

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

Alessandra Cristina Gomes Magno

**Relação Entre o Volume da Célula e Dinâmica do  
Ciclo Celular em Mamíferos**

Juiz de Fora

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

Alessandra Cristina Gomes Magno

## **Relação Entre o Volume da Célula e Dinâmica do Ciclo Celular em Mamíferos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência da Computação.

Orientador: Itamar Leite de Oliveira

Juiz de Fora

2016

Alessandra Cristina Gomes Magno

## **Relação Entre o Volume da Célula e Dinâmica do Ciclo Celular em Mamíferos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência da Computação.

Aprovada em 22 de Março de 2016.

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof. D.Sc. Itamar Leite de Oliveira - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. D.Sc. Wagner Antonio Arbex  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. D.Sc. Sandro Roberto Fernandes  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais

*A Deus em primeiro lugar. Aos  
meus pais, namorado e amigos  
pelo apoio incondicional.*

# AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar tenho que agradecer a Deus, que me permitiu nascer, viver e me conduziu para o que sou hoje.

Agradeço, também, à minha querida família, que me amou e me ensinou e incentivou a sempre lutar pelos meus sonhos. Dete, mãe querida, por ser essa pessoa maravilhosa que, em momento algum me deixou desamparada, que sempre me apoiou, sempre me incentivou, mãe... você é minha rocha! Minha querida e amada filha, Luisa, é por você que nunca desisti. Minha querida irmã Lílian, o qual sempre me serviu de inspiração nesta caminhada. Minha querida irmã, Any, uma pessoa maravilhosa que, me sempre inspira a ir além. Meus queridos sobrinhos, Douglas e Diego, também por todo o carinho e apoio doado durante nossa convivência.

Não posso esquecer dos amigos. Gostaria de agradecer, os amigos que sempre estiveram do meu lado desde o começo, a galera do "*forever alone*", pois sem vocês essa jornada seria insuportável, sempre estaremos juntos, para o que der e viver, especialmente a Camila Campos, que se tornou uma grande amiga e companheira de sala. Aos amigos, Evelyn, Marcos Paulo, Camila Saporetti, Ruy, Mateus, Ana Mara, Rodrigo (Lemão), Lucas, Janaina, pelos bons momentos compartilhados dentro e fora da UFJF. Aos amigos e professores do pé descalço, Felipe, Clarissa, Carlos Krepp, Carlos Dias, Alexandre, Janice, Gustavo, Gui, Márcio, Clebim etc., pela paciência e alegria. Aos meus amigos queridos Kleber Gonçalves, Bruno Golvêa e Daniela Santurio, pelos sábios conselhos que me ajudaram muito em minhas decisões e também pelas horas de descontração e diversão que tive com vocês. Não poderia deixar de agradecer a pessoa que mais me ajudou durante toda minha jornada, o meu namorado João Vitor, obrigada pelo apoio, paciência, carinho, ajuda, de uma coisa tenho certeza, se cheguei até aqui, com certeza, foi porque você sempre me salvou quando precisei de ajuda, você foi e sempre será o meu herói!!!

Aos professores que contribuíram pra minha formação. Em especial ao meu orientador, Itamar, que me confiou e possibilitou a criação deste projeto e pela imensa paciência gasta. E aos professores Maria Julieta Ventura Carvalho de Araújo, Wilhelm Passarella Freire, Guilherme Albuquerque Pinto, Ana Tércia Oliveira, Eduardo Barrére, Wagner Arbex e Carlos Cristiano, pois por vocês tenho um imenso carinho e admiração.

*"Nada no mundo consegue tomar  
o lugar da persistência. O  
talento não consegue; a  
genialidade não consegue; a  
educação não consegue. A  
persistência e determinação  
sozinhas são onipotentes"*  
*Calvin Coolidge*

# RESUMO

O objetivo principal deste trabalho é adicionar e analisar uma equação que representa o volume no modelo dinâmico do ciclo celular de mamíferos proposto por Gérard e Goldbeter (2011). A divisão celular ocorre quando o complexo *ciclinaB/Cdk1* (quinase dependente de ciclina) é totalmente degradado atingindo um valor mínimo. Neste ponto, a célula é dividida em duas novas células filhas e cada uma irá conter a metade do conteúdo citoplasmático da célula mãe. As equações do modelo de base são válidas apenas se o volume celular, onde as reações ocorrem, é constante. Quando o volume celular não é constante, isto é, a taxa de variação do volume em relação ao tempo é explicitamente levada em consideração no modelo matemático, então as equações do modelo original não são mais válidas. Portanto, todas as equações foram modificadas a partir do princípio de conservação das massas para considerar um volume que varia ao longo do tempo. Por meio desta abordagem, o volume celular afeta todas as variáveis do modelo. Dois métodos diferentes de simulação foram efetuados: determinista e estocástico. Na simulação estocástica, o volume afeta todos os parâmetros do modelo que possuem de alguma forma unidade molar, enquanto que no determinista, ele é incorporado nas equações diferenciais. Na simulação determinista, as espécies bioquímicas podem estar em unidades de concentração, enquanto na simulação estocástica tais espécies devem ser convertidas para número de moléculas que são diretamente proporcional ao volume celular. Em um esforço para entender a influência da nova equação sobre o modelo uma análise de estabilidade foi feita. Isso esclarece como o novo parâmetro  $\mu$ , fator de crescimento do volume celular, impacta na estabilidade do ciclo limite do modelo. Para encontrar a solução aproximada do modelo determinista, o método Runge Kutta de quarta ordem foi implementado. Já para o modelo estocástico, o método direto de Gillespie foi usado. Para concluir, um modelo mais preciso, em comparação ao modelo de base, foi desenvolvido ao levar em consideração a influência da taxa de variação do volume celular sobre o ciclo celular.

**Palavras-chave:** Ciclo Celular. Simulação estocástica. Simulação determinista. Volume celular variável.

# ABSTRACT

The main goal of this work is to add and analyse an equation that represents the volume in a dynamical model of the mammalian cell cycle proposed by Gérard and Goldbeter (2011). The cell division occurs when the *cyclinB/Cdk1* (cyclin-dependent kinase) complex is totally degraded and it reaches a minimum value. At this point, the cell is divided into two newborn daughter cells and each one will contain the half of the cytoplasmic content of the mother cell. The equations of our base model are valid only if the cell volume, where the reactions occur, is constant. Whether the cell volume is not constant, that is, the rate of change of its volume with respect to time is explicitly taken into account in the mathematical model, then the equations of the original model are no longer valid. Therefore, every equations were modified from the mass conservation principle for considering a volume that changes with time. Through this approach, the cell volume affects all model variables. Two different dynamic simulation methods were accomplished: deterministic and stochastic. In the stochastic simulation, the volume affects every model's parameters which have molar unit, whereas in the deterministic one, it is incorporated into the differential equations. In deterministic simulation, the biochemical species may be in concentration units, while in stochastic simulation such species must be converted to number of molecules which are directly proportional to the cell volume. In an effort to understand the influence of the new equation over the model an stability analysis was performed. This elucidates how the new parameter  $\mu$ , cell volume growth factor, impacts the stability of the model's limit cycle. In order to find the approximated solution of the deterministic model, the fourth order Runge Kutta method was implemented. As for the stochastic model, the Gillespie's Direct Method was used. In conclusion, a more precise model, in comparison to the base model, was created for the cell cycle as it now takes into consideration the rate of change of the cell volume.

**Keywords:** Cell Cycle. Stochastic Simulation. Deterministic Simulation. Variable Cell Volume.



# LISTA DE FIGURAS

|      |  |    |
|------|--|----|
| 3.1  | Componentes e organelas de uma célula eucariótica: (1) nucléolo (armazena a carga genética); (2) núcleo celular (armazena os cromossomos); (3) ribossomos (pequena esfera - faz a síntese de proteínas); (4) vesícula; (5) retículo endoplasmático rugoso (faz o transporte de proteínas); (6) aparato de Golgi (armazena e libera as proteínas); (7) citoesqueleto; (8) retículo endoplasmático liso (transporte de proteínas); (9) mitocôndria (faz a respiração celular); (10) vacúolo (serve como reserva de energia); (11) citoplasma; (12) lisossomo (digestão celular) e (13) centríolos (divisão celular).(ALBERTS et al., 2010) . . . . . | 21 |
| 3.2  | Estrutura básica da dupla fita de DNA. A base adenina (A) se liga com a timina (T) através de duas ligações de hidrogênio, enquanto que a citosina (C) se liga com a guanina (G) através de três ligações de hidrogênio.(ANTHONY et al., 2013) . . . . .   | 22 |
| 3.3  | (A) A dupla-hélice ( $2nm$ ), composta apenas de DNA. (B) Segmento de DNA com as histonas. Essa junção é denominada nucleossomos ( $11nm$ ) e se faz importante para a condensação do DNA. (C) Sequência de DNA mais nucleossomos gerando um alto grau de condensação ( $30nm$ ). (ANTHONY et al., 2013) . . . . .   | 23 |
| 3.4  | centrômero de um cromossomo.(ANTHONY et al., 2013) . . . . .   | 24 |
| 3.5  | A replicação do DNA.(ANTHONY et al., 2013) . . . . .   | 24 |
| 3.6  | Fases da meiose (LODISH et al., 2000). . . . .   | 26 |
| 3.7  | Fases da mitose (LODISH et al., 2000): (1) prófase; (2) metáfase; (3) anáfase e (4) telófase. . . . .  | 27 |
| 3.8  | Fases do ciclo celular (LODISH et al., 2000). . . . .  | 30 |
| 3.9  | Cinética de Michaelis–Menten para diferentes valores de $K_m$ (Equação 3.20).<br>$V_{max} = 1$ . $K_m$ equivale a quantidade do substrato $S$ que dá uma velocidade igual 0.5 de $V_{max}$ . . . . .   | 37 |
| 3.10 | Esquema para as reações bioquímicas que ocorrem na cinética de Goldbeter–Koshland. . . . .   | 39 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.11 | Cinética de Goldbeter–Koshland para diferentes valores de $J_1$ e $J_2$ (Equação 3.22). A forma sigmoide confere a esta cinética uma natureza de liga-desliga em função do sinal $X$ . Percebe-se que esta função tem um comportamento muito parecido com a função de Hill (Figura 3.12, Equação 3.26). . . . .   | 40 |
| 3.12 | Cinética de Hill para diferentes valores do coeficiente de Hill: $n$ (Equação 3.26). A forma sigmoide confere a esta cinética uma natureza de liga-desliga em função do sinal $X$ . O comportamento dessa função é semelhante a cinética de Goldbeter–Koshland. $K_a = 1$ . Quando $n = 1$ , o comportamento dessa função é igual ao da cinética de Michaelis-Menten . . . . .  | 42 |
| 3.13 | Seleção da próxima reação, usando o tipo roleta. Em um sistema com sete reações ( $r_1, r_2, \dots, r_7$ ), com as propensidades ( $a_1, a_2, \dots, a_7$ ), respectivamente, a próxima reação é escolhida pelo valor do número aleatório ( $U_2$ ), multiplicado pelo somatório das propensidades de todas as reações ( $a_0$ ). Em (a), a reação selecionada foi a de índice 7. Em (b), após a execução da reação de índice 7, houve alteração na propensidade das reações de índices 5 e 7. Já em (b), a reação selecionada foi a de índice 3. . . . . | 52 |
| 3.14 | Fluxograma do <i>Direct Method</i> (DM). . . . .  | 52 |
| 3.15 | Fluxograma do <i>First Reaction Method</i> (FRM). . . . .   | 53 |
| 3.16 | Fluxograma do <i>Next Reaction Method</i> (NRM). . . . .  | 55 |
| 4.1  | Esquema da rede de <i>Cdk</i> na condução do ciclo celular de mamíferos. As setas vermelhas significam que a reação foi induzida por um determinado composto, enquanto que as setas pretas na horizontal são as reações. As setas pretas verticais mostram em qual fase do ciclo celular está ocorrendo determinada reação. . . . .   | 58 |
| 4.2  | Esquema de modelo para a rede de <i>Cdk</i> na condução do ciclo celular de mamíferos com a inclusão da EDO do volume. As setas vermelhas significam que a reação foi induzida por um determinado composto, as setas verdes significam que um determinado composto está sendo inativado e as setas pretas são as reações. . . . .   | 60 |
| 4.3  | Diagrama de bifurcação. Valor de equilíbrio de $Mb$ em relação ao parâmetro $\mu$ . O ponto H representa a bifurcação de Hopf ( $\mu = 0.11$ ). . . . .   | 67 |
| 4.4  | Plano de fases $M_a \times M_b$ . Cada curva representa um valor diferente de $\mu$ . . .   | 67 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 4.5  | Gráfico dos diversos plano de fases $M_a \times M_b$ com $\mu$ sendo a altura. . . . .  | 68 |
| 5.1  | Simulação determinista do modelo com volume constante (GÉRARD; GOLDBETER, 2011). . . . .  | 73 |
| 5.2  | Simulação determinista do modelo com volume variável. . . . .   | 74 |
| 5.3  | Simulação determinista do volume celular ( $V$ ) do modelo com volume variável. . . . .   | 75 |
| 5.4  | Simulação determinista do complexo de <i>ciclinaB/Cdk1</i> do modelo com volume variável Mb(1) e do modelo com volume constante Mb(2) (GÉRARD; GOLDBETER, 2011). . . . .  | 76 |
| 5.5  | Simulação determinista de um único ciclo do complexo de <i>ciclinaB/Cdk1</i> do modelo com volume variável Mb(1) e do modelo com volume constante Mb(2) (GÉRARD; GOLDBETER, 2011). . . . .                                  | 76 |
| 5.6  | Plano de fases $M_a \times M_b$ para alguns valores chaves de $\mu$ . . . . .   | 77 |
| 5.7  | Simulação estocástica do modelo com volume constante e $\Omega = 200$ (GÉRARD; GOLDBETER, 2011). O resultado é uma média de 500 simulações. . . . .   | 79 |
| 5.8  | Simulação estocástica do modelo com volume constante e $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$ . O resultado é uma média de 500 simulações. . . . .  | 80 |
| 5.9  | Concentrações na simulação estocástica no modelo com volume constante e $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$ . O resultado é uma média de 500 simulações. . . . .   | 81 |
| 5.10 | Simulação estocástica de 10 trajetórias do complexo <i>ciclinaD/Cdk4 - 6</i> , do fator de transcrição <i>E2F</i> e da proteína <i>Cdc20</i> no modelo com volume variável. Os valores estão dados em concentração. . . . . | 82 |
| 5.11 | Simulação estocástica do modelo com volume variável. O resultado é uma média de 500 simulações. . . . .   | 83 |
| 5.12 | Simulação estocástica do modelo com volume variável. O resultado é a concentração média de 500 simulações. . . . .  | 84 |

# LISTA DE TABELAS

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 2.1 | Alguns modelos matemáticos de Ciclo Celular Eucarioto. . . . .   | 20 |
| 4.1 | Valores dos parâmetros do modelo de EDO. Nomes e valores. . . . .  | 64 |
| 4.2 | Pontos de equilíbrio . . . . .   | 65 |
| 4.3 | Autovalores do sistema . . . . .   | 66 |
| 4.4 | Versão do modelo estocástico. . . . .  | 69 |
| 5.1 | Valores iniciais das variáveis de estado do modelo do ciclo celular. Nomes, valores deterministas e estocásticos. Usou-se o fator $\Omega = 200 [L/\mu mol]$ ou $\Omega = 1.99 \cdot 10^5 [L/\mu mol]$ para a conversão. . . . . | 71 |
| 5.2 | Valores dos parâmetros do modelo de EDO. Nomes, valores deterministas e estocásticos. Após a multiplicação por $\Omega$ é necessário arredondar o valor para o inteiro para mais próximo. . . . .                                | 72 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |  |
|---------------|--|
| $Cdk$         | Quinase Dependente de Ciclina  |
| $APC$         | Complexo Promotor da Anáfase   |
| $DM$          | <i>Direct Method</i>   |
| $FRM$         | <i>First Reaction Method</i>   |
| $NRM$         | <i>Next Reaction Method</i>  |
| $Md$          | Complexo ciclinaD/Cdk4-6   |
| $Me$          | Complexo ciclinaE/Cdk2   |
| $Ma$          | Complexo ciclinaA/Cdk2   |
| $Mb$          | Complexo ciclinaB/Cdk1   |
| $E2F$         | Fator de transcrição $E2F$   |
| $Cdc20$       | Proteína que pertence ao $APC$   |
| $Cdc20_{tot}$ | Concentração total da proteína $Cdc20$   |
| $E2F_{tot}$   | Concentração total do fator de transcrição $E2F$   |
| $GF$          | Fator de crescimento   |
| $K_{da}$      | Constante de Michaelis para degradação, tivado pela $Cdc20$ , do complexo <i>ciclinaA/Cdk2</i>   |
| $K_{db}$      | Constante de Michaelis para degradação, ativado pela $Cdc20$ , do complexo <i>ciclinaB/Cdk1</i>  |
| $K_{dd}$      | Constante de Michaelis para degradação do complexo <i>ciclinaD/Cdk4 – 6</i>  |
| $K_{de}$      | Constante de Michaelis para degradação do complexo <i>ciclinaE/Cdk2</i>  |
| $K_{gf}$      | Constante de Michaelis para a síntese do complexo <i>ciclinaD/Cdk4 – 6</i> induzida pelo fator de crescimento                          |
| $K_{1cdc20}$  | Constante de Michaelis para a ativação da $Cdc20$ através da fosforilação pelo complexo <i>ciclinaB/Cdk1</i>                           |
| $K_{2cdc20}$  | Constante de Michaelis para a inativação da $Cdc20$ através da desfosforilação   |
| $K_{1e2f}$    | Constante de Michaelis para a ativação do $E2F$ pelos complexos <i>ciclinaD/Cdk4 – 6</i> e <i>ciclinaE/Cdk2</i>                        |
| $K_{1e2f}$    | Constante de Michaelis para a inativação do $E2F$ pelo complexo <i>ciclinaA/Cdk2</i>   |
| $V_{da}$      | Taxa constante para a degradação do complexo <i>ciclinaA/Cdk2</i> pela proteína $Cdc20$  |
| $V_{db}$      | Taxa constante para a degradação do complexo <i>ciclinaB/Cdk1</i> pela proteína $Cdc20$  |
| $V^*$         | Concentração total do Volume   |
| $V_{dd}$      | Taxa de degradação máxima do complexo <i>ciclinaD/Cdk4 – 6</i>   |
| $V_{de}$      | Taxa constante para a degradação do complexo <i>ciclinaE/Cdk2</i> pelo complexo <i>ciclinaA/Cdk2</i>                                   |
| $v_{sa}$      | Taxa constante para a síntese do complexo <i>ciclinaA/Cdk2</i> induzida pelo fator de transcrição $E2F$                                |
| $v_{sb}$      | Taxa constante para a síntese do complexo <i>ciclinaB/Cdk1</i> induzida pelo complexo <i>ciclinaA/Cdk2</i>                             |
| $v_{sd}$      | Taxa constante para a síntese do complexo <i>ciclinaD/Cdk4 – 6</i> induzida pelo fator de crescimento $GF$ (sem volume) ou pelo volume |

|              |   |
|--------------|---|
| $v_{se}$     | Taxa constante para a síntese do complexo <i>ciclinaE/Cdk2</i> induzida pelo fator de transcrição <i>E2F</i>                      |
| $V_{1cdc20}$ | Taxa constante para a ativação da proteína <i>Cdc20</i> através da fosforilação pelo complexo <i>ciclinaB/Cdk1</i>                |
| $V_{2cdc20}$ | Taxa constante máxima para a inativação da proteína <i>Cdc20</i> através da desfosforilação                                       |
| $V_{1e2f}$   | Taxa constante para a ativação do fator de transcrição <i>E2F</i> pelos complexos <i>ciclinaD/Cdk4 – 6</i> e <i>ciclinaE/Cdk2</i> |
| $V_{2e2f}$   | Taxa constante para a inativação do fator de transcrição <i>E2F</i> pelo complexo <i>ciclinaA/Cdk2</i>                            |

# SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                        | <b>16</b> |
| 1.1      | DEFINIÇÃO DO PROBLEMA .....                    | 16        |
| 1.2      | OBJETIVOS .....                                | 17        |
| 1.3      | ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO .....                  | 17        |
| <b>2</b> | <b>TRABALHOS RELACIONADOS</b> .....            | <b>18</b> |
| <b>3</b> | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....             | <b>21</b> |
| 3.1      | CONCEITOS BIOLÓGICOS .....                     | 21        |
| 3.1.1    | A Célula Eucariótica .....                     | 21        |
| 3.1.2    | DNA .....                                      | 22        |
| 3.1.3    | Cromossomos .....                              | 23        |
| 3.1.4    | Replicação do DNA .....                        | 24        |
| 3.1.5    | Divisão Celular .....                          | 25        |
| 3.1.5.1  | Meiose .....                                   | 25        |
| 3.1.5.2  | Mitose .....                                   | 27        |
| 3.1.6    | Ciclo Celular .....                            | 27        |
| 3.2      | REAÇÕES BIOQUÍMICAS .....                      | 30        |
| 3.2.1    | A Lei de Ação das Massas .....                 | 30        |
| 3.2.2    | Cinética das reações enzimáticas .....         | 32        |
| 3.2.2.1  | A aproximação do equilíbrio .....              | 34        |
| 3.2.2.2  | Aproximação de estado quase estacionário ..... | 35        |
| 3.2.2.3  | Cinética de Goldbeter-Koshland .....           | 38        |
| 3.2.2.4  | Equação de Hill .....                          | 41        |
| 3.3      | ANÁLISE DE SISTEMA DINÂMICOS .....             | 42        |
| 3.3.1    | Estabilidade de Sistemas Não-Lineares .....    | 43        |
| 3.3.2    | Linearização de sistemas .....                 | 43        |
| 3.3.3    | Tipos de Pontos de equilíbrio .....            | 44        |
| 3.3.4    | Ciclo Limite .....                             | 44        |
| 3.3.5    | Bifurcação de Hopf .....                       | 45        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.4      | SIMULAÇÃO DETERMINISTA .....                       | 45        |
| 3.4.1    | Métodos Numéricos .....                            | 46        |
| 3.4.1.1  | Método de Euler .....                              | 46        |
| 3.4.1.2  | Método de Runge Kutta .....                        | 47        |
| 3.4.1.3  | Runge Kutta de Quarta Ordem .....                  | 47        |
| 3.5      | SIMULAÇÃO ESTOCÁSTICA .....                        | 48        |
| 3.5.1    | Métodos de Simulação Estocástica.....              | 49        |
| 3.5.1.1  | <i>Direct Method</i> (DM) .....                    | 50        |
| 3.5.1.2  | <i>First Reaction Method</i> (FRM).....            | 53        |
| 3.5.1.3  | <i>Next Reaction Method</i> (NRM).....             | 54        |
| <b>4</b> | <b>MODELO PROPOSTO .....</b>                       | <b>57</b> |
| 4.1      | FORMULAÇÃO DETERMINÍSTICA - VOLUME CONSTANTE ..... | 57        |
| 4.2      | FORMULAÇÃO DETERMINÍSTICA - VOLUME VARIÁVEL .....  | 59        |
| 4.3      | ANÁLISE QUALITATIVA DO MODELO DE EDOS .....        | 63        |
| 4.4      | FORMULAÇÃO ESTOCÁSTICA .....                       | 67        |
| 4.4.1    | Volume Variável.....                               | 69        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                             | <b>71</b> |
| 5.1      | PARÂMETROS DO MODELO .....                         | 71        |
| 5.2      | SIMULAÇÃO DETERMINISTA .....                       | 72        |
| 5.3      | SIMULAÇÃO ESTOCÁSTICA .....                        | 77        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                             | <b>85</b> |
| 6.1      | TRABALHOS FUTUROS .....                            | 85        |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                           | <b>87</b> |



# 1 INTRODUÇÃO

O ciclo celular de mamíferos é impulsionado por uma rede de quínases dependentes de ciclina (Cdks), que controlam sua progressão ao longo de quatro fases sucessivas: o *gap* da fase  $G1$  para a fase  $S$  é a replicação do DNA e o *gap* da fase  $G2$  para a fase  $M$  é a mitose. Quando as células não estão em um estado proliferativo, elas permanecem em repouso na fase denominada  $G0$ . Vários modelos foram propostos para representar as fases do ciclo celular de células de mamíferos, especialmente a transição  $G1/S$ , com a restrição no ponto de verificação  $G1$  ou a transição  $G2/M$ .

Os modelos aqui estudados envolvem os quatro complexos de *ciclina/Cdk* que permitem a progressão correta ao longo das sucessivas fases do ciclo celular. Outras variáveis são os fatores de transcrição  $E2F$  e a proteína  $Cdc20$ , que controlam a degradação dos complexos *ciclinaA/Cdk2* e *ciclinaB/Cdk1* e o volume  $V$  da célula, que aumenta conforme o crescimento celular e cai quando a célula se divide.

O modelo do ciclo celular proposto neste trabalho pode ser aplicado de forma a ampliar a compreensão de como o ciclo celular é afetado por doenças, como o câncer e Alzheimer, sendo assim, é uma aplicação de grande interesse. Outra aplicação para o modelo proposto é verificar como os quimioterápicos interferem na regulação do ciclo celular.

## 1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

O problema tratado neste trabalho é o estudo do ciclo celular de células de mamíferos. Para compreender o processo da divisão celular é necessário um estudo das etapas que envolvem a divisão celular, técnicas de modelagem e simulação do ciclo celular de forma a obter os resultados esperados.

A partir dos trabalhos de Gérard e Goldbeter (2011) e Gérard et al. (2012), foi proposta uma ampliação do modelo matemático por meio da inclusão de uma equação do volume celular para analisar o funcionamento das divisões celulares e utilizando-se tanto simulações estocásticas quanto determinísticas.

## 1.2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é realizar a simulação dinâmica do ciclo celular de células de mamíferos a partir de um modelo de equações diferenciais ordinárias (EDO's) acopladas disponível na literatura (GÉRARD; GOLDBETER, 2011) com a inclusão de uma equação que represente o volume celular.

Como objetivo secundário, este trabalho visa simular deterministicamente e estocasticamente o modelo com a equação do volume incluída e comparar os resultados das duas simulações como os resultados presentes na literatura.

## 1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho está dividido da seguinte forma, primeiro os trabalhos relacionados são apresentados no capítulo 2. O capítulo 3 o referencial teórico, principalmente biológico, matemático e numérico, necessário para compreender o desenvolvimento do trabalho. O capítulo 4 irá mostrar os modelos computacionais que serão utilizados neste trabalho. A seguir o capítulo 5 mostra os resultados obtidos tanto no modelo proposto neste trabalho quanto os propostos em Gérard e Goldbeter (2011) de forma a validar o modelo. Finalmente, O capítulo 6 apresenta as conclusões a partir da análise dos resultados. Além disto, este capítulo introduz os possíveis trabalhos futuros, principalmente aplicações que podem ser desenvolvidas a partir do modelo proposto e validado neste trabalho.

## 2 TRABALHOS RELACIONADOS

O trabalho de Gérard e Goldbeter (2011) propôs um modelo de 5 variáveis para a rede de quinases dependentes de ciclinas (Cdk), pois são elas que controlam a progressão do ciclo celular das células de mamíferos ao longo das fases G1, S, G2 e M. Na presença de uma quantidade suficiente de fatores de crescimento, o modelo passa de um estado estável para as oscilações sofridas pelos diferentes complexos ciclina/Cdk. A ativação sequencial desses complexos de ciclina/Cdk levam à progressão das fases G1, S, G2 e M do ciclo celular de células de mamíferos.

O trabalho de Gérard et al. (2012) faz uma análise baseada nas simulações deterministas e estocásticas do modelo para a rede Cdk. A modelagem determinista indica como a forma de onda e amplitude das oscilações das Cdk são afetadas por vários tipos de feedbacks positivos. Neste trabalho são apresentadas simulações estocásticas que complementam a abordagem determinista, fornecendo uma compreensão sobre a robustez das oscilações, no que diz respeito ao ruído molecular.

Em Tyson e Novak (2001) são examinados os eventos moleculares que controlam o passo de compromisso com uma nova rodada de replicação dos cromossomos, formação de gemas e mitose (*Start*) e a transição da metáfase para anáfase, quando as cromátides-irmãs são separadas e o broto se separa da célula-mãe (*Finish*) em células, eucariotas, da levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*. Este trabalho apresenta uma equação diferencial para a massa celular, onde a célula se divide ao meio quando a *ciclinaB* chega a um determinado valor. Essa equação da massa serviu de inspiração para a criação da equação do volume, incluída no modelo desenvolvido neste trabalho.

O trabalho de Elowitz et al. (2002) diz que clones de células apresentam variações fenotípica substanciais e esta heterogeneidade pode ser essencial para muitos processos biológicos e conjectura-se que surjam da estocasticidade, ou ruído, na expressão dos genes. Os autores construíram cepas de *Escherichia coli* que permitiram a detecção de ruído e discriminação de qual mecanismo gerou cada variação fenotípica. Tanto a estocasticidade inerente ao processo bioquímico da expressão gênica (ruído intrínseco) e as flutuações em outros componentes celulares (ruído extrínseco) contribuem substancialmente para a variação global. A taxa de transcrição, a dinâmica de regulação e os fatores genéticos con-

trolam a amplitude do ruído. Estes resultados estabeleceram uma base quantitativa para a modelagem do ruído em redes gênicas e revelaram como o baixo número de moléculas pode limitar fundamentalmente a precisão da regulação gênica. Este fenômeno pode ser visto através de simulações estocásticas, como as apresentadas neste trabalho.

O trabalho de Csikász-Nagy (2009) mostra o início e a evolução da modelagem computacional da regulação do ciclo celular até a data do trabalho. Além de discutir possíveis direções futuras, diz também que precisa de novos conceitos, ferramentas e modelos computacionais mais detalhados e precisos da regulação do ciclo celular. Isto é um dos objetivos deste trabalho.

Ferrell et al. (2011) fizeram uma análise da estabilidade linear, permitindo que se determine se um determinado modelo de equações diferenciais e um conjunto particular de parâmetros cinéticos irá produzir oscilações. O trabalho desenvolvido por Ferrell et al. (2011), assim como o trabalho aqui desenvolvido, visa obter resultados oscilatórios.

Em um trabalho anterior Magno (2015) também buscou incluir o volume ao ciclo celular. Contudo, neste trabalho não foi incluído o volume no modelo estocástico. Além disto, não foram feitas as análises necessárias para verificar a influência da nova equação sobre a estabilidade do modelo e sobre o ciclo limite do modelo.

A modelagem do ciclo celular tornou-se um trabalho relevante entre os pesquisadores, por isso muitos modelos têm sido publicados. A Tabela 2.1, logo a seguir, mostra alguns tipos de modelos do ciclo celular e o ano em que foram publicados. De fato, muitos destes modelos celulares foram propostos ao longo do tempo, começando com o de Goldbeter (1991), baseado em um conjunto simples de equações diferenciais, passando por modelos muito complexos que levam em consideração dezenas de variáveis. Além disso, diferentes abordagens foram propostas, como a modelagem por equações diferenciais ou a modelagem estocástica. Assim como modelos específicos para diferentes tipos de células. Alguns modelos como o visto em Powathil et al. (2012) modelam um conjunto de células. Este mesmo modelo usa uma abordagem determinista para o ciclo celular e uma estocástica para a interação entre as células e o ambiente externo.

Tabela 2.1: Alguns modelos matemáticos de Ciclo Celular Eucarioto.

| Ano  | Organismo / Tipo celular                           | Tipo de Modelo                  | Referência                    |
|------|--|---------------------------------|-------------------------------|
| 1991 | Embriões de <i>Xenopus laevis embryos</i>          | EDO                             | Goldbeter (1991)              |
| 1991 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Norel e Agur (1991)           |
| 1991 | Embriões de <i>Xenopus</i> , células somáticas     | EDO                             | Tyson (1991)                  |
| 1992 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Obeyesekere et al. (1992)     |
| 1993 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Novak e Tyson (1993a)         |
| 1993 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Novak e Tyson (1993b)         |
| 1996 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Goldbeter e Guilmot (1996)    |
| 1997 | <i>S. pombe</i>                                    | EDO                             | Novak e Tyson (1997)          |
| 1998 | <i>S. pombe</i>                                    | EDO                             | Novak et al. (1998)           |
| 1998 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Borisuk e Tyson (1998)        |
| 1999 | Células somáticas de mamíferos                     | EDO                             | Aguda e Tang (1999)           |
| 2003 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Pomerening et al. (2003)      |
| 2003 | <i>S. cerevisiae</i>                               | EDO                             | Ciliberto et al. (2003)       |
| 2004 | <i>S. cerevisiae</i>                               | EDO                             | Chen et al. (2004)            |
| 2004 | <i>S. pombe</i>                                    | Estocástico                     | Steuer (2004)                 |
| 2005 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Pomerening et al. (2005)      |
| 2006 | <i>S. cerevisiae</i>                               | Estocástico                     | Zhang et al. (2006)           |
| 2007 | <i>S. cerevisiae</i>                               | Estocástico                     | Braunewell e Bornholdt (2007) |
| 2007 | <i>S. cerevisiae</i>                               | Estocástico                     | Okabe e Sasai (2007)          |
| 2008 | Embriões de <i>Xenopus</i>                         | EDO                             | Tsai et al. (2008)            |
| 2008 | <i>S. cerevisiae</i>                               | Estocástico                     | Ge et al. (2008)              |
| 2008 | <i>S. cerevisiae</i>                               | Estocástico                     | Mura e Csikász-Nagy (2008)    |
| 2008 | Células somáticas de mamíferos                     | EDO                             | Yao et al. (2008)             |
| 2009 | Células somáticas de mamíferos                     | EDO                             | Alferi et al. (2009)          |
| 2010 | <i>S. cerevisiae</i>                               | EDO                             | Charvin et al. (2010)         |
| 2010 | <i>S. pombe</i>                                    | EDO                             | Li et al. (2010)              |
| 2012 | levedura de fissão                                 | EDO                             | Fisher et al. (2012)          |
| 2012 | Célula Tumoral                                     | EDO e Estocástico               | Powathil et al. (2012)        |
| 2014 | Linfócitos   | Estocástico                     | Dowling et al. (2014)         |
| 2015 | Células de mamíferos                               | Estocástico                     | Sandler et al. (2015)         |
| 2015 | Comportamento de sistemas biomoleculares complexos | Estocástico com redes booleanas | Novère (2015)                 |

## 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 CONCEITOS BIOLÓGICOS

Entre os conceitos biológicos para facilitar a compreensão deste trabalho, destacam-se o entendimento de célula eucariótica, o conhecimento de ácido desoxirribonucléico (DNA) e dos cromossomos, o entendimento da replicação do DNA, da divisão celular e da regulação do ciclo celular. Toda esta seção, incluindo algumas figuras, está baseada nos trabalhos de ANTHONY et al. (2013), Alberts et al. (2010), Alberts et al. (2011) e Malacinski e Motta (2005).

#### 3.1.1 A CÉLULA EUCARIÓTICA

As células eucarióticas são consideradas células mais complexas, comparadas com as procaríóticas, pois possuem um desenvolvido sistema de membranas. Os fungos, protozoários, animais e plantas possuem esse tipo de constituição estrutural, isto é, apresentam divisão de funções metabólicas entre as organelas citoplasmáticas. Um aspecto evolutivo importante das células eucarióticas é o núcleo ou carioteca, delimitado pela membrana nuclear, separando em seu interior o material cromossômico das demais organelas (Fig. 3.1).

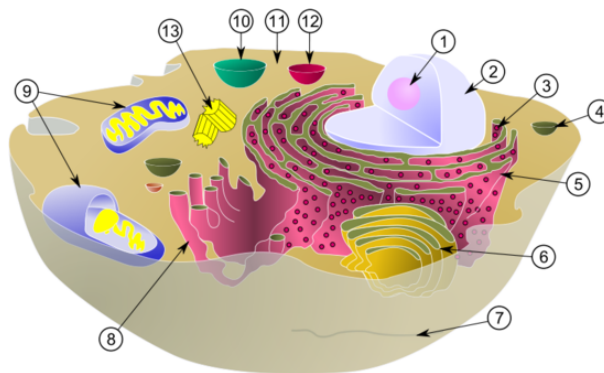


Figura 3.1: Componentes e organelas de uma célula eucariótica: (1) nucléolo (armazena a carga genética); (2) núcleo celular (armazena os cromossomos); (3) ribossomos (pequena esfera - faz a síntese de proteínas); (4) vesícula; (5) retículo endoplasmático rugoso (faz o transporte de proteínas); (6) aparato de Golgi (armazena e libera as proteínas); (7) citoesqueleto; (8) retículo endoplasmático liso (transporte de proteínas); (9) mitocôndria (faz a respiração celular); (10) vacúolo (serve como reserva de energia); (11) citoplasma; (12) lisossomo (digestão celular) e (13) centríolos (divisão celular). (ALBERTS et al., 2010)

### 3.1.2 DNA

O DNA foi descoberto pelo cientista suíço Johann Friedrich Miescher, no século XIX. Ele trabalhava com o núcleo de leucócitos retirados do pus de ataduras de ferimentos infeccionados e identificou uma substância desconhecida que possuía nitrogênio e fósforo na composição. Após algumas pesquisas, verificou-se que está substância era ácida e estava presente em todos os núcleos celulares. Além disso, havia dois tipos de ácidos, uma ribose e uma desoxirribose.

A molécula de DNA é composta por uma fita dupla de nucleotídeos, os dois filamentos que compõem o DNA se enrolam, um sobre o outro, formando uma dupla hélice, semelhante a uma espiral de caderno (Figura 3.2). Essas fitas se unem através de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas dos nucleotídeos, que estão no interior da hélice. Os nucleotídeos são divididos em quatro subunidades, eles são formados por uma pentose associada a um ou mais grupos fosfato e a uma base nitrogenada. O DNA é composto por uma desoxirribose e um grupo fosfato, contém quatro tipos de bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina). As bases citosina e timina são chamadas de pirimidinas, enquanto que as bases adenina e guanina são chamadas de purinas. A cadeia do DNA possui duas extremidades, denominadas extremidade 3 e extremidade 5; a extremidade 3 possui um hidroxil e a extremidade 5 um fosfato. A descoberta da dupla hélice permitiu responder muitas perguntas sobre a duplicação do DNA e a transmissão de genes para os descendentes do indivíduo.

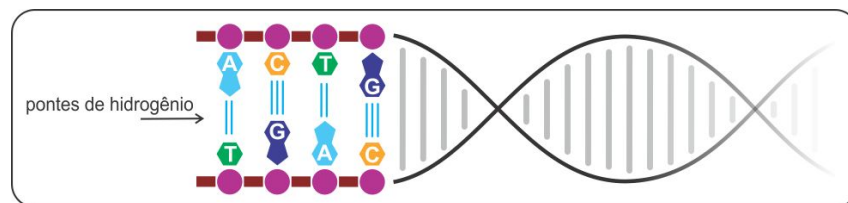


Figura 3.2: Estrutura básica da dupla fita de DNA. A base adenina (A) se liga com a timina (T) através de duas ligações de hidrogênio, enquanto que a citosina (C) se liga com a guanina (G) através de três ligações de hidrogênio.(ANTHONY et al., 2013)

Em 1953 foi proposto um modelo de dupla hélice do DNA, pelo americano James D. Watson e pelo físico inglês H.C. Crick, que recebeu o nome de duplicação semi-conservativa, pois conservava 50% do DNA da célula-mãe. Neste modelo, quando as duas fitas se separavam, ocorria a formação de uma fita complementar. Para que essa duplicação ocorra, as ligações de hidrogênio se desfazem para que as cadeias se separem.

Após esta separação, uma nova cadeia começa a ser formada, chamada cadeia complementar, com a ajuda da enzima DNA-polimerase. A adenina sempre emparelha com a timina, e a guanina sempre emparelha com a citosina na fita de DNA, no RNA a adenina emparelha com a uracila. No final do processo temos duas fitas idênticas.

### 3.1.3 CROMOSSOMOS

O cromossomo é constituído por uma longa fita dupla de DNA condensada. O cromossomo é composto de proteínas chamadas histonas, que se arranjam em grupos de oito, e são envolvidas pela molécula de DNA. Estes grupos de oito histonas, enroladas pelo DNA são chamados de nucleossomos. Há muitos nucleossomos na molécula de DNA. Como mostrado na Figura 3.3.

Os nucleossomos ajudam no enovelamento do cromossomo. Na intérfase, o cromossomo encontra-se totalmente descondensado, formando a cromatina. Já na metáfase ele encontra-se no estado de condensação máxima.

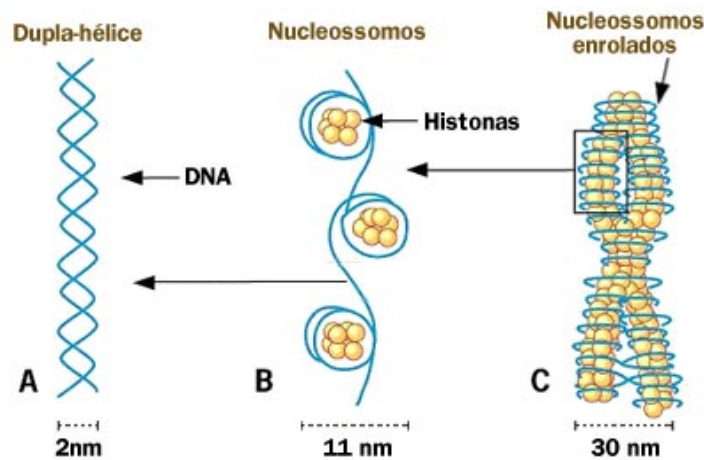


Figura 3.3: (A) A dupla-hélice (2nm), composta apenas de DNA. (B) Segmento de DNA com as histonas. Essa junção é denominada nucleossomos (11nm) e se faz importante para a condensação do DNA. (C) Sequência de DNA mais nucleossomos gerando um alto grau de condensação (30nm). (ANTHONY et al., 2013)

Todo cromossomo possui um estrangulamento, por meio do qual são puxados pelas fibras do fuso até os pólos da célula para separação das cromátides-irmãs. Este estrangulamento recebe o nome de centrômero. A Figura 3.4 mostra o centrômero de um cromossomo.



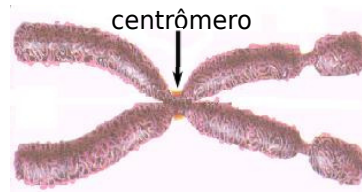


Figura 3.4: centrômero de um cromossomo.(ANTHONY et al., 2013)

### 3.1.4 REPLICAÇÃO DO DNA

A replicação do DNA, ou duplicação do DNA, é um fenômeno genético que assegura a autoduplicação das informações contidas nos cromossomos, especificamente nos genes. Esse processo ocorre durante a fase *S* da interfase, sendo necessário para a manutenção orgânica do indivíduo, permitindo o desenvolvimento do organismo, a reposição de tecidos lesionados ou regeneração quando possível, bem como a propagação hereditária das características, propiciando a formação de gametas contendo as informações fidedignas da espécie.

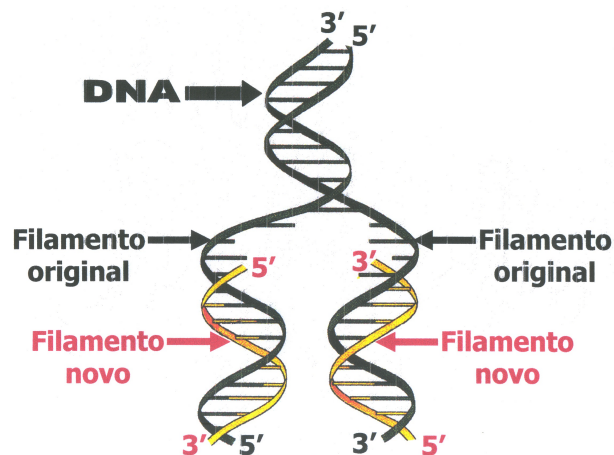


Figura 3.5: A replicação do DNA.(ANTHONY et al., 2013)

Para o acontecimento desse processo, alguns eventos envolvendo o filamento da molécula de DNA são indispensáveis. Inicialmente, o filamento da molécula molde (molécula mãe) tem sua dupla fita separada devido o rompimento das ligações de hidrogênio, mantidas entre as bases nitrogenadas complementares. A Figura 3.5 mostra que sobre cada uma das cadeias nucleotídicas molde vão se emparelhando novos nucleotídios dispersos no núcleo, construindo dessa forma uma nova cadeia. No final do processo são produzidas duas moléculas idênticas, denominadas de cromátides-irmãs, cada uma constituída por uma fita nucleotídica da molécula original e outra recém-fabricada. Devido a esse fato, o processo de replicação é considerado semi-conservativo, ou seja, finalizada a divisão, as cé-

lulas resultantes conservam consigo metade das informações genéticas originais herdadas da célula genitora (célula mãe).

### 3.1.5 DIVISÃO CELULAR

Os caracteres hereditários são transmitidos pelos cromossomos, isto é, os cromossomos são responsáveis pelas características genéticas que são transmitidas de pais para filhos. Os cromossomos são formados basicamente por dois tipos de substâncias químicas: proteínas e ácidos nucleicos. O ácido nucleico encontrado nos cromossomos é o ácido desoxirribonucleico (DNA). O DNA é a substância química que forma o gene. Cada gene possui um código específico, uma espécie de instrução química que pode controlar determinada característica do indivíduo, como a cor da pele, o tipo de cabelo, a altura, etc. Cada cromossomo abriga inúmeros genes, dispostos em ordem linear ao longo de filamentos. Atualmente, estima-se que em cada célula humana existam de 20 mil a 25 mil genes. Os cromossomos diferem entre si quanto à forma, ao tamanho e ao número de genes que contêm.

Com exceção das células de reprodução (gametas), todas as demais células do corpo são diploides ( $2n$ ), ou seja, possuem dois cromossomos de cada tipo. Os gametas possuem em seu núcleo apenas um cromossomo de cada tipo, são células haplóides ( $n$ ). Eles são células que não exercem nenhuma função até encontrarem o gameta do outro sexo e completarem a sua carga genética. Nos seres humanos, tanto o espermatozoide como o ovócito possuem 23 cromossomos, isto é, apenas um cromossomo para cada tipo.

A divisão celular é o processo por meio do qual uma célula se divide em duas (mitose) ou quatro (meiose) células-filhas, com toda a informação genética relativa à espécie. Este processo faz parte do ciclo celular.

#### 3.1.5.1 Meiose

É o processo de divisão celular através do qual uma célula tem o seu número de cromossomos reduzido pela metade. O processo da meiose apresenta oito fases (Figura 3.6).

Na prófase I, os cromossomos tornam-se mais condensados. Ocorre o emparelhamento dos cromossomos homólogos e podem surgir pontos de cruzamento entre as cromátides dos cromossomos homólogos, podendo ocorrer quebra das cromátides, levando a trocas de segmentos dos bivalentes (*Crossing-over*), que contribui para o aumento da variabilidade

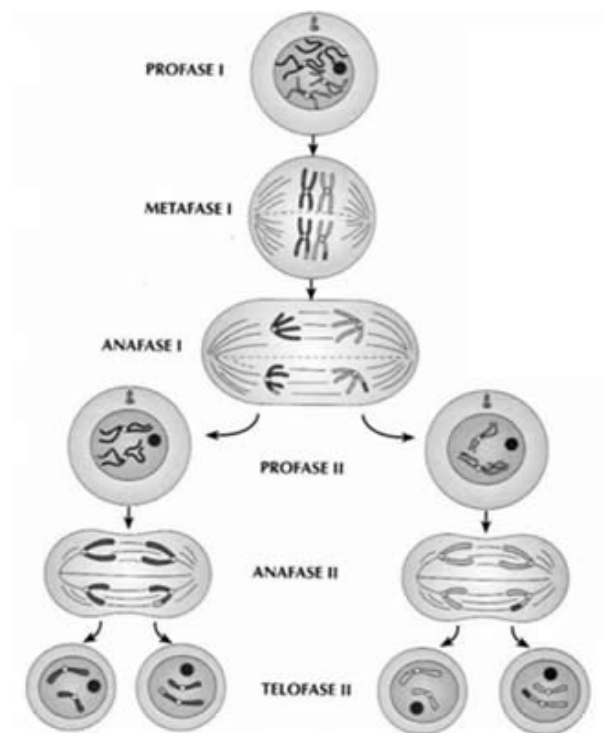


Figura 3.6: Fases da meiose (LODISH et al., 2000).

dos descendentes. Finalmente, desaparece o nucléolo e a carioteca. Os centríolos migram para os polos opostos da célula e forma-se o fuso acromático. A prófase I é dividida em cinco subdivisões: leptóteno, zigoteno, paquíteno (local de ocorrência do crossing-over), diploteno e diacinese. Na metafase I, ocorre o desaparecimento da membrana nuclear, forma-se um fuso e os cromossomos pareados estão alinhados no plano equatorial da célula com seus centrômeros orientados para os polos opostos. Na anáfase I, os emparelhamentos dos cromossomos são desfeitos. Ocorre disjunção dos pares homólogos duplicados. Cada cromossomo, com suas cromátides-irmãs migra para os polos opostos da célula. Na telófase I, ocorre a descondensação do nucléolo e formação de dois núcleos com metade do número de cromossomos.

Na prófase II, os cromossomos tornam-se mais condensados (caso tenham descondensado na telófase I), desaparece a membrana nuclear e o fuso acromático é formado. Na metafase II, os cromossomos ficam dispostos com os centrômeros no plano "equatorial" e com as cromátides voltadas cada uma para seu polo, ligadas às fibras do fuso. Na anáfase II, os centrômeros se duplicam, separando as duas cromátides. Na telófase II, os cromossomos descondensam-se e forma-se de novo um núcleo, formando quatro células haploides. Na citocinese, formam-se quatro células-filhas haploides, contendo cada uma apenas um

cromossomo de cada par de homólogos.

### 3.1.5.2 Mitose

É o processo de divisão celular que permite a distribuição dos cromossomos e dos constituintes citoplasmáticos da célula-mãe igualmente entre as duas células-filhas. A mitose possui as seguintes etapas (Figura 3.7):

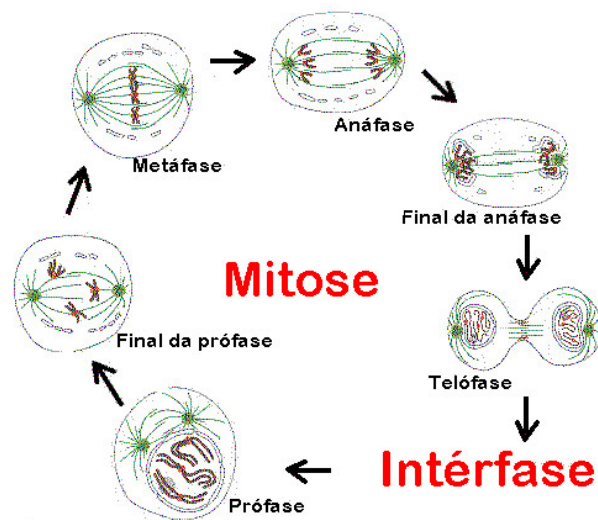


Figura 3.7: Fases da mitose (LODISH et al., 2000): (1) prófase; (2) metáfase; (3) anáfase e (4) telófase.

Na prófase, o nucléolo e a carioteca desaparecem gradativamente, a cromatina se condensa para virar cromossomos, os centríolos migram para polos opostos da célula e o aparelho mitótico é formado. Na metáfase, ocorre a formação da placa equatorial e os cromossomos estão bem individualizados e fortemente condensados. Na anáfase, ocorre a divisão longitudinal do centrômero, os cromossomos-filhos migram para os polos opostos da célula, orientados pelas fibras dos fusos. Na telófase, ocorre o desaparecimento das fibras do fuso, surgimento da carioteca e do nucléolo, descondensação dos cromossomos, fim da cariocinese e início da citocinese.

### 3.1.6 CICLO CELULAR

O conjunto de fenômenos que regem o ciclo de crescimento e divisão das células é conhecido como sistema de controle do ciclo celular. Esse sistema de controle é altamente conservado em organismos eucarióticos e crucial para a saúde do organismo. Anomalias em seu funcionamento têm comumente uma consequência dramática: o câncer (entre

outras doenças).

A divisão celular normalmente começa com a duplicação do conteúdo da célula, seguida da distribuição deste conteúdo para duas células-filhas. O ciclo celular é dividido em 4 fases: S (síntese), M (mitose), G1 (*gap 1*) e G2 (*gap 2*). A duplicação dos cromossomos ocorre durante a fase S do ciclo celular, enquanto que a maioria dos outros componentes celulares é duplicada continuamente ao longo do ciclo. Durante a fase M, os cromossomos replicados são segregados em núcleos individuais (mitose) e a célula é então dividida em duas (citocinese). A fase S e a fase M geralmente são separadas por fases de intervalo chamadas G1 e G2; quando vários sinais intracelulares e extracelulares regulam a progressão do ciclo celular. A fase G1 está entre a fase M e a fase S e a fase G2 entre a fase S e a mitose. As fases G1, S e G2 são em conjunto chamadas de interfase. As duas fases de intervalo, G1 e G2, dão tempo para que a célula monitore o ambiente interno e externo a fim de se assegurar de que as condições são adequadas e os preparativos estejam completos antes que a célula se comprometa com as principais transformações da fase S e da mitose. A fase G1 é especialmente importante; sua duração pode variar imensamente, dependendo das condições internas e dos sinais extracelulares de outras células. Se as condições intra ou extracelulares são desfavoráveis, as células retardam a progressão à fase G1 e podem entrar em um estado de repouso conhecido como G0 (LODISH et al., 2000). Neste estado, as células podem permanecer por dias, semanas ou anos antes que a proliferação seja retomada ou até que elas ou o organismo morram. Se as condições são favoráveis e os sinais para crescer e se dividir estão presentes, as células no início de G1 ou G0 avançam até um ponto de comprometimento próximo ao fim de G1 conhecido como Início ou ponto de restrição.

A função básica do ciclo celular é duplicar, de forma exata, a imensa quantidade de DNA nos cromossomos e então segregar com precisão as cópias em duas células-filhas geneticamente idênticas. Esses processos definem as duas principais fases do ciclo celular. A duplicação dos cromossomos ocorre durante a fase S (S de síntese de DNA), que ocupa cerca de metade do tempo do ciclo celular de uma célula típica de mamífero. Após a fase S, a segregação dos cromossomos e a divisão celular ocorrem na fase M (M de mitose), que requer muito menos tempo (menos de uma hora em uma célula de mamífero). A fase M compreende dois eventos principais: a divisão nuclear, ou mitose, durante a qual os cromossomos copiados são distribuídos em um par de núcleos-filhos; e a divisão

citoplasmática, ou citocinese, quando a própria célula se divide em duas.

Na fase G1, é um período de intensa atividade bioquímica, no qual a célula cresce em volume e o número de organelos aumenta e ocorre a síntese de RNA no sentido de a célula sintetizar (fabricar) proteínas, lípidos e glícidos. A fase S, é caracterizada pela replicação do DNA, onde as novas moléculas de DNA associam-se às proteínas básicas chamadas histonas, formando os cromossomos, constituídos por duas cromátides ligadas pelo centrômero. Na fase G2, ocorre a síntese de mais proteínas e a produção de estruturas membranares que serão utilizadas nas células-filhas resultantes da mitose. Na fase M, onde uma célula se divide em duas células-filhas, podem ser considerada 2 processos consecutivos: a Mitose propriamente dita ou a Cariocinese (divisão do núcleo) e a Citocinese (divisão do citoplasma).

O sistema de controle do ciclo celular opera como um cronômetro rigidamente programado que propicia uma quantidade fixa de tempo para a conclusão de cada evento do ciclo celular. O sistema de controle, nessas células, é independente dos eventos que controla, de forma que seus mecanismos de sincronização continuam a operar mesmo que aqueles eventos falhem. Contudo, na maioria das células, o sistema de controle não responde a informações recebidas dos processos que controla. Sensores, por exemplo, detectam a conclusão da síntese de DNA, e se alguma falha ou algum mau funcionamento impede a conclusão bem-sucedida desse processo, são enviados sinais para que o sistema de controle retarde a progressão à fase M. Tais atrasos garantem tempo para que a maquinaria seja reparada e também impedem a tragédia que poderia resultar se o ciclo celular progredisse prematuramente ao próximo estágio - segregando cromossomos incompletamente replicados, por exemplo.

Uma variedade de produtos de gene, tais como os membros da família E2F de fatores de transcrição, podem interagir e modular as atividades dos complexos de ciclina-Cdk. Estudos tem demonstrado a importância dos fatores de transcrição E2F e outras moléculas reguladoras do ciclo celular no controle do crescimento de células *in vitro* e *in vivo* (LI; BROOKS, 1999).

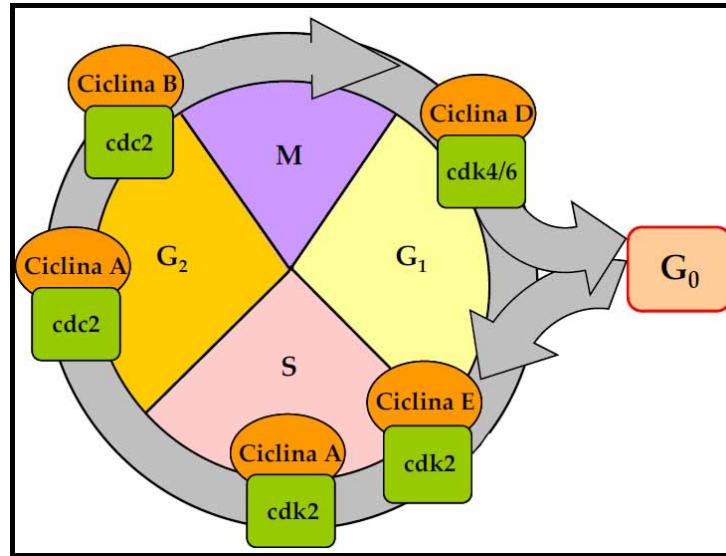


Figura 3.8: Fases do ciclo celular (LODISH et al., 2000).

A passagem de uma fase para outra é controlada por fatores de regulação (de modo geral proteicos) que atuam nos chamados pontos de checagem do ciclo celular. Dentre essas proteínas, se destacam as ciclinas, que controlam a passagem da fase G<sub>1</sub> para a fase S e da G<sub>2</sub> para a mitose (LI; BROOKS, 1999). Como mostra a Figura 3.8.

## 3.2 REAÇÕES BIOQUÍMICAS

Células podem fazer coisas maravilhosas. Individualmente elas podem mover-se, contrair-se, excretar, reproduzir-se, sinalizar ou responder a sinais e podem executar as transações energéticas necessárias para essas atividades. Coletivamente elas realizam todas as numerosas funções necessárias para qualquer organismo sustentar a vida. Ainda assim, tudo que as células fazem pode ser descrito com grupo básico de leis naturais. O fascínio com as células é que apesar das regras de comportamento serem relativamente simples, elas são aplicadas a uma enorme e complexa rede de produtos e substratos conectados por reações bioquímicas. Um esforço de décadas tem sido realizado apenas para revelar poucos esquemas de reações e ainda existem muitos mistérios para serem descobertos.

### 3.2.1 A LEI DE AÇÃO DAS MASSAS

A "lei" fundamental das reações químicas é a Lei de Ação das Massas. Essa "lei" descreve a velocidade em que químicos, grandes macromoléculas ou simples íons, colidem e interagem para formar diferentes combinações químicas. Suponha que duas espécies químicas, por

exemplo A e B, reagem através de uma colisão entre eles para formar o produto C,



A velocidade desta reação é a velocidade de acumulação do produto  $\frac{d[C]}{dt}$ . Esta velocidade é o produto do número de colisões por unidade de tempo entre os dois reagentes e a probabilidade de que a colisão seja suficientemente energética para superar a energia de ativação livre da reação. O número de colisões por unidade de tempo é assumidamente proporcional ao produto das concentrações de A e B com um fator de proporcionalidade que depende da forma geométrica, do tamanho das moléculas reagentes e da temperatura da mistura. Combinando estes fatores temos

$$\frac{d[C]}{dt} = k[A][B] \quad (3.2)$$

A identificação da Equação 3.2 com a Reação 3.1 é chamada de lei de ação das massas, e a constante k é chamada de constante de velocidade para a reação. Contudo, a lei de ação das massas não é uma lei no sentido de ser inviolável, está mais como um modelo muito útil, muito semelhante a lei de Ohm ou as leis de Newton para o resfriamento. Como um modelo, existem situações onde ele não é válido. Por exemplo, em altas concentrações, dobrar a concentração de um reagente não necessariamente dobra a velocidade da reação, e em concentrações extremamente baixas, pode não ser apropriado representar concentrações como uma variável contínua.

Enquanto é comum escrever reações como acontecendo em somente uma direção, com a maioria das reações Bioquímicas, reações reversas também acontecem, de forma que o esquema da reação para A, B e C deveria ter sido escrito como



Com  $k_+$  e  $k_-$  denotando a constante velocidade direta e reversa, respectivamente. Se a reação reversa é lenta comparada a reação direta, ela é geralmente ignorada, e somente a direção principal é mostrada. Como a quantidade de A é consumida pela reação direta e produzida pela reação reversa, a velocidade em que [A] muda para esta reação bidirecional



é

$$\frac{d[A]}{dt} = k_-[C] - k_+[A][B] \quad (3.4)$$

No equilíbrio, as concentrações não estão mudando, então  $[C]_{eq} = \frac{k_+}{k_-}[A]_{eq}[B]_{eq}$ . Se não existirem outras reações envolvendo A e C então  $[A] + [C] = A_0$  é constante, e

$$[C] = A_0 \frac{[B]}{K_{eq} + [B]} \quad (3.5)$$

o número  $K_{eq} = \frac{k_+}{k_-}$  é chamado de constante de equilíbrio e é relacionada a preferência relativa dos químicos em ficar no estado combinado C comparado ao estado desassociado. A constante de equilíbrio tem unidade de concentração. Se  $K_{eq}$  é pequeno, então existe uma grande afinidade entre A e B. Note da Equação 3.5 que quando  $[B] = [K_{eq}]$  metade de A está no estado combinado.

Infelizmente, a lei de ação das massas não pode ser usada em todas as situações porque nem todas os mecanismos das reações químicas são conhecidos com detalhes suficientes. De fato, um vasto número de reações químicas não podem ser descritas pela cinética de ação das massas. Estas reações que seguem a cinética de ação das massas são chamadas de reações elementares porque presumidamente eles são originadas diretamente da colisão entre os reagentes. Reações que não seguem a lei de ação das massas geralmente provêm de um mecanismo complexo consistindo de dois ou mais passos elementares. Este é comumente o caso das reações bioquímicas em que os esquemas das reações elementares não são conhecidos ou são muito complicados para serem escritos.

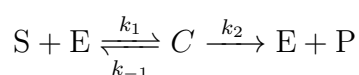
### 3.2.2 CINÉTICA DAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Para verificar de onde os esquemas das reações mais complicadas vem, considere uma reação que é catalisada por uma enzima. Enzimas (proteínas) são catalisadoras que ajudam a converter outras moléculas, chamadas substratos, em produtos, mas elas mesmas não são afetadas pela reação. Suas características mais importantes são poder catalítico, especificidade e regulação. Enzimas aceleram a conversão do substrato em produto por diminuir a energia livre de ativação da reação. Por exemplo, enzimas podem ajudar a superar a repulsão de carga, permitindo que as moléculas reagentes entrem em contato para a formação das novas ligações químicas. Ou, se a reação requer a quebra de uma ligação

existente, a enzima pode exercer um estresse sobre a molécula substrato, tornando uma ligação particular mais instável. Enzimas são particularmente eficientes na aceleração de reações biológicas, dando aumentos na velocidade da ordem de dez milhões de vezes ou mais. Elas são também altamente específicas, geralmente catalisando a reação de um único substrato em particular ou de substratos intimamente relacionados. Finalmente, elas são tipicamente reguladas por um enorme e complicado conjunto de sistemas de *feedbacks* positivos e negativos, que então permite um controle preciso sobre a velocidade da reação (NELSON et al., 2008). Serão apresentados alguns modelos mais simples.

Uma das primeiras coisas para saber sobre reações enzimáticas é que elas não seguem a Lei de Ação das Massas diretamente. Pois conforme a concentração do substrato (**S**) aumenta, a velocidade da reação aumenta somente até um certo ponto, atingindo a velocidade máxima da reação em altas concentrações de substratos. Isto está em contraste com a Lei de Ação das Massas, que quando aplicada diretamente sobre a reação de **S** com a enzima **E** prediz que a velocidade da reação aumenta linearmente conforme **S** aumenta.

Um modelo para explicar o desvio da lei ação das massas foi primeiramente proposto por Michaelis e Menten (1913). Em seu esquema de reação, a enzima E converte o substrato S no produto P através de um processo de dois passos. Primeiro, E se combina com S formando o complexo C que então se quebra no produto P liberando E no processo para catalisar novamente a reação. O esquema da reação está representado por



É importante notar que, apesar disto aparentemente implicar que P não pode se combinar com E para formar o complexo, este não é o caso. De fato, quase todas as enzimas aumentam a velocidade de reação em ambas as direções. Contudo, tipicamente as velocidades das reações são medidas em condições onde P é removido continuamente, o que efetivamente previne a reação reversa de acontecer. Logo, para determinar os parâmetros cinéticos ( $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$ ) a partir de dados experimentais é suficiente assumir que nenhuma reação reversa acontece. No entanto, é preciso lembrar que este não é o caso em uma célula, logo as expressões derivadas para a velocidade somente podem ser aplicadas com grande cuidado na fisiologia de células intactas. Tendo dito isto, estas complexidades serão ignoradas no restante deste trabalho.

Existem duas maneiras semelhantes para analisar esta equação; a aproximação do equilíbrio e a aproximação de estado quase estacionário. Como estes métodos tem resultados similares é fácil confundir-los, então vale a pena entender suas diferenças.

Para tal, primeiro defini-se  $s = [S]$ ,  $c = [C]$ ,  $e = [E]$  e  $p = [P]$ . A lei de ação das massas aplicada a esta reação produz quatro equações diferenciais para as taxas de variação de  $s$ ,  $c$ ,  $e$  e  $p$  como visto abaixo

$$\frac{ds}{dt} = k_{-1}c - k_1se \quad (3.6)$$

$$\frac{dc}{dt} = (k_{-1} + k_2)c - k_1se \quad (3.7)$$

$$\frac{de}{dt} = k_1se - (k_2 + k_{-1})c \quad (3.8)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_2c \quad (3.9)$$

Note que  $p$  pode ser encontrado por integração direta e existe uma quantidade conservada pois  $\frac{de}{dt} + \frac{dc}{dt} = 0$ , de modo que  $e + c = e_0$ , onde  $e_0$  é o total de enzimas disponível.

### 3.2.2.1 A aproximação do equilíbrio

Em seu trabalho original Michaelis e Menten (1913) assumiram que o substrato está em equilíbrio instantâneo com o complexo  $\frac{ds}{dt} = 0$ , logo

$$k_1se = k_{-1}c \quad (3.10)$$

e como  $e + c = e_0$ , logo nota-se que

$$c = \frac{e_0s}{K_s + s} \quad (3.11)$$

onde  $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$ . Consequentemente, a velocidade  $V$  da reação (Equação 3.9), ou a taxa em que o produto é formado é dado por

$$V = \frac{dp}{dt} = k_2c = \frac{k_2e_0s}{K_s + s} = \frac{V_{max}s}{K_s + s} \quad (3.12)$$

onde  $V_{max} = k_2e_0$  é a velocidade máxima da reação, obtida quando toda enzima está associada com o substrato.

Em concentrações pequenas de substrato, a velocidade da reação é linear, com velocidade proporcional a quantidade de enzima disponível  $e_0$ . Por outro lado, em altas concentrações a velocidade da reação satura para  $V_{max}$ , de forma que a velocidade máxima da reação é limitada pela quantidade de enzima presente e pela constante de desassociação  $k_2$ . Por essa razão, a reação de desassociação  $C \xrightarrow{k_2} P + E$  é conhecida por limitar a velocidade desta reação. Quando  $s = K_s$ , a velocidade da reação é exatamente a metade da máxima.

É importante notar que (3.10) pode não estar exatamente correta o tempo todo; se estivesse então de acordo com (3.6) o substrato não seria usado e o produto não seria gerado. Isto mostra que de fato (3.10) é uma aproximação. Também ilustra a necessidade por uma forma sistemática de propor aproximações, de modo que se tenha uma ideia da magnitude e da natureza dos erros introduzidos ao fazer a aproximação.

### 3.2.2.2 Aproximação de estado quase estacionário

Uma análise alternativa das reações enzimáticas foi proposta por Briggs e Haldane (1925), e esta análise é agora a base para a maioria dos trabalhos atuais sobre reações enzimáticas. Este trabalho assumiu que as taxas de formação e destruição do complexo são essencialmente iguais durante todo o tempo (exceto talvez no início da reação, enquanto os primeiros complexos estão sendo formados). Logo,  $\frac{dc}{dt}$  deve ser aproximadamente zero. Com esta aproximação, é relativamente simples determinar a velocidade da reação. Para dar a esta aproximação uma base matemática sistemática, será útil introduzir variáveis adimensionais

$$\sigma = \frac{s}{s_0}, x = \frac{c}{e_0}, \tau = k_1 e_0 t, k = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 s_0}, \varepsilon = \frac{e_0}{s_0}, \alpha = \frac{k_{-1}}{k_1 s_0} \quad (3.13)$$

que serão usadas para obter o sistema de duas equações diferenciais

$$\frac{d\sigma}{d\tau} = -\sigma + x(\sigma + \alpha) \quad (3.14)$$

$$\varepsilon \frac{dx}{d\tau} = \sigma - x(\sigma + k) \quad (3.15)$$

Existe geralmente uma variedade de maneiras em que um sistema de equações diferenciais pode ser adimensionalizado. Esta não unicidade é normalmente uma fonte de grande

confusão, como nem sempre é obvio qual escolha de variáveis e parâmetros adimensionais é a melhor. A notável eficácia das enzimas como catalisadoras de reações bioquímicas está refletida pela pequena concentração necessária comparada a concentração dos substratos. Para este modelo, isso significa que  $\varepsilon$  é pequeno, tipicamente no intervalo de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ . Portanto a reação (3.15) é rápida, e se equilibra rapidamente permanecendo quase em equilíbrio mesmo enquanto a variável  $\sigma$  varia. Logo, é valido tomar a aproximação de estado quase estacionário  $\varepsilon \frac{dx}{d\tau} = 0$ . Note que isso não é o mesmo que tomar  $\frac{dx}{d\tau} = 0$ . Contudo devido a diferença na escala de  $x$  e  $c$  é equivalente a  $\frac{dc}{dt} = 0$  como sugerido no parágrafo introdutório. A aproximação de estado quase estacionário significa que a variável  $x$  está mudando enquanto restrita a algumas variações através da restrição adicionada ao igualar o lado direito de (3.15) à zero. Esta suposição é valida dado que  $\varepsilon$  é pequeno e  $\frac{dx}{d\tau}$  é da ordem de 1.

Segue da aproximação de estado quase estacionário que

$$x = \frac{\sigma}{\sigma + k} \quad (3.16)$$

$$\frac{d\sigma}{d\tau} = -\frac{q\sigma}{\sigma + k} \quad (3.17)$$

onde  $q = k - \alpha = \frac{k_2}{k_1 s_0}$ . A Equação 3.17 descreve a velocidade de absorção do substrato e é chamada lei de Michaelis-Menten. Nos termos das variáveis originais, esta lei é

$$V = \frac{dp}{dt} = -\frac{ds}{dt} = \frac{k_2 e_0 s}{s + K_m} = \frac{V_{max} s}{s + K_m} \quad (3.18)$$

onde  $K_m = \frac{k_1 + k_2}{k_1}$ . No estado quase estacionário, a concentração do complexo  $c$  satisfaz

$$c = \frac{e_0 s}{s + K_m} \quad (3.19)$$

Note a semelhança entre (3.12) e (3.19), a única diferença sendo que a aproximação de equilíbrio usa  $K_s$ , enquanto que a aproximação de estado quase estacionário usa  $K_m$ . Apesar desta semelhança na forma, é importante lembrar que os dois resultados são baseados em diferentes aproximações.

Como a lei de ação das massas, a lei de Michaelis-Menten (3.19) não é universalmente aplicável mas é uma aproximação útil. Ela pode ser aplicável mesmo se  $\varepsilon = \frac{e_0}{s_0}$  não for pequeno, na construção de modelos geralmente é usado sem se importar com pressupostos.

Enquanto que as constantes individuais são difíceis de medir experimentalmente, a razão  $K_m$  é relativamente simples de se medir pois (3.19) pode ser escrita na forma

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S} \quad (3.20)$$

Em outras palavras,  $\frac{1}{V}$  é uma função linear de  $\frac{1}{S}$ . Gráficos desta curva duplamente recíproca são chamados de gráficos de Lineweaver-Burk e a partir destes gráficos (determinados experimentalmente),  $V_{max}$  e  $K_m$  podem ser encontrados.

A Figura 3.9 mostra, como exemplo, o gráfico da cinética de Michaelis-Menten para alguns valores de  $K_m$  e com  $V_{max} = 1$ .

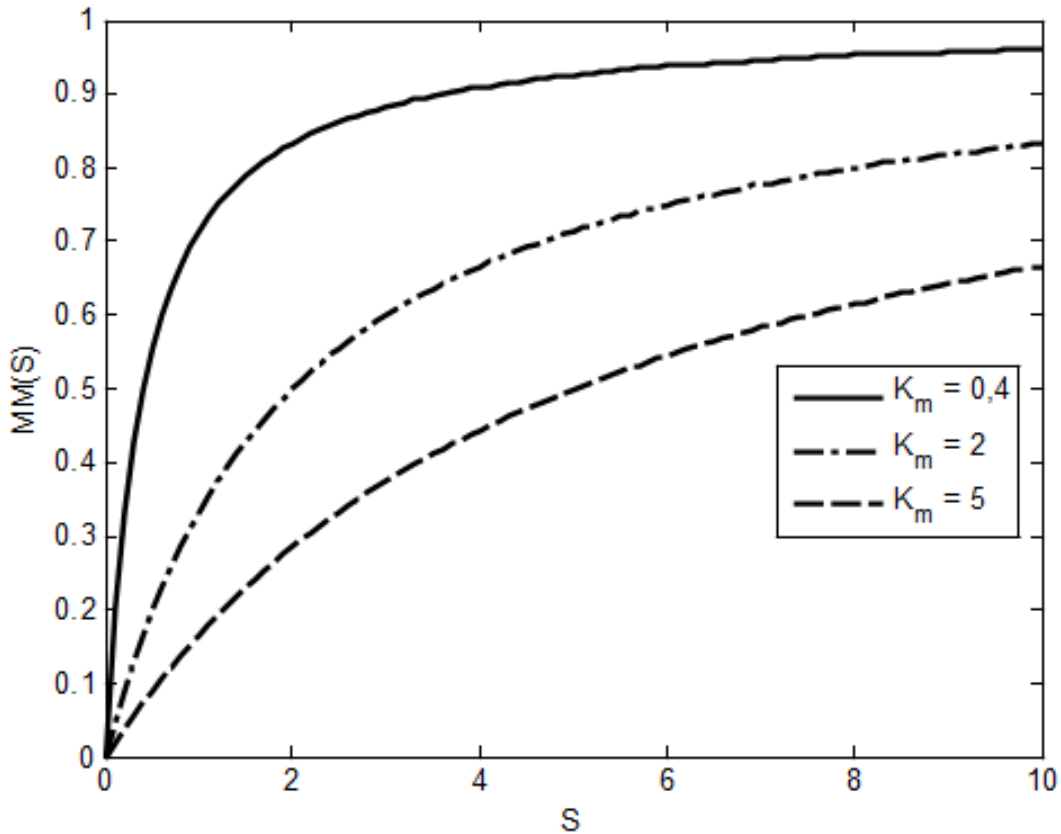


Figura 3.9: Cinética de Michaelis-Menten para diferentes valores de  $K_m$  (Equação 3.20).  $V_{max} = 1$ .  $K_m$  equivale a quantidade do substrato  $S$  que dá uma velocidade igual 0.5 de  $V_{max}$ .

Apesar do gráfico de Lineweaver-Burk tornar fácil determinar  $V_{max}$  e  $K_m$  a partir das velocidades de reação medidas, não é simples determinar a velocidade da reação em função da concentração do substrato durante o curso de um único experimento. A concentração geralmente não podem ser medidas com precisão suficiente ou com resolução temporal que

permite o cálculo de uma derivada confiável. Na prática, como é mais facilmente medida, a velocidade inicial da reação é determinada para um intervalo de diferentes concentrações de substrato.

Um método alternativo para determinar  $K_m$  e  $V_{max}$  a partir dos dados experimentais é o gráfico linear direto (EISENTHAL; CORNISH-BOWDEN, 1974). Primeiro escreve-se (3.19) da seguinte forma

$$V_{max} = V + \frac{V}{s} K_m \quad (3.21)$$

Então,  $V_{max}$  e  $K_m$  são tratadas como variáveis para cada medida experimental de  $V$  e  $s$ . (Lembre-se que tipicamente somente a concentração do substrato inicial e sua velocidade inicial são usadas.) Então o gráfico de uma linha de  $V_{max}$  contra  $K_m$  pode ser feito. Repetindo isso para um número de diferentes concentrações e velocidades iniciais para o substrato da uma família de linhas retas, em um ambiente ideal, livre de erros experimentais, elas se interceptam em único ponto. É claro que na realidade erros experimentais impedem uma interseção exata, mas  $V_{max}$  e  $K_m$  podem ser estimados a partir da mediana das interseções.

Agora com o conhecimento sobre as reações bioquímicas, os sistemas bioquímicos podem ser modelados através de sistemas de EDOs. Isto é de grande utilidade permitindo a modelagem de processos celulares como a divisão celular através de um conjunto de equações diferenciais ordinárias.

### 3.2.2.3 Cinética de Goldbeter-Koshland

A cinética de Goldbeter-Koshland descreve uma solução de estado estacionário para um sistema biológico de dois estados. Neste sistema, a interconversão entre estes dois estados é feita por duas enzimas com efeitos opostos. Um exemplo seria a proteína  $Z$  que existe na forma fosforilada  $ZP$  e na forma desfosforilada  $Z$ ; a correspondentes quinase  $Y$  e fosfatase  $X$  interconvertem as duas formas. Neste caso, o interesse é na concentração de equilíbrio da proteína  $Z$  (a cinética de Goldbeter-Koshland somente descreve as propriedades de equilíbrio, logo nenhuma dinâmica pode ser modelada). Esta cinética tem muitas aplicações na descrição de sistemas biológicos (GOLDBETER; KOSHLAND, 1981).

A cinética de Goldbeter–Koshland é descrita pela função de Goldbeter–Koshland:

$$z = \frac{[Z]}{[Z]_0} = G(v_1, v_2, J_1, J_2) = \frac{2v_1J_2}{B + \sqrt{B^2 - 4(v_2 - v_1)v_1J_2}} \quad (3.22)$$

com as constantes

$$v_1 = k_1[X]; v_2 = k_2[Y]; J_1 = \frac{K_{M1}}{[Z]_0}; J_2 = \frac{K_{M2}}{[Z]_0}; B = v_2 - v_1 + J_1v_2 + J_2v_1 \quad (3.23)$$

A Figura 3.10 ilustra as reações que ocorrem na cinética de Goldbeter–Koshland.

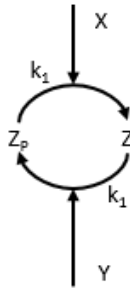


Figura 3.10: Esquema para as reações bioquímicas que ocorrem na cinética de Goldbeter–Koshland.

Graficamente (Figura 3.11) a função toma valores entre 0 e 1 e tem um comportamento sigmoide. Quanto menor os parâmetros  $J_1$  e  $J_2$  mais inclinada é transição entre 0 e 1 e o comportamento se torna mais semelhante ao comportamento de uma chave. A cinética de Goldbeter–Koshland é um exemplo de ultra sensibilidade.

**Derivação** A taxa de variação de variação de  $[Z]$  é dada por:

$$\frac{d[Z]}{dt} = r_1 - r_2$$

Como as propriedades estão sendo observadas no equilíbrio vale a seguinte equação:

$$\frac{d[Z]}{dt} = 0$$

Usando-se a cinética de Michaelis–Menten, a taxa com que  $[ZP]$  é desfosforilado é  $r_1 =$



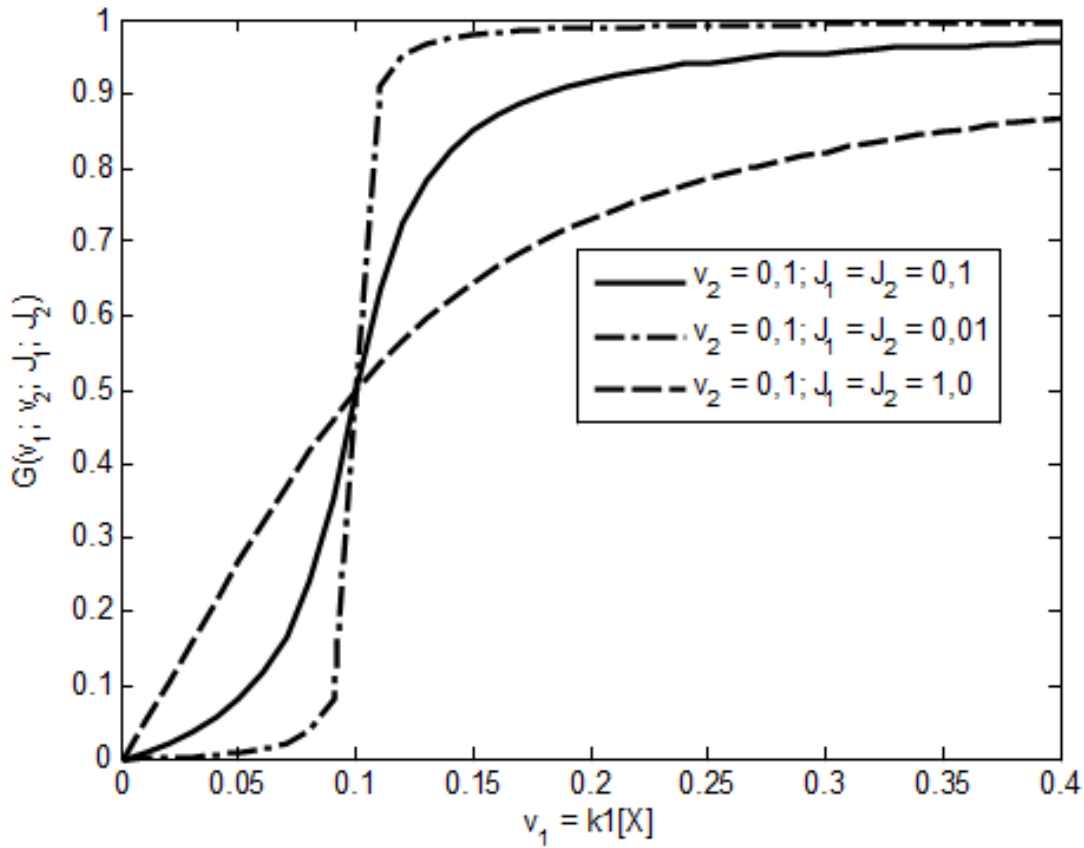


Figura 3.11: Cinética de Goldbeter–Koshland para diferentes valores de  $J_1$  e  $J_2$  (Equação 3.22). A forma sigmoide confere a esta cinética uma natureza de liga-desliga em função do sinal  $X$ . Percebe-se que esta função tem um comportamento muito parecido com a função de Hill (Figura 3.12, Equação 3.26).

$\frac{k_1[X][Z_P]}{K_{M1}+[Z_P]}$  e a taxa com que  $[Z]$  é fosforilado é  $r_2 = \frac{k_2[Y][Z]}{K_{M2}+[Z]}$ .



Aqui  $K_M$  representa a constante de Michaelis–Menten que descreve o quão bem as enzimas  $X$  e  $Y$  se ligam e catalisam a conversão enquanto que os parâmetros cinéticos  $k_1$  e  $k_2$  denotam a taxa constante para as reações catalisadas. Assumindo que a concentração total de  $Z$  é constante, pode-se escrever também que  $[Z]_0 = [Z_P] + [Z]$  e então:

$$\frac{d[Z]}{dt} = r_1 - r_2 = \frac{k_1[X]([Z]_0 - [Z])}{K_{M1} + ([Z]_0 - [Z])} - \frac{k_2[Y][Z]}{K_{M2} + [Z]} = 0$$

$$\frac{k_1[X]([Z]_0 - [Z])}{K_{M1} + ([Z]_0 - [Z])} = \frac{k_2[Y][Z]}{K_{M2} + [Z]}$$

$$\frac{k_1[X](1 - \frac{[Z]}{[Z]_0})}{\frac{K_{M1}}{[Z]_0} + (1 - \frac{[Z]}{[Z]_0})} = \frac{k_2[Y] \frac{[Z]}{[Z]_0}}{\frac{K_{M2}}{[Z]_0} + \frac{[Z]}{[Z]_0}}$$

$$\frac{v_1(1 - z)}{J_1 + (1 - z)} = \frac{v_2z}{J_2 + z} \quad (3.25)$$

Com as mesmas constantes definidas na Equação (3.23). Se então a Equação Quadrática (3.25) for resolvida para  $z$ , a solução vista na Equação (3.22) é obtida.

A Equação para  $\frac{d[Z]}{dt}$  é usada para modelar a dinâmica do ciclo celular, ver no capítulo 4 as equações 4.2 e 4.4 na página 59.

### 3.2.2.4 Equação de Hill

Em bioquímica e farmacologia, a ligação de um composto a uma macromolécula é frequentemente melhorada se já existirem outros compostos ligados a mesma macromolécula (isto é conhecido como ligação cooperativa). O coeficiente de Hill é uma forma de quantificar este efeito.

Ele descreve a fração da macromolécula saturada pelo composto ligante como uma função da concentração do mesmo. É usado para determinar a grau de cooperação do composto ligante ligado à enzima ou ao receptor. Foi originalmente formulado por Hill (1910) para descrever a curva sigmoide de ligação do  $O_2$  à hemoglobina.

Um coeficiente de 1 indica uma ligação completamente independente, não importando quantos compostos adicionais já estão ligados. Números maiores que 1 indicam cooperação positiva, enquanto que números menores que 1 indicam cooperatividade negativa. O coeficiente de Hill da ligação do oxigênio à hemoglobina está entre 2.3 – 3.0.

A equação de Hill é dada pela seguinte fórmula:

$$\theta = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} = \frac{[L]^n}{(K_a)^n + [L]^n} = \frac{1}{(\frac{K_a}{[L]})^n + 1} \quad (3.26)$$

onde  $\theta$  é a fração da macromolécula receptora que está ocupada pelo composto  $L$ ,  $[L]$  é a concentração do composto  $L$  livre,  $K_d$  constante de desassociação aparente derivada da lei de ação das massas (constante de equilíbrio para desassociação),  $K_A$  concentração de  $L$  que ocupa metade da capacidade de ligação da macromolécula (constante de desassociação microscópica) e  $n$  é o coeficiente de Hill que descreve a cooperatividade (ou outras propriedades bioquímicas, de acordo com o contexto em que a equação de Hill está

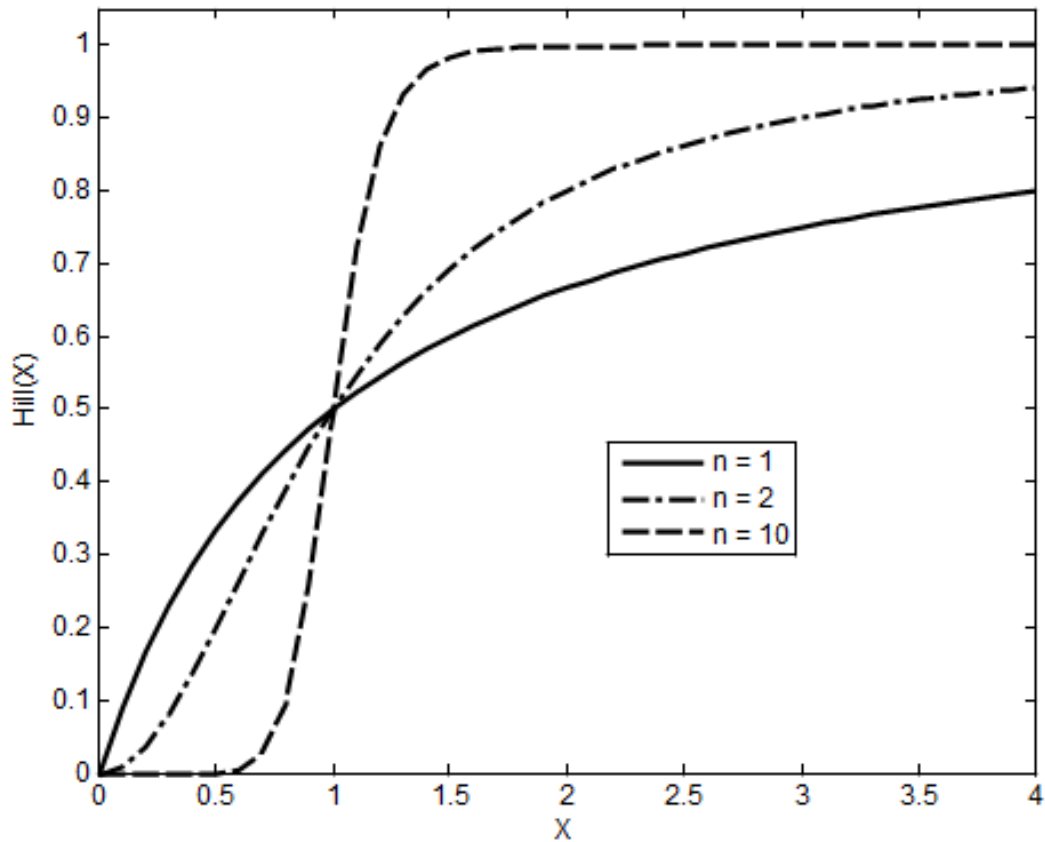


Figura 3.12: Cinética de Hill para diferentes valores do coeficiente de Hill:  $n$  (Equação 3.26). A forma sigmoide confere a esta cinética uma natureza de liga-desliga em função do sinal  $X$ . O comportamento dessa função é semelhante a cinética de Goldbeter–Koshland.  $K_a = 1$ . Quando  $n = 1$ , o comportamento dessa função é igual ao da cinética de Michaelis-Menten

sendo usada). A Figura 3.12 apresenta os gráficos para diferentes valores de  $n$  de forma a ilustrar seu efeito.

A equação de Hill está relacionada com a função logística, sendo de alguma forma uma transformação logarítmica dela, pois quando plotada em escala logarítmica ela é idêntica a função logística (NELSON et al., 2008) .

### 3.3 ANÁLISE DE SISTEMA DINÂMICOS

Como os modelos bioquímicos podem ser reduzidos a um conjunto de equações diferenciais ordinárias, saber analisar as características principais destes sistemas, como pontos de estabilidade, ciclos limite e bifurcações, é fundamental. Assim esta seção busca dar a base matemática necessária para as análises feitas na seção 4.3.

### 3.3.1 ESTABILIDADE DE SISTEMAS NÃO-LINEARES

A grande maioria dos sistemas de EDOs não podem ser resolvidos analiticamente, assim é importante buscar meios de extrair informações qualitativas a partir das equações sem resolvê-las realmente. Para isso, uma importante fonte de informações são os pontos críticos ou de equilíbrio do sistema, ou seja, pontos onde a solução para o sistema de EDOs é uma constante. Contudo, esta análise é limitada ao caso de sistemas lineares. Desta forma em sistemas não lineares uma aproximação linear para o sistema de EDOs é feita, e partir dos resultados da análise desta aproximação é que se verifica o comportamento do sistema nas proximidades do ponto de equilíbrio (ZILL; CULLEN, 2001).

São de grande importância prática, pois geralmente indicam tendências do sistema à medida que o tempo passa. Por exemplo, indica o valor em que uma população irá se estabilizar. Além disto, mesmo em sistemas que não tendem a estabilidade, informações podem ser extraídas destes pontos. Por exemplo, os ciclos limites estão relacionados a eles, de forma que no interior de cada ciclo limite existe um ponto de equilíbrio.

### 3.3.2 LINEARIZAÇÃO DE SISTEMAS

As técnicas de linearização de um sistema não-linear em torno de um ponto de operação permitem que o sistema linear resultante seja analisado com base nas ferramentas já consolidadas de análise válidas para o caso linear.

Como a linearização é uma aproximação em torno de um ponto, ela só pode levar à predição do comportamento do sistema na vizinhança deste ponto. Nenhum outro comportamento não-local, muito menos global do sistema em todo espaço de operação, podem ser preditos pelo modelo linearizado.

Raramente é possível determinar a estabilidade de um ponto crítico de um sistema não-linear por meio de soluções explícitas. Em vez disso, substitui-se o termo  $\mathbf{X}' = \mathbf{g}(\mathbf{X})$  por um termo linear  $\mathbf{A}(\mathbf{X} - X_I)$  que melhor aproxime  $\mathbf{g}(\mathbf{X})$  em uma vizinhança  $X_I$ , onde

$$A = \begin{pmatrix} \frac{\partial E q_1}{\partial X_1} & \dots & \frac{\partial E q_1}{\partial X_n} \\ \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \dots & \cdot \\ \frac{\partial E q_n}{\partial X_1} & \dots & \frac{\partial E q_n}{\partial X_n} \end{pmatrix} \quad (3.27)$$

A matriz  $A$  é chamada de matriz jacobiana em  $X_I$  e se denota por  $\mathbf{g}'(X_I)$ . Fazendo  $\mathbf{H} = \mathbf{X} - X_I$ , o sistema linear  $\mathbf{X}' = \mathbf{A}(\mathbf{X} - X_I)$  é escrito como  $\mathbf{H}' = \mathbf{A}\mathbf{H}$ , que é a forma do sistema linear. O ponto  $\mathbf{X} = X_I$  para  $\mathbf{X}' = \mathbf{A}(\mathbf{X} - X_I)$  corresponde agora ao ponto crítico  $\mathbf{H} = \mathbf{0}$  para  $\mathbf{H}' = \mathbf{A}\mathbf{H}$  (ZILL; CULLEN, 2001).

### 3.3.3 TIPOS DE PONTOS DE EQUILÍBRIO

Os pontos de equilíbrio podem ser classificados pelo sinal dos autovalores da linearização das equações nas proximidades do ponto. Isto é, ao computar a matriz Jacobiana em cada um dos pontos de equilíbrio do sistema e encontrar os autovalores associados, o ponto de equilíbrio pode ser finalmente ser categorizado. Assim, o comportamento do sistema na vizinhança de cada ponto de equilíbrio pode ser determinado qualitativamente, ao encontrar os autovetores associados a cada autovalor.

Um ponto de equilíbrio é hiperbólico se nenhum dos seus autovalores tem parte real nula. Se todos os autovalores tem parte real negativa, o ponto de equilíbrio é estável. Se ao menos um tem parte real positiva, o ponto tem equilíbrio instável. Se ao menos um autovalor é positivo e um é negativo, o ponto é um ponto de sela. Caso ao menos um par de autovalores apresente parte complexa não nula a convergência ou divergência, a depender do sinal da parte real, se dará através de uma espiral (ZILL; CULLEN, 2001).

### 3.3.4 CICLO LIMITE

Na matemática, no estudo de sistemas dinâmicos com espaço de fase bidimensional, um ciclo limite é uma trajetória fechada no espaço de fase que tem ao menos uma outra trajetória que espirala em sua direção quando o tempo se aproxima do infinito. Tal comportamento é exibido em alguns sistemas não lineares. Ciclos limites tem sido usado para modelar o comportamento de uma variedade de sistemas oscilatórios reais (HUREWICZ, 1964).

**Definição 1.** *Considere um sistema dinâmico da forma*

$$x'(t) = V(x(t))$$

onde

$$V : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}^2$$

*é uma função suave. A trajetória deste sistema é uma função suave  $x(t)$  com valores em  $\mathbb{R}^2$  que satisfazem a equação diferencial. Tal trajetória é chamada fechada(ou periódica) se ela não é constante e retorna ao seu ponto inicial. Ou seja, se existe algum  $t_0 > 0$  tal que  $x(t + t_0) = x(t)$  para todo  $t \in \mathbb{R}$ . Uma órbita é a imagem da trajetória em um subconjunto de  $\mathbb{R}^2$ . A órbita fechada, ou ciclo, é a imagem de uma trajetória fechada. Um ciclo limite é um ciclo que é o limite de alguma outra trajetória.*

Como o sistema oscila naturalmente, para que o ciclo celular ocorra de forma contínua, é natural que um ciclo limite seja formado pelo sistema de EDOs. Assim, o modelo aqui proposto deve ser analisado de forma a confirmar a existência deste ciclo, validando o modelo proposto. Como foi dito anteriormente, no interior de um ciclo sempre existe um ponto de equilíbrio, logo a busca de ciclos limites está ligada, mas não limitada, a busca dos pontos críticos.

### 3.3.5 BIFURCAÇÃO DE HOPF

Uma bifurcação de Hopf, também conhecida como bifurcação de Poincaré-Andronov-Hopf, é caracterizada pela existência de um par de autovalores puramente imaginários no ponto de bifurcação. Isto implica que ela ocorre somente em sistemas de equações diferenciais constituídos por duas ou mais equações. Assim sendo, uma bifurcação de Hopf refere-se ao aparecimento de uma órbita periódica a partir de um estado de equilíbrio quando o parâmetro de bifurcação cruza um valor crítico. Este tipo de bifurcação é muito interessante, pois simultaneamente à perda de estabilidade do ponto de equilíbrio pode ocorrer o aparecimento de um ciclo limite que envolve este ponto (SOUZA, 2015).

Como o sistema proposto por Gérard e Goldbeter (2011) apresenta um ciclo limite que deve ser preservado, uma análise sobre o impacto do novo parâmetro que controla o crescimento do volume celular sobre o ciclo deve ser realizada. Assim, deve-se buscar o intervalo de valores que este parâmetro pode assumir antes que uma bifurcação de Hopf desestabilize o ciclo limite.

## 3.4 SIMULAÇÃO DETERMINISTA

A simulação determinista utiliza um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDO's), acopladas ou não, para descrever processos químicos, bioquímicos, biológicos, físicos, en-

tre outros. Essas equações descrevem a variação das taxas das concentrações de cada variável em função do tempo. Se o sistema de EDO's for simples, é possível formular uma solução analítica, mas para conjuntos complexos de EDO's, uma solução numérica pode ser necessária (KLIPP et al., 2008).

### 3.4.1 MÉTODOS NUMÉRICOS

Equações diferenciais são usadas para modelar problemas em ciência e engenharia que envolvam a alteração de qualquer variável em relação à outra. A maioria destes problemas exige a solução de um problema de valor inicial (PVI), isto é, a solução para a equação diferencial que satisfaz uma determinada condição inicial.

Na maioria das situações da vida real, a equação diferencial que modela o problema é muito complicada para resolver ser resolvida analiticamente, e as abordagens usadas levam a uma solução aproximada. Uma abordagem é a de simplificar a equação diferencial, para uma que pode ser resolvida analiticamente e, em seguida, utilizar a solução da equação simplificada para aproximar a solução para a equação original. Outra abordagem, examinada nesta seção, é a utilização de métodos para aproximar a solução do problema original.

A seguir, será apresentado alguns métodos numéricos para solução de sistemas de equações diferenciais ordinárias (EDO's).

#### 3.4.1.1 Método de Euler

Embora o método de Euler seja raramente usado na prática, a simplicidade da sua derivação pode ser usado para ilustrar as técnicas envolvidas na construção de algumas das técnicas mais avançadas. O objetivo do método é obter uma aproximação para uma equação diferencial ordinária ou um sistema de equações diferenciais ordinárias dado as condições iniciais.

O Algoritmo 1 é o pseudocódigo para o método de Euler. É possível notar que é um método muito simples que usa apenas a primeira derivada para calcular um novo valor para o problema no próximo passo de tempo.

---

**Algoritmo 1:** Algoritmo para o Método de Euler.
 

---

 ENTRADA: Pontos de entrada  $a$ ,  $b$ ; inteiro  $N$ ; condição inicial  $a$ .

 SAÍDA: aproximação de  $w$  para  $y$  em  $(N + 1)$  valores de  $t$ .

$$h = \frac{b-a}{N};$$

$$t = a;$$

$$w = \alpha;$$

**foreach**  $i = 1, 2, \dots, N$  **do**

$$\left| \begin{array}{l} w = w + hf(t, w); \\ t = a + ih; \end{array} \right.$$

**end foreach**
**return**  $(t, w)$ 


---

### 3.4.1.2 Método de Runge Kutta

Os métodos de Runge Kutta são uma família de métodos explícitos muito importante na solução de equações diferenciais ordinárias, pois possuem uma precisão muito superior ao método de Euler e não necessitam de informações além da primeira derivada. O mais famoso e mais utilizado método da família Runge Kutta é sem dúvidas o Runge Kutta de quarta ordem. Sendo assim este método será detalhado a seguir.

### 3.4.1.3 Runge Kutta de Quarta Ordem

É o método mais utilizado pois ainda apresenta um custo computacional razoável aliada a uma grande precisão. Apesar do baixo custo necessita calcular o valor de derivada em vários pontos distintos de forma a fazer uma melhor aproximação do valor no próximo passo de tempo, conforme demonstrado a seguir.

$$\begin{aligned} w_0 &= \alpha, \\ k_1 &= hf(t_i, w_i), \\ k_2 &= hf\left(t_i + \frac{h}{2}, w_i + \frac{1}{2}k_1\right), \\ k_3 &= hf\left(t_i + \frac{h}{2}, w_i + \frac{1}{2}k_2\right), \\ k_4 &= hf(t_{i+1}, w_i + k_3), \\ w_{i+1} &= w_i + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4), \end{aligned}$$

Cada passo de tempo  $i = 0, 1, \dots, N - 1$  neste método tem erro de truncamento locais  $O(h^4)$ , e a solução  $y(t)$  fornecida tem cinco derivadas contínuas. A introdução da notação  $k - 1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  e  $k_4$  no método é para eliminar a necessidade de sucessivos assentamentos



na segunda variável de  $f(t, y)$ . O algoritmo 2 mostra o método Runge-Kutta de quarta ordem.

---

**Algoritmo 2:** Algoritmo para o Método de Runge Kutta.

---

ENTRADA: Pontos de entrada  $a, b$ ; inteiro  $N$ ; condição inicial  $\alpha$ .

SAÍDA: aproximação de  $w$  para  $y$  em  $(N + 1)$  valores de  $t$ .

$h = \frac{b-a}{N}$ ;

$t = a$ ;

$w = \alpha$ ;

**foreach**  $i = 1, 2, \dots, N$  **do**

$k_1 = hf(t, y)$ ;

$k_2 = hf(t + h/2, w + k_1/2)$ ;

$k_3 = hf(t + h/2, w + k_2/2)$ ;

$k_4 = hf(t + h, w + k_3)$ ;

$w = w + (k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)/6$ ;

$t = a + ih$ ;

**end foreach**

**return**  $(t, w)$

---

### 3.5 SIMULAÇÃO ESTOCÁSTICA

Embora a simulação determinista seja uma abordagem de sucesso, ela possui alguns problemas. Em subsistemas celulares, onde é comum encontrar um número pequeno de moléculas de uma determinada espécie, essa abordagem não leva em conta as flutuações aleatórias que podem alterar consideravelmente o comportamento dinâmico do sistema. Além disso, sistemas bi-estáveis ou multi-estáveis não podem ser descritos corretamente por essa abordagem. Outra desvantagem da simulação determinista é que a estocasticidade de um sistema pode ser uma propriedade importante para o estudo do modelo (PAHLE, 2009).

O uso de EDO's para descrever processos bioquímicos de um sistema que possui natureza discreta pode levar à obtenção de resultados insatisfatórios. Além disso, nas simulações de sistemas de EDO's, considerando o processo como determinista, as flutuações aleatórias não são levadas em consideração (MCADAMS; ARKIN, 1997).

Uma solução para as limitações da simulação determinista é utilizar a simulação estocástica, pois essa última calcula explicitamente a variação do número de moléculas de cada espécie envolvida em fenômeno químico, físico, biológico, bioquímico, entre outros, ao longo do tempo (OLIVEIRA, 2008).

A simulação estocástica possui uma desvantagem em relação à simulação determinista: um aumento na demanda computacional. Já que os métodos de simulação estocástica exatos possuem o tempo de processamento proporcional ao número de reações que ocorrem durante a simulação (PAHLE, 2009).

As constantes de velocidades usadas para simulação estocástica e as usadas para simulação determinística são relacionadas, mas não idênticas. As constantes determinísticas dependem de concentração e as estocásticas do número de moléculas. A análise dimensional mostra como as constantes de velocidade clássicas para as reações de primeira e segunda ordem podem ser transformadas apropriadamente para serem usadas em simulações estocásticas (GILLESPIE, 1977).

### 3.5.1 MÉTODOS DE SIMULAÇÃO ESTOCÁSTICA

A simulação estocástica pode ser feita utilizando uma equação, denominada Equação Mestra (KAMPEN, 1992) porém, esse método geralmente é computacionalmente inviável devido à complexidade de alguns modelos.

Gillespie (1976, 1977) propôs o método conhecido como *Stochastic Simulation Algorithm* (SSA), que utiliza métodos derivados do Método de Monte Carlo (KAMPEN, 1992) para simular numericamente o processo de Markov, que é analiticamente descrito pela Equação Mestra. O SSA é um algoritmo exato, pois ele gera resultados equivalentes aos resultados da Equação Mestra. A simulação com o SSA tornou-se possível pois o SSA apresenta somente uma trajetória, enquanto que a Equação Mestra apresenta a probabilidade de todas as trajetórias simultaneamente. Para se obter as mesmas informações que seriam obtidas se a Equação Mestra fosse utilizada, é necessário executar o SSA várias vezes e armazenar cada trajetória, de forma que o conjunto das trajetórias obtido seja estudado estatisticamente (KLIPP et al., 2008).

O SSA possui dois passos principais. Primeiro, é a escolha do tempo em que a próxima reação ocorrerá e, segundo, é a escolha da próxima reação.

O SSA utiliza alguns parâmetros comuns, dentre eles, destacam-se o estado inicial, a estequiometria, as constantes de velocidades de reação e a propensidade.

No SSA, o estado inicial é a representação da quantidade de moléculas de cada espécie do modelo no tempo imediatamente anterior à primeira reação executada. Ele é representado por um vetor, cujos índices indicam as espécies e os valores indicam suas respectivas

quantidades.

A estequiometria é a representação das proporções definidas de cada espécie em cada reação. Ela pode ser representada por uma matriz, cujas linhas representam as reações e as colunas, as espécies. Os valores armazenados de cada espécie em cada reação representam a quantidade a ser alterada daquela espécie após a execução da reação. Assim, os valores negativos indicam que a espécie terá a sua população diminuída. Já os valores positivos indicam que a espécie terá sua população aumentada.

A constante de velocidade de reação ( $k$ ), representa a variação das concentrações dos reagentes e produtos, dividido pelos respectivos coeficientes estequiométricos. Ela é representada por um vetor, onde o índice indica a reação e o valor indica a constante de velocidade.

A propensidade utiliza um vetor que é gerado e controlado dentro de cada simulação, onde o índice indica a reação e o valor é probabilidade desta reação ser escolhida como a próxima reação a ser executada. Portanto, reações com grande propensidade possuem mais chance de serem escolhidas como a próxima reação.

A seguir, serão apresentadas algumas variações do SSA.

### 3.5.1.1 *Direct Method* (DM)

O *Direct Method* (DM), foi proposto por Gillespie (1977). É o primeiro e mais conhecido método publicado para simulação estocástica (SILVA, 2014). A seleção da próxima reação é do tipo roleta, onde a chance de cada reação ser selecionada é proporcional à sua propensidade (Figura 3.13). Alguns métodos mais recentes, como FRM apresentado na subseção 3.5.1.2, modificam este método de seleção. A Figura 3.14, mostra o fluxograma do DM.

---

**Algoritmo 3:** Algoritmo DM.
 

---

**Entrada:** Estequiometria ( $\nu$ ), constantes de velocidades das reações ( $k$ ), estado inicial ( $S$ ), tempo de simulação ( $T$ );

Inicializar  $t$ ,  $X_0$  e o gerador de números aleatórios;

**foreach** reação  $R_i$  **do**

$$a_i = c_i \prod_{k=1}^N (X_k)^{r_{ik}} ;$$

$$a_0 = \sum_{i=1}^N a_i$$

**end foreach**

**while**  $t < T$  **do**

Gerar dois números aleatórios  $r_1$  e  $r_2$ ;

$$\tau = \frac{1}{a_0} \ln \left( \frac{1}{r_1} \right);$$

Determinar o menor inteiro  $i$  (índice da reação ocorrida) que satisfaz a equação

$$\sum_{k=1}^i a_k > r_2 a_0;$$

$$t = t + \tau;$$

$$X(t) = X(t) - r_i + p_i;$$

**if**  $t > t_{end}$  ||  $a_0 = 0$  **then**

  | **break**;

**else**

  | Vá para **while**;

**end if**

**end while**

**return**  $X$ ;

---

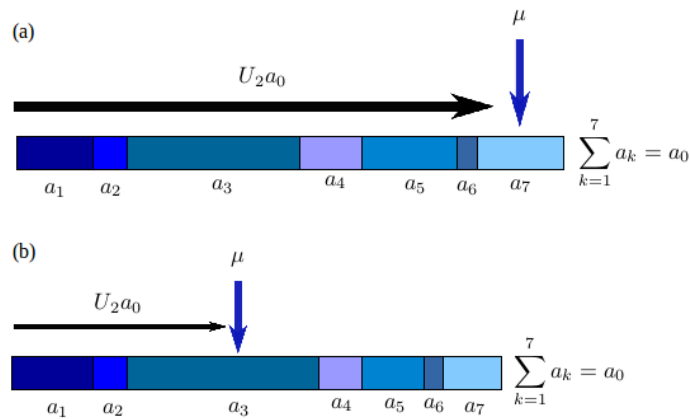


Figura 3.13: Seleção da próxima reação, usando o tipo roleta. Em um sistema com sete reações ( $r_1, r_2, \dots, r_7$ ), com as propensidades ( $a_1, a_2, \dots, a_7$ ), respectivamente, a próxima reação é escolhida pelo valor do número aleatório ( $U_2$ ), multiplicado pelo somatório das propensidades de todas as reações ( $a_0$ ). Em (a), a reação selecionada foi a de índice 7. Em (b), após a execução da reação de índice 7, houve alteração na propensidade das reações de índices 5 e 7. Já em (b), a reação selecionada foi a de índice 3.

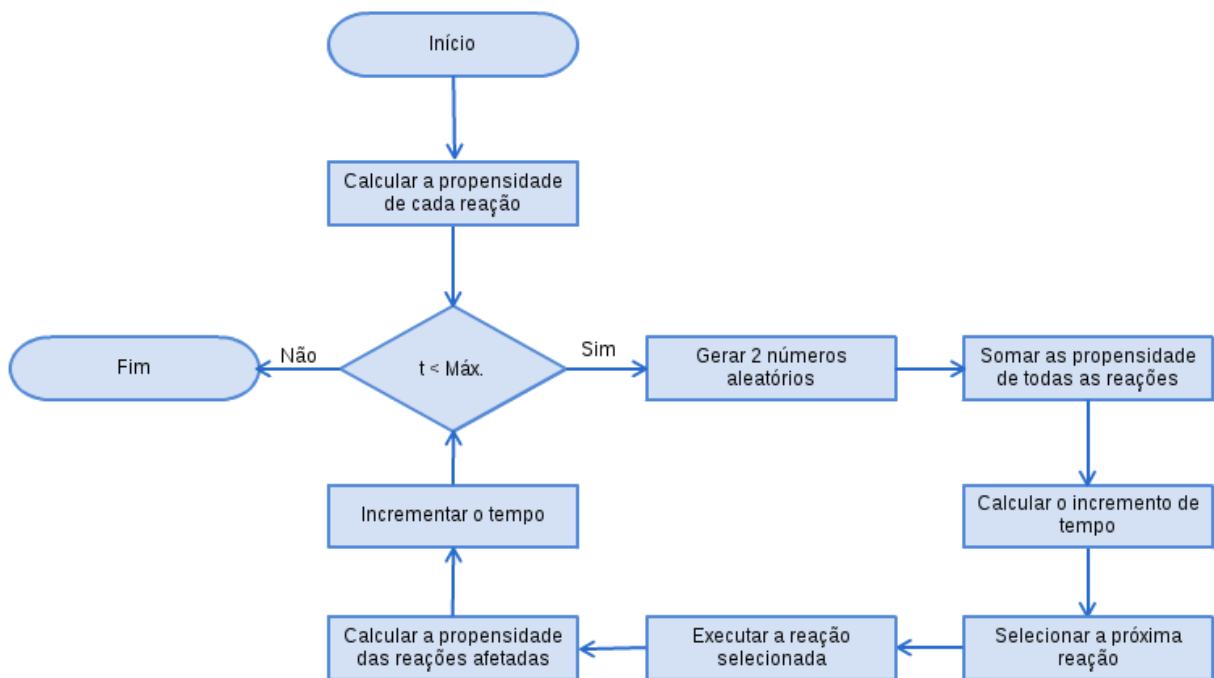


Figura 3.14: Fluxograma do *Direct Method* (DM).

No algoritmo 3, é apresentado o pseudocódigo para o algoritmo DM, primeiro, é realizada a soma das propensidades de cada reação. Depois  $U_1$  e  $U_2$  são gerados como variáveis uniformemente randômicas no intervalo  $(0, 1)$ . Depois é feito o cálculo do próximo incremento de tempo ( $\tau$ ), onde  $\tau$  será somado ao tempo atual de simulação ( $t$ ), para que seja obtido o tempo em que a próxima reação ( $i$ ) ocorrerá. Depois é feita a seleção da próxima

reação ( $i$ ), percorrendo as propensidades de cada reação como em uma seleção do tipo roleta, cujo número sorteado é obtido multiplicando o número aleatório  $U_2$  à soma das propensidades. Por fim, o algoritmo retorna a dinâmica dos estados ( $X$ ).

### 3.5.1.2 *First Reaction Method* (FRM)

O *First Reaction Method* (FRM), também foi proposto por Gillespie (1977). Esse método não é tão eficiente quanto o *Direct Method* (DM), devido à sua necessidade de gerar novos números aleatórios e calcular novos tempos de disparo para todas as reações a cada reação executada. Apesar disto é importante, pois o método mais eficiente proposto por este autor é baseado neste método. O fluxograma para o FRM é apresentado na Figura 3.15.

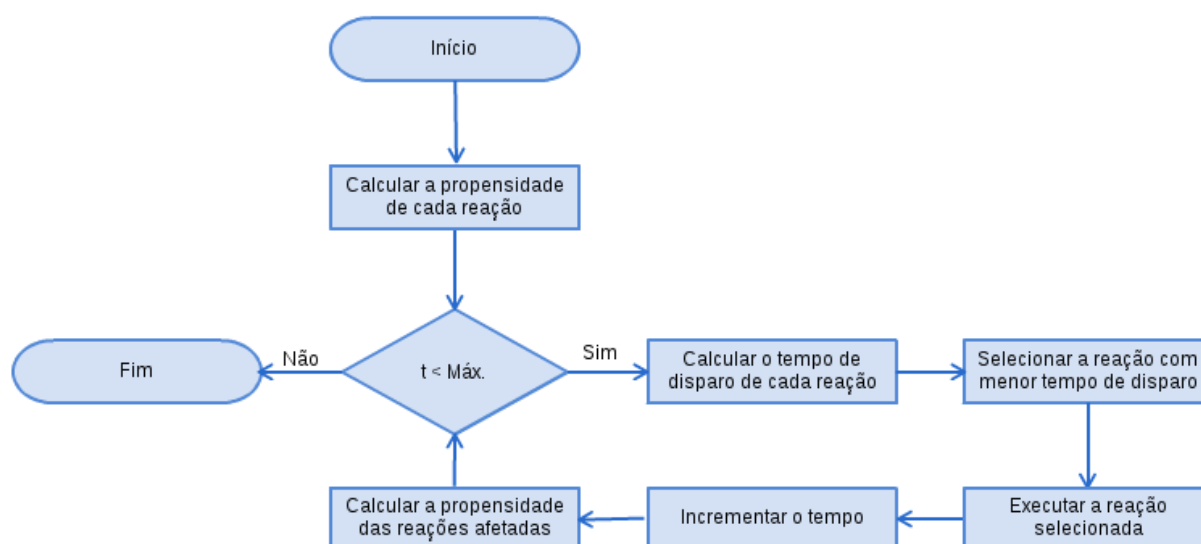


Figura 3.15: Fluxograma do *First Reaction Method* (FRM).

No algoritmo 4, onde é apresentado o pseudocódigo para o algoritmo FRM, primeiro, a propensidade de cada reação é calculada. Um novo número aleatório é gerado para cada reação. Depois é calculado o tempo relativo de disparo de cada reação. Por fim, o algoritmo retorna a dinâmica dos estados ( $X$ ).

---

**Algoritmo 4:** Algoritmo FRM.
 

---

**Entrada:** Estequiometria ( $v$ ), constantes de velocidades das reações ( $k$ ), estado inicial ( $S$ ), tempo de simulação ( $T$ );

Inicializar  $t$ ,  $X_0$  e o gerador de números aleatórios;

**foreach** reação  $R_i$  **do**

$$a_i = c_i \prod_{k=1}^N (X_k)^{r_{ik}} ;$$

$$a_0 = \sum_{i=1}^N N a_i ;$$

**end foreach**

**while**  $t < T$  **do**

**foreach** reação  $R_i$  **do**

Gerar o número aleatório  $r$ ;

$$a_i = c_i \prod_{k=1}^N (X_k)^{r_{ik}} ;$$

$$\tau_i = -\frac{\log(r)}{a_i} ;$$

**end foreach**

$t = t + (\tau_\mu = \min\{\tau\})$ ;

$X(t) = X(t) - r_i + p_i$ ;

**end while**

**return**  $X$

---

### 3.5.1.3 Next Reaction Method (NRM)

O *Next Reaction Method* (NRM), também foi proposto por Gibson e Bruck (2000). Este método é baseado no *First Reaction Method* (FRM), com a principal diferença de trabalhar com tempos absolutos em vez de tempos relativos (utilizado pelo FRM). O NRM reutiliza os números aleatórios de todas as reações do modelo, exceto o da reação executada. Para que não seja necessário recalculá-los o tempo de disparo de todas as reações a cada reação executada, o NRM utiliza um *Dependency Graph* (DG), para que o algoritmo saiba quais reações são afetadas pela reação executada. O DG também é útil para obter as reações que precisam ter as propensidades recalculadas.

O NRM reaproveita os números utilizados para o cálculo do próximo tempo de disparo das reações que foram identificadas pelo DG, para que suas propensidades sejam recalculadas. Somente a reação executada recebe um novo número aleatório. A Figura 3.16 apresenta o fluxograma do NRM.

O algoritmo 5 apresenta o pseudocódigo para o algoritmo NRM. Para ranquear as reações de um jeito que seja fácil a obtenção da reação com menor tempo de disparo, uma fila de prioridades indexada  $P$  é utilizada. O reaproveitamento de números aleatórios é

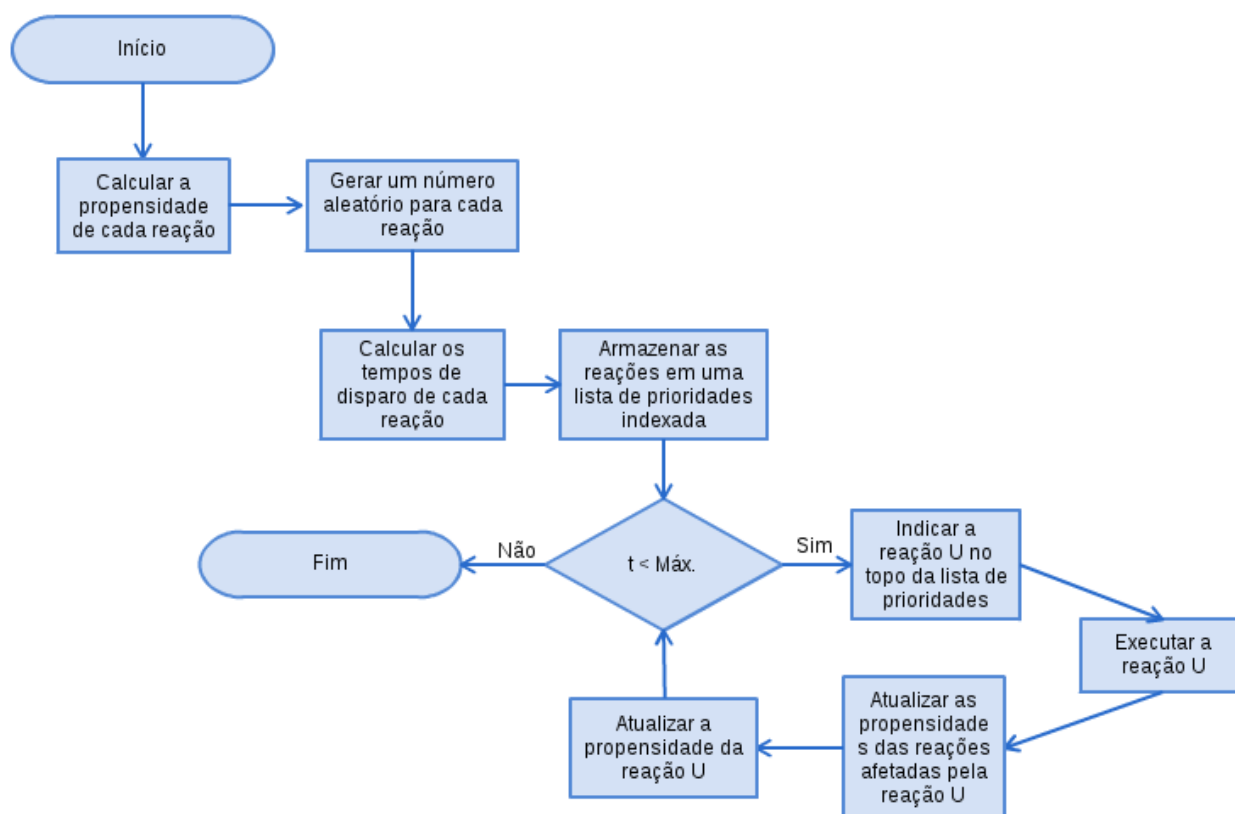


Figura 3.16: Fluxograma do *Next Reaction Method* (NRM).

feito utilizando o condicional **if** ( $\alpha <> \mu$ ) **then**  $t_\alpha = \frac{a_{\alpha,old}}{a_\alpha}(t_\alpha - t) + t$ . Já o próximo tempo de disparo da reação selecionada é obtido após o novo número aleatório ser obtido. Quando  $a_\alpha$  deixar de ser zero, o reaproveitamento de números aleatórios é substituído pelo condicional **if** ( $a_\alpha <> 0$ ) **then**  $t_\alpha = \frac{a_{\alpha,oldNonZero}}{a_\alpha}(t_\alpha - t) + t$ , onde  $a_{\alpha,oldNonZero}$  é a última propensidade diferente de zero e  $t_1$  é o tempo que  $a_\alpha$  se tornou zero.



---

**Algoritmo 5:** Algoritmo NRM.
 

---

**Entrada:** Estequiometria ( $v$ ), constantes de velocidades das reações ( $k$ ), estado inicial ( $S$ ), tempo de simulação ( $T$ );

Inicializar  $t$ ,  $X_0$  e o gerador de números aleatórios;

**foreach** reação  $R_i$  **do**

$$a_i = c_i \prod_{k=1}^N (X_k)^{r_{ik}} ;$$

Gerar o número aleatório  $r$ ;

$$\tau_i = \frac{1}{a_i} \ln \left( \frac{1}{r} \right);$$

Armazenar  $\tau_i$  na fila de prioridades indexada  $P$ ;

**end foreach**

**while**  $t < T$  **do**

$$t = \tau_i = \min(P);$$

$$X(t) = X(t) - r_i + p_i;$$

**foreach** aresta  $(i, \alpha)$  no grafo de dependência  $DG$  **do**

Atualizar  $a_\alpha$ ;

**if**  $\alpha <> i$  **then**

$$t_\alpha = \frac{a_{\alpha,old}}{a_\alpha} (t_\alpha - t) + t;$$

**else**

Gerar um novo número aleatório  $r$ ;

$$t_\alpha = \frac{1}{a_\alpha} \ln \left( \frac{1}{r} \right) + t;$$

**end if**

Atualizar  $P$  com o novo valor de  $t_\alpha$ ;

**end foreach**

**end while**

**return**  $X$

---

## 4 MODELO PROPOSTO

Dentre os esforços para se conhecer melhor o ciclo celular e seu sistema de controle, uma abordagem frequentemente usada é a modelagem matemática e computacional. Depois de estudar e compreender a regulação do ciclo celular, foi analisado um modelo computacional do mesmo e que reproduzia o comportamento do ciclo celular de células de mamíferos. Após esta análise, uma equação que representa o volume celular foi incluída e alguns ajustes no modelo foram feitos para se adaptar às simulações determinista e estocástica.

### 4.1 FORMULAÇÃO DETERMINÍSTICA - VOLUME CONSTANTE

A partir de uma análise da literatura, diversos modelos para o ciclo celular de células eucarióticas foram encontrados (TYSON; NOVAK, 2001; CSIKÁSZ-NAGY, 2009; GOLDBETER, 1991; GÉRARD; GOLDBETER, 2011). O presente trabalho detalha, reproduz e incrementa o modelo proposto por Gérard e Goldbeter (2011). Este modelo é descrito por meio de um conjunto de equações diferenciais ordinárias, ver equações 4.1 à 4.6.

A Figura 4.1 mostra um esquema de modelo para a rede de *Cdk* na condução do ciclo celular de mamíferos. O modelo contém os quatro principais complexos de *ciclina* (*A*, *B*, *D* e *E*)/*Cdk*, o fator de transcrição *E2F* e a proteína *Cdc20*.

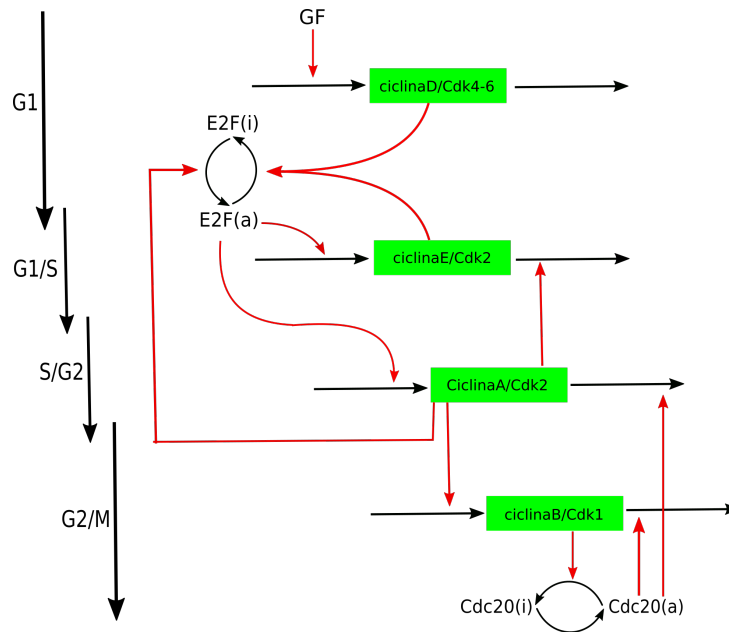


Figura 4.1: Esquema da rede de *Cdk* na condução do ciclo celular de mamíferos. As setas vermelhas significam que a reação foi induzida por um determinado composto, enquanto que as setas pretas na horizontal são as reações. As setas pretas verticais mostram em qual fase do ciclo celular está ocorrendo determinada reação.

No início do ciclo celular, o fator de crescimento  $GF$  ativa diretamente a síntese do complexo *ciclinaD/Cdk4 – 6*, que promove a progressão da fase  $G1$  (Equação 4.1). Este complexo garante a ativação do fator de transcrição  $E2F$  (Equação 4.2) que, por sua vez, ativa a síntese dos complexos de *ciclinaE/Cdk2* (Equação 4.3) e *ciclinaA/Cdk2* (Equação 4.4). Durante a fase  $G1$ , o complexo de *ciclinaE/Cdk2* reforça a ativação da transcrição do fator  $E2F$  (Equação 4.2). Durante a fase  $S$ , replicação do DNA, o complexo de *ciclinaA/Cdk2* ativa a degradação do complexo de *ciclinaE/Cdk2* (Equação 4.3), garantindo que o último complexo não será ativado no final do ciclo celular. O complexo de *ciclinaA/Cdk2* também permite sair da fase  $S$  ao promover a inativação do fator de transcrição  $E2F$  (Equação 4.2) e ao promover a síntese do complexo de *ciclinaB/Cdk1* (Equação 4.5), cujo pico de atividade acarreta a transição  $G2/M$ . Durante a mitose, o complexo de *ciclinaB/Cdk1* ativa, por fosforilação, a proteína  $Cdc20$  (Equação 4.6). Esta proteína está no núcleo do *feedback* negativo, uma vez que ele promove a degradação dos complexos de *ciclinaA/Cdk2* (Equação 4.4) e *ciclinaB/Cdk1* (Equação 4.5), desse modo permitindo a conclusão do ciclo celular. Um novo ciclo celular começa novamente se o fator de crescimento ainda estiver presente na célula.

As EDOs do modelo são apresentadas nas equações (4.1 - 4.6). A tabela (5.2), na

página 72, mostra a lista de parâmetros juntamente com seus respectivos valores. Já a tabela (5.1), na página 71, mostra as variáveis e seus valores iniciais usados nas simulações.

$$\frac{dM_d}{dt} = v_{sd} \cdot \left( \frac{GF}{K_{gf} + GF} \right) - V_{dd} \cdot \left( \frac{M_d}{K_{dd} + M_d} \right) \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} \frac{dE2F}{dt} = & V_{1e2f} \cdot \left( \frac{E2F_{tot} - E2F}{K_{1e2f} + E2F_{tot} - E2F} \right) \cdot (M_d + M_e) \\ & - V_{2e2f} \cdot \left( \frac{E2F}{K_{2e2f} + E2F} \right) \cdot M_a \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$\frac{dM_e}{dt} = v_{se} \cdot E2F - V_{de} \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{K_{de} + M_e} \right) \quad (4.3)$$

$$\frac{dM_a}{dt} = v_{sa} \cdot E2F - V_{da} \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{M_a}{K_{da} + M_a} \right) \quad (4.4)$$

$$\frac{dM_b}{dt} = v_{sb} \cdot M_a - V_{db} \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{M_b}{K_{db} + M_b} \right) \quad (4.5)$$

$$\begin{aligned} \frac{dCdc20}{dt} = & V_{1cdc20} \cdot M_b \cdot \left( \frac{Cdc20_{tot} - Cdc20}{K_{1cdc20} + Cdc20_{tot} - Cdc20} \right) \\ & - V_{2cdc20} \cdot \left( \frac{Cdc20}{K_{2cdc20} + Cdc20} \right) \end{aligned} \quad (4.6)$$

## 4.2 FORMULAÇÃO DETERMINÍSTICA - VOLUME VARIÁVEL

Uma das principais contribuições deste trabalho foi a inclusão da equação diferencial do volume ao conjunto de EDOs que descreve a dinâmica do ciclo celular, descrito na seção 4.1. A Equação diferencial do volume (4.11) foi inspirada no trabalho de Tyson e Novak (2001). É uma equação simples e foi incluída no modelo proposto por Gérard e Goldbeter (2011). O sistema de EDOs proposto está definido nas equações diferenciais (4.13 - 4.18).

A Figura 4.2 mostra um esquema de modelo para a rede de *Cdk* na condução do ciclo celular de mamíferos. O modelo contém os quatro principais complexos de *ciclina/Cdk*, o fator de transcrição *E2F*, a proteína *Cdc20* e o volume  $V$ .

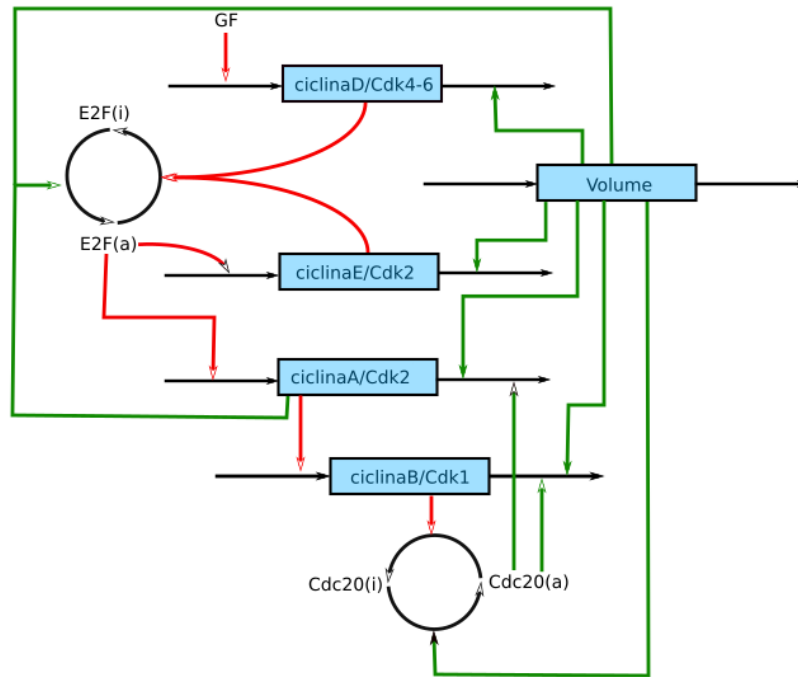


Figura 4.2: Esquema de modelo para a rede de *Cdk* na condução do ciclo celular de mamíferos com a inclusão da EDO do volume. As setas vermelhas significam que a reação foi induzida por um determinado composto, as setas verdes significam que um determinado composto está sendo inativado e as setas pretas são as reações.

Dada a Equação Diferencial abaixo para  $M_e$  (*ciclinaE/Cdk2*):

$$\frac{dM_e}{dt} = v_{se} \cdot E2F - V_{de} \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{K_{de} + M_e} \right) \quad (4.7)$$

A discussão que se segue vale, e deve ser usada, para todas as variáveis do modelo. A unidade de  $M_e$  é concentração, neste caso em particular  $[\frac{mol}{L}]$ . As equações do modelo são válidas apenas sobre a suposição de que o volume, onde ocorre as reações - volume celular - seja constante. Ao considerar o volume celular não constante, ou seja, ao torná-lo variável ao longo do tempo, segundo uma equação diferencial, a Equação (4.7) e todas as equações do modelo original não são mais válidas. Estas equações são desenvolvidas a partir do princípio da conservação da massa e, portanto, é a massa que se conserva e não a concentração. Seja  $N_e$  o equivalente de  $M_e$  em *mol* (massa) e  $V$  o volume celular  $[L]$ , a Equação (4.7) deve ser reescrita como indicada na Equação (4.8), onde  $M_e V = N_e$ .

$$\frac{d(VM_e)}{dt} = V \left[ v_{se} \cdot E2F - V_{de} \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{K_{de} + M_e} \right) \right] \quad (4.8)$$

Aplicando a regra do produto para a derivada no lado esquerdo da Equação (4.8):

$$M_e \frac{dV}{dt} + V \frac{dM_e}{dt} = V \left[ v_{se} \cdot E2F - V_{de} \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{K_{de} + M_e} \right) \right] \quad (4.9)$$

Dividindo a Equação (4.9) por  $V$ :

$$\frac{M_e}{V} \frac{dV}{dt} + \frac{dM_e}{dt} = v_{se} \cdot E2F - V_{de} \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{K_{de} + M_e} \right) \quad (4.10)$$

É razoável supor que a célula cresce de forma proporcional ao seu volume, seguindo assim um crescimento exponencial durante o período da divisão celular. Logo o volume pode ser descrito pela Equação Diferencial (4.11), onde  $\mu$  [ $min^{-1}$ ] é a velocidade específica de crescimento celular.

$$\frac{dV}{dt} = \mu V \quad (4.11)$$

Substituindo a Equação (4.11) em  $\frac{dV}{dt}$  na Equação (4.10) e passando  $\mu M_e$  para o lado direito dessa mesma equação, obtém-se a equação:

$$\frac{dM_e}{dt} = v_{se} \cdot E2F - V_{de} \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{K_{de} + M_e} \right) - \mu M_e \quad (4.12)$$

A Equação (4.12) leva, agora, em consideração a variação do volume celular. Este novo termo é conhecido como diluição devido ao crescimento celular.

Fazendo essa discussão para todas as variáveis do modelo, obtém-se o sistema de EDO's descrito pelas equações 4.13 a 4.18. Estas equações são as mesmas equações do modelo anterior sem o volume, contudo elas agora levam em consideração um sistema com volume variável. Já a Equação (4.11) é a nova EDO que representa a variação do volume celular em relação ao tempo. Além da taxa de variação codificada nesta equação, o volume também varia de forma pontual quando a célula se divide ( $M_b$  atinge o valor mínimo). Nota-se também que o volume influencia todas as equações do modelo, reduzindo suas concentrações à medida que o volume cresce. Este comportamento é esperado, pois o mesmo número de moléculas sobre um volume maior apresenta uma menor concentração de tais moléculas.

$$\frac{dM_d}{dt} = v_{sd} \cdot \left( \frac{Gf}{K_{gf} + GF} \right) - V_{dd} \cdot \left( \frac{M_d}{K_{dd} + M_d} \right) - \mu M_d \quad (4.13)$$

$$\begin{aligned} \frac{dE2F}{dt} &= V_{1e2f} \cdot \left( \frac{E2F_{tot} - E2F}{K_{1e2f} + E2F_{tot} - E2F} \right) \cdot (M_d + M_e) \\ &\quad - V_{2e2f} \cdot M_a \left( \frac{E2F}{K_{2e2f} + E2F} \right) - \mu E2F \end{aligned} \quad (4.14)$$

$$\frac{dM_e}{dt} = v_{se} \cdot E2F - V_{de} \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{K_{de} + M_e} \right) - \mu M_e \quad (4.15)$$

$$\frac{dM_a}{dt} = v_{sa} \cdot E2F - V_{da} \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{M_a}{K_{da} + M_a} \right) - \mu M_a \quad (4.16)$$

$$\frac{dM_b}{dt} = v_{sb} \cdot M_a - V_{db} \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{M_b}{K_{db} + M_b} \right) - \mu M_b \quad (4.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{dCdc20}{dt} &= V_{1cdc20} \cdot M_b \cdot \left( \frac{Cdc20_{tot} - Cdc20}{K_{1cdc20} + Cdc20_{tot} - Cdc20} \right) \\ &\quad - V_{2cdc20} \cdot \left( \frac{Cdc20}{K_{2cdc20} + Cdc20} \right) - \mu Cdc20 \end{aligned} \quad (4.18)$$

Na Equação (4.11), o crescimento é desimpedido (isto é, cresce exponencialmente sem nenhum limite) e modelado pelo termo  $\mu$ . O valor da taxa  $\mu$  representa o aumento proporcional do volume celular  $V$  em uma unidade de tempo. A partir desta equação diferencial simples facilmente obtém-se uma solução analítica para a Equação (4.11) dada pela Equação abaixo

$$V = V_0 e^{\mu t}, \quad (4.19)$$

onde  $V_0$  é o volume inicial  $V$  no tempo  $t = 0$ .

O valor de  $\mu$  pode ser estimado, considerando que um ciclo celular de célula de mamífero leva por volta de 12 a 20h ( $\tau$ ) para ser completado (CHIGNOLA; MILOTTI, 2005). Então considerando que o volume celular ao final do ciclo deva ser duas vezes o volume inicial (*doubling time*) (OLIVEIRA, 2008), isto é  $V = 2V_0$ , usando a Equação(4.19) e  $\tau = 18h^{-1}$ :

$$2V_0 = V_0 e^{\mu \tau}$$

$$2 = e^{\mu\tau}$$

$$\mu = \frac{\ln(2)}{\tau}$$

$$\mu = \frac{0.6931}{18} = 0.0385h^{-1} \quad (4.20)$$

A divisão celular ocorre de acordo com o trabalho de Tyson e Novak (2001), ou seja, no momento em que o complexo de *ciclinaB/Cdk1* é totalmente degradado, ele atinge seu ponto de mínimo. Neste momento o volume da célula cai pela metade, simulando sua divisão em duas células filhas com volumes iguais.

### 4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DO MODELO DE EDOS

De posse deste novo modelo para o ciclo celular, uma análise qualitativa do modelo será realizada. Primeiro será verificado se o novo modelo possui pontos críticos, para em seguida analisar sua estabilidade. Um diagrama de bifurcação será criado de forma a verificar a influência do novo parâmetro  $\mu$  sobre o modelo, principalmente sobre o ciclo limite que caracteriza o ciclo celular.

Substituindo os valores da tabela (4.1) nas equações (4.13) e (4.18), tem-se:

$$\frac{dM_d}{dt} = 0.175 \cdot \left( \frac{1.0}{0.1 + 1.0} \right) - 0.245 \cdot \left( \frac{M_d}{0.1 + M_d} \right) - 0.0385 \cdot M_d$$

$$\begin{aligned} \frac{dE2F}{dt} &= 0.805 \cdot \left( \frac{3.0 - E2F}{0.01 + 3.0 - E2F} \right) \cdot (M_d + M_e) \\ &\quad - 0.7 \cdot M_a \cdot \left( \frac{E2F}{0.01 + E2F} \right) - 0.0385 \cdot E2F \end{aligned}$$

$$\frac{dM_e}{dt} = 0.21 \cdot E2F - 0.35 \cdot M_a \cdot \left( \frac{M_e}{0.1 + M_e} \right) - 0.0385 \cdot M_e$$

$$\frac{dM_a}{dt} = 0.175 \cdot E2F - 0.245 \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{M_a}{0.1 + M_a} \right) - 0.0385 \cdot M_a$$

$$\frac{dM_b}{dt} = 0.21 \cdot M_a - 0.28 \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{M_b}{0.005 + M_b} \right) - 0.0385 \cdot M_b$$



$$\begin{aligned} \frac{dCdc20}{dt} &= 0.21 \cdot M_b \cdot \left( \frac{5.0 - Cdc20}{1.0 + 5.0 - Cdc20} \right) \\ &- 0.35 \cdot \left( \frac{Cdc20}{1.0 + Cdc20} \right) - 0.0385 \cdot Cdc20 \end{aligned}$$

Tabela 4.1: Valores dos parâmetros do modelo de EDO. Nomes e valores.

| Parâmetro      | Valor                |
|----------------|----------------------|
| $E2F_{tot}$    | $3\mu M$             |
| $doublingTime$ | $18 h$               |
| $v_{sd}$       | $0.175 \mu M h^{-1}$ |
| $\mu$          | $0.0385 h^{-1}$      |
| $K_{gf}$       | $0.1 \mu M$          |
| $V_{dd}$       | $0.245 \mu M h^{-1}$ |
| $K_{dd}$       | $0.1$                |
| $V_{1e2f}$     | $0.805 h^{-1}$       |
| $V_{2e2f}$     | $0.7 h^{-1}$         |
| $K_{1e2f}$     | $0.01 \mu M$         |
| $K_{2e2f}$     | $0.01 \mu M$         |
| $v_{se}$       | $0.21 h^{-1}$        |
| $V_{de}$       | $0.35 h^{-1}$        |
| $K_{de}$       | $0.1 \mu M$          |
| $v_{sa}$       | $0.175 h^{-1}$       |
| $V_{da}$       | $0.245 h^{-1}$       |
| $K_{da}$       | $0.1 \mu M$          |
| $GF$           | $1.0 \mu M$          |
| $v_{sb}$       | $0.21 h^{-1}$        |
| $V_{ab}$       | $0.28 h^{-1}$        |
| $K_{db}$       | $0.005 \mu M$        |
| $V_{1cdc20}$   | $0.21 h^{-1}$        |
| $Cdc20_{tot}$  | $5\mu M$             |
| $K_{1cdc20}$   | $1.0 \mu M$          |
| $V_{2cdc20}$   | $0.35 \mu M h^{-1}$  |
| $K_{2cdc20}$   | $1.0 \mu M$          |

agora, os pontos críticos serão encontrados fazendo todas as derivadas iguais a 0 (zero):

$$\frac{dM_d}{dt} = 0$$

$$\frac{dE2F}{dt} = 0$$

$$\frac{dM_e}{dt} = 0$$

$$\frac{dM_a}{dt} = 0$$

$$\frac{dM_b}{dt} = 0$$

$$\frac{dCdc20}{dt} = 0$$

Para resolver o sistema formado ao igualar as derivadas a zero, o software MAPLE foi utilizado, encontrando diversos pontos de estabilidade. Contudo, limitando a busca aos números reais positivos, visto que as concentrações só fazem sentido no espaço dos reais positivos, apenas dois pontos de equilíbrio foram obtidos, que são  $P_1$  e  $P_2$  conforme Table 4.2. Ao analisar os valores de  $Cdc20$  e  $E2F$  observa-se que no segundo ponto eles estão mais altos. Porém, eles tem um valor máximo, que é dado pelos parâmetros  $Cdc20_{tot}$  e  $E2F_{tot}$ , e ao se observar o valor de  $E2f$ , é possível ver que ele está acima de seu valor máximo 3. Sendo assim será realizada a análise somente do ponto viável, ou seja o primeiro ponto.

Tabela 4.2: Pontos de equilíbrio

|       | $Cdc20$      | $E2f$        | $Ma$         | $Mb$         | $Me$          | $Md$     |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------|
| $P_1$ | 0.1738902240 | 0.2448834860 | 0.2901560559 | 0.3365279086 | 0.08954976057 | 0.165495 |
| $P_2$ | 1.786431803  | 3.010457122  | 2.715508604  | 1.834578112  | 0.1783832744  | 0.165495 |

Para estudar a estabilidade do sistema de EDOs formado pelas equações (4.13) e (4.18), é preciso antes linearizá-lo conforme visto no capítulo 3 na página 43.

Como este é um sistema homogêneo (a variável  $t$  não aparece explicitamente do lado direito das EDOs), o tempo não influi na análise. Então para analisar o único ponto de equilíbrio encontrado dentro do intervalo de validade do sistema de EDOs será aplicada a técnica de linearização do sistema. Esta técnica consiste em aproximar o sistema de equações não lineares por uma função linear nas proximidades do ponto de equilíbrio. Para tal foi calculada, usando o MAPLE, a matriz jacobiana do sistema no ponto de

equilíbrio.

$$\begin{pmatrix} -0.3860788 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -0.0700326 & 0.8020887 & -0.6725364 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -0.3211526 & -0.1653519 & 0 & 0 \\ 0 & 0.175 & 0 & -0.06648752 & 0 & -0.1822046 \\ 0 & 0 & 0 & 0.21 & -0.0405871 & -0.2759007 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0.1739553 & -0.2945699 \end{pmatrix}$$

Também com auxílio do MAPLE, os autovalores do sistema foram computados para analisar o ponto de equilíbrio. Os autovalores deste são dados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Autovalores do sistema

| $\lambda_1$   | $\lambda_2$                       | $\lambda_3$                     |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| -0.3860788895 | $-0.008178747757 + 0.4005814098i$ | $-0.1752854121 + 0.1620781022i$ |
| $\lambda_4$   | $\lambda_5$                       | $\lambda_6$                     |
| -0.4259016177 | $-0.008178747757 - 0.4005814098i$ | $-0.1752854121 - 0.1620781022i$ |

como temos autovalores complexos o sistema oscila nas proximidades do ponto de equilíbrio, exatamente como esperado, pois o sistema deve oscilar entre as fases do ciclo celular como acontece com uma célula real.

De posse das informações do ponto equilíbrio foi analisado como a variação do parâmetro  $\mu$  afeta o ponto de equilíbrio. Para fazer isso a extensão `matcont` (DHOOGHE et al., 2003) do MATLAB foi usada. Conforme o valor de  $\mu$  aumenta o sistema vai perdendo sua característica oscilatória, e ao atingir o valor de  $\mu = 0.11$  ocorre uma bifurcação do tipo Hopf, o ponto passa a ser então um ponto de equilíbrio estável. O diagrama de bifurcação para o parâmetro  $\mu$  pode ser visto na Figura (4.3) Isso inviabiliza a ocorrência de ciclos, pois o sistema tende a convergir para o ponto de equilíbrio e não oscila.

O gráficos 4.4 e 4.5 mostram o plano fases  $M_a \times M_b$  para diferente valores de  $\mu$ . Contudo, o primeiro gráfico mostra os diferentes ciclos limites no plano, já o segundo mostra um gráfico 3D onde o plano é formado pelo plano de fases  $M_a \times M_b$  e a altura é o valor de  $\mu$ . Lembre-se que quando um ciclo é formado no plano de fases o sistema apresenta um comportamento oscilatório. A partir destes gráficos fica claro que conforme o parâmetro  $\mu$  se aproxima de 0.11 o ciclo limite vai sendo reduzido até que ao atingir o ponto crítico com  $\mu = 0.11$  o ciclo limite deixa de existir. Isso mostra que o  $\mu$  influencia na convergência do sistema para um ciclo estável, mas também nota-se que o valor que

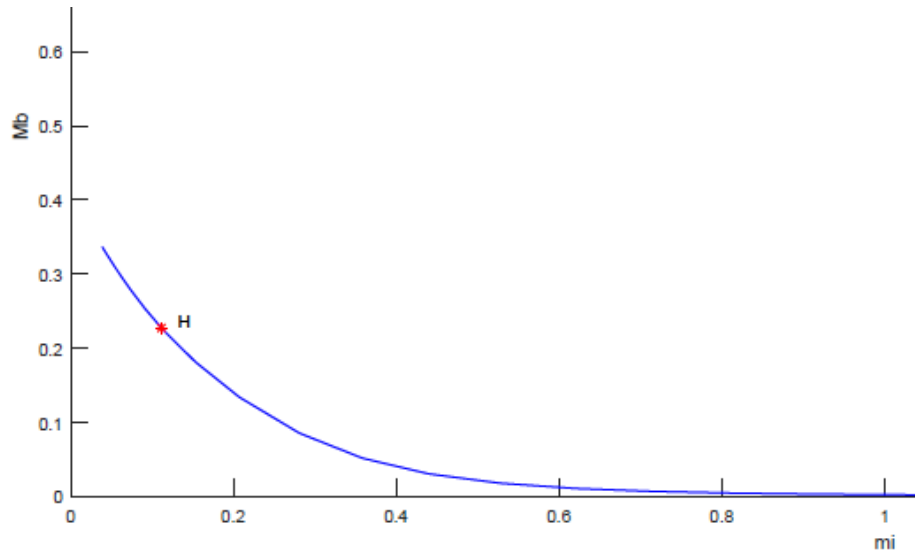


Figura 4.3: Diagrama de bifurcação. Valor de equilíbrio de  $Mb$  em relação ao parâmetro  $\mu$ . O ponto H representa a bifurcação de Hopf ( $\mu = 0.11$ ).

foi utilizado (0.0385) esta longe de afetar a característica oscilatória desejada do sistema.

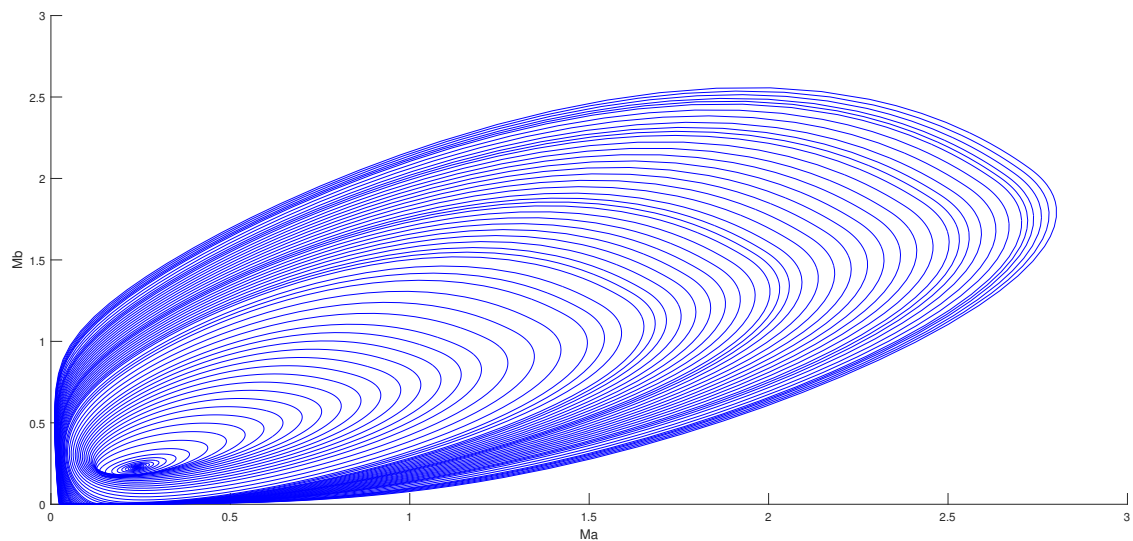


Figura 4.4: Plano de fases  $M_a \times M_b$ . Cada curva representa um valor diferente de  $\mu$

#### 4.4 FORMULAÇÃO ESTOCÁSTICA

Até aqui, usou-se o modelo determinista regido por EDO's para analisar o ciclo celular de células de mamíferos. Para obter um conhecimento adicional, é útil analisar os efeitos do ruído molecular sobre as redes de ciclinas, para isso, o modelo será convertido para uma versão estocástica, conforme descrito a seguir. Para tanto, é necessário converter as

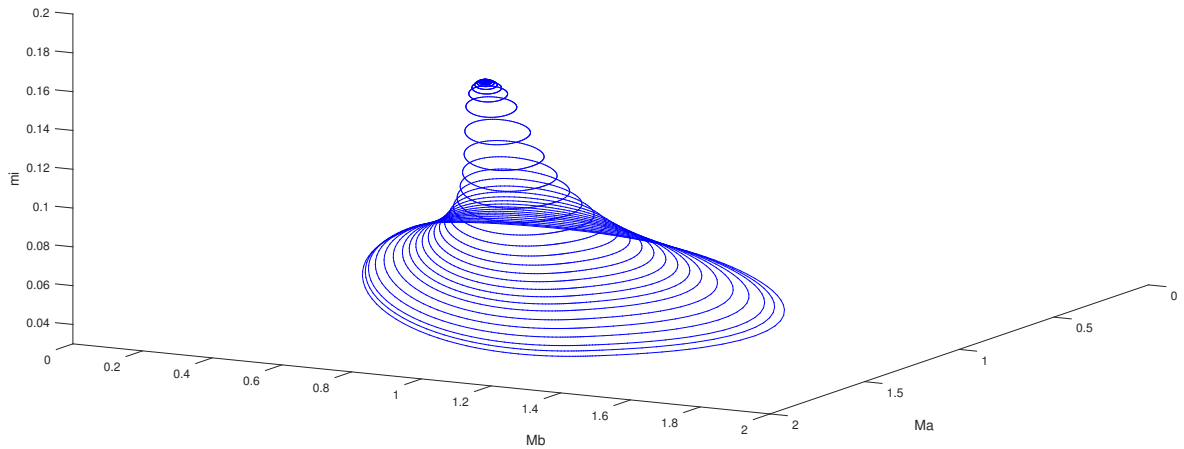


Figura 4.5: Gráfico dos diversos plano de fases  $M_a \times M_b$  com  $\mu$  sendo a altura.

variáveis e os parâmetros que tem concentração (microM) em sua unidade em número de moléculas, onde esse número é proporcional ao tamanho do sistema - neste caso, o volume celular. Quanto maior o número de moléculas, mais a média do comportamento do modelo estocástico se aproxima do modelo determinista. O tamanho do sistema pode ser usado para converter as concentrações usadas no modelo determinista em número de moléculas.

As constantes de velocidade usadas para a simulação estocástica e as usadas para a simulação determinística são relacionadas, mas não idênticas. As constantes determinísticas dependem da concentração e as estocásticas do número de moléculas. A análise dimensional mostra como as constantes de velocidade clássicas, para as reações de primeira e segunda ordem, podem ser transformadas apropriadamente para serem usadas em simulações estocásticas (GILLESPIE, 1977).

No modelo com volume constante, o tamanho do sistema é controlado pelo parâmetro constante  $\Omega$ , onde  $\Omega$  é proporcional ao tamanho da célula. E, segundo Gérard et al. (2012), fazer  $\Omega = 200 [L/\mu mol]$  é uma aproximação suficientemente boa. Contudo, neste trabalho também será utilizado o seguinte cálculo  $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$ . Foi utilizado neste um volume constante de  $V = 0,334 \text{ pL}$  (pico litros), pois este é o volume médio dos granulócitos humanos (NIBBERING et al., 1990). Neste caso, como  $N_A$  é a constante de Avogrado,  $\Omega = 0,334 \cdot 10^{-12} \cdot 6.022 \cdot 10^{23} \cdot 10^{-6} = 2,00 \cdot 10^5$ . Lembrar que o fator  $10^{-6}$  se deve ao fato de que todas as concentrações estão em  $\mu M$  (micro molar).

Para converter cada equação, deve-se enxergar cada reação separadamente. Uma sendo responsável pela ativação das moléculas (fosforilação) e a outra pela sua desativação (desfosforilação). Além disso, cada parâmetro deve ser convertido de acordo com o tamanho do sistema, ou seja, os parâmetros que possuem unidade  $\mu M$  devem ser multiplicados por  $\Omega$ , tabela 5.2 na página 72.

A versão do modelo estocástico é apresentada na Tabela 4.4. Cada linha desta representa uma reação de ativação ou desativação. Quando a seta está antes do reagente ele esta sendo ativado, quando ela está depois do reagente ele está sendo desativado.

Tabela 4.4: Versão do modelo estocástico.

| Número da reação | Reação              | Propensidade da reação   |
|------------------|---------------------|--|
| 1                | $\rightarrow$ Md    | $v_{sd} \cdot \Omega \cdot \left( \frac{GF}{K_{gf} \cdot \Omega + GF} \right)$   |
| 2                | Md $\rightarrow$    | $V_{dd} \cdot \Omega \cdot \left( \frac{Md}{K_{dd} \cdot \Omega + Md} \right)$   |
| 3                | $\rightarrow$ E2F   | $V_{1e2f} \cdot \left( \frac{E2F_{tot} \cdot \Omega - E2F}{K_{1e2f} \cdot \Omega + E2F_{tot} \cdot \Omega - E2F} \right) \cdot (Md + Me)$      |
| 4                | E2F $\rightarrow$   | $V_{2e2f} \cdot \left( \frac{E2F}{K_{2e2f} \cdot \Omega + E2F} \right) \cdot Ma$   |
| 5                | $\rightarrow$ Me    | $v_{se} \cdot E2F$   |
| 6                | Me $\rightarrow$    | $V_{de} \cdot Ma \cdot \left( \frac{Me}{K_{de} \cdot \Omega + Me} \right)$   |
| 7                | $\rightarrow$ Ma    | $v_{sa} \cdot E2F$   |
| 8                | Ma $\rightarrow$    | $V_{da} \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{Ma}{K_{da} \cdot \Omega + Ma} \right)$  |
| 9                | $\rightarrow$ Mb    | $v_{sb} \cdot Ma$  |
| 10               | Mb $\rightarrow$    | $V_{db} \cdot Cdc20 \cdot \left( \frac{Mb}{K_{db} \cdot \Omega + Mb} \right)$  |
| 11               | $\rightarrow$ Cdc20 | $V_{1cdc20} \cdot Mb \cdot \left( \frac{Cdc20_{tot} \cdot \Omega - Cdc20}{K_{1cdc20} \cdot \Omega + Cdc20_{tot} \cdot \Omega - Cdc20} \right)$ |
| 12               | Cdc20 $\rightarrow$ | $V_{2cdc20} \cdot \Omega \cdot \left( \frac{Cdc20}{K_{2cdc20} \cdot \Omega + Cdc20} \right)$   |

#### 4.4.1 VOLUME VARIÁVEL

Para simular o ciclo celular com volume variável não será necessário modificar as equações descritas na Tabela (4.4). Isto se deve ao fato do modelo estocástico trabalhar diretamente com as moléculas e o aumento do volume não influi diretamente no número de moléculas.

Assim a única alteração necessária, além da inclusão da equação do volume celular, será no termo  $\Omega$ , que deixará de ser constante e irá variar de acordo com o volume celular. O valor de  $\Omega$  seguirá a formula  $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$ , onde  $V_c$  é o volume celular e  $N_A$  é a constante de Avogrado.

Para o volume celular foi utilizada a mesma EDO 4.11. O volume foi simulado deterministicamente usando como  $\Delta t$  aquele computado na simulação estocástica. Além disso, se uma célula não dividir devido as flutuações estocásticas sobre os valores de  $M_i$  a célula

creceria demasiadamente, então o volume máximo foi limitado ao valor de  $0.7pL$ .

## 5 RESULTADOS

Este capítulo apresenta os resultados obtidos com os modelos desenvolvidos, tanto estocástico quanto determinista. Além disto é apresentado também uma análise da influência do parâmetro  $\mu$  sobre a estabilidade do sistema de EDOs.

### 5.1 PARÂMETROS DO MODELO

Antes de mostrar os resultados obtidos, deve-se definir os valores para todos os parâmetros e para as condições iniciais. Assim, nossas simulações utilizaram os valores iniciais da Tabela 5.1 e os parâmetros definidos na tabela 5.2. Os valores com  $\Omega = 1.99 \cdot 10^5 [L/\mu mol]$  foram usados como valores iniciais tanto do modelo com volume constante quando usamos o  $\Omega = 1.99 \cdot 10^5 [L/\mu mol]$ , quanto como valor inicial para o modelo com volume variável. Os parâmetros, no modelo com volume variável se alteram durante a simulação, de acordo com o valor de  $\Omega$ , por isso a tabela de parâmetros para se manter válida para todos os casos manteve os parâmetros do modelo estocástico em função de  $\Omega$ .

Tabela 5.1: Valores iniciais das variáveis de estado do modelo do ciclo celular. Nomes, valores deterministas e estocásticos. Usou-se o fator  $\Omega = 200 [L/\mu mol]$  ou  $\Omega = 1.99 \cdot 10^5 [L/\mu mol]$  para a conversão.

| Nome         | Valor det.      | Valor est. ( $\Omega = 200$ ) | Valor est. ( $\Omega = 1.99 \cdot 10^5$ ) |
|--------------|-----------------|-------------------------------|---|
| <i>Md</i>    | 0,1655 $\mu M$  | 33 <i>moléculas</i>           | 32934 <i>moléculas</i>                    |
| <i>E2F</i>   | 0,0037 $\mu M$  | 1 <i>molécula</i> *           | 736 <i>moléculas</i>                      |
| <i>Me</i>    | 0,0003 $\mu M$  | 1 <i>molécula</i> *           | 60 <i>moléculas</i>                       |
| <i>Ma</i>    | 0,6937 $\mu M$  | 139 <i>moléculas</i>          | 138046 <i>moléculas</i>                   |
| <i>Mb</i>    | 1,0055 $\mu M$  | 201 <i>moléculas</i>          | 200094 <i>moléculas</i>                   |
| <i>Cdc20</i> | 0,4720 $\mu M$  | 94 <i>moléculas</i>           | 93928 <i>moléculas</i>                    |
| $V_0$        | 0,334 <i>pL</i> | -                             | -   |

\* Valores arredondados.



Tabela 5.2: Valores dos parâmetros do modelo de EDO. Nomes, valores deterministas e estocásticos. Após a multiplicação por  $\Omega$  é necessário arredondar o valor para o inteiro para mais próximo.

| Parâmetro           | Valor (determinista) | Valor (estocástico)                    |
|---------------------|----------------------|--|
| $E2F_{tot}$         | $3\mu M$             | $3\Omega$ moléculas                    |
| <i>doublingTime</i> | 18 h                 | 18h                                    |
| $v_{sd}$            | $0,175 \mu M h^{-1}$ | $0,175\Omega$ moléculash <sup>-1</sup> |
| $\mu$               | $0,0385 h^{-1}$      | $0,0385 h^{-1}$                        |
| $K_{gf}$            | $0,1 \mu M$          | $0,1\Omega$ moléculas                  |
| $V_{dd}$            | $0,245 \mu M h^{-1}$ | $0,245\Omega$ moléculash <sup>-1</sup> |
| $K_{dd}$            | $0,1 \mu M$          | $0,1\Omega$ moléculas                  |
| $V_{1e2f}$          | $0,805 h^{-1}$       | $0,805 h^{-1}$                         |
| $V_{2e2f}$          | $0,7 h^{-1}$         | $0,7 h^{-1}$                           |
| $K_{1e2f}$          | $0,01 \mu M$         | $0,01\Omega$ moléculas                 |
| $K_{2e2f}$          | $0,01 \mu M$         | $0,01\Omega$ moléculas                 |
| $v_{se}$            | $0,21 h^{-1}$        | $0,21 h^{-1}$                          |
| $V_{de}$            | $0,35 h^{-1}$        | $0,35 h^{-1}$                          |
| $K_{de}$            | $0,1 \mu M$          | $0,1\Omega$ moléculas                  |
| $v_{sa}$            | $0,175 h^{-1}$       | $0,175 h^{-1}$                         |
| $V_{da}$            | $0,245 h^{-1}$       | $0,245 h^{-1}$                         |
| $K_{da}$            | $0,1 \mu M$          | $0,1\Omega$ moléculas                  |
| $GF$                | $1,0 \mu M$          | $1,0\Omega$ moléculas                  |
| $v_{sb}$            | $0,21 h^{-1}$        | $0,21 h^{-1}$                          |
| $V_{db}$            | $0,28 h^{-1}$        | $0,28 h^{-1}$                          |
| $K_{db}$            | $0,005 \mu M$        | $0,005\Omega$ moléculas                |
| $V_{1cdc20}$        | $0,21 h^{-1}$        | $0,21 h^{-1}$                          |
| $Cdc20_{tot}$       | $5\mu M$             | $5\Omega$ moléculas                    |
| $K_{1cdc20}$        | $1,0 \mu M$          | $\Omega$ moléculas                     |
| $V_{2cdc20}$        | $0,35 \mu M h^{-1}$  | $0,35\Omega$ moléculash <sup>-1</sup>  |
| $K_{2cdc20}$        | $1,0 \mu M$          | $\Omega$ moléculas                     |

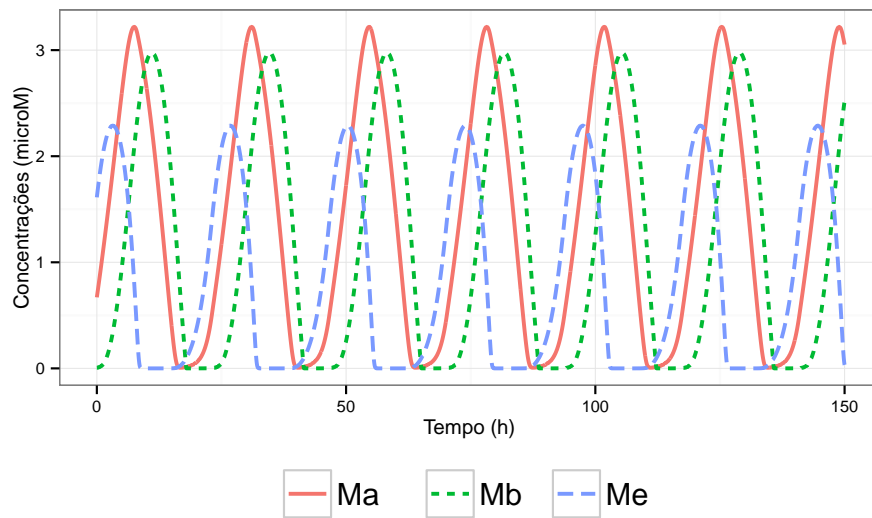
As simulações serão apresentadas nas duas seções seguintes. A primeira com os resultados da simulação determinista e a segunda com os resultados da simulação estocástica.

## 5.2 SIMULAÇÃO DETERMINISTA

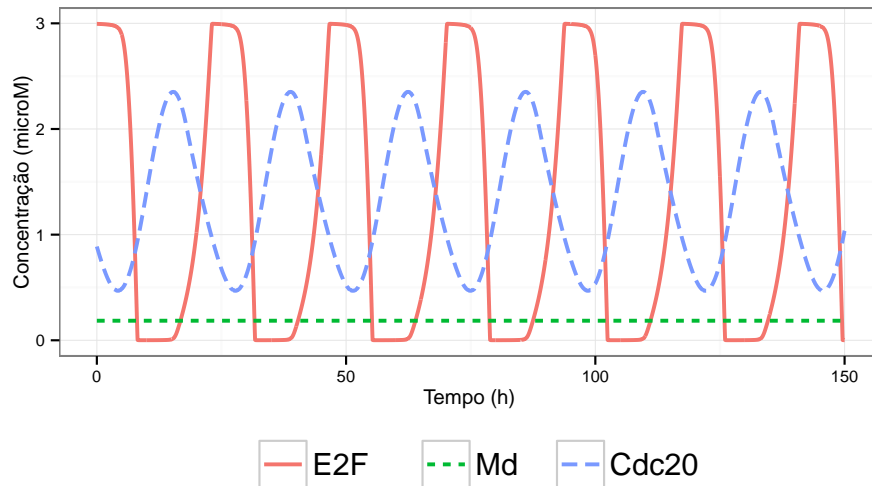
Nessa seção será apresentado o resultado da simulação determinista do ciclo celular. Na divisão celular, cada célula-filha gerada recebe sempre a metade do conteúdo celular da célula-mãe.

A Figura 5.1 mostra os resultados da simulação do modelo com volume constante proposto por Gérard e Goldbeter (2011). Estes resultados estão idênticos aos apresentados em seu trabalho. Desta forma, é possível concluir que a implementação do modelo está correta e pode-se utilizar os resultados para validar o novo modelo aqui proposto.

A Figura 5.2 apresenta os resultados da simulação determinista do modelo com volume celular variável. O primeiro Gráfico 5.2a mostra que o comportamento dos complexos de



(a) Complexos *ciclinaA/Cdk2* ( $M_a$ ), *ciclinaB/Cdk1* ( $M_b$ ) e *ciclinaE/Cdk2* ( $M_e$ ).

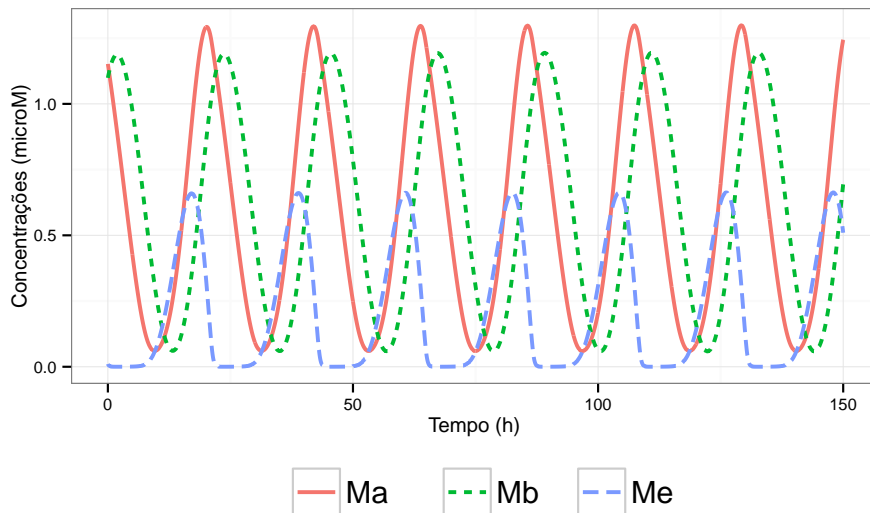


(b) Complexo *ciclinaD/Cdk4-6* ( $M_d$ ), fator de transcrição *E2F* e proteína *Cdc20*.

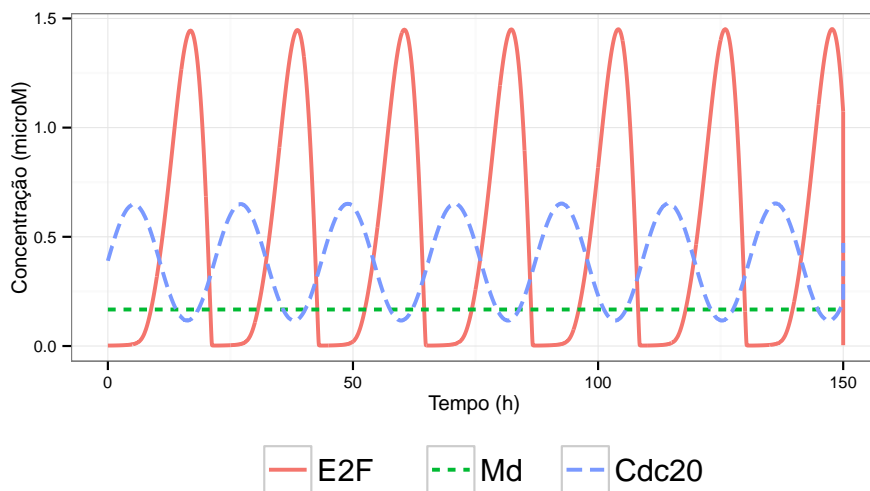
Figura 5.1: Simulação determinista do modelo com volume constante (GÉRARD; GOLDBETER, 2011).

*ciclinaA/Cdk2*, *ciclinaB/Cdk1* e *ciclinaE/Cdk2* é similar ao modelo original ao longo do tempo, contudo ele apresenta concentrações mais baixas. Isto pode ser explicado pelo fator da diluição (adicionado pelo volume variável) diminuir as concentrações. O segundo gráfico 5.2b também apresenta resultados para o modelo com volume variável, mas desta vez para o complexo *ciclinaD/Cdk4-6*, para o fator de transcrição *E2F* e para a proteína *Cdc20*. Os resultados tem um comportamento ao longo do tempo semelhante ao original com o tempo entre picos muito próximo ao original. Apresenta também a redução esperada nas concentrações, contudo desta vez ela não manteve a relação entre os reagentes. Pode-se

observar que a concentração da proteína *Cdc20* cai abaixo da concentração do complexo *ciclinaD/Cdk4 – 6*, o que não ocorria no modelo anterior.



(a) Complexos *ciclinaA/Cdk2* ( $M_a$ ), *ciclinaB/Cdk1* ( $M_b$ ) e *ciclinaE/Cdk2* ( $M_e$ ).



(b) Complexo *ciclinaD/Cdk4 – 6* ( $M_d$ ), fator de transcrição *E2F* e proteína *Cdc20*.

Figura 5.2: Simulação determinista do modelo com volume variável.

A Figura 5.3 mostra a variação do volume celular ao longo do tempo, nela é possível observar que o volume cresce exponencialmente até que seu volume praticamente dobre e a célula se divida em duas. Neste momento, o volume volta praticamente ao seu valor original. Este é o comportamento esperado em células em processo de mitose. Logo, pode-se concluir que o modelo representa de forma satisfatória o processo mitótico.

A Figura 5.4 mostra a concentração do complexo *ciclinaB/Cdk1* ao longo do tempo para ambos os modelos no mesmo gráfico. Ao analisar este gráfico nota-se que as concen-

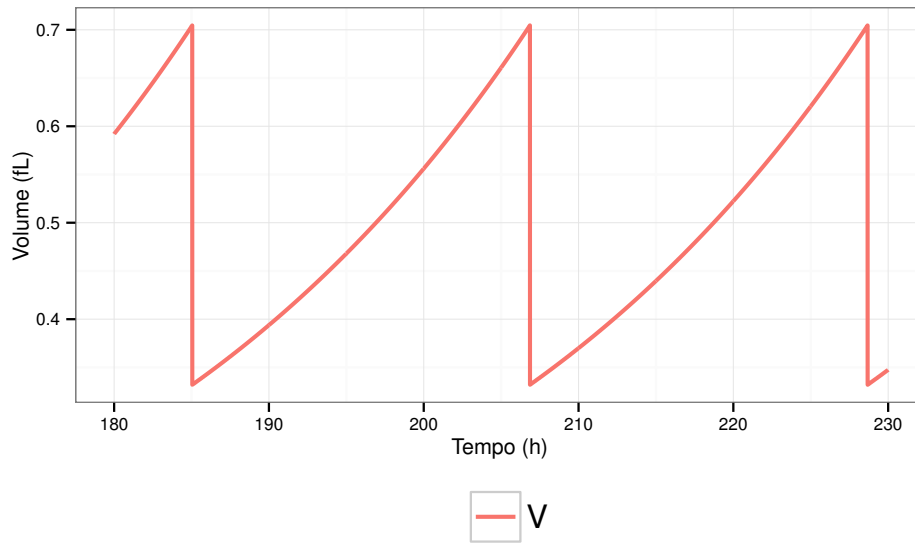


Figura 5.3: Simulação determinista do volume celular ( $V$ ) do modelo com volume variável.

trações no modelo são inferiores às apresentadas no modelo com volume constante. Isto pode ser explicado, pois o mesmo número de moléculas apresenta concentrações diferentes em diferentes volumes. Além disto, é notável um pequeno avanço no ciclo celular no novo modelo, isto também é explicado pelo variação do volume que afeta a concentração máxima dos compostos e conseqüentemente a velocidade das reações. Apesar destas pequenas diferenças vê-se que ambos os modelos tem um comportamento qualitativo semelhante.

A Figura 5.5 mostra o complexo *ciclinaB/Cdk1* ao longo de um único ciclo celular para ambos os modelos. Nota-se que a inclusão do volume celular reduziu o tamanho do ciclo celular por um pequeno fator. Para ser exato o ciclo celular do modelo com volume constante tem 23,573 horas e o do modelo com volume variável tem 21,816 horas. Contudo, essa pequena redução não descaracteriza o modelo. Além disso, é possível ver que a concentração do complexo *ciclinaB/Cdk1* varia de forma mais suave, atingindo tanto picos menores quando mínimas superiores. Isto se deve ao fator de diluição que amortiza a variação dos compostos.

A Figura 5.6 mostra o plano de fases  $M_a \times M_b$  para três valores chaves do novo parâmetro  $\mu$ . Primeiro, é mostrado o plano de fases para o valor  $\mu = 0,0385$ , que é o valor utilizado nas nossas simulações. Neste caso pode-se notar que um ciclo limite perfeito é formado (Fig 5.6a). Um segundo caso é quando  $\mu = 0,11$ , exatamente o valor onde ocorre a bifurcação do tipo Hopf vista anteriormente. Para este valor é possível observar que o ciclo limite não é atingido e com o passar do tempo o tamanho do ciclo

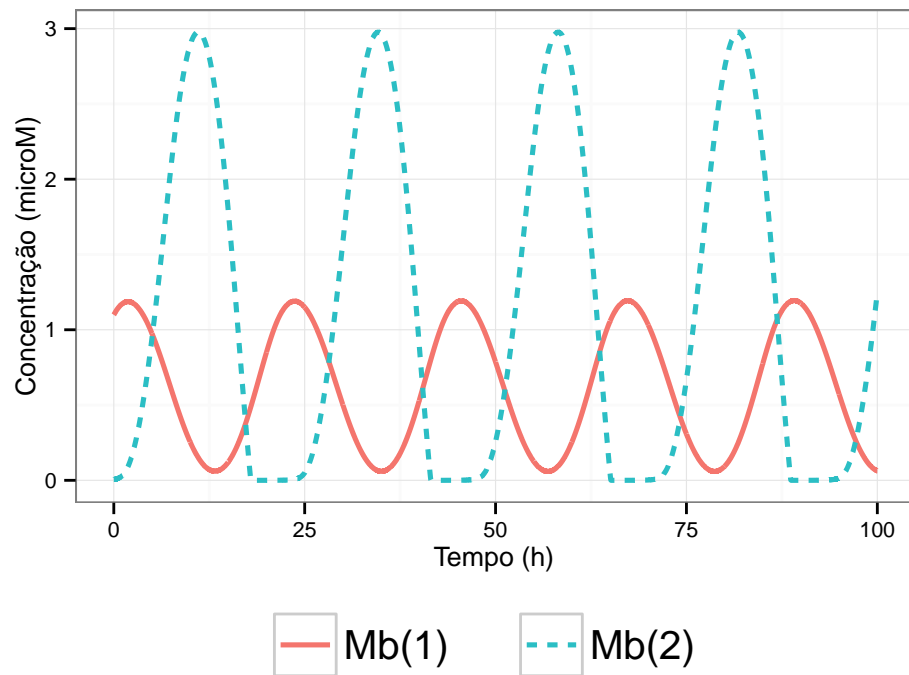


Figura 5.4: Simulação determinista do complexo de *ciclinaB/Cdk1* do modelo com volume variável Mb(1) e do modelo com volume constante Mb(2) (GÉRARD; GOLDBETER, 2011).

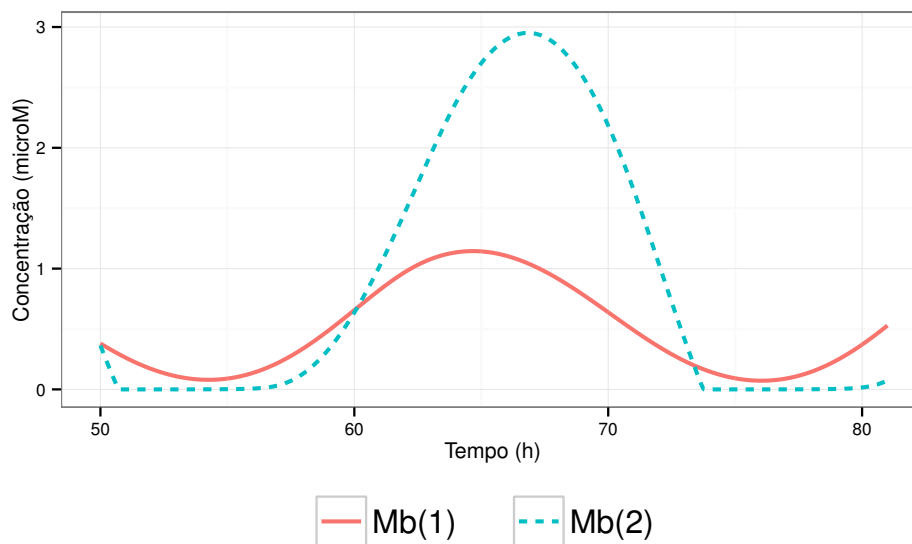


Figura 5.5: Simulação determinista de um único ciclo do complexo de *ciclinaB/Cdk1* do modelo com volume variável Mb(1) e do modelo com volume constante Mb(2) (GÉRARD; GOLDBETER, 2011).

diminui formando efetivamente uma espiral convergindo para um ponto (Fig 5.6b). Já quando  $\mu = 0,2$ , ou seja após a bifurcação, o ciclo também não é formado, convergindo

rapidamente para um valor fixo (Fig 5.6c). Assim podemos concluir que o ponto de equilíbrio passou a ser estável após a bifurcação de Hopf, impedindo assim a formação de ciclos limites.

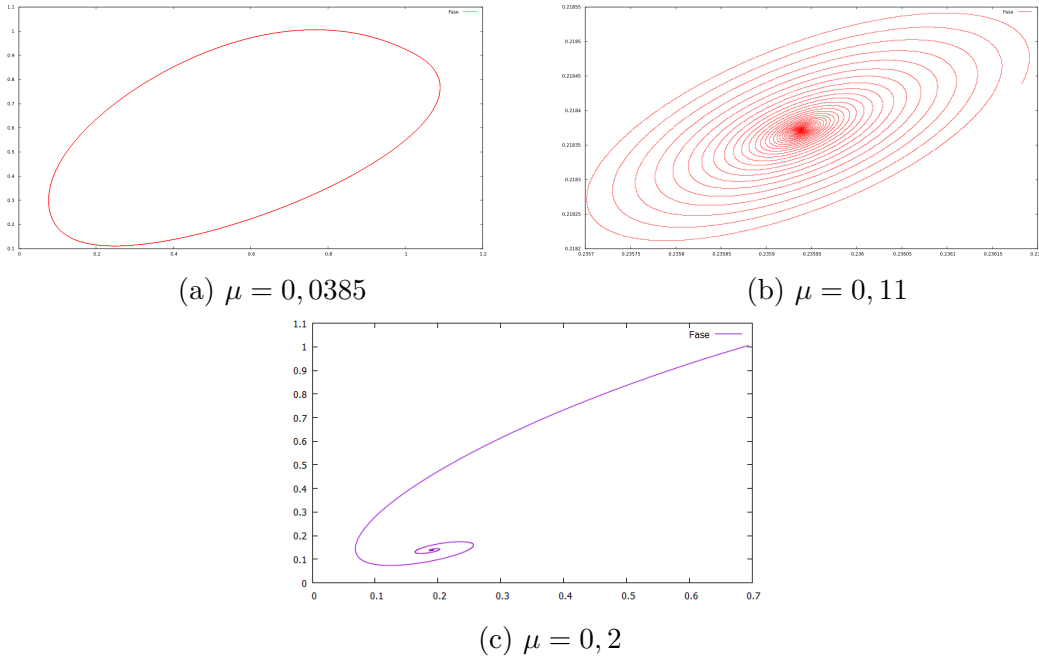


Figura 5.6: Plano de fases  $M_a \times M_b$  para alguns valores chaves de  $\mu$ .

O modelo com volume variável pode ser validado através das comparações com o modelo de Gérard e Goldbeter (2011), um modelo já conhecido e validado. Além disso, é fácil verificar que a inclusão do volume não afetou a estabilidade do sistema, pois de acordo com a análise a estabilidade do modelo só é afetada para valores muito altos para o parâmetro  $\mu$ . Desta forma, pode-se concluir que o modelo mantém o sistema estável e ainda seguindo o comportamento do ciclo celular enquanto ainda adiciona informações relevantes do ponto vista prático. Pois é muito simples verificar o volume celular e a partir dele e do modelo poderíamos extrair informações a respeito do ciclo celular.

### 5.3 SIMULAÇÃO ESTOCÁSTICA

Nesta seção serão vistos os resultados obtidos ao fazer a simulação estocástica do ciclo celular. Primeiro será mostrado o resultado da simulação para o modelo proposto por Gérard e Goldbeter (2011). Em seguida o mesmo modelo mas utilizando o  $\Omega$  calculado de acordo como o volume de  $0,334pL$ , volume médio de um granulócito humano (NIBBERING et al., 1990). Por fim será mostrado o resultado do modelo com volume

variável. Para o caso do  $\Omega$  calculado de acordo como o volume de  $0,334pL$  e do modelo com variável, será apresentado os resultados tanto em concentração quanto em número de moléculas. Isto facilitará a comparação dos resultados estocásticos com os resultados do modelo determinista que são dados em termos da concentração.

A Figura 5.7 mostra o resultado da simulação estocástica (valor médio) do modelo de Gérard e Goldbeter (2011), inclusive com o mesmo valor de  $\Omega = 200$  que eles utilizaram. Pode-se observar que os resultados aqui apresentados são praticamente idênticos aos obtidos no referido trabalho. Assim, também é possível validar o modelo estocástico. Os resultados apresentados nos gráficos são uma média de 500 simulações.

A Figura 5.8 é resultado da simulação estocástica do mesmo modelo, contudo agora utiliza-se como valor de  $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$ , onde o  $V_c$  é o volume celular de  $0,334pL$  e  $N_A$  é a constante de Avogadro com valor de  $6.022 \cdot 10^{23}$ .

Já o gráfico 5.9 mostra a concentração de cada componente obtida pela mesma simulação estocástica, sendo agora possível comparar o seu valor com a simulação determinista apresentada na seção anterior. Para obter a concentração  $C$  foi realizado o calculo inverso  $C = \frac{N_m}{\Omega}$ .

A Figura (5.10) mostra a simulação estocástica do modelo com volume variável. Ao analisar o resultado é possível observar que apesar de próximas, as trajetórias são distintas. Elas apresentam uma maior variação no ponto onde ocorre as divisões, devido a ser um evento que influência de forma significativa o número de moléculas em um único instante de tempo. A fórmula  $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$  é mantida. Porém desta vez o volume  $V_c$  não é constante, logo  $\Omega$  varia conforme o volume celular varia.

Por fim a Figura 5.11 mostra o resultado da simulação estocástica do modelo proposto neste trabalho com volume variável. A fórmula  $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$  é mantida. O volume  $V_c$  novamente não é constante e o  $\Omega$  varia de acordo com o volume celular.

Também apresentamos, como no modelo com volume constante, o gráfico da concentração na Figura 5.12. Diferentemente do que aconteceu no modelo anterior ao plotar a concentração o gráfico se altera de forma mais significativa, pois não está mais sendo multiplicado por uma constante já que o  $\Omega$  varia ao longo do tempo. Pode-se ver que o gráfico da concentração se aproxima mais dos resultados obtidos no modelo determinista. Isto já era esperado, pois o modelo determinista usa concentrações.

Ao final dos resultados é possível validar a abordagem estocástica, pois esta apresenta

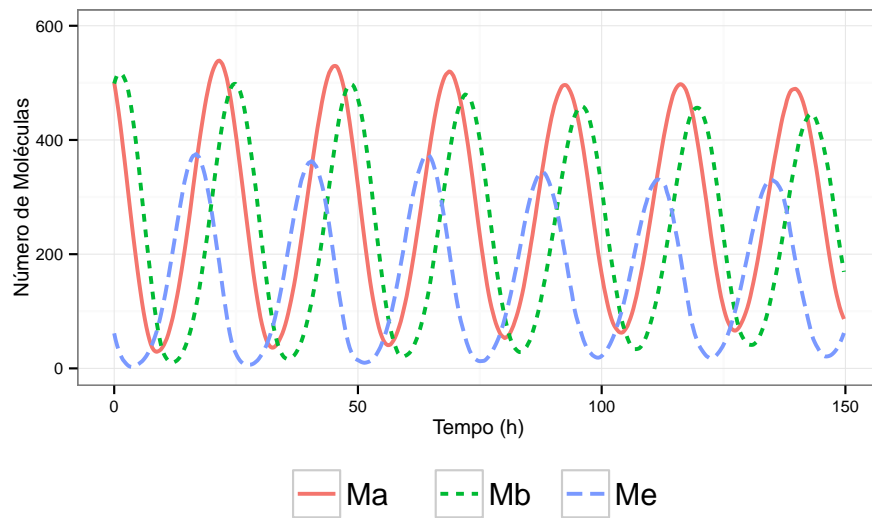
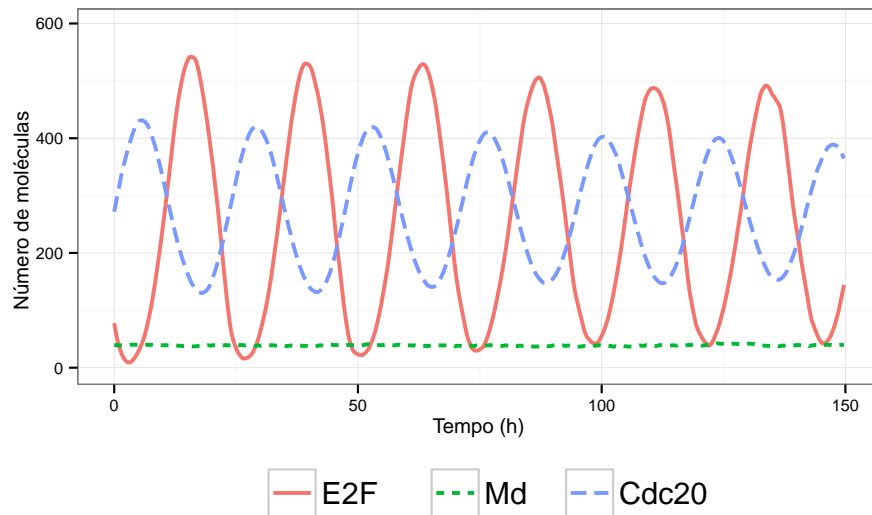
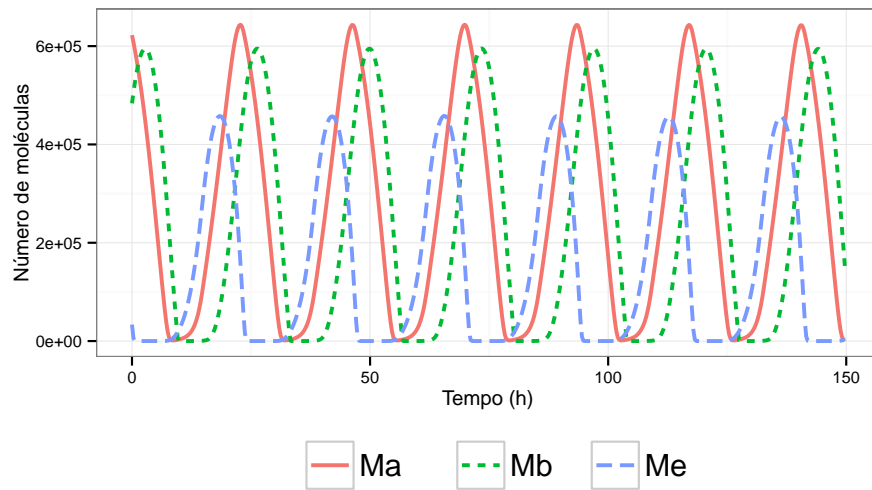
(a) complexos *ciclinaA/Cdk2*, *ciclinaB/Cdk1* e *ciclinaE/Cdk2*(b) Complexo *ciclinaD/Cdk4-6*, fator de transcrição *E2F* e proteína *Cdc20*

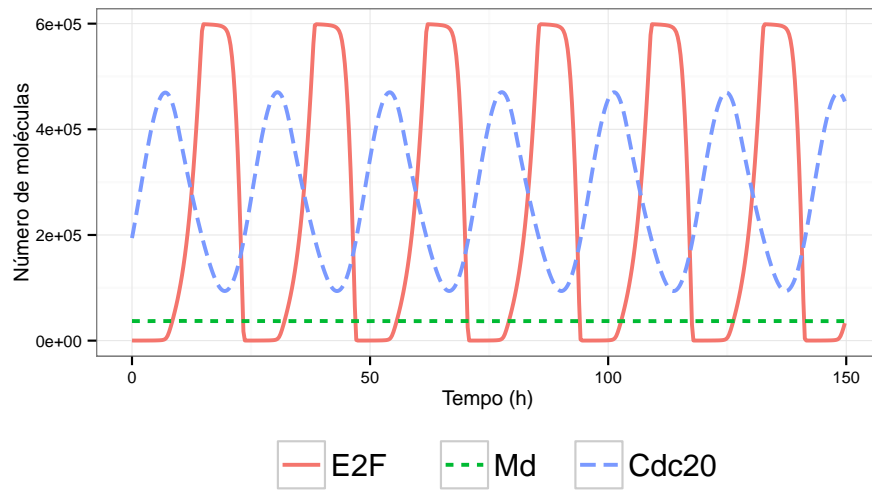
Figura 5.7: Simulação estocástica do modelo com volume constante e  $\Omega = 200$  (GÉRARD; GOLDBETER, 2011). O resultado é uma média de 500 simulações.

um comportamento semelhante ao comportamento obtido no modelo determinista. Além é claro, de muito semelhante também ao modelo estocástico visto em Gérard e Goldbeter (2011). Pode-se observar também como analisar o número de moléculas e a concentração são diferentes quando o volume não é constante. Por isso ao comparar o modelo e o determinista é preciso sempre utilizar a concentração, já que o volume varia explicitamente.



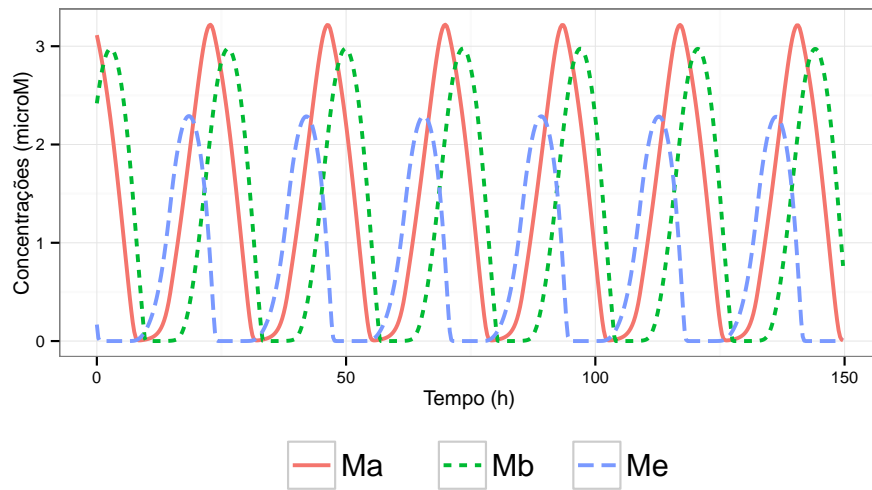


(a) Complexos *ciclinaA/Cdk2*, *ciclinaB/Cdk1* e *ciclinaE/Cdk2*.

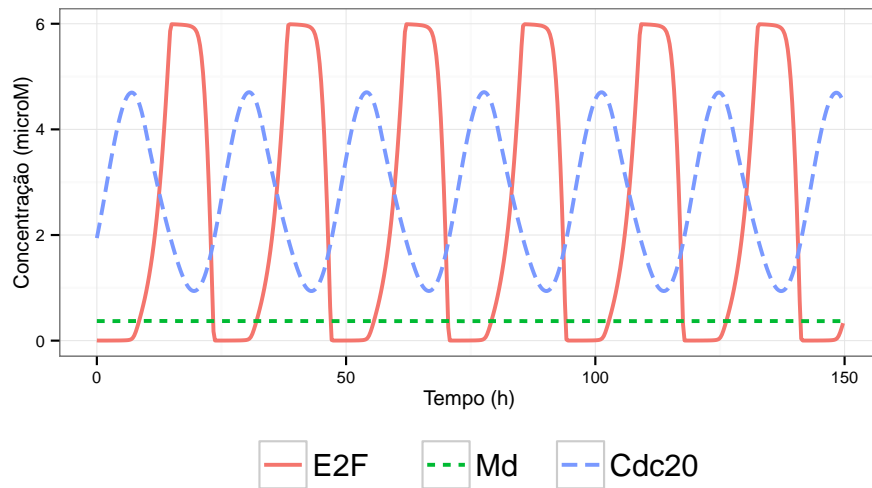


(b) Complexo *ciclinaD/Cdk4-6*, fator de transcrição *E2F* e proteína *Cdc20*.

Figura 5.8: Simulação estocástica do modelo com volume constante e  $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$ . O resultado é uma média de 500 simulações.



(a) Complexos *ciclinaA/Cdk2*, *ciclinaB/Cdk1* e *ciclinaE/Cdk2*.



(b) Complexo *ciclinaD/Cdk4-6*, fator de transcrição *E2F* e proteína *Cdc20*.

Figura 5.9: Concentrações na simulação estocástica no modelo com volume constante e  $\Omega = V_c \cdot N_A \cdot 10^{-6}$ . O resultado é uma média de 500 simulações.

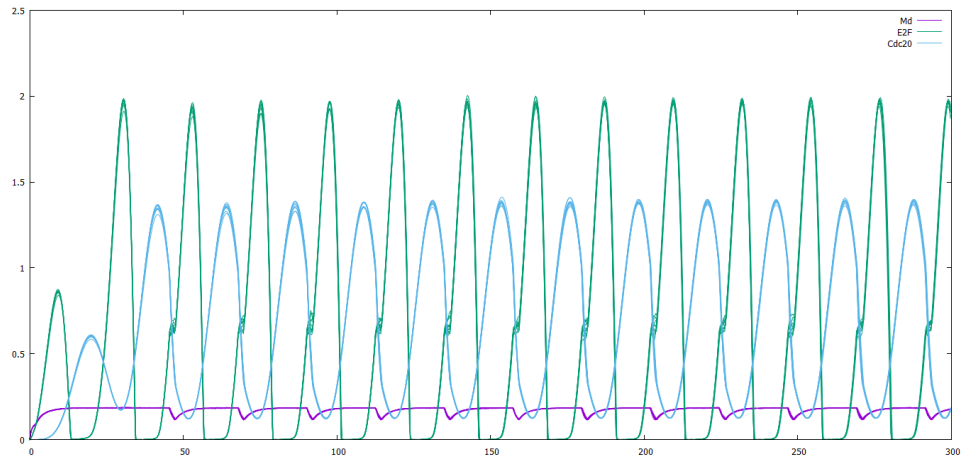
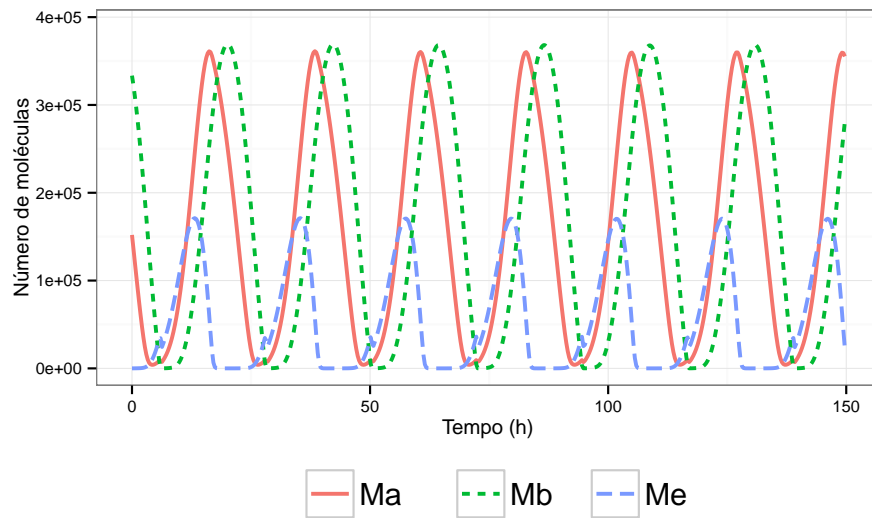
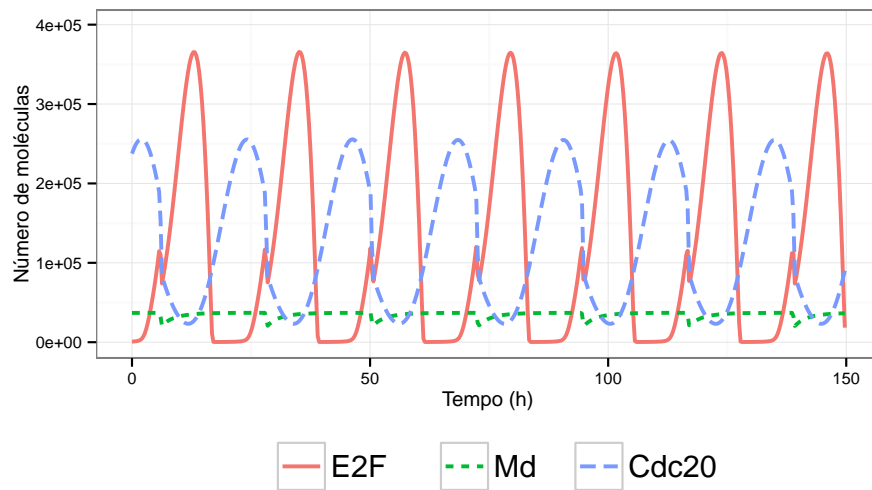


Figura 5.10: Simulação estocástica de 10 trajetórias do complexo *ciclinaD/Cdk4 – 6*, do fator de transcrição *E2F* e da proteína *Cdc20* no modelo com volume variável. Os valores estão dados em concentração.

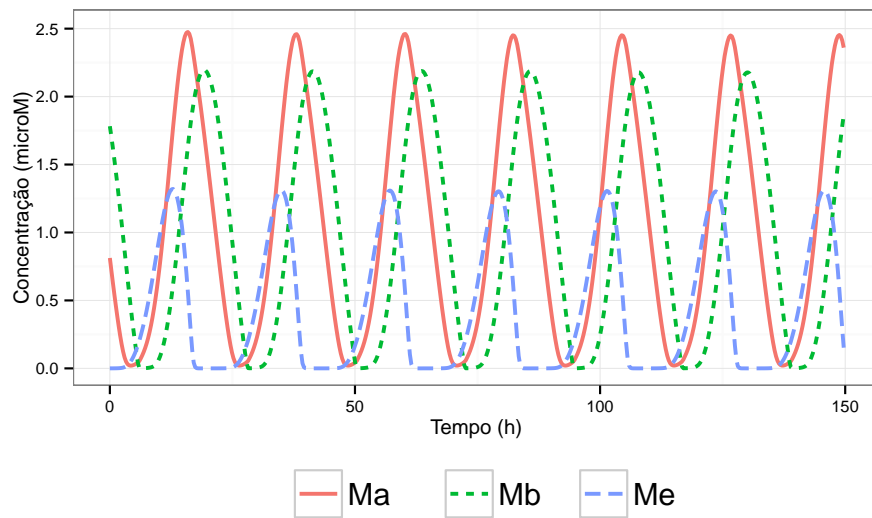


(a) Complexos *ciclinaA/Cdk2*, *ciclinaB/Cdk1* e *ciclinaE/Cdk2*.

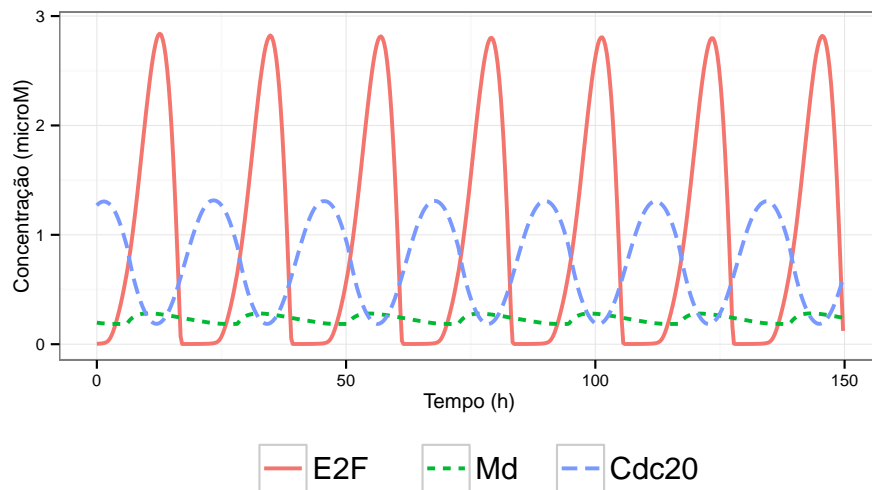


(b) Complexo *ciclinaD/Cdk4-6*, fator de transcrição *E2F* e proteína *Cdc20*.

Figura 5.11: Simulação estocástica do modelo com volume variável. O resultado é uma média de 500 simulações.



(a) Complexos *ciclinaA/Cdk2*, *ciclinaB/Cdk1* e *ciclinaE/Cdk2*.



(b) Complexo *ciclinaD/Cdk4 – 6*, fator de transcrição *E2F* e proteína *Cdc20*.

Figura 5.12: Simulação estocástica do modelo com volume variável. O resultado é a concentração média de 500 simulações.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e apresentado um novo modelo matemático para o ciclo celular de células de mamíferos, que além de modelar a concentração dos compostos-chaves para regulação do ciclo celular, leva em consideração explicitamente a variação do volume celular. Por fim o modelo também leva em consideração a divisão celular de forma explícita. Ou seja, quando as condições para a divisão celular já estão concluídas a célula se divide em duas, cada qual contendo metade do volume celular.

Foi feita uma análise da influência do novo parâmetro  $\mu$  sobre a estabilidade do modelo e concluiu-se que somente valores muito altos para este parâmetro afetariam a estabilidade do modelo. Como valores desta magnitude não são valores viáveis do ponto de vista fisiológico, foi possível concluir que o parâmetro pouco influi sobre a estabilidade do sistema. Isto foi confirmado analisando os resultados, pois fica evidente que o comportamento do modelo segue inalterado. Permanecendo a estrutura cíclica do ciclo celular.

Assim, pode-se concluir que o modelo determinista aqui proposto é uma boa contribuição para a literatura, visto que estende um modelo já conhecido de forma a levar em consideração uma nova informação muito relevante, que é o volume celular. Esta contribuição pode ser de grande valia, pois o volume celular pode ser mais facilmente medido que as concentrações dos compostos de ciclina.

### 6.1 TRABALHOS FUTUROS

Os modelos do ciclo celular são de extrema importância prática, visto que existem tanto doenças, como fármacos que afetam o ciclo celular. Desta forma existem inúmeras possibilidades de extensão deste trabalho, dentre as quais destacam-se duas.

A primeira seria a inclusão dos efeitos de um fármaco sobre o ciclo celular. Dentre os diversos fármacos, destacam-se os da família cisplatina, que mudam a conformação do DNA e inibem sua síntese. Também podem ligar-se as bases, formando pares anormais que determinam o desenrolamento do DNA. A Cisplatina tem sido classificada como agente alquilante não-específico sobre o ciclo celular. Portanto, a cisplatina pode ser incluída no modelo de forma que ela atue na fase S, pois na fase S do ciclo celular é que ocorre a síntese do DNA.

Outra família de fármacos de grande destaque que poderia ser incluído no modelo é a família paclitaxel (Taxol) que exerce efeito citotóxico sobre os microtúbulos das células. Este efeito é obtido através de sua ligação à tubulina, impedindo assim sua despolarização. A estabilização dos microtúbulos resulta em inibição da reorganização dinâmica normal que constitui função essencial para a mitose celular. Portanto, o Taxol pode ser incluído no modelo de forma que ele atue na fase M, pois na fase M do ciclo celular é que ocorre a migração dos cromossomos para polos opostos da célula, através dos microtúbulos.

Por fim, o modelo pode ser adaptado de forma a simular o comportamento de células cancerígenas. Desta forma seria possível entender qual parte do sistema de regulação do ciclo celular que está sendo afetada, guiando assim a escolha dos medicamentos mais adequados de acordo com a sua área de atuação sobre o ciclo celular. Poderia também ser usado para guiar o desenvolvimento de novas drogas, ao facilitar a validação dos efeitos do novo fármaco tanto sobre o ciclo celular de uma célula comum, quanto sobre o de uma célula cancerígena.

## REFERÊNCIAS

- AGUDA, B.; TANG, Y. The kinetic origins of the restriction point in the mammalian cell cycle. **Cell proliferation**, v. 32, n. 5, p. 321–335, 1999.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RARR, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da biologia celular. **Artmed**, 2011.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia molecular da célula. **Artmed**, 2010.
- ALFIERI, R.; BARBERIS, M.; CHIARADONNA, F.; GAGLIO, D.; MILANESI, L.; VANONI, M.; KLIPP, E.; ALBERGHINA, L. Towards a systems biology approach to mammalian cell cycle: modeling the entrance into s phase of quiescent fibroblasts after serum stimulation. **BMC bioinformatics**, v. 10, p. S16, 2009.
- ANTHONY, J. G.; SUSAN, R. W.; RICHARD, C. L.; WILLIAM, M. G.; DAVID, T. S. Introdução à genética. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Grupo GEN)**, 2013.
- BORISUK, M. T.; TYSON, J. J. Bifurcation analysis of a model of mitotic control in frog eggs. **Journal of Theoretical Biology**, v. 195, n. 1, p. 69–85, 1998.
- BRAUNEWELL, S.; BORNHOLDT, S. Superstability of the yeast cell-cycle dynamics: ensuring causality in the presence of biochemical stochasticity. **Journal of theoretical biology**, v. 245, n. 4, p. 638–643, 2007.
- BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **Biochemical journal**, v. 19, n. 2, p. 338, 1925.
- CHARVIN, G.; OIKONOMOU, C.; SIGGIA, E. D.; CROSS, F. R. Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. **PLoS Biol**, v. 8, n. 1, p. e1000284, 2010.
- CHEN, K. C.; CALZONE, L.; CSIKASZ-NAGY, A.; CROSS, F. R.; NOVAK, B.; TYSON, J. J. Integrative analysis of cell cycle control in budding yeast. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 8, p. 3841–3862, 2004.



- CHIGNOLA, R.; MILOTTI, E. A phenomenological approach to the simulation of metabolism and proliferation dynamics of large tumour cell populations. **Physical biology**, IOP Publishing, v. 2, n. 1, p. 8, 2005.
- CILIBERTO, A.; NOVAK, B.; TYSON, J. J. Mathematical model of the morphogenesis checkpoint in budding yeast. **The Journal of cell biology**, v. 163, n. 6, p. 1243–1254, 2003.
- CSIKÁSZ-NAGY, A. Computational systems biology of the cell cycle. **Briefings in bioinformatics**, v. 10, n. 4, p. 424–434, 2009.
- DHOOGHE, A.; GOVAERTS, W.; KUZNETSOV, Y. A. Matcont: a matlab package for numerical bifurcation analysis of odes. **ACM Transactions on Mathematical Software (TOMS)**, ACM, v. 29, n. 2, p. 141–164, 2003.
- DOWLING, M. R.; KAN, A.; HEINZEL, S.; ZHOU, J. H.; MARCHINGO, J. M.; WEL-LARD, C. J.; MARKHAM, J. F.; HODGKIN, P. D. Stretched cell cycle model for proliferating lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6377–6382, 2014.
- EISENTHAL, R.; CORNISH-BOWDEN, A. The direct linear plot. a new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. **Biochemical Journal**, v. 139, n. 3, p. 715–720, 1974.
- ELOWITZ, M. B.; LEVINE, A. J.; SIGGIA, E. D.; SWAIN, P. S. Stochastic gene expression in a single cell. **Science**, v. 297, n. 5584, p. 1183–1186, 2002.
- FERRELL, J. E.; TSAI, T. Y.-C.; YANG, Q. Modeling the cell cycle: why do certain circuits oscillate. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 874–885, 2011.
- FISHER, D.; KRASINSKA, L.; COUDREUSE, D.; NOVÁK, B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. **Journal of cell science**, v. 125, n. 20, p. 4703–4711, 2012.
- GE, H.; QIAN, H.; QIAN, M. Synchronized dynamics and non-equilibrium steady states in a stochastic yeast cell-cycle network. **Mathematical biosciences**, v. 211, n. 1, p. 132–152, 2008.

- GÉRARD, C.; GOLDBETER, A. A skeleton model for the network of cyclin-dependent kinases driving the mammalian cell cycle. **Interface Focus**, p. rsfs20100008, 2011.
- GÉRARD, C.; GONZE, D.; GOLDBETER, A. Effect of positive feedback loops on the robustness of oscillations in the network of cyclin-dependent kinases driving the mammalian cell cycle. **FEBS Journal**, v. 279, n. 18, p. 3411–3431, 2012.
- GIBSON, M. A.; BRUCK, J. Efficient exact stochastic simulation of chemical systems with many species and many channels. **The journal of physical chemistry A**, v. 104, n. 9, p. 1876–1889, 2000.
- GILLESPIE, D. T. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. **Journal of computational physics**, v. 22, n. 4, p. 403–434, 1976.
- GILLESPIE, D. T. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. **The journal of physical chemistry**, v. 81, n. 25, p. 2340–2361, 1977.
- GOLDBETER, A. A minimal cascade model for the mitotic oscillator involving cyclin and cdc2 kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 20, p. 9107–9111, 1991.
- GOLDBETER, A.; GUILMOT, J.-M. Arresting the mitotic oscillator and the control of cell proliferation: insights from a cascade model for cdc2 kinase activation. **Experientia**, v. 52, n. 3, p. 212–216, 1996.
- GOLDBETER, A.; KOSHLAND, D. E. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 78, n. 11, p. 6840–6844, 1981.
- HILL, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **J Physiol (Lond)**, v. 40, p. 4–7, 1910.
- HUREWICZ, W. **Lectures on ordinary differential equations**, 1964.
- KAMPEN, N. G. V. Stochastic processes in physics and chemistry. **Elsevier**, v. 1, 1992.

- KLIPP, E.; HERWIG, R.; KOWALD, A.; WIERLING, C.; LEHRACH, H. Systems biology in practice: concepts, implementation and application. **John Wiley & Sons**, 2008.
- LI, B.; SHAO, B.; YU, C.; OUYANG, Q.; WANG, H. A mathematical model for cell size control in fission yeast. **Journal of theoretical biology**, v. 264, n. 3, p. 771–781, 2010.
- LI, J.-M.; BROOKS, G. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system; potential targets for therapy. **European heart journal**, v. 20, n. 6, p. 406–420, 1999.
- LODISH, H. F.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. et al. Molecular cell biology. **Citeseer**, v. 4, 2000.
- MAGNO, A. C. G. **Inflência do Volume Celular sobre a Dinâmica do Ciclo de Células de Mamíferos**. Monografia (Monography) — Universidade Federal de Juiz de Fora Advisor: Itamar Leite de Oliveira, 2015.
- MALACINSKI, G. M.; MOTTA, P. A. Fundamento de biologia molecular. **Guanabara Koogan**, 2005.
- MCADAMS, H. H.; ARKIN, A. Stochastic mechanisms in gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 3, p. 814–819, 1997.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochem. z**, v. 49, n. 333-369, p. 352, 1913.
- MURA, I.; CSIKÁSZ-NAGY, A. Stochastic petri net extension of a yeast cell cycle model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 254, n. 4, p. 850–860, 2008.
- NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**, 2008.
- NIBBERING, P. H.; ZOMERDIJK, T. P.; TILBURG, A. J. C.-V.; FURTH, R. V. Mean cell volume of human blood leucocytes and resident and activated murine macrophages. **Journal of immunological methods**, Elsevier, v. 129, n. 1, p. 143–145, 1990.
- NOREL, R.; AGUR, Z. A model for the adjustment of the mitotic clock by cyclin and mpf levels. **Science**, v. 251, n. 4997, p. 1076–1078, 1991.

- NOVAK, B.; CSIKASZ-NAGY, A.; GYORFFY, B.; CHEN, K.; TYSON, J. J. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the g1/s, g2/m and metaphase/anaphase transitions. **Biophysical chemistry**, v. 72, n. 1, p. 185–200, 1998.
- NOVAK, B.; TYSON, J. J. Modeling the cell division cycle: M-phase trigger, oscillations, and size control. **Journal of theoretical biology**, v. 165, n. 1, p. 101–134, 1993.
- NOVAK, B.; TYSON, J. J. Numerical analysis of a comprehensive model of m-phase control in xenopus oocyte extracts and intact embryos. **Journal of cell science**, v. 106, n. 4, p. 1153–1168, 1993.
- NOVAK, B.; TYSON, J. J. Modeling the control of dna replication in fission yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 17, p. 9147–9152, 1997.
- NOVÈRE, N. L. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. **Nature Reviews Genetics**, 2015.
- OBEYESEKERE, M. N.; TUCKER, S. L.; ZIMMERMAN, S. O. Mathematical models for the cellular concentrations of cyclin and mpf. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 184, n. 2, p. 782–789, 1992.
- OKABE, Y.; SASAI, M. Stable stochastic dynamics in yeast cell cycle. **Biophysical journal**, v. 93, n. 10, p. 3451–3459, 2007.
- OLIVEIRA, I. L. Análise computacional de redes metabólicas com regulação. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Tese de Doutorado, Florianópolis, SC, 2008.
- PAHLE, J. Biochemical simulations: stochastic, approximate stochastic and hybrid approaches. **Briefings in bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 53–64, 2009.
- POMERENING, J. R.; KIM, S. Y.; FERRELL, J. E. Systems-level dissection of the cell-cycle oscillator: bypassing positive feedback produces damped oscillations. **Cell**, v. 122, n. 4, p. 565–578, 2005.
- POMERENING, J. R.; SONTAG, E. D.; FERRELL, J. E. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of cdc2. **Nature cell biology**, v. 5, n. 4, p. 346–351, 2003.

- POWATHIL, G. G.; GORDON, K. E.; HILL, L. A.; CHAPLAIN, M. A. Modelling the effects of cell-cycle heterogeneity on the response of a solid tumour to chemotherapy: biological insights from a hybrid multiscale cellular automaton model. **Journal of theoretical biology**, v. 308, p. 1–19, 2012.
- SANDLER, O.; MIZRAHI, S. P.; WEISS, N.; AGAM, O.; SIMON, I.; BALABAN, N. Q. Lineage correlations of single cell division time as a probe of cell-cycle dynamics. **Nature**, v. 519, n. 7544, p. 468–471, 2015.
- SILVA, C. de Lellis Falcão da. **Novos Algoritmos de Simulação Estocástica com Atraso para Redes Gênicas**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Ciência da Computação, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação, 2014.
- SOUZA, G. H. de. **Bifurcação de Hopf em sistemas de equações diferenciais com simetria**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Matemática, Programa de Pós-Graduação em Matemática, 2015.
- STEUER, R. Effects of stochasticity in models of the cell cycle: from quantized cycle times to noise-induced oscillations. **Journal of theoretical biology**, v. 228, n. 3, p. 293–301, 2004.
- TSAI, T. Y.-C.; CHOI, Y. S.; MA, W.; POMERENING, J. R.; TANG, C.; FERRELL, J. E. Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. **Science**, v. 321, n. 5885, p. 126–129, 2008.
- TYSON, J. J. Modeling the cell division cycle: cdc2 and cyclin interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7328–7332, 1991.
- TYSON, J. J.; NOVAK, B. Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 210, n. 2, p. 249–263, 2001.
- YAO, G.; LEE, T. J.; MORI, S.; NEVINS, J. R.; YOU, L. A bistable rb–e2f switch underlies the restriction point. **Nature cell biology**, v. 10, n. 4, p. 476–482, 2008.

ZHANG, Y.; QIAN, M.; OUYANG, Q.; DENG, M.; LI, F.; TANG, C. Stochastic model of yeast cell-cycle network. **Physica D: Nonlinear Phenomena**, v. 219, n. 1, p. 35–39, 2006.

ZILL, D. G.; CULLEN, M. R. **Equações diferenciais. vol. 2. Trad. Alfredo Alves de Farias**, 2001.