

Identificação de Padrões Celulares por Cálculo de Atratores em Sistemas Dinâmicos Discretos

Luiz C. S. Rozante¹ and Marco D. Gubitoso²

¹ Centro de Matemática, Cognição e Computação
Universidade Federal do ABC, Santo André - SP, Brasil
luiz.rozante@gmail.com

² Instituto de Matemática e Estatística
Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil
marco.gubitoso@gmail.com

Abstract. Juxtacrine signaling is an important intercellular communication, in which the receptor of the signal as well as the ligand are anchored in the plasma membranes. J-Systems are a framework of discrete modeling of juxtacrine signaling systems which are defined as a class of dynamical systems with discrete time and space and state variables that can be continuous and discrete. We propose a method for identification of cellular patterns, modulated by juxtacrine interactions, via attractor calculation in a subclass of J-Systems constituted of finite discrete dynamical systems. We have built a J-System discrete model for the neurogenic network, describing its participation in the neuroblast segregation in *Drosophila melanogaster*. We were able to reproduce the best established and documented experiments involving the key molecular elements of the Delta-Notch system *in silico*. The obtained results were compatible with the already known experimental results.

1 Introdução

Sinalização *justácrina* (do inglês *juxtacrine*) [3] é vital em vários momentos do desenvolvimento e na manutenção dos tecidos como, por exemplo, na neurogênese em *D. melanogaster* [1] e no desenvolvimento anterior de vertebrados [6], entre outros. Definimos um *Sistema de Sinalização Justácrina* (SSJ) como sendo o conjunto formado pelos elementos moleculares, suas interações e os mecanismos moleculares que participam do processo de sinalização justácrina. Estes elementos e mecanismos podem ser intracelulares — como, por exemplo, vias de transdução de sinal ou redes de regulação gênica — ou estar associados às membranas das células em processo de comunicação como, por exemplo, eventos de acoplamento (*binding*) entre ligantes e receptores posicionados nas membranas.

A maioria dos modelos propostos para SSJs é basicamente contínua. Alguns são contínuos no tempo e no espaço [9], outros são contínuos no tempo e discretos no espaço [10, 14, 2, 15, 12, 13] e outros discretos no tempo e no espaço [7].

Na seção que segue descrevemos resumidamente os *J-Systems* [11], uma importante classe de modelos discretos para SSJs capaz de capturar explicitamente as interações moleculares intracelulares e de membrana que ocorrem no processo de sinalização justácrina.

1.1 J-Systems

J-Systems são um *framework* de modelagem discreta de SSJs definido como uma classe de sistemas dinâmicos com tempo e espaço discretos e variáveis de estado que podem ser contínuas e discretas. A estrutura tecidual em *J-Systems* é representada através de um reticulado finito, com variáveis de estado associadas ao ambiente intracelular e à seus segmentos de membrana. As variáveis de estado intracelulares, juntamente com as suas regras

de transição, representam as redes de sinalização e de regulação intracelular presentes na célula viva, as quais serão denominadas simplesmente de *redes intracelulares*. As variáveis de estado associadas à membrana, juntamente com as suas regras de transição, representam os mecanismos de sinalização que operam na membrana plasmática da célula viva, abreviadamente chamados de *redes de membrana*. Todas as células do reticulado contêm as mesmas variáveis (intracelulares e de membrana) e seus estados, a cada passo de tempo discreto, são determinados pela aplicação das mesmas regras de transição que valem para toda célula do reticulado. Ou seja, um modelo *J-System* de um SSJ pode ser visto como um conjunto de sistemas dinâmicos “locais” que são replicados e interconectados (ver Fig. 1) de um modo que é definido pela estrutura e geometria do reticulado. Existem duas arquiteturas diferentes de *J-Systems*: sem ou com estrutura de membrana explicitamente definida, as quais serão denominadas, respectivamente, de *Arquitetura Sem Estrutura de Membrana* (ASEM) e *Arquitetura Com Estrutura de Membrana* (ACEM). A Fig. 1 ilustra essas arquiteturas.

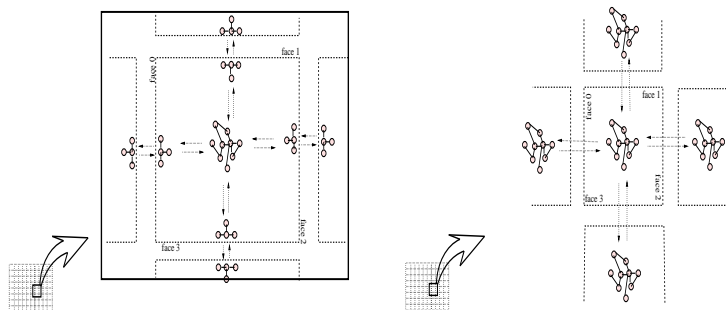


Fig. 1. Visão geral de um *J-System* com reticulado planar de células retangulares. As redes intracelular e de membrana são replicadas em todas as células e segmentos de membrana do reticulado e a comunicação entre elas é governada pelas mesmas regras de transição. (A): À esquerda, *J-System* de arquitetura sem estrutura de membrana explicitamente definida (ASEM). (B): À direita, *J-System* de arquitetura com estrutura de membrana explicitamente definida (ACEM).

Nas redes intracelulares de *J-Systems* operam os chamados *sinais localmente independentes* (SLI), que são aqueles não influenciados por qualquer outro sinal com origem na própria rede intracelular; eles podem ser sinais de entrada e/ou sinais externos, sendo que os *sinais externos* correspondem aqui àqueles sinais oriundos da membrana da própria célula (para o caso de ACEM) ou das células vizinhas (para o caso de ASEM).

Em *J-Systems* o estado de uma variável intracelular g^k na célula p no instante de tempo discreto $t + 1$ é dado por

$$g_p^k(t + 1) = \psi_k (g_p^u(t - x), \dots, g_p^v(t - y), \\ e_p^a(t - x), \dots, e_p^r(t - y), \\ b_p^h(t - x), \dots, b_p^i(t - y)),$$

sendo que $0 \leq x, y \leq \tau$, onde τ corresponde ao máximo recuo no tempo (memória) utilizado pela função de transição ψ_k . Os sinais com origem na rede intracelular e que influenciam no estado de g^k são representados pelas variáveis de estado intracelulares g^u, \dots, g^v . Os SLI intracelulares são representados pelas variáveis de entrada e^a, \dots, e^r . Os SLI extracelulares são representados pelos sinalizadores externos b^h, \dots, b^i , os quais são determinados por

$$b_p^k(t) = \delta_k(s_1^c(t), \dots, s_f^c(t), \dots, s_1^d(t), \dots, s_f^d(t)),$$

onde δ é denominada função de vizinhança ou membrana, sendo que os elementos $s_1^c(t), \dots, s_f^c(t), \dots, s_1^d(t), \dots, s_f^d(t)$ denotam os valores das s^c, \dots, s^d variáveis de saída da rede intracelular das f células vizinhas à célula p (para o caso ASEM) ou das variáveis de membrana dos f segmentos de membrana da mesma célula (para o caso ACEM). A quantidade f de células vizinhas é determinada pela geometria do reticulado.

1.2 Atratores em Sistemas Dinâmicos Discretos Finitos

Um *Sistema Dinâmico Discreto* consiste em um espaço de estados X e um mapeamento $f : X \rightarrow X$ tal que f define a evolução no tempo do sistema. Um *Sistema Dinâmico Discreto Finito* (SDF) é um sistema dinâmico discreto (X, f) onde X é finito.

Uma típica aplicação de SDFs é na descrição da evolução de um número finito de elementos conectados entre si e que têm seus estados internos atualizados por funções que representam suas interações. Em outras palavras, seja um conjunto de variáveis x_1, x_2, \dots, x_n que assumem valores num conjunto finito X e sejam as funções f_1, f_2, \dots, f_n tal que a função $f_i : X^n \rightarrow X$ determina o estado da variável x_i . Não é difícil ver que o espaço de estados X^n e a função $f : (f_1, \dots, f_n) : X^n \rightarrow X^n$ correspondem a um SDF e que sua dinâmica pode ser representada pelo grafo do espaço de estados $G_f = (V, E)$, onde $V = X^n$ e $(x, y) \in E$ se e somente se $f(x) = y$. Chamaremos este tipo de aplicação de *Rede Dinâmica Discreta* (RDD). Wuensche [16] criou um método baseado numa estratégia *retrocedente* (“*backward running*”) (aqui denominado de `LocalReverso`) para construir bacias de atração de RDDs.

1.3 Interpretação Biológica

Redes intracelulares podem ser modeladas como RDDs e tipos celulares podem ser interpretados como suas bacias de atração [4, 17, 18], dentro das quais a dinâmica celular estabiliza-se a partir de vários estados iniciais, de modo que cada atrator (pontual ou cíclico) corresponde a um padrão de expressão e regulação intracelular associado a um tipo celular. As bacias de atração fornecem um modelo para homeostase celular em resposta às mutações e às perturbações no estado padrão de ativação dos genes.

Se a rede intracelular de um *J-System* é uma RDD, então podemos conceber suas bacias de atração global como padrões celulares: um tipo celular corresponde a uma bacia de atração local da rede intracelular e um padrão celular (estrutura no nível tecidual) corresponde a uma bacia de atração global, que é composta por um arranjo de bacias locais posicionadas em células vizinhas tal que as saídas e as entradas das dinâmicas locais em cada célula e em cada segmento de membrana são compatíveis entre si (na Seção 2.1 definimos em detalhe essa noção de compatibilidade). Um estado estacionário global corresponde a um padrão de regulação intracelular e de comunicação célula-célula associado a um determinado padrão celular.

1.4 Contribuição do Trabalho, Restrições do Método e Organização do Texto

Rozante e colegas [11] propuseram um método para identificação de padrões celulares a partir de um modelo *J-System* e de um conjunto de condições iniciais (valores das variáveis de estado no instante inicial). Esse método, grosso modo, pode ser assim descrito: dado um modelo *J-System* e um conjunto de condições iniciais, o modelo é iterado de forma *progressiva* (“*forward running*”) a partir do estado inicial até que um estado estacionário global seja encontrado. Isso implica na necessidade de estimação das condições iniciais para a realização das simulações, o que, em geral, é obtido através de conhecimento biológico do

fenômeno em questão. Entretanto, infelizmente nem sempre dispomos *a priori* de conhecimento biológico suficiente para permitir a estimação de um bom conjunto de condições iniciais.

No sentido de ampliar as possibilidades de aplicação dos *J-Systems*, apresentamos aqui um novo método para cálculo de estados estacionários globais a partir unicamente do modelo, ou seja, um método que identifica os atratores globais (padrões celulares) sem a necessidade de descrição de condições iniciais.

Esse método opera em uma subclasse dos *J-Systems* definida pelas seguintes restrições: o modelo deve ser de memória homogênea (a mesma para todas as variáveis), entrada estacionária (constante), determinístico, síncrono e com variáveis de estado de domínio discreto e finito. Além disso, por simplicidade descrevemos aqui apenas a versão aplicada ao caso ASEM.

Em cada uma das subseções da Seção 2 descrevemos esse método detalhando suas etapas constituintes: inicialmente descrevemos o procedimento para cálculo dos atratores locais; em 2.1 definimos o conceito de compatibilidade entre atratores locais posicionados em células vizinhas e o procedimento usado para encontrar agrupamentos de atratores que são compatíveis entre si (denominados agrupamentos sintônicos); em 2.2 descrevemos o procedimento usado para montagem dos atratores globais a partir dos agrupamentos sintônicos. Na Seção 3 descrevemos uma aplicação do método proposto, e, por fim, na Seção 4 tecemos as conclusões e considerações finais.

2 Método para Cálculo de Atratores Globais em *J-Systems*

Num primeiro momento calculamos as bacias de atração da rede intracelular do *J-System*. Para isso usamos uma versão adaptada do algoritmo *LocalReverso*, que pode ser assim descrita: 1) Construímos uma extensão da rede intracelular definida pelos seguintes procedimentos: i) incorporamos ao conjunto das variáveis de estado intracelulares uma variável para cada um dos SLI que incidem sobre a rede intracelular e ii) definimos para as variáveis de estado incorporadas funções de transição constantes. Na Fig. 2 ilustramos os tipos de sinais em uma rede intracelular simples e o seu processo de expansão; 2) Aplicamos na RDD associada à rede intracelular expandida o algoritmo *LocalReverso*, conforme descrito por Wuensche.

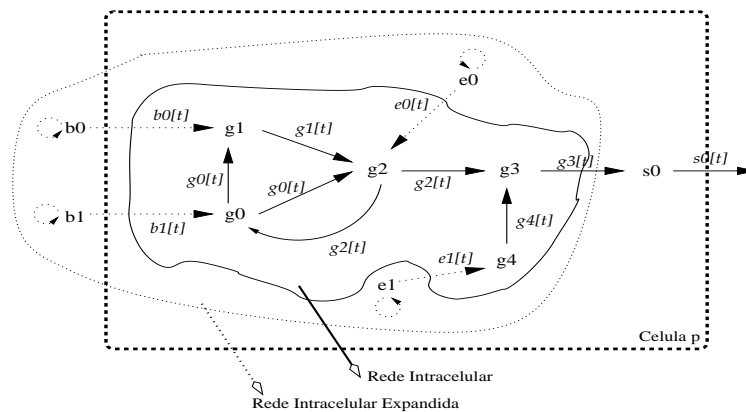


Fig. 2. Expansão de Rede Intracelular em *J-Systems*. Nesse exemplo de rede intracelular, os sinais $b_0[t], b_1[t], e_0[t], e_1[t]$ são localmente independentes e os sinais $g_0[t], g_1[t], g_2[t]$ e $g_3[t]$ e $g_4[t]$ são localmente regulados. Na rede intracelular expandida é incorporada uma variável para cada sinal localmente independente e é definida uma função de transição do tipo constante para cada uma.

2.1 Composição de Atratores Globais a Partir de Atratores Locais

Num segundo momento, arranjamos, em agrupamentos de células vizinhas do reticulado, os atratores presentes no campo atrator da rede intracelular de modo a obter nesses agrupamentos combinações de atratores locais tal que as saídas e as entradas das células sejam compatíveis entre si.

O conjunto A dos atratores locais fornecido por `ReversoLocal` é o mesmo para toda célula do reticulado, pois as entradas e a rede intracelular são as mesmas em todas células, que são conectadas simetricamente, às células vizinhas, através das variáveis de saída, que também são as mesmas em todas as células. Daí, podemos estabelecer que um atrator global corresponde a um arranjo de atratores locais, tal que:

1. Os valores dos sinalizadores externos para o atrator posicionado na célula p são compatíveis com os valores presentes nas saídas proporcionadas pelos atratores locais posicionados nas células vizinhas à célula p e que são requeridos pelas funções de vizinhança aplicadas na célula p . Em outras palavras, dizemos que um atrator $\mathbf{a}_j \in A$ posicionado na célula p é compatível (ou *sintoniza*) com os atratores $\mathbf{a}_x, \dots, \mathbf{a}_y \in A$ posicionados, respectivamente, nas células u, \dots, v da vizinhança $V(p)$ da célula p se

$$g_p^k[\mathbf{a}_j] = \psi_k(g_p^u[\mathbf{a}_j], \dots, g_p^v[\mathbf{a}_j], e_p^q[\mathbf{a}_j], \dots, e_p^r[\mathbf{a}_j], b_p^h[\mathbf{a}_j], \dots, b_p^i[\mathbf{a}_j]), \forall g^k \in \mathcal{V},$$

onde $g_p^k[\mathbf{a}_j]$ denota o valor da variável intracelular g^k no atrator \mathbf{a}_j , sendo que \mathcal{V} denota o conjunto das variáveis intracelulares sobre as quais incidem algum SLI externo e $\{g^u, \dots, g^v\}$ denota o conjunto das variáveis intracelulares tal que o sinal produzido por elas incidem sobre algum elemento de \mathcal{V} . Além disso, os elementos $e_p^q[\mathbf{a}_j], \dots, e_p^r[\mathbf{a}_j]$ denotam os valores dos SLI intracelulares e $b_p^h[\mathbf{a}_j], \dots, b_p^i[\mathbf{a}_j]$ denotam os valores dos SLI extracelulares no atrator \mathbf{a}_j , sendo que

$$b_p^k[\mathbf{a}_j] = \delta_k(s_1^c[\mathbf{a}_x], \dots, s_f^c[\mathbf{a}_y], \dots, s_1^d[\mathbf{a}_x], \dots, s_f^d[\mathbf{a}_y]), \forall k \in \{h, \dots, i\},$$

onde $s_n^m[\mathbf{a}_z]$, $s^m \in \{s^c, \dots, s^d\}$, $n \in \{1, \dots, f\}$, $\mathbf{a}_z \in \{\mathbf{a}_x, \dots, \mathbf{a}_y\}$, denota o valor da variável de saída s^m na célula $n \in V(p)$ quando nesta está posicionado o atrator \mathbf{a}_z . Vale observar que $\{1, 2, \dots, f\}$ é conjunto de inteiros que representam as faces da célula, onde o número de faces f da célula é determinado pela geometria do reticulado.

2. Os valores dos sinalizadores externos para os atratores locais posicionados nas células vizinhas à célula p são compatíveis com os valores das variáveis de saída proporcionados pelo atrator local posicionado na célula p e que são requeridos pelas funções de vizinhança. Em outras palavras, dizemos que os atratores $\mathbf{a}_x, \dots, \mathbf{a}_y$ posicionados, respectivamente, nas células $u, \dots, v \in V(p)$, são compatíveis (ou *sintonizam*) com um atrator \mathbf{a}_j posicionado na célula p se para todo atrator local $\mathbf{a}_z \in \{\mathbf{a}_x, \dots, \mathbf{a}_y\}$ posicionado em $t \in V(p)$ vale que

$$g_t^k[\mathbf{a}_z] = \psi_k(g_t^u[\mathbf{a}_z], \dots, g_t^v[\mathbf{a}_z], e_t^q[\mathbf{a}_z], \dots, e_t^r[\mathbf{a}_z], b_t^h[\mathbf{a}_z], \dots, b_t^i[\mathbf{a}_z]), \forall g^k \in \mathcal{V},$$

sendo que

$$b_t^k[\mathbf{a}_z] = \delta_k(s_p^c[\mathbf{a}_j], \dots, s_p^d[\mathbf{a}_j], s_{t'}^c[\mathbf{a}_m], \dots, s_{t'}^d[\mathbf{a}_m], s_{t''}^c[\mathbf{a}_n], \dots, s_{t''}^d[\mathbf{a}_n]), \forall k \in \{h, \dots, i\},$$

para todo $\mathbf{a}_m \in \{\mathbf{a}_x, \dots, \mathbf{a}_y\} - \{\mathbf{a}_z\}$ posicionado em $t' \in (V(t) \cap V(p)) - \{p\}$ e para algum $\mathbf{a}_n \in A$ posicionado em $t'' \in V(t) - ((V(t) \cap V(p)) \cup \{p\})$.

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

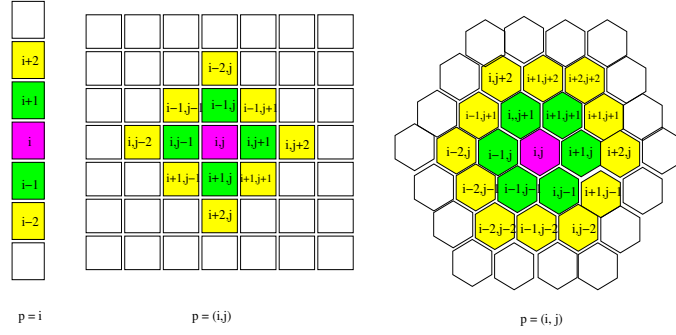


Fig. 3. Exemplos de vizinhança em reticulados linear e planar. À esquerda, num reticulado linear quadrado, se $p = i$ temos que $V(p) = \{i - 1, i + 1\}$ e que $V(P) = \{i - 2, i + 2\}$. Ao centro, num reticulado planar quadrado, se $p = (i, j)$ temos que $V(p) = \{(i, j - 1), (i - 1, j), (i, j + 1), (i + 1, j)\}$ e que $V(P) = \{(i, j - 2), (i - 1, j - 1), (i - 2, j), (i - 1, j + 1), (i, j + 2), (i + 1, j + 1), (i + 2, j), (i + 1, j - 1)\}$. À direita, num reticulado planar hexagonal, se $p = (i, j)$ temos que $V(p) = \{(i - 1, j), (i, j + 1), (i + 1, j + 1), (i + 1, j), (i, j - 1), (i - 1, j - 1)\}$ e que $V(P) = \{(i - 2, j), (i - 1, j + 1), (i, j + 2), (i + 1, j + 2), (i + 2, j + 2), (i + 2, j + 1), (i + 2, j), (i + 1, j - 1), (i, j - 2), (i - 1, j - 2), (i - 2, j - 2), (i - 2, j - 1)\}$

Dadas a geometria e as dimensões de um reticulado \mathcal{R} e uma célula $p \in \mathcal{R}$, denotamos por $V(p)$ o conjunto das células vizinhas à célula p e por P o conjunto formado por p e suas vizinhas, isto é, $P = \{p\} \cup V(p)$. Além disso, denotamos por $V(P) = \{q \in \mathcal{R} : q \in V(r) - \{q\}, \forall r \in V(p)\}$ o conjunto das células vizinhas das vizinhas de p . Evidentemente, $V(p)$ e $V(P)$ variam de reticulado para reticulado. A Fig. 3 ilustra essas definições.

Dizemos que \mathbf{a}_j em p é *sintônico* (ou sintoniza) com $\mathbf{a}_x, \dots, \mathbf{a}_y$ posicionados em $u, \dots, v \in V(p)$, respectivamente, para algum $\mathbf{a}_w, \dots, \mathbf{a}_z$ posicionados em $b, \dots, d \in V(P)$, respectivamente, se as propriedades de sintonia forem satisfeitas. Denotaremos esse fato por

$$(\mathbf{a}_j, p) \rightleftharpoons [(\mathbf{a}_x, u), \dots, (\mathbf{a}_y, v)] \rightleftharpoons [(\mathbf{a}_w, b), \dots, (\mathbf{a}_z, d)].$$

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

Se existe $\mathbf{a}_j, \mathbf{a}_x, \dots, \mathbf{a}_y, \mathbf{a}_w, \dots, \mathbf{a}_z \in \mathbf{A}$ e $p, u, \dots, v, w, \dots, z \in \mathcal{V}_p$ tal que

$$(\mathbf{a}_j, p) \rightleftharpoons [(\mathbf{a}_x, u), \dots, (\mathbf{a}_y, v)] \rightleftharpoons [(\mathbf{a}_w, b), \dots, (\mathbf{a}_z, d)],$$

dizemos que $[(\mathbf{a}_j, p), (\mathbf{a}_x, u), \dots, (\mathbf{a}_y, v), (\mathbf{a}_w, b), \dots, (\mathbf{a}_z, d)]$ é um *agrupamento sintônico* (ou *cluster sintônico*).

Como em sinalização justácrina o processo de comunicação intercelular está baseado no contato célula-célula, podemos tomar esses arranjos como unidades de formação dos atratores globais.

Dados um agrupamento de células \mathcal{V}_p e um conjunto \mathbf{A} de atratores locais, identificamos os agrupamentos sintônicos usando o seguinte procedimento: dado um arranjo $[(\mathbf{a}_j, p), (\mathbf{a}_x, u), \dots, (\mathbf{a}_y, v), (\mathbf{a}_w, b), \dots, (\mathbf{a}_z, d)]$, se vale que $(\mathbf{a}_j, p) \rightleftharpoons [(\mathbf{a}_x, u), \dots, (\mathbf{a}_y, v)] \rightleftharpoons [(\mathbf{a}_w, b), \dots, (\mathbf{a}_z, d)]$, então ele é um agrupamento sintônico.

2.2 Montagem dos Atratores Globais

No terceiro e último passo, preenchemos o reticulado encaixando esses arranjos nas posições definidas por suas células. Um padrão celular corresponde a um arranjo sintônico global. A partir da definição das propriedades de sintonia e de agrupamento sintônico, podemos estabelecer de forma mais precisa essa noção. Dado um reticulado \mathcal{R} e um conjunto de atratores A , um padrão é um mapeamento $f : \mathcal{R} \rightarrow A$ que associa cada célula em \mathcal{R} com um atrator em A tal que para todo $(p, \mathbf{a}_j) \in f$ vale que

$$(\mathbf{a}_j, p) \Leftrightarrow [(\mathbf{a}_x, u), \dots, (\mathbf{a}_y, v)] \Leftrightarrow [(\mathbf{a}_w, b), \dots, (\mathbf{a}_z, d)],$$

com $(u, \mathbf{a}_x), \dots, (v, \mathbf{a}_y), (b, \mathbf{a}_w), \dots, (d, \mathbf{a}_z) \in f$. Representaremos f por um vetor $R[0..n-1]$, isto é, $R[p] = \mathbf{a}_j$ denota que à célula $p \in \mathcal{R}$ está associado o atrator $\mathbf{a}_j \in A$.

O método que propomos para identificação de padrões celulares consiste, grosso modo, na composição de um “mosaico” onde as peças correspondem aos *clusters* sintônicos, que são “encaixados” nos “*slots*” definidos pelos *clusters* de células do reticulado de modo a preencher todo o reticulado. Um encaixe é válido se as seguintes condições são satisfeitas: a) não ocorrência de algum *mismatch* (definido logo adiante) de atratores do *cluster* sintônico que está sendo encaixado com atratores de algum *cluster* já encaixado e b) depois do encaixe, as células da intersecção do *cluster* sintônico que está sendo encaixado com aquele já estava encaixado mantém-se em sintonia umas com as outras e com suas vizinhas.

Antes de descrever como operam esses procedimentos de encaixe, convém definir, de modo mais formal, o significado que estamos atribuindo aos termos ‘encaixe’ e ‘*mismatch*’. Seja um reticulado \mathcal{R} e um conjunto de *clusters* sintônicos $\text{CLUSTERS} = \{C_0, C_1, \dots, C_{m-1}\}$. O *encaixe* de um *cluster* sintônico $C_i = [(\mathbf{a}_j, p), (\mathbf{a}_x, u), \dots, (\mathbf{a}_y, v), (\mathbf{a}_w, b), \dots, (\mathbf{a}_z, d)] \in \text{CLUSTERS}$ em um agrupamento de células $\mathcal{V}_q \subset \mathcal{R}$ com centro em q é a atribuição

$$R[q] \leftarrow \mathbf{a}_j, R[r] \leftarrow \mathbf{a}_x, \dots, R[s] \leftarrow \mathbf{a}_y, R[c] \leftarrow \mathbf{a}_w, \dots, R[e] \leftarrow \mathbf{a}_z,$$

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

É direto estabelecer que um encaixe $R[[\mathcal{V}_q]] \leftarrow C_i$ define um mapeamento parcial $f(\mathcal{V}_q, C_i) = \{(q, \mathbf{a}_j), (r, \mathbf{a}_x), \dots, (s, \mathbf{a}_y), (c, \mathbf{a}_w), \dots, (e, \mathbf{a}_z)\}$ em \mathcal{R} que cobre apenas as células em \mathcal{V}_q .

Dados um padrão parcial formado por $f(\mathcal{R}_p, C_k) \cup \dots \cup f(\mathcal{V}_q, C_i)$ e um encaixe $R[[\mathcal{V}_r]] \leftarrow C_i$, dizemos que há um *mismatch* de atratores entre eles se $(\mathcal{V}_p \cup \dots \cup \mathcal{V}_q) \cap \mathcal{V}_r \neq \emptyset$ e se $R[i] \neq R[j]$ para algum $i \in \{(\mathcal{V}_p \cup \dots \cup \mathcal{V}_q)\}$ e algum $j \in \mathcal{V}_r$.

Montagem por Expansão Aritmética O procedimento para montagem de padrões através do encaixe de agrupamentos sintônicos por Expansão Aritmética pode ser descrito em linhas gerais pelos seguintes passos: i) escolhemos aleatoriamente um agrupamento sintônico em CLUSTERS e o encaixamos numa célula arbitrária $p \in \mathcal{R}$, ii) escolhemos novamente um agrupamento sintônico em CLUSTERS e o encaixamos nas bordas do padrão parcial definido pelo encaixe anterior, caso ele não produza algum *mismatch* com algum atrator já encaixado e iii) repetimos o passo anterior até que o padrão parcial cubra todo o reticulado ou atinja um limite de expansão definido pela seqüência de encaixes e pelas dimensões do reticulado. O Procedimento 1 descreve de modo mais detalhado essa idéia.

A função ‘ladeia’ (linha 8 do Procedimento 1) recebe uma célula $r \in \text{BORDA}$ e devolve um segmento de borda (uma aresta da borda) cujo tamanho é igual ao tamanho do lado do *cluster*. Quando encaixamos um *cluster* sintônico nas bordas do padrão parcial (MANCHA) é preciso atualizar a borda da mancha de modo que ela reflita a inclusão do *cluster* (linha 13 do Procedimento 1); para isso usamos a função ‘interior’ que recebe um segmento de células e o devolve sem as duas células posicionadas nas suas extremidades. É conveniente

notar que ao realizarmos uma escolha aleatória (função ‘random’) em CLUSTERS ou em BORDA, estamos assumindo que os elementos em CLUSTERS e em BORDA são equiprováveis. O critério que usamos para fazer a detecção dos limites de expansão é: dado uma MANCHA com o conjunto de células que constituem sua borda (BORDA) e o conjunto de clusters (CLUSTERS), se repetirmos $|\text{CLUSTERS}| \times |\text{BORDA}|$ vezes a tentativa de encaixe de um novo *cluster* em alguma posição da borda e o tamanho da mancha não se alterar, então diremos que a mancha atingiu seu limite de expansão.

Procedure 1 : ArithmeticExpansion. Monta padrões por expansão aritmética.

Input: um reticulado \mathcal{R} , um conj. CLUSTERS de *clusters* sintônicos e uma célula p
Output: um padrão $R[0..n-1]$.
1: $C_i \leftarrow \text{random}(\text{CLUSTERS})$ // escolhe por sorteio um *cluster* em CLUSTERS
2: $R[[V_p]] \leftarrow C_i$
3: $\text{MANCHA} \leftarrow V_p$ // MANCHA denota o conj. das células cobertas pelo padrão parcial
4: $\text{BORDA} \leftarrow V(P)$ // BORDA denota o conj. das células que estão na borda de MANCHA
5: **while** ($\text{MANCHA} \neq \mathcal{R}$) **and** (‘MANCHA não atingir limite de expansão’) **do**
6: $C_i \leftarrow \text{random}(\text{CLUSTERS})$;
7: $r \leftarrow \text{random}(\text{BORDA})$ // escolhe por sorteio uma célula na borda da mancha
8: $\text{ARESTA} \leftarrow \text{ladeia}(r)$ // ARESTA é um pedaço da borda do tam. de um lado do cluster
9: $p \leftarrow t \in (\mathcal{R} - \text{MANCHA}) : V(T) \cap \text{BORDA} = \text{ARESTA}$
10: **if** não há *mismatch* entre $R[[\text{MANCHA}]]$ e $f(V_p, C_i)$ **and** intersecção permanece sintônica **then**
11: $R[[V_p]] \leftarrow C_i$
12: $\text{MANCHA} \leftarrow \text{MANCHA} \cup V_p$
13: $\text{BORDA} \leftarrow (\text{BORDA} \cup V(P)) - (\text{interior}(\text{BORDA} \cap V(P)))$
14: **end if**
15: **end while**
16: **if** MANCHA não cobriu 100% do reticulado \mathcal{R} **then**
17: RetoqueMancha(MANCHA, SELECT)
18: **end if**

3 Aplicação: Padronização Celular no Processo de Segregação de Neuroblastos em *D. melanogaster*

Sinalização mediada através da via Notch é um mecanismo que opera em várias situações [1, 6] onde há definições de destino celular. Um dos mais bem conhecidos exemplos onde opera a via do Notch (conhecido como rede neurogênica) está relacionado ao processo de segregação de neuroblastos em *Drosophila*. A arquitetura da rede neurogênica [5, 8], seus componentes e suas interações estão esquematizadas na Fig. 4, parte A. Para detalhes de suas principais características sugerimos consultar [11].

Aplicamos o método proposto ao modelo de padronização de precursores neuronais desenvolvido por Rozante e colegas [11]. O procedimento **ReverseLocal** operou com a versão expandida da rede neurogênica (ver Figura 4, parte B) e computou uma dinâmica intracelular com um total de 1162261467 estados, sendo identificadas 44 bacias de atração com atratores que imprimem expressão constitutiva para *Notch* e *DA*, as quais somam 129140163 estados. Testamos a geração de padrões na presença de três atratores locais, os quais são indicados na Tabela 1.

Aplicamos o procedimento de montagem de atratores globais por expansão aritmética em 10 execuções. Obtemos 100% de cobertura do reticulado em duas delas e média de 98% de cobertura nas 8 demais, sendo que nas áreas cobertas os padrões celulares observados foram de 46% de células bipotentes, 18.5% de neuroblastos e 35.5% de epidermoblastos, em média. Vale notar que essa proporção de tipos celulares é compatível com resultados experimentais [5, 8]. A Fig. 5 mostra um exemplo de padrão obtido com o método.

4 Conclusões

Os métodos até então desenvolvidos para experimentação *in silico* de modelos em *J-Systems* são baseados em simulações do tipo “*forward running*”, as quais exigem a des-

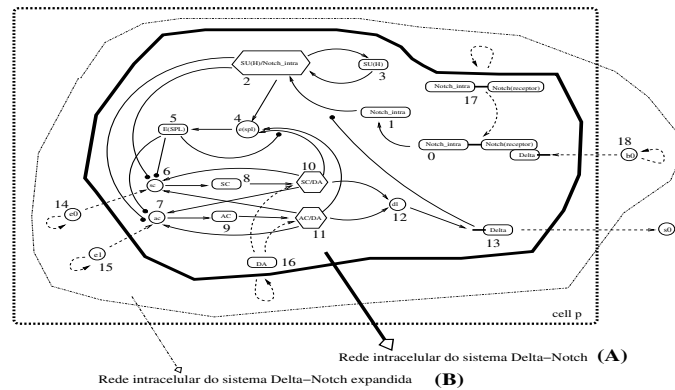


Fig. 4. (A): Os componentes da rede neurogênica (sistema Delta-Notch). (B): A versão expandida da rede neurogênica inclui duas variáveis locais independentes ($e0$ e $e1$), as quais foram usada para representar o *knockout* de *ac* e *sc*. Ela inclui também um sinalizador externo ($b0$) representando o sinal Delta das células vizinhas.

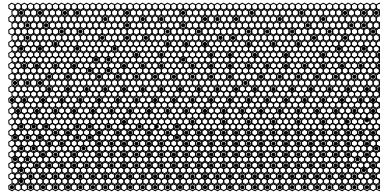


Fig. 5. Exemplo de padronização em reticulado 60×33 . As células brancas correspondem a epidermoblastos e as pretas a neuroblastos.

crição de um determinado conjunto de condições iniciais, a partir das quais as simulações prosseguem. A desvantagem desses métodos é que infelizmente nem sempre dispomos de informação *a priori* que nos permita estimar boas condições iniciais.

Propomos um método para cálculo de atratores globais (padrões celulares) em *J-Systems* que dispensa a descrição do conjunto de condições iniciais, o qual é baseado numa estratégia retrocedente (“*backward running*”). Isso é importante porque amplia o leque de aplicações dos *J-Systems*, visto que os padrões celulares gerados por esse método podem ser utilizados tanto na formulação de hipóteses acerca do evento biológico em questão, como também na estimação de novas potenciais condições iniciais.

Nos experimentos preliminares que realizamos com um modelo *J-System* para segregação de neuroblastos, obtemos resultados compatíveis tanto com experimentos de bancada já bem estabelecidos, como também com outros experimentos *in silico*, o que nos fornece evidências acerca da validade do método.

References

- [1] Castro, B., Barolo S., Bailey, A. M., Posakony, J. W.: Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless. *Development* (132)**15** (2005) 3333–3344
- [2] Collier, J. R., Monk, N. A. M., Maini, P. K., Lewis, H. L.: Pattern formation by lateral inhibition with feedback: a mathematical model of Delta-Notch intercellular signalling. *J. Theor. Biol.* **183** (1996) 429–446
- [3] Fagotto, F., Gumbiner, B. M.: Cell contact dependent signalling. *Dev. Biol.* **180** (1996) 445–454

Table 1. Bipotente: a segunda coluna mostra os estados do atrator local correspondente ao padrão de expressão da rede neurogênica para as células bipotentes; **Neuroblasto:** a terceira coluna mostra o padrão de expressão da rede neurogênica nos neuroblastos e **Epidermoblasto:** a quarta coluna mostra os estados do atrator local correspondente ao padrão de expressão da rede neurogênica em epidermoblastos.

Variáveis de Estado	Bipotentes	Neuroblastos	Epidermoblastos
b^0	1	0	2
<i>Notch</i>	1	1	1
<i>DA</i>	1	1	1
e^0	1	2	1
e^1	1	2	1
<i>Delta</i>	1	2	0
<i>dl</i>	1	2	0
<i>ACDA</i>	1	2	0
<i>SCDA</i>	1	2	0
<i>AC</i>	1	2	0
<i>SC</i>	1	2	0
<i>ac</i>	1	2	0
<i>sc</i>	1	2	0
<i>ESPL</i>	1	0	2
<i>espl</i>	1	0	1
<i>SUH</i>	1	0	2
<i>SUHNotch.intra</i>	1	0	2
<i>Notch.intra</i>	1	0	2
<i>Notch.Delta</i>	1	0	2

- [4] Kauffman, S. A.: The Origins of Order. Oxford University Press, New York. (1993)
- [5] Lai, E. C.: Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131** (2004) 965–973
- [6] Lewis, J.: Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9** (1998) 583–589
- [7] Luthi, P. O., Chopard, B., Preiss, P., Ramsden, J. J.: A cellular automaton model for neurogenesis in *Drosophila*. *Physica D* **118** (1998) 151–160
- [8] Meir, E., Dassow, G. von, Munro, E., Odell, G. M.: Robustness, Flexibility, and the Role of Lateral Inhibition in the Neurogenic Network. *Curr. Biol* **12** (2002) 778–786
- [9] Owen, M. R., Sherratt, J. A.: Mathematical modelling of juxtacrine cell signalling. *Math. Biosci.* **152** (1998) 125–150
- [10] Owen, M. R., Sherratt, J. A., Wearing, H. J.: Lateral induction by juxtacrine signalling is a new mechanism for pattern formation. *Dev. Biol.* **217** (2000) 54–61
- [11] Rozante, L. C. S., Gubitoso, M. D., Mantioli, S. R.: A Framework for Modeling of Juxtacrine Signaling Systems. *Genetics and Molecular Research* (6)**4** (2007) 821–845
- [12] Dassow, G. von, Meir, E., Munro, E., M., Odell, G. M.: The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* **406** (2000) 188–192
- [13] Dassow, G. von, Odell, G. M.: Design and Constraints of the *Drosophila* Segment Polarity Module: Robust Spatial Patterning Emerges from Intertwined Cell State Switches. *Journal of Experimental Zoology* **294** (2002) 179–215
- [14] Wearing, H. J., Owen, M. R., Sherratt, J. A.: Mathematical modelling of juxtacrine patterning. *Bull. Math. Biol.* **62** (2000) 293–320
- [15] Webb, S. D., Owen, M. R.: Intra-membrane ligand diffusion and cell shape modulate juxtacrine patterning. *J. Theor. Biol.* **230** (2004) 444–476
- [16] Wuensche, A.: *Discrete Dynamical Networks and their Attractor Basins*. Complex Systems '98, Sydney, Australia (1998)
- [17] Wuensche, A.: Genome regulation modeled as a network with basins of attraction. *Complexity* (3)**4** (1998) 47–66
- [18] Wuensche, A.: Basins of Attraction in Network Dynamics Modularity in Development and Evolution - G.Schlosser and G.P.Wagner, Chicago (2004) 288–311