontos onde nulclinas se intersectam), depende do valor de p . Para valores de p ($p_1 < p < p_2$), as equações (4.6) têm três estados estacionários: dois nós estáveis separados por um ponto de sela. Os nós estáveis são **G1** (**Cdh1** ativa, **ciclina** baixa) e **S-G2-M** (**Cdh1** inativo, **ciclina** alta). Progresso através do ciclo celular pode ser pensado como um circuito em torno do ciclo de histerese na Figura 4.17.

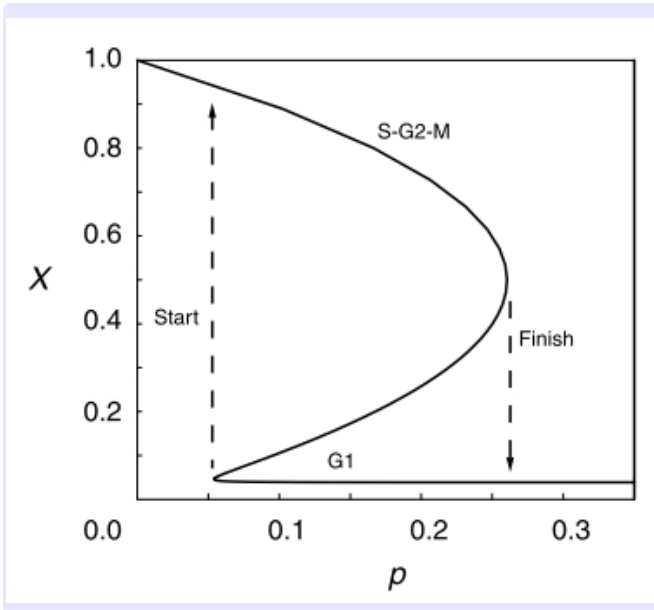


Figura 4.17 Diagrama de bifurcação para as equações (4.6). A concentração de estado estacionário de $X = [\text{CDK:ciclina}]$ é representada graficamente em função do parâmetro de bifurcação $p = (k'_3 + k''_3 A)/(k_4 m)$. Outros parâmetros: $\beta = \epsilon = 0.04$. A bifurcação sela-nó ocorre em $p_1 \approx 0.05418$ e $p_2 \approx 0.2604$.

Para uma pequena célula recém-nascida, na fase **G1** (com $A \approx 0$ e $p \approx k'_3/k_4 m < p_1$), o sistema é atraído para o estado estacionário estável **G1**. À medida que a célula cresce, m aumenta e p diminui. Eventualmente, p é inferior a p_1 , e o estado estacionário **G1** desaparece, forçando o sistema a saltar irreversivelmente para o estado estacionário **S-G2-M**. Uma atividade elevada de **CDK:ciclina** inicia os processos de síntese de **ADN** e mais tarde a Mitose, à medida que a célula continua a crescer. Supomos que, quando a replicação do **ADN** está completa e os cromossomas estão adequadamente alinhados no fuso mitótico, o parâmetro A aumenta bruscamente, forçando p a aumentar acima de p_2 . Consequentemente, o estado estacionário **S-G2-M** é “apanhado” por uma bifurcação sela-nó, e o sistema salta irreversivelmente de volta para o estado **G1**. A célula divide-se ($m \rightarrow m/2$), A diminui de volta para 0, e o sistema regressa à sua condição inicial. Neste modelo simples, as transições irreversíveis do ciclo celular (**START** e **FINISH**) são os saltos abruptos do ciclo de histerese nos pontos de bifurcação sela-nó. A transição **G1** \rightarrow **S-G2-M** é impulsionada por um crescimento celular, e a transição inversa é conduzida pelo alinhamento dos cromossomas no fuso mitótico.

4.5 Bi-estabilidade no ciclo celular

Como vimos no capítulo anterior existem dois ingredientes fundamentais para que haja bi-estabilidade – feedback positivo e não linearidade.

Pode-se considerar o ciclo celular como um ciclo de feedback onde certas espécies bioquímicas ativam a sua produção (feedback positivo), certas espécies desativam a produção de outras (feedback negativo), e ainda certas espécies interagem com outras inibindo-se mutuamente numa espécie de antagonismo mútuo (feedback positivo). Quando o tipo de interação é antagonismo mútuo o feedback positivo é implementado por um ciclo de duplo

TABELA 4.2 Actividade de alguns componentes do ciclo celular

Variável	Espécie	Atividades
Cyc	ciclina B	controla as cinases CDK (parceiro de ligação) alta no START antagonista de APC quando Cyc é baixa, a célula divide-se
APC	Cdh1	associada com APC marca proteínas com o rótulo "DESTRUIR" (incluindo ciclinas) antagonista de ciclina B
A	Cdc20	tem uma forma ativa (A_{at}) e uma inativa (A_{inat}) A_{at} atua como ativador de Cdh1 A_T representa o total de Cdc20
I_p	IEP	ativador hipotético de Cdc20
m	massa	massa da célula cresce até um valor máximo permitido influencia os reguladores da divisão celular regressa a um valor inicial baixo logo após a divisão celular

feedback negativo.

Consideremos o sistema representado pelo diagrama na Figura 4.18A. De acordo com Kapuy et al [7] a variação da concentração $K = [\text{CDK1:CycB}]^1$ (na figura representada apenas por **CycB**), pode ser descrita pela seguinte equação diferencial:

$$\dot{K} = k_s - (k_d + k_a \cdot X_a) \cdot K \quad (4.9)$$

onde k_d é a taxa constante de primeira ordem para a degradação basal de K , k_a é taxa constante de segunda ordem para a degradação de K , induzida pela forma ativa, X_a , de $X = \text{Cdh1:APC}$. X_a é dada pela solução de estado estacionário da cadeia de fosforilação multi-sítio representada na Figura 4.18A

$$X_a = \frac{1 - (K/h)^{q+1}}{1 - (K/h)^{N+1}} \quad (4.10)$$

onde q é o número limiar de grupos fosfato, acima do qual **Cdh1-P_i** é inativo e $h = [\text{H}]$ é a atividade da fosfatase [15] neutralizante de **CDK**.

As Figuras 4.18B, C e D, mostram uma simulação do sistema representado na Figura 4.18A, com os valores dos parâmetros indicados na Tabela 5.1. A Figura 4.18B mostra a variação da concentração de X_a em função da concentração de K . A Figura 4.18C mostra as curvas das velocidades de síntese e degradação dadas pelas expressões: $V_{\text{síntese}} = k_s$ e $V_{\text{degradação}} = (k_d + k_a \cdot X_a) \cdot K$. Os pontos de interseção das duas curvas são os estados estacionários do sistema – os pontos cheios são estáveis e o ponto vazio é instável.

¹Uma espécie entre [] representa a concentração dessa espécie. Exemplo [**CycB**] = concentração de **CycB**

Já a Figura 4.18D mostra-nos o diagrama de bifurcação do sistema, em função do parâmetro $h = [H]$. Os pontos de bifurcação são $h = 0.184$ e $h = 0.492$. Para valores no intervalo $0.184 < h < 0.492$ o sistema exibe bi-estabilidade com dois estados estacionários estáveis e um instável (na linha tracejada). Para valores fora desse intervalo o sistema é mono-estável. Também podemos ver que para valores de $h < 0.184$ a concentração de estado estacionário de K ativo é sempre elevada o que nos permite concluir que as reações catalisadas por essa enzima estão numa fase acelerada, enquanto que para valores de $h > 0.492$ acontece o inverso, isto é, as reações no ciclo celular que dependem dessa cinase [13] ocorrem a um ritmo muito lento.

O diagrama também mostra que para valores de $h > 0.492$ o antagonismo mútuo é vencido por X_a enquanto para valores $h < 0.184$ o antagonismo é vencido por K . Já no intervalo $0.184 < h < 0.492$ pode vencer qualquer uma das espécies, dependendo das concentrações iniciais. Esses dois pontos de bifurcação são bifurcações de sela-nó, que no ciclo celular acontecem quando há uma transição irreversível de fase (nos *checkpoints*) e são conhecidos como interruptores (switches). Este diagrama pode muito bem representar o *checkpoint* da Mitose onde **Cdh1:APC** catalisa a ubiquinação de **CDK1:CycB** e a sua rápida degradação por proteassomas.

TABELA 4.3 Valor dos parâmetros para a interação CycB e Cdh1

Parâmetro	valor	Parâmetro	valor	Parâmetro	valor
k_s	0.1	k_d	0.1	k_a	1
q	2	N	9	h	0.25

4.6 Transições irreversíveis no ciclo celular

A regulação do ciclo celular é feita pelos dímeros **CDK:ciclina**, obtidos por ligação das cinases **CDK** com as **ciclina**s parceiras, e pelo grupo de inibidores (por exemplo, **CKI**). Os dímeros **CDK:ciclina** são promotores das várias fases do ciclo celular, enquanto que a interação com os seus inibidores pode levar à estabilização numa fase ou a uma transição irreversível de fase através de um antagonismo mútuo.

A fase **G1** é mantida por **CKI** e por **Cdh1 = Cdh1:APC**, que por isso se chamam os estabilizadores de **G1**, e que inibem a ação de **CycA = CycA:CDK2** que é promotora da fase **S (SPF)**² e **CycB = CycB:CDK1** que é promotora da fase **M (MPF)**. A Figura 4.19 mostra as interações entre **CycB**, **CKI** e **Cdh1**, no caso do fungo levedura. **Cdh1** estabiliza a fase **G1** por promover a degradação de **CycB**, **CKI** promove a estabilização de **G1** por formar complexo com **CycB** desativando-o, enquanto que **CycB** promove a transição de fase por catalisar a fosforilação (desativação) dos seus inibidores. Esse tipo de interação cria um interruptor bi-estável feito pelo antagonismo mútuo entre os estabilizadores de **G1**, nomeadamente **CKI** e **Cdh1**, e os promotores de fase (**CycA** e **CycB**).

²SPF = S-promoting factor, MPF = M-promoting factor

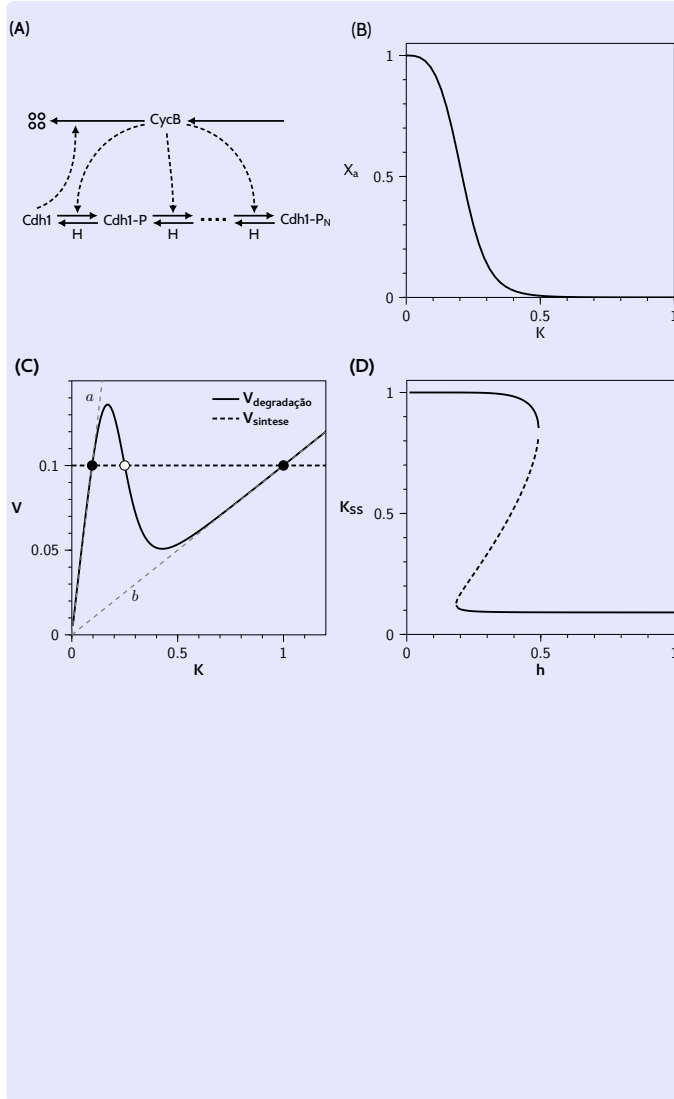
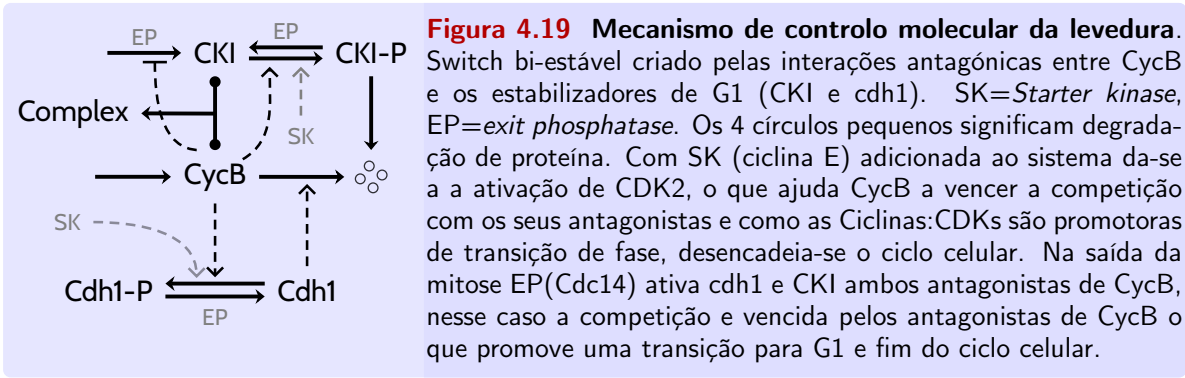


Figura 4.18 Interação entre CycB:Cdk1 e Cdh1:APC . (A) Rede de regulação molecular, mostrando o antagonismo mútuo entre $\text{CycB} = \text{CDK1:CycB}$ (uma cinase proteica) e $\text{Cdh1} = \text{Cdh1:APC}$ (uma E3 ubiquitina ligase). Cdh1 tem múltiplos sítios (N) de fosforilação por CDK1:CycB – os primeiros q estão ativos ($\text{Cdh1}, \text{Cdh1-P}, \dots, \text{Cdh1-P}_q$) e os restantes inativos. H é uma fosfatase neutralizante de CDK . (B) Diagrama da atividade estacionária de Cdh1 como função da atividade do complexo CDK1:CycB . Pode ver-se que o aumento da concentração de uma espécie leva à diminuição da outra que é próprio do antagonismo mútuo entre as duas espécies. (C) Curvas da variação das velocidades de síntese e degradação de CycB como função da atividade do complexo CDK1:CycB . Os pontos de interseção são os estados estacionários do sistema – os pequenos círculos negros são os estados estacionários estáveis enquanto que o círculo branco é o estado estacionário instável. A presença de 3 estados estacionários, dois estáveis e um instável, é uma característica própria dos sistemas bi-estáveis. (D) Diagrama de bifurcação de $[\text{CycB}]$ em função do parâmetro h . O sistema possui dois pontos de bifurcação – um em $h = 0.184$ e outro $h = 0.492$. Pode ver-se que o sistema é bi-estável em $0.184 < h < 0.492$ e mono-estável fora desse intervalo. Os parâmetros estão na Tabela 5.1.

A Na transição de G1 Cln2:CDK2 (SK) promove a transição de fase, por degradar o estabilizador de G1, SKI , controlado pelo fator SBF . Este processo é implementado através de um feedback positivo com 3 etapas: SBF ativa a produção de Cln2 (feedback positivo); Whi5 desativa SBF por formar complexo com este (feedback negativo); Cln2 ativa a fosforilação de Whi5 (feedback negativo). Cln2 ao desativar o inibidor do seu ativador está ativando a sua produção, daí o feedback positivo. Esse início de transição da fase G1 para a fase S na levedura, conhecida como **START**, nos mamíferos é designada usualmente por Ponto de restrição (**Restriction Point = RP**). Os processos são muito análogos como mostra a Figura 1 de [10]. A analogia é feita desta forma: $\text{SBF} \rightarrow \text{E2F}$, $\text{Whi5} \rightarrow \text{RB}$, $\text{Cln2} \rightarrow \text{CycE}$, $\text{Cln3} \rightarrow \text{CycD}$, $\text{Clb5} \rightarrow \text{CycA}$. O Checkpoint G1/S responde a sinais extra-celulares. Nos Mamíferos o fator de crescimento (GF) ativa a kinase MAP (Mitogen-Activated Protein) que catalisa o fator de transcrição de CycE que promove a passagem através do **RP**. Nos mamíferos o estado padrão da célula é G1. Somente em certas circunstâncias algumas



células tem permissão para iniciar o ciclo celular. Essa permissão é garantida pelo fator de crescimento que promove a passagem através do **RP**.

Yao et al [16] demonstraram experimentalmente bi-estabilidade na passagem através do **RP**. Já na saída da mitose (interruptor **T/G1**) há muita controvérsia quanto à bi-estabilidade dessa saída.

4.7 Dois estados alternativos

A rede da Figura 4.19 pode ser modelada pela seguinte sistema diferencial:

$$\begin{cases} \dot{C} = \frac{k_{pc}}{1+K} + (k_{pec} + k_{dec_p} \cdot C_p) \cdot EP + k_{dc_p} C_p - ((k_{fkc} + k_{akc}) \cdot K + k_{fc} + k_{fsc} \cdot SK) \cdot C \\ \dot{C}_p = (k_{fkc} \cdot K + k_{fc} + k_{fsc} \cdot SK) \cdot C - (k_{dec_p} \cdot EP + k_{dc_p} + k_{rc_p}) \cdot C_p \\ \dot{K} = k_{pk} - (k_{rk} + k_{rxk} \cdot X + k_{akc} \cdot C) \cdot K \\ \dot{X} = (k_{dx_p} + k_{dex_p} \cdot EP) \cdot (X_T - X) - (k_{fkx} \cdot K + k_{fsx} \cdot SK + k_{fx}) \cdot X \end{cases} \quad (4.11)$$

em que $K=[\text{CycB:CDK1}]$, $C=[\text{CKI}]$, $C_p=[\text{CKI-P}]$, $X=[\text{Cdh1:APC}]$, $X_T=[\text{Cdh1:APC}] + [\text{Cdh1:APC-P}]$, **SK** = starter kinase, **EP** = exit phosphatase.

A Figura 4.20A mostra o diagrama de continuação de **CycB** em função de **SK**. Pode ver-se que **SK = CycE** nos mamíferos inicia o ciclo celular ao acelerar a degradação dos inibidores de **CycB** e, desta forma, fazendo com que **CycB** promova a mudança para o estado complementar de **G1, S-G2-M**. A Figura 4.20B mostra como **EP** promove a transição de **S-G2-M** para **G1** por acelerar a degradação de **CycB** por **Cdh1:APC** e promover a associação **CKI:CycB**. Uma comparação dos diagramas, mostra bi-estabilidade para o diagrama de bifurcação a dois parâmetros do modelo, onde podemos concluir que **SK** é responsável por iniciar o ciclo celular e **EP** é responsável por fechar o ciclo celular. Os parâmetros foram todos tomados iguais a 0.1.

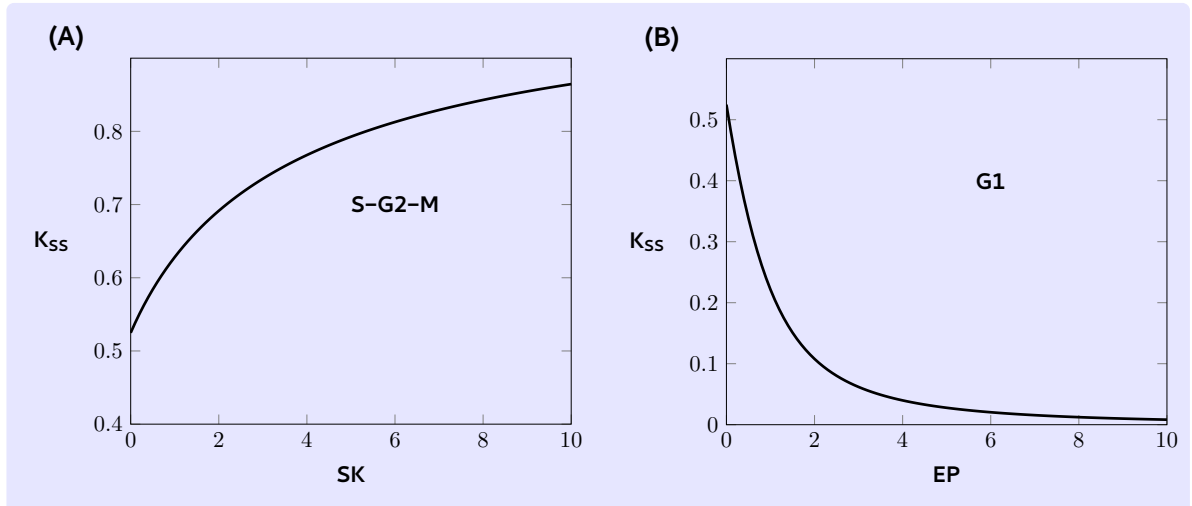


Figura 4.20 Diagrama de continuação para o modelo 4.11. (A) Diagrama de continuação de **CycB** em função de **SK** = starter kinase. **SK** promove o início do ciclo celular ao acelerar a degradação dos inibidores de **CycB** e desta forma ativando a produção de **CycB** que promove a passagem para o estado **S-G2-M**. (B) Diagrama de continuação em função de **EP**. **EP** promove o fecho do ciclo celular por acelerar a degradação de **CycB** por **Cdh1:APC** e promover a formação de complexo de **CycB:CKI**, desta forma promovendo a passagem para o estado padrão **G1**.

4.8 A transição G2/M

As propriedades dinâmicas do sistema molecular de regulação mostrado na Figura Podem ser descritas pelo seguinte sistema EDOs.

$$\frac{dB}{dt} = (k_{ab} + k_{abd}D_p) \cdot (B_T - B) - (k_{ib} + k_{ib}W) \cdot B, \quad (4.12a)$$

$$\frac{dD_p}{dt} = k_{adb}B \cdot (D_T - D_p) - k_{idh}H \cdot D_p, \quad (4.12b)$$

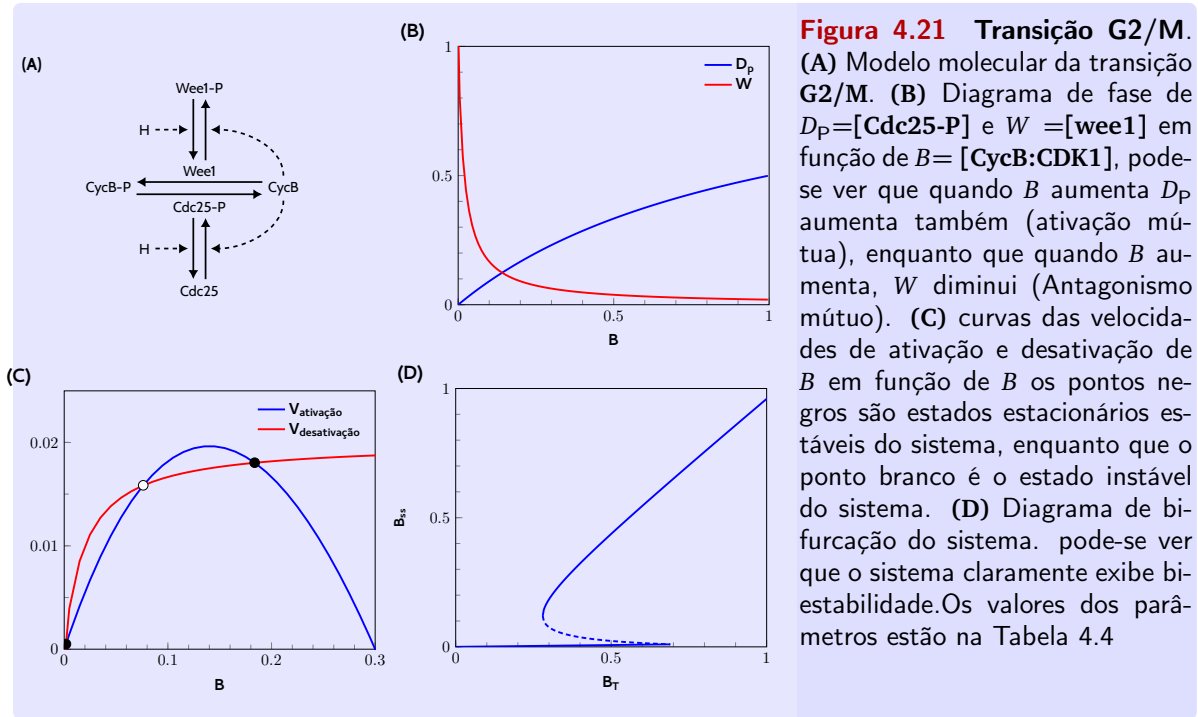
$$\frac{dW}{dt} = k_{awh}H \cdot (W_T - W) - k_{iwb}B \cdot W, \quad (4.12c)$$

onde $B = [\text{CycB:CDK1}]$, $W = [\text{Wee1}]$, $D_p = [\text{Cdc25-P}]$, $k_{a...}$ e $k_{i...}$ são constantes cinéticas para a ativação e desativação das proteínas correspondentes, o parametro H é a atividade da fosfatase neutralizante da ação de CycB. Sem perda de generalidade podemos escolher H de tal forma que $k_{idh} = k_{adb}$.

As soluções de estado estacionário das Equações (4.12a,4.12c) são $D_p = D_T B / (H + B)$ e $W = W_T \epsilon H / (\epsilon H + B)$, onde $\epsilon = k_{awh} / k_{iwb}$. O gráfico da Figura 4.21B mostra D_p e W como função de B , para valores dos parâmetros na Tabela 4.4. A curva da velocidade,

$$\frac{dB}{dt} = \left(k_{ab} + k_{abd} D_T \frac{B}{H + B} \right) \cdot (B_T - B) - \left(k_{ib} + k_{iwb} W_T \frac{\epsilon H}{\epsilon H + B} \right) \cdot B \quad (4.13)$$

$$= V_{ativação} - V_{desativação} \quad (4.14)$$



são mostrados no gráfico da Figura 4.21C. Os pontos de interseção dessas duas curvas são os estados estacionários da Equação (4.14). Pode-se ver de modo claro que o sistema exibe bi-estabilidade e na Figura 4.21D mostramos o diagrama de bifurcação de B em função do parâmetro B_T . Todos os outros parâmetros estão na Tabela (ref)

TABELA 4.4 Valor dos parâmetros para o modelo Wee1-CycB-Cdc25

Parâmetro	valor	Parâmetro	valor	Parâmetro	valor
k_{ab}	0	k_{awh}	0.02	D_T	1
B_{abd}	1	B_T	0.3	W_T	1
K_{ib}	0	H	1	K_{iwb}	1
C_{ibw}	1				

4.9 Interruptor da anáfase

O diagrama da rede de reações na Figura 4.22[12] pode ser modelado pelo seguinte sistema de equações diferenciais

$$\dot{B} = k_{sb} - k_{db} \cdot B - k_{dbc} \cdot C \cdot B \quad (4.15a)$$

$$\dot{M}_{AT} = k_{amb} \cdot L \cdot B \cdot M_I - k_{imh} \cdot H \cdot M - k_{break} \cdot C \cdot X \quad (4.15b)$$

$$\dot{X} = k_{assoc} \cdot M \cdot C - k_{dissoc} \cdot X - k_{break} \cdot C \cdot X \quad (4.15c)$$

em que $B = [\text{CycB}]$, $M_{AT} = [\text{Mad2}_A]_{\text{livre}} + [\text{Mad2}_A:\text{Cdc20}]$, $X = [\text{Mad2}_A:\text{Cdc20}]$, $C_T = [\text{Cdc20}]_{\text{total}}$, $C = [\text{Cdc20}]_{\text{ativo}} = C_T - X$, $M_T = [\text{Mad2}]_{\text{total}}$, $M_I = [\text{Mad2}]_{\text{inativo}} = M_T - M_{AT}$, $M = [\text{Mad2}_A]_{\text{livre}} = M_{AT} - X$. As constantes k_{amb} e k_{imb} referem-se a ativação e inibição de **Mad2**, k_{break} modela a dissociação de **Mad2_A:Cdc20**, devido a **Cdc20**_{ativo}, k_{dissoc} refere-se à dissociação de **Mad2_A:Cdc20**, k_{assoc} modela a associação **Mad2_A:Cdc20**. O parâmetro L refere a fração de cromossomas sem tensão (fração de cromossomas que não estão alinhadas no fuso mitótico) e H indica a atividade da fosfatase neutralizante.

A equação (4.15a) tem como solução de estado estacionário $B = B_T C_0 / (C_0 + C)$, onde $B_T = k_{sb} / k_{db}$ e $C_0 = k_{db} / k_{dbc}$. A solução de estado estacionário de (4.15c) satisfaz a equação quadrática

$$0 = (M_{AT} - X) \cdot (C_T - X) - K_{diss} \cdot X - K_{break} (C_T - X) \cdot X \quad (4.16)$$

onde $K_{diss} = k_{dissoc} / k_{assoc}$ e $K_{break} = k_{break} / k_{assoc}$. Resolvendo esta equação em ordem a X , obtemos

$$F = M_{AT} + C_T + K_{diss} + K_{break} C_T$$

$$X = \frac{2M_{AT}C_T}{F + \sqrt{F^2 - 4(1 + k_{break})M_{AT}C_T}} \quad (4.17)$$

Na figura 4.22B mostramos o gráficos de X , $C = C_T - X$ e B em função de M_{AT} . Substituindo os resultados acima na equação (4.15b), obtemos

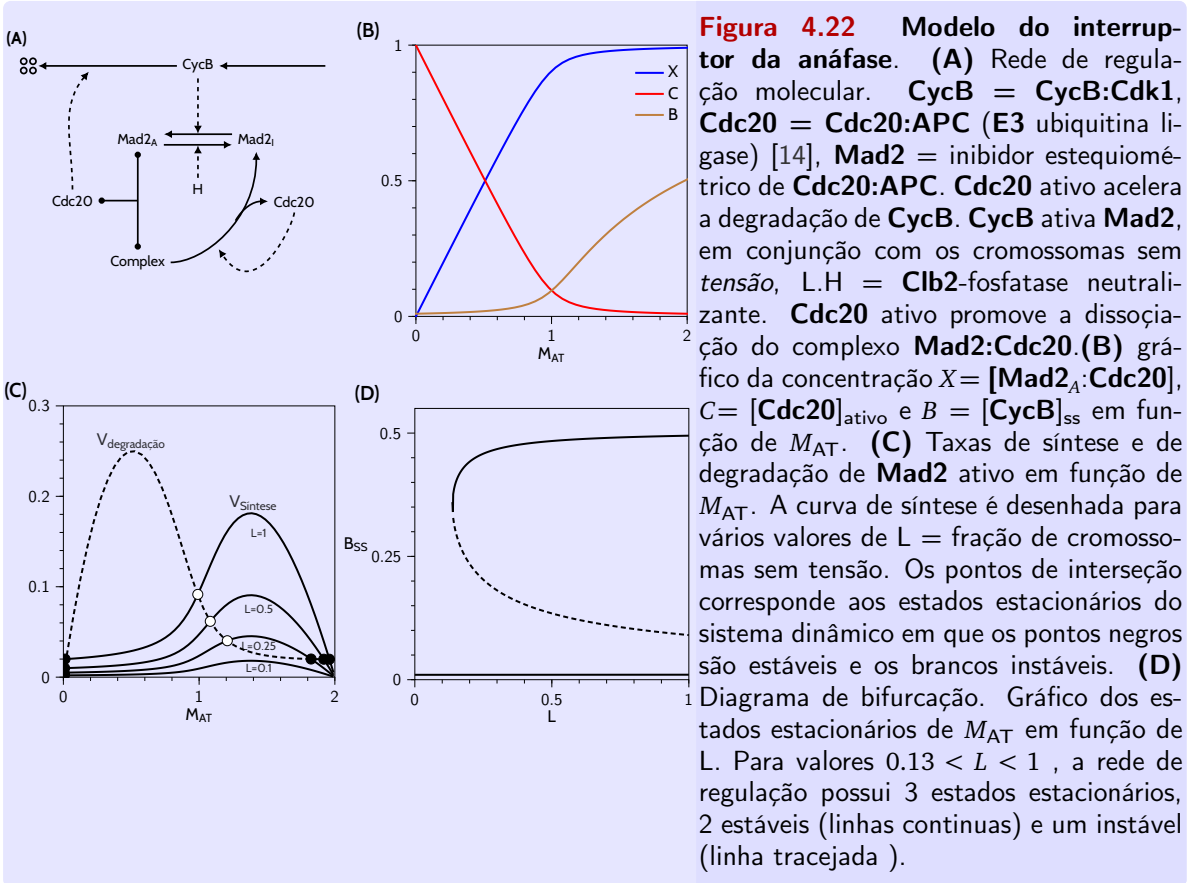
$$\dot{M}_{AT} = k_{amb} L \frac{B_T C_0}{C_0 + C_T - X} (M_T - M_{AT}) - [k_{imb} H (M_{AT} - X) + k_{break} (C_T - X) X] \quad (4.18)$$

$$= V_{\text{Síntese}} - V_{\text{Degradação}}$$

Na figura 4.22C mostramos os gráficos das duas leis de velocidades $V_{\text{Síntese}}$ e $V_{\text{Degradação}}$ em função de M_{AT} , para os valores dos parâmetros da Tabela 4.5. Os pontos de interseção das curvas das duas leis de velocidades são estados estacionários da Equação 4.18. O sistema é bi-estável e na figura 4.22D mostramos como os estados estacionários de M_{AT} variam com L , com todos os outros parâmetros fixos conforme a Tabela 4.5. Mad2 permanece ativo até $1 - L$, a fração das cromossomas alinhadas aproxima-se de 1, e Mad2 é desativado de forma abrupta assim que o último cromossoma se alinha na placa metafásica e a célula prossegue para a anáfase.

TABELA 4.5 Valor dos parâmetros para o modelo Mad2-Cdc20

Parâmetro	valor	Parâmetro	valor	Parâmetro	valor
k_{amb}	1	k_{imb}	0.01	k_{break}	1
B_T	1	C_0	0.01	K_{diss}	0.01
K_{break}	0.001	H	1	M_T	2
C_T	1				



Resumo das componentes moleculares e reações típicas do modelo de ciclo celular de Tyson/Novak

TABELA 4.6 Componentes Moleculares do ciclo celular

Nome	Nome em Fungo	Descrição	Reação típica
Cdk1, Cdk2, ...	Cdc28	Kinase ciclina-dependente	Proteína + ATP → Proteína-P + ADP; Cdkn:CycX
CycA	Clb5, Clb6	Ciclina que promove a fase S	ORC → ORC-P; Cdk2:CycA
CycB	Clb1, Clb2	Ciclina que promove a fase M	Histona → Histona-P; Cdk1:CycB
CycD	Cln3	Ciclina ativada por Cresc.	RB → RB-P; Cdk4:CycD
CycE	Cln1, Cln2	Kinase de arranque	CKI → CKI-P; Cdk2:CycE
CAP		Fosfatase neutralizante	Proteína-p + H ₂ O → Proteína + P _i ; CAP Cdk2:CycE
CKI	Sic1	Inibidor Estequiométrico de CDK	Cdk1:CycB + CKI → CKI:Cdk1:CycB
Cohesina	Scc1, etc.	Cohesina dos cromátdeos irmãos	Xsome → Xtid:Cohesina:Xtid; fase S
Separase	Esp1.	Degradação de cohesina	Cohesina → DP; Separase
Segurina	Pds1.	Inibidor de separase	Separase + Segurina ↔ Segurina:Separase
APC	APC	Complexo que promove a anáfase	Segurina:Separase → Separase + DP; APC:Cdc20
Cdc20	Cdc20	Ativador APC	APC + Cdc20 ↔ APC:Cdc20
Cdh1	Hct1	Homologo de Cdc20	Cdk1:CycB → Cdk1 + DP; APC:Cdh1
SCF	SCF	Complexo Skp-Culina-Fbox	CKI-P → DP; SCF
	Cdc14	Fosfatase de saída	APC:Cdh1-P → APC:Cdh1; Cdc14
	Net1	Inibidor de Cdc14	Net1 + Cdc14 ↔ APC:Cdh1; Cdc14
E2F	SBF	Fator de transcrição	promotor de CYCE + E2F ↔ CYCE:E2F (gene ativo)
RB	Whi5	Inibidor de E2F	RB + E2F ↔ RB:E2F
Wee1	Swe1	Tirosina Kinase	Cdk1:CycB → P-Cdk1:CycB; Wee1
Cdc25	Mih1	Tirosina fosfatase	P-Cdk1:CycB → Cdk1:CycB; Cdc25
Mad2		Mitotic arrest deficient 2	Mad2 + Cdc20 → Mad2:Cdc20

5 Modelos Booleanos do ciclo celular

5.1 Introdução

O formalismo das redes Booleanas, desenvolvido por Stuart Kauffman nos anos 70 do século passado, sobretudo no contexto das redes de regulação genética (GRNs), oferecem uma versão mais qualitativa à análise da dinâmica de um processo biológico do que o formalismo baseado em EDO's. Quando as redes bioquímicas têm centenas ou milhares de espécies, dá-se uma "explosão" de parâmetros cinéticos que as torna praticamente intratáveis, mesmo com métodos de simulação computacional. Como para construir uma rede Booleana, é necessária menos informação, sobretudo sobre os parâmetros cinéticos (*rate constants*), que surgem nas redes bioquímicas e devido à sua aparente simplicidade, os modelos Booleanos fornecem uma alternativa muito interessante aos modelos de EDO's. A desvantagem é que estes modelos só dão informação qualitativa e, por isso, são limitados nas conclusões que deles se pode deduzir.

Nos modelos Booleanos consideramos dois tipos de redes ou grafos (ver as figuras 5.1 e 5.2):

- **Redes regulatórias** - são grafos de influências, dirigidos e etiquetados. Mais concretamente, os nós representam espécies - genes, proteínas, complexos, processos, pequenas moléculas, RNA, etc.. As arestas são orientadas, representam relações de influência entre dois nós e fornecem ainda dois tipos de informação: podem representar ativação, sinal (+), ou \longrightarrow ou inibição, sinal (-) ou $\longrightarrow|$.
- **Espaço de estados** - é um grafo cujos nós representam os estados (compostos pelo valor da atividade de cada nó) e os arcos representam transições de estados.

A cada nó da rede regulatória está associada uma variável de estado que representa a atividade (em vez da concentração) da espécie representada pelo nó. Por exemplo, se o nó representa um gene g , ele pode estar ativo (ou expresso) ($g=1$ ou ON) ou inativo ($g=0$ ou OFF)¹. Além disso, nestes modelos não se considera o tempo real, mas apenas o tempo de simulação (*step*, *tick*, etc.).

Para construir um modelo Booleano, precisamos de

1. em primeiro lugar, traduzir a informação biológica através de uma rede regulatória de influências entre as espécies.

¹Por simplicidade de notações, representamos pela mesma letra a espécie e a variável de estado que representa a sua atividade.

2. De seguida, definir as regras de transição de cada nó - o conjunto de condições que definem o estado ON ou OFF de cada nó. Estas condições são definidas através de funções lógicas Booleanas, como veremos em breve.
3. Finalmente, definir a estratégia de atualização: síncrona, assíncrona (determinística ou probabilística) ou mista.

Mais especificamente, uma rede regulatória booleana liga, com regras lógicas (ou funções lógicas), um conjunto de variáveis discretas cujos valores dependem dos valores das outras variáveis. Cada variável corresponde a um nó da rede (uma espécie). Atribuímos então, a cada nó da rede, uma regra lógica que define como os diferentes *inputs* (determinados pelas arestas de entrada nesse nó, quer ativadoras, quer inibidoras) se combinam para controlar o seu estado (ou nível) de ativação.

Formalmente, sejam $\sigma_1(t), \sigma_2(t), \dots, \sigma_N(t)$ os valores das variáveis booleanas dos nós da rede regulatória, no instante t , onde N é o número de nós da rede regulatória. Se $\text{ant}(\sigma_i)$ representa o conjunto dos nós antecessores imediatos de σ_i , então, a cada nó σ_i associamos uma função booleana $B_i(\text{ant}(\sigma_i))$ que permite a atualização do valor de σ_i de acordo com a regra

$$\sigma_i(t+1) = B_i(\text{ant}(\sigma_i(t))), \quad i = 1, \dots, N \quad (5.1)$$

Para condições iniciais dadas, em cada iteração (step, tick,...), uma ou mais variáveis eventualmente mudam o seu valor, de acordo com as regras de atualização (5.1) e também de acordo com a *estratégia de atualização* escolhida. Assim, (i). se a estratégia é síncrona, todas as variáveis são atualizadas ao mesmo tempo (de uma forma determinística); (ii). se a estratégia é assíncrona, as variáveis são atualizadas uma de cada vez, segundo uma ordem pré-estabelecida ou uma ordem aleatória.

Os diferentes cenários de todas as possíveis transições de estado da rede regulatória são descritos no grafo de transições de estados ou espaço de estados. Se as variáveis σ_i são Booleanas (os seus valores possíveis são 0 e 1), o espaço de estados tem 2^N nós possíveis. No entanto a sua estrutura de grafo depende da estratégia de atualização escolhida.

Existem dois tipos de soluções assintóticas ou atratores num modelo lógico: **estados estacionários estáveis** e **ciclos limite**. Se o sucessor de um estado é ele próprio, este é considerado um estado estacionário estável ou ponto atrator. Se um conjunto de estados é visitado mais do que uma vez, num ciclo repetitivo, esse conjunto diz-se um ciclo limite atrator.

Resumindo:

- **Etapas na construção de um modelo booleano**

1. INPUT para o modelo: componentes; interações; estados binários das componentes em certas condições conhecidas.
2. Construir a rede de interação.
3. Determinar as funções de atualização booleanas para cada nó. Quando existem vários reguladores (antecessores do nó), selecionar a função que melhor representa o conhecimento existente sobre a sua ação combinada.

4. Determinar a condição inicial relevante.
 5. Escolher uma metodologia de atualização da dinâmica da rede.
 6. Analisar o modelo: determinar os atratores, os efeitos das perturbações de um certo nó nos atratores, etc.
 7. Comparar com o comportamento conhecido. Se houver discrepâncias, reveja as funções de rede regulatória e / ou a atualização booleana.
 8. Usar o modelo para fazer novas previsões.
- **Alguns aspectos característicos dos Modelos Booleanos versus Modelos Cinéticos Contínuos (baseados em EDO's).**

TABELA 5.1 Modelo Booleano Vs Modelo Cinético contínuo

Formalismo	Diagrama	Input	Output
Booleano	Rede de Influências	Regras lógicas	Grafo de transições de estado com soluções estáveis
		Condições iniciais	Trajetórias no espaço de estados
Cinética química	Rede de reações	Conjunto de reações químicas, leis cinéticas, valores de parâmetros, condições iniciais	Séries temporais das concentrações

5.2 Dois exemplos

Ver as figuras 5.1 e 5.2. Nas simulações de redes Booleanas, realizadas no âmbito desta tese, usou-se o pacote [BoolNet](#) do [R](#).

5.3 Modelo Booleano do Ciclo Celular

Vamos agora analisar alguns modelos booleanos de ciclo celular inspirados nos modelos contínuos do capítulo anterior. Essa análise é justificada devido a bi-estabilidade no ciclo celular que leva que a interação de longo curso entre um elemento e seu antagonista prevalece apenas aquele que vencer a competição. Começamos com algumas hipóteses básicas.

- Ciclina (**Cyc**) e **APC** são mutuamente antagônicos.
- **APC** tem uma taxa natural de desativação (conversão para um estado inativo), que é modelada através de um *feedback-loop* negativo de **APC** em si próprio, isto é, um *loop auto-inibitório*, como se ilustra na Figura 5.3.
- Se **Cdc20** está ativo então **APC** também está ativo, o que se representa por **Cdc20** \rightarrow **APC**, na Figura 5.3.

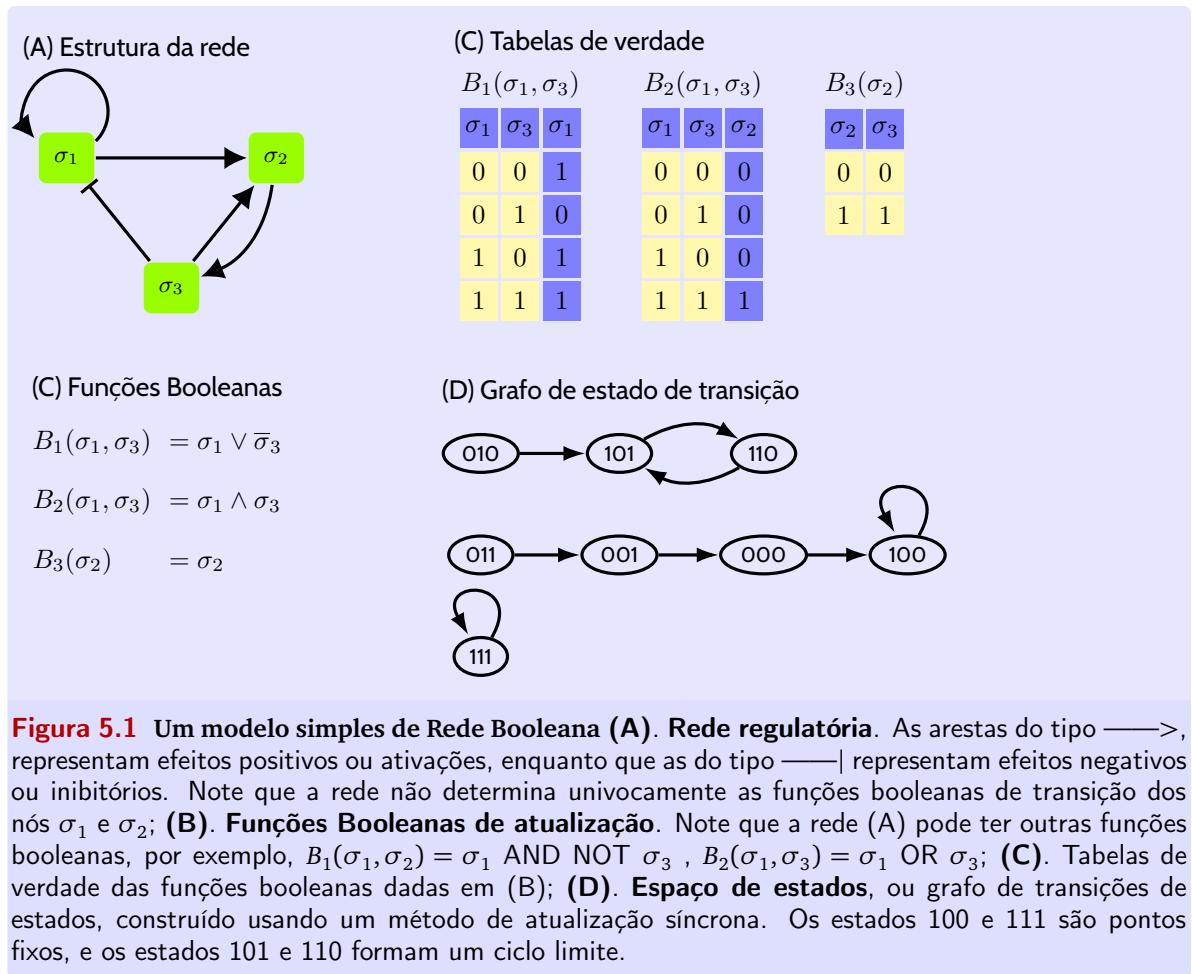


Figura 5.1 Um modelo simples de Rede Booleana (A). Rede regulatória. As arestas do tipo \longrightarrow , representam efeitos positivos ou ativações, enquanto que as do tipo $\longrightarrow|$ representam efeitos negativos ou inibitórios. Note que a rede não determina univocamente as funções booleanas de transição dos nós σ_1 e σ_2 ; (B). Funções Booleanas de atualização. Note que a rede (A) pode ter outras funções booleanas, por exemplo, $B_1(\sigma_1, \sigma_2) = \sigma_1$ AND NOT σ_3 , $B_2(\sigma_1, \sigma_3) = \sigma_1$ OR σ_3 ; (C). Tabelas de verdade das funções booleanas dadas em (B); (D). Espaço de estados, ou grafo de transições de estados, construído usando um método de atualização síncrona. Os estados 100 e 111 são pontos fixos, e os estados 101 e 110 formam um ciclo limite.

- A **massa** da célula aumenta até que a concentração de ciclina **Cyc** caia para um valor baixo, provocando a divisão celular. Como as nossas variáveis só podem tomar os valores 0 e 1, usamos $massa = 0$ para indicar o estado da célula recém-nascida, logo após a divisão, e $massa = 1$ para representar a célula totalmente adulta. Como a massa depende de valores altos de ciclina, escrevemos $massa = Cyc$.

No entanto, para investigar o processo de crescimento celular como função de um parâmetro, definimos um parâmetro booleano **FG** (Factor de Crescimento = Growth Factor). Quando $FG = 1$ a célula cresce e quando $FG = 0$ inibe-se o crescimento da célula. O valor do parâmetro é definido por defeito, antes de uma determinada simulação. O estado natural é $FG = 1$.

- Um valor alto da massa, ativa **Cdc20**.

A implementação booleana destas regras pode ser feita usando o pacote `boolNet` de R, e os resultados de várias simulações são apresentados na Fig 5.4.

O modelo da Fig 5.3 tem cinco variáveis de estado e portanto $2^5 = 32$ estados possíveis. As transições de estados estão representados no grafo na Figura 5.4. As variáveis de estado estão representados na seguinte ordem: **massa**, **Cdc20**, **APC**, **CycB**, **FG**.

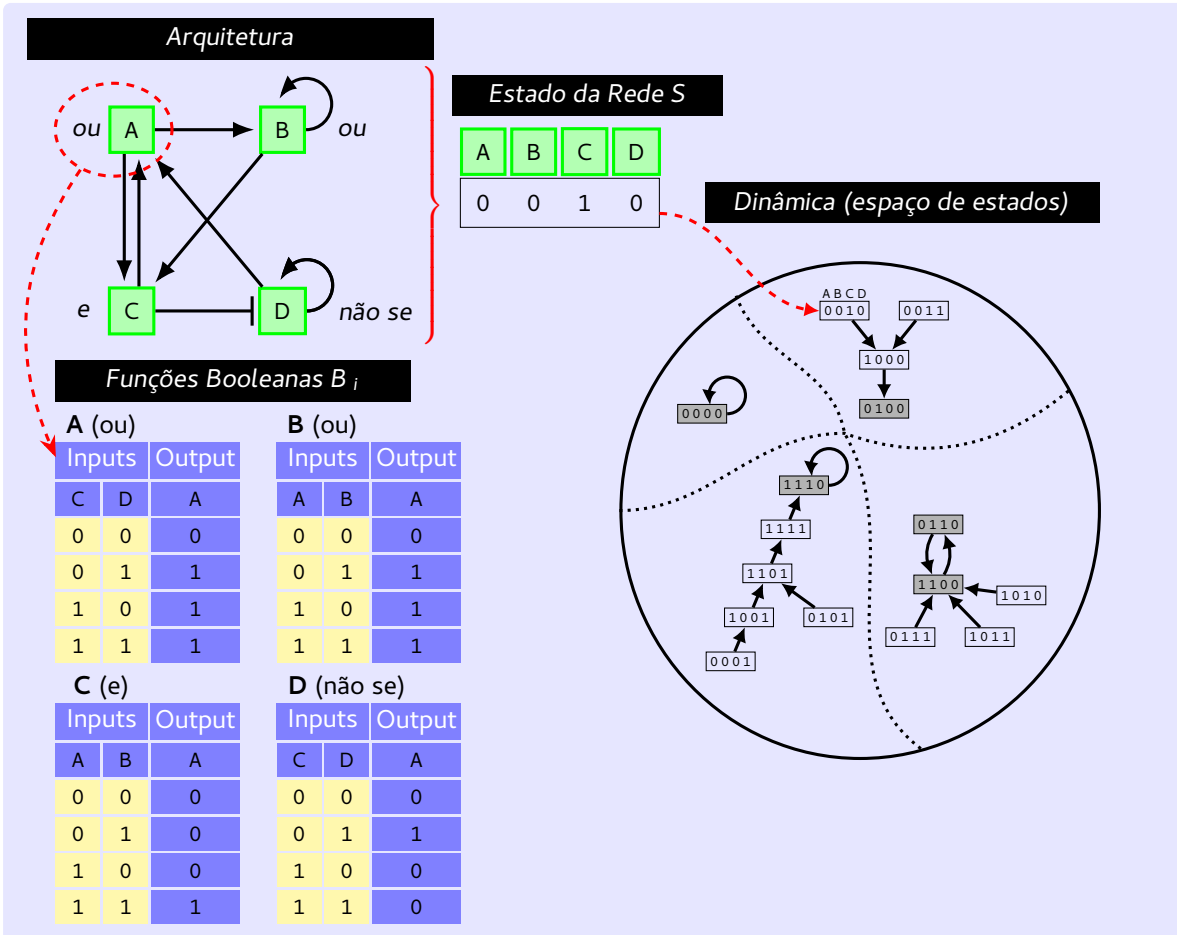


Figura 5.2 Um outro modelo de Rede Booleana GRN. Um modelo de rede Booleana para $N = 4$ espécies (genes) $\sigma_i = A, B, C, D$. Da arquitetura da rede regulatória à dinâmica. Os estados atratores estão pintados a cinzento. Neste exemplo, existem 3 atratores pontuais e um ciclo limite de período 2. As linhas tracejadas no espaço de estados representam separatrizes das bacias de atração.

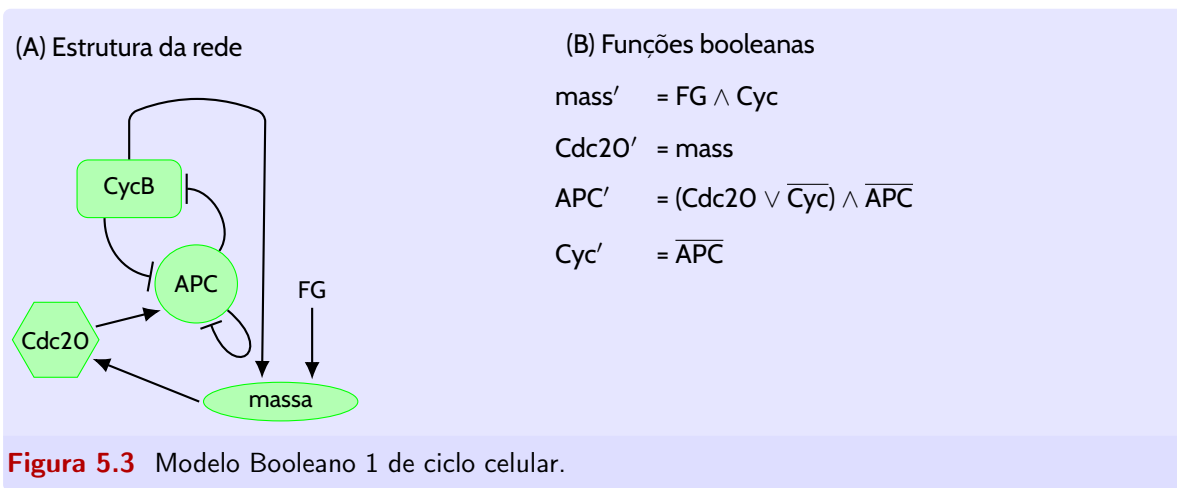


Figura 5.3 Modelo Booleano 1 de ciclo celular.

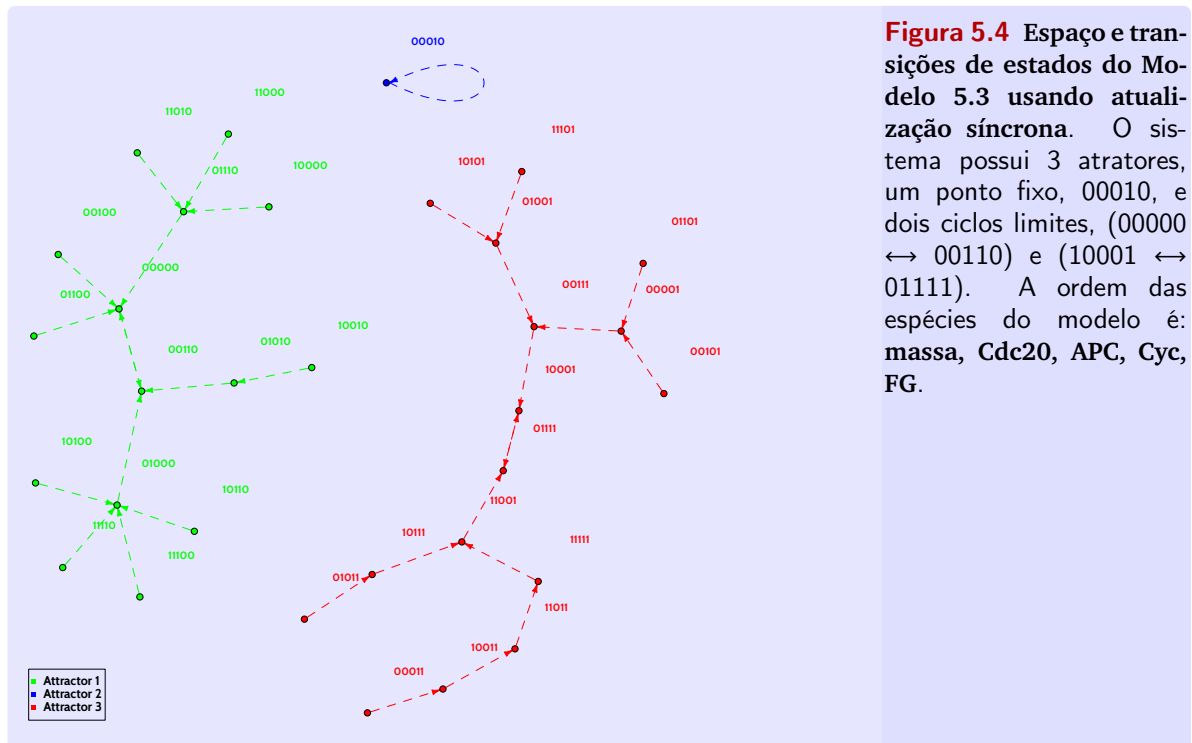
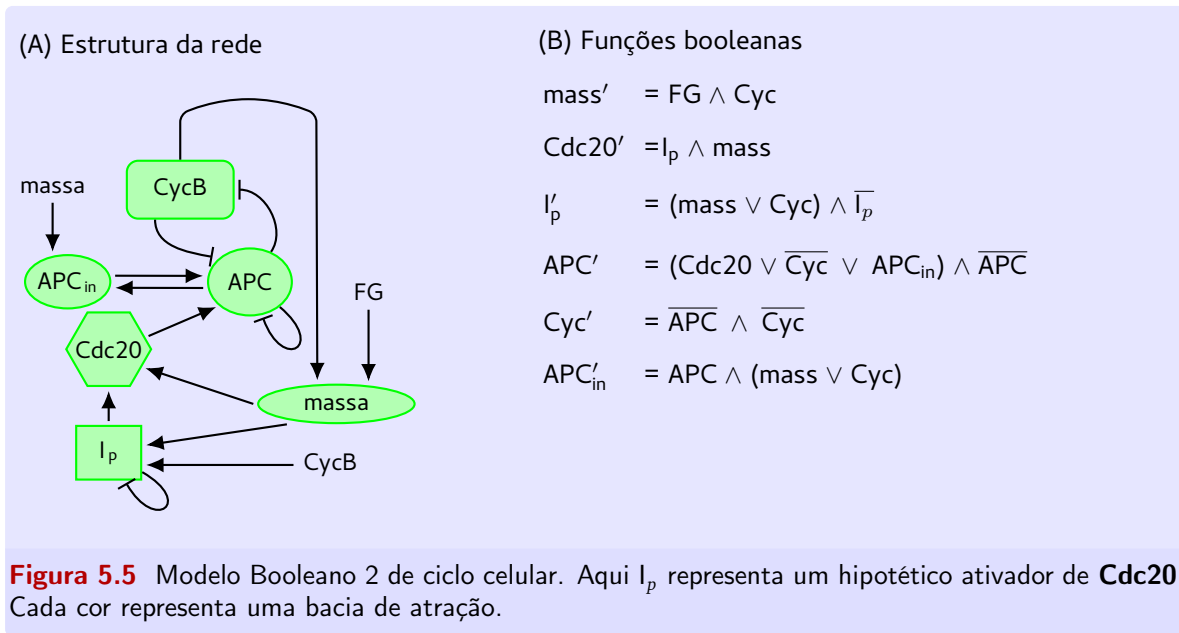


TABELA 5.2 Atratores para o modelo da Figura 5.3

Atratores com 1 estado		Atratores (ciclos limite) com 2 estados			
	Attr. 1	Attr. 2		Attr. 3	
massa	0	0	0	1	0
Cdc20	0	0	0	0	1
APC	0	0	1	0	1
CycB	1	0	1	0	1
FG	0	0	0	1	1
Freq.	3.12%	46.88%		50%	

O atrator 1 na figura (a verde) é composto pelo ciclo limite $00000 \leftrightarrow 00110$, e tem todos os estados a verde (quinze) na sua bacia de atração. Se começarmos em qualquer desses estados vamos acabar oscilando sempre no ciclo limite composto por um estado em que todas variáveis estão inativas (OFF) e um estado em que apenas **APC** e **Cyc** estão ativos (ON). O atrator 2 (00010), representado pela cor azul, é um ponto fixo e é o único estado na sua bacia de atração, ou seja se começarmos no estado em que apenas **CycB** está ativo nunca sairemos deste estado. O atrator 3 na figura (a vermelho) é composto pelo ciclo limite $10001 \leftrightarrow 01111$, e tem todos os estados a vermelho (dezasseis) na sua bacia de atração. Todos os estados a vermelho vão acabar oscilando num ciclo limite composto por um estado em que apenas **massa** e **FG** estão ativos e um estado em que apenas a **massa**



está inativa.

A parte da função Booleana do nó **APC**, função dos dois antecessores **Cyc** (inibitório) e **Cdc20** (ativador), foi escolhida como um OR, ou seja, **APC** estará ativo se, ou **Cdc20** está ON ou se **Cyc** está OFF.

A simulação inicia-se com **Cyc** = 1 e ou **massa** = 0 ou = 1. Em células em fase de crescimento normal, (quando **FG** = 1), o sistema atinge rapidamente um ciclo limite atrator com massa dividindo (=0) ou crescendo (=1), em iterações alternadas. O crescimento da célula é essencial para obter estes ciclos. Se **FG** = 0, imitando um eventual tratamento clínico que impede o crescimento das células, o ciclo congela e apenas **Cyc** permanece ON. Ver a Figura 5.4.

Na Figura 5.5 representa-se um outro modelo de ciclo celular, desta vez incorporando mais espécies. Aqui **APC_{in}** representa uma forma inativa de **APC**. O efeito da **massa** e ciclina **Cyc** aparece em vários sítios, o que permite uma leitura mais simples e clara do grafo de interações.

Fizemos alguma opções (com algum grau de arbitrariedade) sobre a forma como os vários inputs de um certo nó se combinam para formar as funções Booleanas de atualização do estado desse nó. Em alguns casos, supomos que é necessária a ativação simultânea de dois inputs (ambos ON) para que um efeito seja produzido (ON do estado de chegada dos inputs), enquanto que, noutros casos, basta a ativação de pelo menos um dos inputs.

Na Figura 5.6 mostramos o grafo do estados de transição do modelo 5.5. O modelo possui 3 atratores ambos constituídos por um ciclo limite com dois estados. A Tabela 5.3 mostra cada atrator e a percentagem de estados na sua bacia de atração.

TABELA 5.3 Atratores para o modelo na Figura 5.5

Atratores com 2 estados						
	Attr. 1		Attr. 2		Attr. 3	
massa	0	0	0	1	1	0
Cdc20	0	0	1	0	0	0
APC	1	0	1	0	0	1
CycB	1	0	1	0	0	1
APC_{in}	0	1	0	1	1	0
I_p	0	1	0	1	0	1
FG	0	0	1	1	1	1
Freq.	50%		39.06%		10.94%	

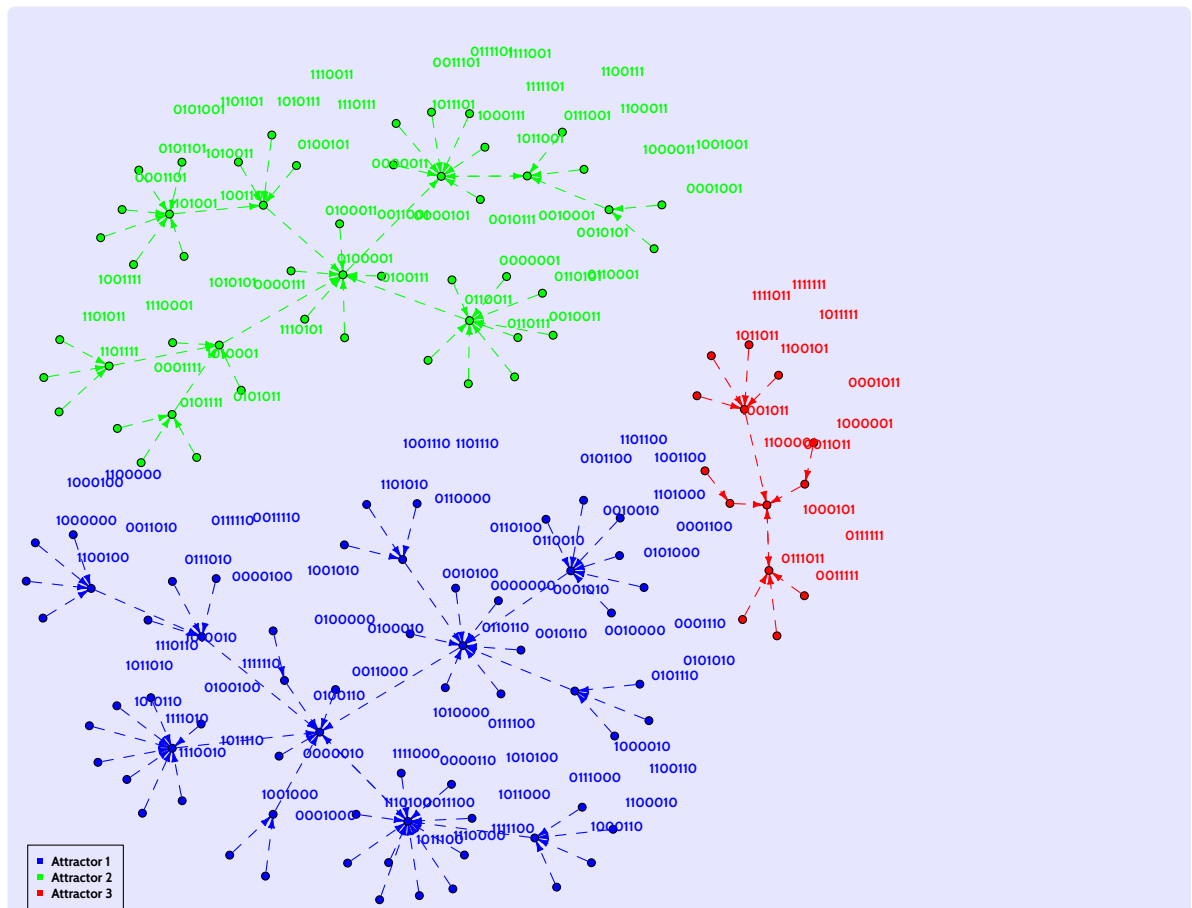


Figura 5.6 Modelo Booleano 2 de ciclo celular. Aqui I_p representa um hipotético ativador de **Cdc20**.

5.4 Modelo de Fauré, Naldi, Chaouiya e Thieffry

Com a finalidade de construir um modelo Booleano, formalmente equivalente ao modelo contínuo do ponto de restrição, apresentado por Novak e Tyson, Fauré et al. (2006), transpuseram a rede bioquímica de Tyson/Novak na rede de influências da Figura 5.7.

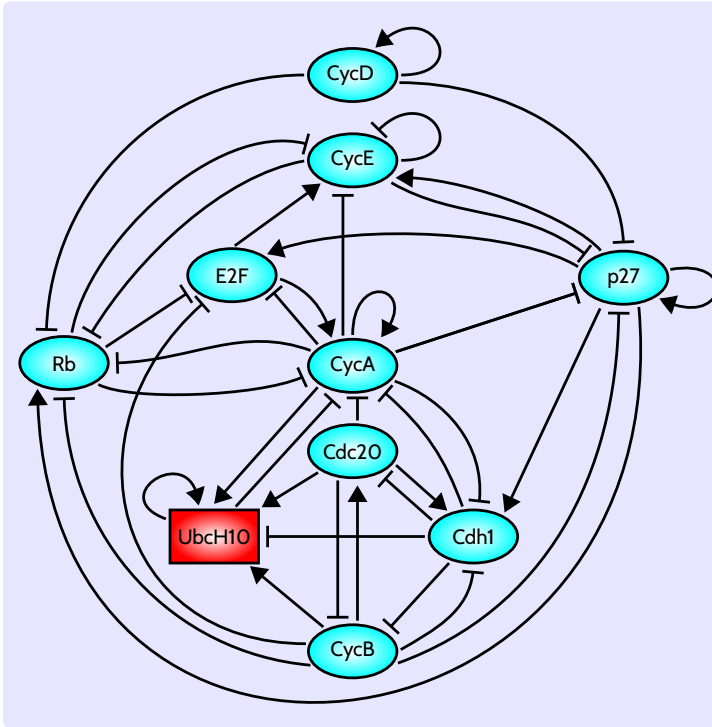


Figura 5.7 Modelo de Fauré. Modelo Booleano adaptado do modelo de Tyson e Novak [11] do *Restriction point*(RP)

O ciclo de divisão celular do mamífero deve ser coordenado com o crescimento geral do organismo, e deve responder a necessidades específicas, tais como, por exemplo, a cicatrização de feridas. Esta coordenação é conseguida através da sinalização de estímulos (sinais) extra-celulares, positivos e negativos, cujo balanço resulta na decisão da célula se dividir ou permanecer num estado de repouso **G0**.

Os sinais positivos, ou fatores de crescimento (FGs), provocam, em última análise, a ativação de ciclina D (**CycD**). No modelo de Fauré et al [3], **CycD** representa o INPUT e a sua atividade é considerada constante. Note que as cinases **CDK4** e **CDK6**, parceiras de **CycD**, não estão explicitamente representadas no modelo da Figura 5.7, já que a sua atividade depende essencialmente da presença ou ausência da sua ciclina. Por outras palavras, **CycD** representa o complexo **CDK4 / 6:ciclina D**. A mesma abordagem foi adotada para os outros dímeros **CDK:ciclina**.

No modelo, **CycD** é necessária para a inativação da proteína retinoblastoma **Rb**, e para o sequestro de **p27**. Esta proteína, **p27**, é um inibidor das cinases **CDK**, impedindo a formação de dímeros associados – **CDK2:ciclina E** (= **CycE**) e **CDK2:ciclina A** (= **CycA**), e portanto impedindo a consequente fosforilação das respetivas proteínas-alvo. Por uma questão de simplicidade, consideramos que **CycD** inibe diretamente **p27**.

Em contraste, os complexos formados por **p27** e **CycE** (respetivamente, por **p27** e **CycA**), são representados de uma forma mais subtil — quando ambos, **p27** e **CycE** (respetivamente, **p27** e **CycA**), estão ativos, forma-se o complexo e a atividade da ciclina é bloqueada. Para modelar o facto de que as ciclinas permanecem presentes, embora sequestradas quando ligadas a **p27**, consideramos que a atividade de **p27** se opõe à dos seus alvos, em vez de os inibir diretamente. No modelo, isto é implementado por setas de **p27** para os alvos de **CycE** e **CycA**, com um sinal oposto ao que corresponde ao efeito das ciclinas nos seus alvos, na ausência de **p27**.

O outro alvo de **CycD**, **Rb**, é um *supressor tumoral* chave, que é detetado (com mutações) numa grande variedade de cancros. **Rb** é inativado por fosforilação, e **CycD** está envolvida no primeiro passo deste processo. No entanto, neste modelo Booleano simplificado, consideramos que a inativação de **Rb** por **CycD** é total.

Rb forma um complexo com os membros da família de fatores de transcrição **E2F**, convertendo-os de ativadores de transcrição a repressores de transcrição. Por esta razão modelamos a ação de **Rb** através da inibição direta dos alvos **E2F** (que incluem o próprio **E2F**).

As funções Booleanas de atualização de cada nó são as seguintes:

- Nó = CycD. Função Booleana:

$$B(CycD) = CycD$$

Justificação: CycD considera-se constante (é um INPUT).

- Nó = Rb. Função Booleana:

$$B(Rb) = (\overline{CycD} \wedge \overline{CycE} \wedge \overline{CycA} \wedge \overline{CycB}) \vee (p27 \wedge \overline{CycD} \wedge \overline{CycB})$$

Justificação: Rb é expressa na ausência de qualquer das ciclinas que a inibem por fosforização [Tyson e Novak, 2004, 11], mas também pode ser expressa se na presença de CycE ou CycA se a atividade inibidora dessas duas ciclinas for bloqueada por p27 [Coqueret, 2003, 2]

- Nó = E2F. Função Booleana:

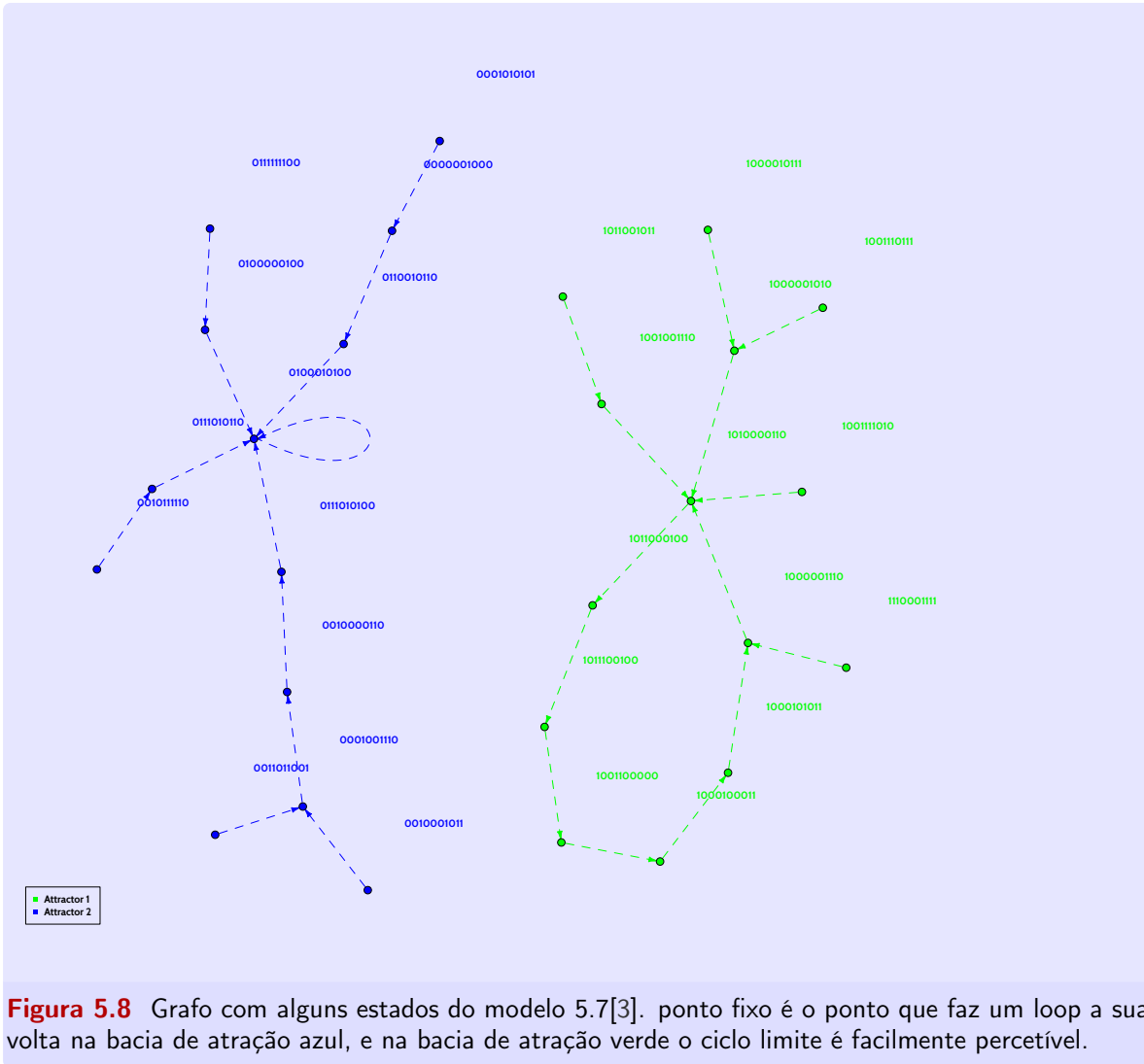
$$B(E2F) = (\overline{Rb} \wedge \overline{CycA} \wedge \overline{CycB}) \vee (p27 \wedge \overline{Rb} \wedge \overline{CycB})$$

Justificação: E2F é ativa na ausência de Rb, que bloqueia a auto ativação da transcrição E2F [Helin 1998, 5], e na ausencia de CycA e CycB [Tyson e Novak, 2004, 11]. CycA pode estar presente, se a sua atividade for bloqueada por p27 [Coqueret, 2003, 2]

- Nó = CycE. Função Booleana:

$$B(CycE) = E2F \wedge \overline{Rb}$$

Justificação: A atividade de CycE requer a presença de de E2F e ausência de de Rb [Helin 1998, 5]



- Nó = CycA. Função Booleana:

$$B(\text{CycA}) = (E2F \wedge \overline{Rb} \wedge \overline{Cdc20} \wedge \overline{(Cdh1 \wedge Ubc)}) \vee (CycA \wedge \overline{Rb} \wedge \overline{Cdc20} \wedge \overline{(Cdh1 \wedge Ubc)})$$

Justificação: A transcrição de CycA é ativada por E2F na ausência de Rb, que bloqueia essa ativação [Helin 1998, 5], na ausência de Cdc20 e do par formado por Cdh1 e UbcH10, que ambos levam a degradação de CycA ([Harper et al, 2002, 4]; [Rape et al, 2004, 9]); CycA é estável na ausência dos seus inibidores Rb, Cdc20, e o par Cdh1 e UbcH10.

- Nó = p27. Função Booleana:

$$B(p27) = (\overline{CycD} \wedge \overline{CycE} \wedge \overline{CycA} \wedge \overline{CycB}) \vee (p27 \wedge \overline{(CycE \wedge CycA)} \wedge \overline{CycB} \wedge \overline{CycD})$$

Justificação: p27 é ativo na ausência de ciclinas; Quando p27 já está presente ele bloqueia a ação de CycE ou CycA (mas não de ambas) por sequestração [Coqueret, 2003,

TABELA 5.4 Atratores para o modelo da Figura 5.7

Atratores com 1 estado		Atrator (ciclo limite) com 7 estados						
	Attr. 1	Attr. 2						
CycD	0	1	1	1	1	1	1	1
Rb	1	0	0	0	0	0	0	0
E2F	0	0	0	0	0	1	1	1
CycE	0	1	0	0	0	0	1	1
CycA	0	1	1	1	0	0	0	1
p27	1	0	0	0	0	0	0	0
Cdc20	0	0	0	1	1	0	0	0
Cdh1	1	0	0	0	1	1	1	1
UbcH10	0	0	1	1	1	1	0	0
CycB	0	0	1	1	0	0	0	0
Freq.	50%	50%						

2]

- Nó = Cdc20. Função Booleana:

$$B(Cdc20) = CycB$$

Justificação: CycB indiretamente ativa Cdc20 [Harper et al, 2002, 4].

- Nó = Cdh1. Função Booleana:

$$B(Cdh1) = (\overline{CycA} \wedge \overline{CycB}) \vee (Cdc20) \vee (p27 \wedge \overline{CycD})$$

Justificação: A atividade de Cdh1 requer a ausência de CycB e CycA, que lhe inibem por fosforilação Cdc20 [Harper et al, 2002, 4]; para além disso Cdc20 ativa Cdh1. [Tyson e Novak, 2004, 11]; p27 permite a presença de CycA, por bloquear a sua atividade.

- Nó = UbcH10. Função Booleana:

$$B(UbcH10) = (\overline{Cdh1}) \vee (Cdh1 \wedge Ubc \wedge (Cdc20 \vee CycA \vee CycB))$$

Justificação: UbcH10 é ativado na ausência de Cdh1; esta atividade pode ser mantida na presença de Cdh1 quando pelo menos um dos seus alvos está presente (CycA, CycB, ou Cdc20) [Rape et al, 2004, 9];

- Nó = CycB. Função Booleana:

$$B(CycB) = (\overline{Cdc20} \wedge \overline{Cdh1})$$

Justificação: CycB é ativo na ausência de Cdc20 e Cdh1, que fosforila CycB para a destruição. [Harper et al, 2002, 4].

Os autores adicionaram ainda uma enzima ubiquitina E2, UbcH10, responsável pela degradação de Cdh1, dependente de CycA.

As propriedades dinâmicas do modelo indicam que a sequência dinâmica biológica é implementada robustamente na rede regulatória, com o estado estacionário biológico **G1** correspondente ao atrator dominante no espaço de estados, em que a sequência biológica de regulação é uma trajetória fortemente atractiva.

No modelo de Fauré et al [3], existem 10 variáveis de estados e portanto $2^{10} = 1024$ estados, o que torna imperceptível representar todos os estados em cada bacia de atração, portanto decidimos representar no grafo apenas um número limitado de estados do sistema, nesse caso 50 estados. A Tabela 5.4 mostra os atratores do sistema. O sistema possui dois atratores sendo um, um ponto fixo e o outro um ciclo limite com 7 estados. Ambos os atratores possuem 512 estados na sua bacia de atração.

O ponto fixo do sistema é a fase G1, onde todas as ciclinas estão a 0 e RB está há um. Estando todas as ciclinas a 0 o ciclo celular não pode ser iniciado. Desta análise podemos supor que numa célula cancerígena existe deficiência de RB porque pode-se ver dessa análise que RB é um estabilizador da fase G1 ou seja é um regulador do ciclo celular numa célula saudável. Também podemos ver que RB é antagono com as ciclinas, o que pode explicar também a rápida proliferação de células cancerígenas com deficiência em RB. Todos os estados com CycD=1 estão na bacia de atração do atrator 2 enquanto que os estados com CycD =0 estão na bacia de atração do atrator 1, o que nos leva a concluir que CycD é o desencadeador do ciclo celular. Também é provável que numa célula cancerígena a um descontrolo na regulação de CycD. Na figura 5.8 apresentamos o grafo com alguns estados do sistema onde os pontos a azul representam a bacia de atração do ponto fixo, enquanto os pontos a verde representam a bacia de atração do ciclo limite.

5.5 Apêndice – Álgebra Booleana

Em álgebra booleana, todas as variáveis podem apenas tomar os dois valores 0 e 1. É útil associar o valor 1 com a ideia de "ON", "ativo", "presente" ou "verdadeiro", e o valor 0 com "OFF", "inativo", "ausente" ou "falso". Por exemplo, se g representa um gene, $g = 1$ significa que g está ON (ou está expresso) e $g = 0$ que g está desligado.

Usamos três operações básicas, ao manipular as variáveis booleanas – NOT= $\bar{\quad}$, AND= \wedge , e OR= \vee , com a notação e definições como segue.

TABELA 5.5 Álgebra Booleana

a	b	$a \wedge b$	a	b	$a \vee b$	a	\bar{a}
0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	1	1	1	0
1	0	0	1	0	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	0

Por palavras

- Se $g = \text{NOT } a$, então g está ON quando a está OFF e g está OFF quando a está ON;
- Se $g = a \text{ OR } b$, então g está ON se a ou b , ou ambos, estão ON, e g está OFF se a e b estão ambos OFF;
- Se $g = a \text{ AND } b$, então g está ON se a e b estão ambos ON, e g está OFF caso contrário.

6 Conclusão

Dá análise feita ao longo desta tese concluímos que :

- ciclo celular é um processo irreversível – em cada transição de fase o estabilizador dessa fase é destruída tornando impossível a reversão do processo.
- nas transições de fase há um antagonismo mútuo (competição) entre o estabilizador de fase e o promotor de mudança de fase que é vencida pelo promotor de mudança de fase.
- existem dois motivos muito relevantes no ciclo celular:
 - antagonismo mútuo** um tipo de competição onde as ciclinas:CDKs competem com os seus inibidores como no caso CycB e CKI; CKI inibe CycB por formar complexo com CycB e desta forma desativando CycB; CycB por sua vez fosforila CKI desativando CKI, que nesta forma é marcada para a destruição.
 - ativação mútua** uma espécie de cooperação onde as espécies ativam-se mutuamente um ao outro como no caso CycB e Cdc25; CycB fosforila Cdc25 que é mais ativa na forma fosforilada (acontece uma *cinase*); quando CycB está fosforilada (na sua forma inativa) Cdc25 desfosforila CycB e desta forma ativa CycB (acontece uma fosfatase).
- o antagonismo mútuo produz um tipo de switch bí-estável em que uma espécie e o seu antagonista são mutuamente exclusivos; desta forma o modelo booleano adapta-se bem ao ciclo celular ou seja quando uma espécie está em 1 o seu antagonista só pode estar a zero.
- ambos os motivos *antagonismo mútuo* e *ativação mútua* produzem feedback positivo.
- numa célula cancerígena é provável que por estar constantemente em ciclo celular ou seja passa no checkpoint T/G1 com CycB alto, que haja uma deficiência em APC que é responsável pela degradação de CycB nesse checkpoint ou em Cdc14 que é responsável por desfosforilar APC e desta forma ajudando-o a vencer a competição com CycB.

Glossário

- APC** (Anaphase Promoting Complex) Complexo promotor de Anáfase: complexo multiproteico que liga, de forma covalente, as moléculas de ubiquitina a proteínas específicas. A ubiquinação dependente de **APC**, de ciclinas de tipo B, **Cyc B**, é regulada por proteínas auxiliares chamadas **Cdc20** e **Cdh1** nas leveduras. 41, 59
- CDKs** Cinases dependentes de ciclinas (Cyclin-dependent kinases) (**CDK1**, **CDK2**, etc.): enzimas que ativam a fosforilação (adicionam um grupo fosfato) a proteínas-alvo específicas. As enzimas **CDK** só estão ativas quando associadas a ciclinas parceiras. Nas leveduras (budding yeast), **CDK1** é referida pelo seu nome inicial, **Cdc28**, onde **Cdc** significa ciclo de divisão celular (cell division cycle). 40
- Centrômero** A região dum cromossoma replicada onde os dois cromatídeos irmãos são mantidos juntos por anéis de coesina em prometáfase. 37
- Checkpoint** Um mecanismo molecular que deteta problemas no processo ciclo celular e evita a progressão para eventos posteriores até que o processo atual seja completo com sucesso.. 38
- Ciclinas** (**Cyc A**, **Cyc B**, etc.): são proteínas que se associam, de forma não-covalente, com subunidades de **CDK** para formar heterodímeros enzimaticamente ativos (**CDK1:Cyc A**, etc.). As células de levedura têm 9 ciclinas diferentes, divididas em duas famílias distintas (**Cln1-3** e **Clb1-6**). 40
- Cinases** um tipo de enzimas que transfere grupos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia (como o ATP) para moléculas-alvo específicas (substratos). O processo tem o nome de fosforilação. A molécula-alvo pode ativar-se ou desativar-se mediante a fosforilação. Todas as cinases necessitam de um íon metálico bivalente como o Mg^{2+} ou o Mn^{2+} para transferir o grupo fosfato. Estas enzimas são ativadas pelo AMP cíclico, que catalisa a fosforilação de determinadas proteínas. 43
- Cinetócoro** região de acoplamento para microtúbulos na região centromérica do cromatídeo. 38
- CKI** inibidora das cinases dependentes de ciclina (Cyclin-dependent kinase inhibitor): proteína que se liga a dímeros **CDK:Ciclina** para formar trímeros (**CDK:Ciclina:CKI**) enzimaticamente inativos. O **CKI** primário em leveduras chama-se **Sic1** (substrato e inibidor de **Cdc28**). Nos mamíferos, um inibidor funcionalmente semelhante chama-se **p21**. 39
- Diagrama de bifurcação de dois parâmetros** Diagrama de bifurcação de dois parâmetros – Gráfico de regiões de comportamentos dinâmicos distintos (e.g., monoesta-

bilidade ou biestabilidade) na dependência de dois parâmetros do sistema dinâmico. 54

Estocástico Flutuação aleatória no número de moléculas de uma espécie química devido a natureza probabilística das reações químicas. 4

Fosfatases são enzimas que removem um grupo fosfato do seu substrato ao hidrolisar os ésteres monofosfóricos de ácido fosfórico dando lugar a um ião fosfato livre e uma molécula com um grupo hidroxilo livre (desfosforilação). Esta ação é a oposta à realizada pelas fosforilases e quinases, as quais unem grupos fosfatos aos seus substratos utilizando moléculas energéticas como o ATP. 50

GFs (Growth factors) Fatores de crescimento: pequenas proteínas, presentes no serum sanguíneo, necessárias para a proliferação de células normais nos mamíferos em cultura. 52

Ligase é uma enzima que catalisa a junção de duas moléculas grandes, geralmente acompanhada da hidrólise de um grupo químico pequeno pendurado numa das moléculas ou enzima que catalisa a ligação entre dois compostos. 55

Proteassoma Um complexo multi-proteico que dissocia cadeias polipeptídicas (i.e., tem a função oposta à dos ribossomas). 41

Rb Retinoblastoma: uma proteína inibidora de **RNAPs** (Polimerases RNA) e também um inibidor específico de factores de crescimento **E2F**. 65

RP (Restriction Point) Ponto de restrição: Um ponto de não-retorno na fase **G1** do ciclo celular dos mamíferos com respeito à remoção do fator de crescimento. Se os fatores de crescimento (**GFs**) são removidos de uma célula, antes do **RP**, a célula pára imediatamente no **G1**. Se, pelo contrário, os **GFs** forem removidos após o **RP**, a célula continua o seu ciclo através de **G1**, **S**, **G2** e **M**, parando na fase **G1** do próximo ciclo celular. 52, 65

Sistema Dinâmico Um sistema de componentes que interagem (e.g., genes e proteínas) que sofre mudanças no tempo (e também possivelmente no espaço); num sistema dinâmico contínuo, essas mudanças podem ser descritas por um sistema de equações diferenciais. 1

TFs (Transcription factors) Fatores de transcrição: proteínas que se unem ao **DNA** e regulam a expressão de genes específicos. Por exemplo, nas leveduras, **Mbp1/Swi6** (também chamada **MBF**) é um fator de crescimento heterodimérico que ativa a síntese das ciclinas da fase **S** e outras proteínas envolvidas na síntese de **DNA**. As proteínas **E2F** e **DP** são fatores de transcrição com papeis idênticos nas células de mamíferos. 42

Ubiquitina Um pequeno polipeptídeo (76 aminoácidos) que pode ser covalentemente ligada a proteínas para marcar a proteína para a degradação das proteassomas. 41

Bibliografia

- [1] Bruce Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*. 5^a ed. Garland Science, 2008. ISBN: 9780815341055.
- [2] Olivier Coqueret. “New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment”. Em: *TRENDS in Cell Biology*. Vol. 13. 2. Elsevier, fev. de 2003.
- [3] Adrien Fauré et al. “Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle”. Em: *Bioinformatics*. Vol. 22. Oxford University Press, 2006. Cap. 14, e124–e131.
- [4] J. Wade Harper, Janet L. Burton e Mark J. Solomon. “The anaphase-promoting complex: it’s not just for mitosis any more”. Em: *GENES & DEVELOPMENT*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. Cap. 16, pp. 2179–2206.
- [5] Kristian Helin. “Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors”. Em: *Current Opinion in Genetics and Development*. Vol. 8. Elsevier, fev. de 1998, pp. 28–35.
- [6] Brian P. Ingalls. *Mathematical Modeling in Systems Biology*. The MIT Press, 2013. ISBN: 9780262018883.
- [7] Orsolya Kapuy et al. “Bistability by Multiple Phosphorylation of Regulatory Proteins”. Em: *NIH Public Access* (2009).
- [8] George Plopper, David Sharp e Eric Sikorski. *Lewin’s CELLS*. 3^a ed. Jones & Bartlett Learning, 2015. Cap. 15.
- [9] Michael Rape e Marc W. Kirschner. “Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry”. Em: *Nature* 432.7017 (2 de dez. de 2004), pp. 535–655.
- [10] Charles J. Sherr e James M. Roberts. “Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases”. Em: *GENES & DEVELOPMENT*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. Cap. 14, pp. 2699–2711.
- [11] John J. Tyson e Béla Novák. “A model for restriction point control of the mammalian cell cycle”. Em: *Journal of Theoretical Biology* 230 (2004), pp. 563–579.
- [12] John J. Tyson e Béla Novák. “Irreversible Transitions, Bistability and Checkpoint Controls in the Eukaryotic Cell Cycle: A Systems-Level Understanding”. Em: *Handbook of Systems Biology*. Elsevier Inc., 2012. Cap. 14, pp. 265–285.
- [13] Wikipédia. *Kinase*. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Kinase>.

- [14] Wikipédia. *Ligase*. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ligase>.
- [15] Wikipédia. *Phosphatase*. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphatase>.
- [16] Guang Yao et al. "A bistable Rb–E2F switch underlies the restriction point". Em: *nature cell biology* 10 (abr. de 2008).

Índice

- Checkpoint, 36
- Restriction point, 52
- Abordagem quantitativa
 - determinística, 4
 - estocástica, 4
- Atualização
 - assíncrona, 60
- ADN, 35
- Análise de sensibilidade, 34
- Antagonismo mútuo, 23, 45
- APC→ *Anaphase Promoting Complex*, 41
- Ativação
 - alostérica, 32
 - mútua, 45
- Ativação/desativação, 42
- Ativo/inativo, 43
- Atrator, 60
- Atualização
 - síncrona, 60
- Bacia de atração, 63
- Barreira energética, 8
- Campo de direções , 21
- Cancro, 36
- Catálise enzimática, 17
- Catalização, 14
- Cdc25→ tirosina-fosfatase, 41
- CellDesigner, 4
- Centríolos, 35
- Checkpoint
 - G1/S, 39
- Ciclina
 - A, 41
 - B, 39
 - D, 41
 - E, 41
- Ciclo celular, 35
- Ciclo-limite, 22, 30, 31
- Ciclooxigenase, 14
- Cinética de Michaelis-Menten, 9, 43
- Cinética química, 8
- Cinase, 42
- Citocinese, 39
- CKI→ *Cyclin Kinase Inhibitor*, 41
- Coeficiente de Hill, 31
- Coeficiente estequiométrico, 7
- Coeficientes de Hill, 24
- Complexo, 10
- Comportamento
 - assimptótico, 22
 - local, 28
 - transitório, 22
- Concentrações, 4
- Conformação, 16
- Constante
 - catalítica, 10
 - de dissociação, 15
 - de Michaelis-Menten, 12
- Copasi, 13
- Cromossomas, 35
- Curva de dose-resposta, 33
- Curvas de nível 0, 22
- Deslocamento duplo, 13
- Diagrama de
 - bifurcação, 33, 49
 - continuação, 33, 42, 43
 - fase, 48
- Diagrama de interação, 4, 14
- Diagrama SBGN, 15
- Direção de movimento, 21

- Eficiência catalítica , 16
 Energia química, 16
 Equilíbrio
 dinâmico, 5
 térmico, 5
 Escala temporal, 11
 lenta, 10, 11, 14
 rápida, 10, 11
 Espécies moleculares, 4
 Espaço de estados, 59
 Estado
 funcional, 16
 não funcional, 16
 Estado estacionário
 estável, 23, 26, 30, 50
 instável, 30, 50
 Estado estacionário
 estável, 27
 Estados estacionário
 instável, 26
 Estrutura terciária, 16
 Evolução temporal, 19

 Feedback
 negativo, 31, 50
 positivo, 31, 45, 49
 FINISH, 46
 Fosfatase, 42
 Fosforilação/desfosforilação, 42, 43
 Francois Jacob, 16
 Função
 de Goldbeter-Koshland , 44
 lógica, 60

 Grau de cooperação, 32
 Grupo funcional, 13

 Homogeneidade espacial, 6

 Inibição
 competitiva, 14
 não competitiva, 17
 Inibidor
 alostérico, 18
 competitivo, 14

 Intérfase, 36
 fase S, 35
 fase G1, 35
 fase G2, 35

 Lei de
 ação-massa, 7, 10, 11, 15
 inibição competitiva, 15
 Michaelis-Menten, 12
 regulação alostérica, 18
 Lei hiperbólica, 12
 Leonor Michaelis, 9
 Linearização, 28
 Lotka-Volterra, 7, 9

 Mad2 → *Mitotic arrest deficient 2* , 58
 Matriz estequiométrica, 7
 Matriz Jacobiana, 30
 Maud Menten, 9
 Mitose, 35, 37
 Anáfase, 38
 Metáfase, 38
 Prófase, 37
 Prometáfase, 38
 Telófase, 39
 Modelo reduzido, 16

 Nó
 estável, 27
 instável, 27
 Nulclinas, 21, 24, 48

 Ordem
 aleatória, 13
 compulsória, 13
 Ordem cinética, 12
 Ordem zero, 13
 Oscilação periódica, 22
 Osciladores
 com relaxação, 31
 retardados, 31

 Plano de fase, 19
 Poder de inibição, 23
 Polinómio característico, 27

- Ponto de bifurcação, 33, 51
- Ponto de equilíbrio, 19
- Ponto espiral
 - estável, 28
 - instável, 28
- Primeira ordem, 13
- Proteassomas, 41
- PVI, 22

- Quantidade conservada, 14
- Quasi-estacionário, 11, 13, 15

- Reação irreversível, 5, 13
- Reações com dois substratos, 13
- Rede
 - assimétrico, 23
 - Booleana, 59
 - de regulação genética, 59
 - simétrica, 23
- Rede de reação
 - fechada, 19
- Rede de reação
 - aberta, 5, 19
 - auto-catalítica, 31
 - fechada, 5
- Redução de modelo, 10
- Regulação alostérica, 14, 16
- Regulação enzimática, 14
- Regulador alostérico, 17
- Resposta
 - hiperbólica, 42, 43
 - sigmoidal, 44
- Robustez, 34

- Síntese/Degradação, 42
- Sítio
 - alostérico, 16
 - ativo, 16
- SBGN, 4, 14
- SCF→ Complexo Skp Cullin F-box
 - ubiquitina-ligase E3, 41
- Separação de escala temporal, 9–11, 18
- Separatriz, 25
- Sistema
 - bi-estável, 25
 - mono-estável, 25
- Solução particular, 27
- START, 46
- Substrato, 8

- TFI→ transcription factor initiation, 41
- Trajetórias, 20

- ubiquitinação, 51

- Valor próprio, 26
- Variável Booleana, 60
- Velocidade de
 - degradação, 50
 - Síntese, 50
- Velocidade de reação, 6, 14
- Velocidade máxima, 15
- Velocidades de reações, 7
- Vetor próprio, 26

- Wee1→ tirosina-cinase, 41