

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Luísa Vargas Cassol

**MODELAGEM DISCRETA DE TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL:
O PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR**

Santa Maria, RS
2024

Luísa Vargas Cassol

**MODELAGEM DISCRETA DE TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL: O PAPEL DA
MATRIZ EXTRACELULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração em Área de Concentração em Sistemas Complexos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Física**. Defesa realizada por videoconferência.

Orientador: Prof. José Carlos Merino Mombach

Coorientador: Prof. Daner Acunha Silveira

Santa Maria, RS
2024

Luísa Vargas Cassol

**MODELAGEM DISCRETA DE TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL: O PAPEL DA
MATRIZ EXTRACELULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração em Física, Área de Concentração em Sistemas Complexos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Física**.

Aprovado em 9 de abril de 2024:

José Carlos Merino Mombach, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Daner Acunha Silveira, Dr. (ICI)
(Coorientador)

Lucio Strazzabosco Dorneles, Dr. (UFSM)

Luciana Renata de Oliveira, Dra. (InCor-USP)

Santa Maria, RS
2024

DEDICATÓRIA

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer antes de tudo, à minha mãe, Marilene Vargas Cassol, que é meu pilar em todas as jornadas, me apoia em todas as minhas loucuras e atura todas as minhas crises, está comigo diante de tudo e supera todas as adversidades de ter me criado sozinha, oferecendo seu amor incondicional e me amparando independente das circunstâncias;

Aos meus amigos, Pedro Lorenzoni, Arthur Santos, Bruno Prates, Letícia Mariano, Lucas Pacheco, Sabrina Elias e Thaís Oliveira por toda a parceria, conversas e encorajamento nesse período, também agradeço àqueles que ofereceram ombro amigo, não deixaram eu desistir e persistiram em me encorajar mesmo diante dos dias difíceis. Vocês tornam meus dias mais felizes;

Às meninas da UFN, Edmeia Buss, Laura Pizarro e Nataly Favarin, por tornarem as noites de aula mais leves enquanto eu tinha mil e um afazeres;

Aos colegas de laboratório por toda ajuda e conhecimento compartilhado, pelos dias de trabalho e conversas e por tornarem o dia a dia menos exaustivo;

Ao meu orientador professor Dr. José Carlos Merino Mombach e coorientador Dr. Daner Acunha Silveira por todo auxílio e ensinamentos com a pesquisa e escrita;

Aos professores da banca Dra. Luciana Renata de Oliveira e Dr. Lucio Strazza-bosco Dorneles por aceitarem participar da minha avaliação e dessa etapa da minha vida comigo;

À CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

Aqui no entanto nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos...e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente.

(Walt Disney)

RESUMO

MODELAGEM DISCRETA DE TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL: O PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR

AUTORA: Luísa Vargas Cassol

Orientador: José Carlos Merino Mombach

Coorientador: Daner Acunha Silveira

A transição epitelial mesenquimal (TEM) é um processo biológico no qual células epiteliais sofrem alterações bioquímicas e são transformadas em mesenquimais, transição a qual desempenha um papel crucial na propagação tumoral por meio da metástase. Alguns fatores colaboram para que essa transição ocorra, dentre eles a matriz extracelular (MEC), em seu estado saudável, desempenha uma função protetora contra o desenvolvimento e disseminação de tumores. Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs), representam uma nova categoria de RNAs não-codificantes que desempenham um papel significativo na progressão do câncer, os quais também podem ser um fator de corroboração para a TEM. O avanço no entendimento das moléculas e interações que regem o complexo sistema da TEM tem demandado a aplicação de abordagens computacionais que revelam a complexidade de sua dinâmica. Diante deste referencial, o presente trabalho tem por objetivo geral estudar a dinâmica da transição epitelial mesenquimal e para atender tal propósito, foi levada em consideração a influência de novas moléculas da matriz extracelular, o comportamento do o RNA longo não-codificante ATB (lncRNA-ATB) no modelo e a evolução temporal do sistema, a partir de uma rede de câncer de mama proposta anteriormente. Para analisar essas execuções foi utilizada a modelagem lógica, a partir da qual foram feitas simulações comparando o modelo atemporal, utilizando o software GINsim, ao modelo temporal empregando o software MaBoSS simulando o tempo. Ao final, os resultados de equiparação dos modelos atemporal para o que simula o tempo se mostraram correspondentes. Adicionalmente, a combinação da MEC ao fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta$), revelou a progressão da transição quando a MEC é rígida, enquanto a influência do lncRNA-ATB foi associada a um novo estado estável, indicando sua relação com a desestabilização da transição celular.

Palavras-chave: Rede regulatória. Metástase. Dinâmica temporal.

ABSTRACT

DISCRETE MODELING OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION: THE ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX

AUTHOR: Luísa Vargas Cassol
ADVISOR: José Carlos Merino Mombach
CO-ADVISOR: Daner Acunha Silveira

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a biological process in which epithelial cells undergo biochemical changes and are transformed into mesenchymal cells, a transition that plays a crucial role in tumor propagation through metastasis. Several factors contribute to this transition, among them the extracellular matrix (ECM), which, in its healthy state, serves a protective function against tumor development and spread. Long non-coding RNAs (lncRNAs) represent a new category of non-coding RNAs that play a significant role in cancer progression and can also be a corroborating factor for EMT. The advancement in understanding the molecules and interactions governing the complex EMT system has demanded the application of computational approaches revealing the intricacies of its dynamics. Against this backdrop, the present study aims to investigate the dynamics of epithelial-mesenchymal transition, considering the influence of new molecules from the extracellular matrix, the behavior of the long non-coding RNA ATB (lncRNA-ATB) in the model, and the temporal evolution of the system, based on a previously proposed breast cancer network. Logical modeling was used for these analyses, and simulations were conducted comparing the atemporal model using the GINsim software to the temporal model employing the MaBoSS software simulating time. In the end, the comparison results between the atemporal and temporal models proved to be consistent. Additionally, the combination of the ECM with transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$) revealed the progression of the transition when the ECM is rigid, while the influence of lncRNA-ATB was associated with a new stable state, indicating its relation to the destabilization of cellular transition.

Keywords: Regulatory network. Metastasis. Temporal dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo para estrutura da molécula de DNA.	18
Figura 2 – Visão geral das etapas da transcrição.	21
Figura 3 – Visão geral das etapas da tradução.	22
Figura 4 – Exemplos de <i>feedback loops</i> . À esquerda, um <i>feedback loop</i> negativo composto por duas moléculas. À direita, um <i>feedback loop</i> duplo positivo, formado apenas por interações positivas, enquanto um <i>feedback loop</i> duplo negativo contém um número par de interações negativas.	25
Figura 5 – Exemplo de uma rede de regulação gênica.	26
Figura 6 – As células epiteliais possuem proteínas juncionais especializadas, apresentam polaridade apicobasal e têm uma capacidade limitada de dissociação e migração. Por outro lado, as células mesenquimais não formam complexos especializados de adesão, têm uma forma irregular com polaridade de ponta a ponta e aderências focais, o que resulta em uma capacidade aumentada de migração.	28
Figura 7 – A transição epitelial mesenquimal (TEM) e seu processo inverso, a transição mesenquimal epitelial (TME), ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, apresentando uma característica espectral distintiva. A regulação da TEM envolve diversos fatores, como fatores de transcrição, sinalização celular e modificações epigenéticas. Os termos técnicos incluem TJ, referente à junção apertada (<i>tight junction</i>); AJ, à junção aderente (<i>adherens junction</i>); DS, ao desmossomo; e HDS, ao hemidesmossomo.	30
Figura 8 – Células com fenótipo híbrido E/M representam um estado de transição durante o processo de transição epitelial mesenquimal. Diversos marcadores e características específicas identificam os estados epitelial (E), mesenquimal (M) e híbrido (H) em diferentes fases da transição. A perda das aderências celulares nas células E desencadeia a TEM, permitindo que essas células se libertem na circulação sanguínea como células tumorais circulantes (CTCs).	32
Figura 9 – Estrutura da matriz extracelular e suas componentes.	34
Figura 10 – Modelagem cinética ao longo do tempo usando um modelo cinético e a abstração lógica correspondente.	37
Figura 11 – Exemplo de aplicação do formalismo lógico em uma rede de regulação genética. (A) O grafo regulatório é delineado pelas interações entre as componentes G4, que atua como sinal de entrada, G1, G2 e G3. (B) As funções lógicas correspondentes controlam os estados dos nós da rede	

apresentada em A.	39
Figura 12 – Exemplo de tabela verdade para a $x_4 = 0$	39
Figura 13 – GTE relacionado ao método assíncrono do correspondente grafo da figura 11.	40
Figura 14 – A interface do GINsim. Vê-se um modelo discreto <i>booleano</i> , especificamente para os estados estáveis no caso assíncrono. Ao selecionar o nó A, o usuário pode definir a regra lógica associada a esse nó. Como resultado, o GINsim apresenta os valores de B e C para os quais o nó A mantém um valor lógico não nulo. Essa funcionalidade oferece uma visão clara das interações lógicas entre os nós do modelo, facilitando a compreensão dos estados estáveis e suas dependências.	46
Figura 15 – Circuitos positivos e negativos e suas interpretações biológicas.	49
Figura 16 – O fator de transformação de crescimento β (TGF- β) desencadeia a transição epitelial mesenquimal. A rede regulatória central da TEM induzida por TGF- β exógeno é composta por dois fatores de transcrição (SNAIL1 e ZEB1), duas famílias de microRNAs (miRNAs; miR-34 e miR-200) e TGF- β endógeno.	51
Figura 17 – Rede regulatória das propriedades de adesão celular controlada pelo microambiente durante a TEM. As entradas do microambiente tumoral são indicadas em cinza, marcadores epiteliais estão em verde, enquanto marcadores mesenquimais estão em marrom escuro. Nós ovais representam componentes <i>booleanos</i> , enquanto os retangulares representam componentes de múltiplos valores. As setas verdes indicam interações ativadoras, e as setas vermelhas indicam interações inibitórias. Duas leituras do modelo fornecem os estados da montagem da junção de adesão (AJ) e da reciclagem da adesão focal (FA).	52
Figura 18 – Rede regulatória para a TEM em resposta ao TGF- β exógeno. As setas verdes e vermelhas indicam interações de ativação e inibição, respectivamente. Nós elípticos representam componentes de valor múltiplo, enquanto nós retangulares são <i>booleanos</i> . Nós em cores azul e amarelo representam marcadores epiteliais e mesenquimais, respectivamente. O nó de entrada em cinza indica TGF- β exógeno Ex-TGFB, enquanto o nó elíptico em branco representa a saída do modelo (TEM). O nó retangular em roxo denota ácido hialurônico (HA).	53
Figura 19 – Rede original adaptada para uma rede <i>booleana</i>	58
Figura 20 – Trajetórias de probabilidades dos estados em 0.5. Ex_TGFB ON	59
Figura 21 – Trajetórias de probabilidades dos estados em 0.5. Ex_TGFB OFF	59
Figura 22 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_34 ON - SNAIL1 OFF.	60
Figura 23 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_34 OFF - SNAIL1 ON.	61

Figura 24 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_200 ON - miR_1199 ON - GRHL2 ON - miR_340 ON - ZEB1 OFF.	62
Figura 25 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_200 OFF - miR_1199 OFF - GRHL2 OFF - miR_340 OFF - ZEB1 ON.	62
Figura 26 – Distribuição de probabilidades final dos estados para Ex_TGFB ON. Estado selvagem.	63
Figura 27 – Rede regulatória para TEM em resposta à MEC e ao TGF- β exógeno. Figura gerada usando o software GINsim 3.0.0b.	66
Figura 28 – Estados estáveis do caso tipo selvagem.	68
Figura 29 – Estados estáveis para lncRNA-ATB KO.	68
Figura 30 – Estados estáveis para ECM KO.	69
Figura 31 – Estados estáveis para ECM E1.	69
Figura 32 – Trajetória de probabilidade dos estados para <i>inputs</i> 0.5.	70
Figura 33 – Trajetória de probabilidade dos estados para lncRNA-ATB OFF.	70
Figura 34 – Trajetória de probabilidade dos estados para ECM OFF.	71
Figura 35 – Trajetória de probabilidade dos estados para ECM ON.	71
Figura 36 – Exemplo de relação de regras lógicas e contexto de funcionalidade de circuitos através do uso do operador AND.	86
Figura 37 – Exemplo de relação de regras lógicas e contexto de funcionalidade de circuitos através do uso do operador OR.	87
Figura 38 – Exemplo de relação de regras lógicas e contexto de funcionalidade de circuitos para uma rede complexa.	88
Figura 39 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 OFF - HA OFF - ZEB1 OFF.	89
Figura 40 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 ON - HA ON - ZEB1 ON.	90
Figura 41 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 ON - ZEB1 OFF - CD44s OFF.	90
Figura 42 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF - ZEB1 ON - CD44s ON.	91
Figura 43 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF.	91
Figura 44 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_200 OFF - miR_1199 OFF - GRHL2 OFF - miR_340 OFF.	92
Figura 45 – Janela de circuitos funcionais do GINsim.	93
Figura 46 – Trajetória de probabilidades dos estados para SNAI1 ON - MIR34A OFF.	94
Figura 47 – Estados estáveis para SNAI1 ON - MIR34A OFF.	94
Figura 48 – Trajetória de probabilidades dos estados para SNAI1 OFF - MIR34A ON.	95
Figura 49 – Estados estáveis para SNAI1 OFF - MIR34A ON.	95
Figura 50 – Trajetória de probabilidades dos estados para MIR200 ON - MIR1199 ON	

- GRHL2 ON - MIR340 ON - ZEB1 OFF.	96
Figura 51 – Estados estáveis para MIR200 ON - MIR1199 ON - GRHL2 ON - MIR340 ON - ZEB1 OFF.	96
Figura 52 – Trajetória de probabilidades dos estados para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF - ZEB1 ON.	97
Figura 53 – Estados estáveis para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF - ZEB1 ON.	97
Figura 54 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 OFF - HA OFF - ZEB1 OFF.	98
Figura 55 – Estados estáveis para HAS2 OFF - HA OFF - ZEB1 OFF.	98
Figura 56 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 ON - HA ON - ZEB1 ON.	99
Figura 57 – Estados estáveis para HAS2 ON - HA ON - ZEB1 ON.	99
Figura 58 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 ON - ZEB1 OFF - CD44s OFF.	100
Figura 59 – Estados estáveis para ESRP1 ON - ZEB1 OFF - CD44s OFF.	100
Figura 60 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF - ZEB1 ON - CD44s ON.	101
Figura 61 – Estados estáveis para ESRP1 OFF - ZEB1 ON - CD44s ON.	101
Figura 62 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF.	102
Figura 63 – Estados estáveis para ESRP1 OFF.	102
Figura 64 – Trajetória de probabilidades dos estados para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF.	103
Figura 65 – Estados estáveis para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF.	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
BKMC	Boolean Kinetic Monte-Carlo
CD24	Molécula CD24
CDH1	Caderina 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CTNNB1	β -Catenina
ESRP1	Proteína reguladora de splicing epitelial 1
FT	Fator de Transcrição
GINsim	Gene Interaction Network Simulation
GRHL2	Grainyhead like transcription factor 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTE	Grafo de transição de estados
LEF1	Lymphoid enhancer binding factor 1
lncRNA	RNA longo não codificante
lncRNA-ATB	RNA longo não codificante ativado por TGF- β
MaBoSS	Markovian Boolean Stochastic Simulator
MEC	Matriz Extracelular
MiRNA	MicroRNA
MIR1199	MicroRNA 1199
MIR190A	MicroRNA 190
MIR200	Família miR-200
MIR34A	Família miR-34
MIR340	MicroRNA 340
RNA	Ácido Ribonucleico
SNAI1	Repressor transcricional 1 da família SNAIL
SNAI2	Repressor transcricional 2 da família SNAIL
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2
TEM	Transição Epitelial Mesenquimal
TGF- β	Fator de transformação do crescimento- β
VIM	Vimentina
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	CONCEITOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	17
2.2	REDES DE REGULAÇÃO GENÉTICA	23
2.3	TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL	26
2.4	FENÓTIPOS HÍBRIDOS	31
2.5	MATRIZ EXTRACELULAR	33
3	METODOLOGIA	35
3.1	MODELAGEM LÓGICA	35
3.2	MODELAGEM CONTÍNUA	41
3.3	GINSIM	45
3.4	MABOSS	47
3.5	COMO FUNCIONAM OS CIRCUITOS POSITIVOS E NEGATIVOS E COMO ELES AFETAM A REDE	48
4	REVISÃO DE ARTIGOS	50
4.1	MODELO: <i>TGF-β-INDUCED EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION PROCEEDS THROUGH STEPWISE ACTIVATION OF MULTIPLE FEEDBACK LOOPS</i>	50
4.2	MODELO: <i>IN SILICO LOGICAL MODELLING TO UNCOVER COOPERATIVE INTERACTIONS IN CANCER</i>	51
4.3	MODELO: <i>DYNAMICS OF THE FEEDBACK LOOPS REQUIRED FOR THE PHENOTYPIC STABILIZATION IN THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION</i>	53
4.4	IMPORTÂNCIA DE CONTEMPLAR A MATRIZ EXTRACELULAR	54
5	OBJETIVOS	56
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1	ANÁLISE PRÉVIA DO COMPORTAMENTO TEMPORAL DO MODELO PROPOSTO PARA TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL EM RESPOSTA À TGF- β EXÓGENO	57
6.2	MODELO PROPOSTO	64
7	CONCLUSÃO	73
7.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	APÊNDICE A – REGRAS LÓGICAS E A FUNCIONALIDADE DOS CIRCUITOS	85
	APÊNDICE B – DEMAIS RESULTADOS: MODELO ORIGINAL UTILIZANDO O SOFTWARE MABOSS	89
	APÊNDICE C – DEMAIS RESULTADOS: SIMULAÇÕES DOS CIRCUITOS FUNCIONAIS DO NOVO MODELO	93

APÊNDICE D – REFERÊNCIAS BIOLÓGICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE AS MOLÉCULAS	104
--	------------

1 INTRODUÇÃO

As células residem em um ambiente elaborado, possuindo a capacidade de detectar uma diversidade de sinais. Estes sinais abrangem desde parâmetros físicos até moléculas de sinalização biológica provenientes de outras células, nutrientes benéficos e substâncias químicas prejudiciais. Informações vitais sobre o estado interno da célula, como os níveis de metabólitos essenciais e danos internos no DNA, membrana ou proteínas, também desempenham um papel significativo. Em resposta a esses sinais, as células iniciam a produção de proteínas específicas, que desempenham funções tanto no ambiente interno quanto externo da célula (ALON, 2019). À medida que tecnologias de alto rendimento geram conjuntos extensos de dados, as redes biológicas tornam-se cada vez mais cruciais para a análise e interpretação dessas informações.

A transição epitelial mesenquimal (TEM) é um processo biológico no qual células epiteliais passam por diversas alterações bioquímicas que resultam em um fenótipo mesenquimal. Caracterizado por adesões celulares mais frágeis e maior capacidade migratória, esse fenótipo desempenha um papel significativo na resistência à quimioterapia (ISER et al., 2017). A degradação da membrana basal marca a conclusão desse processo, facilitando a migração das células mesenquimais para áreas distantes. A classificação da TEM em três subtipos, associados a diferentes contextos biológicos, oferece uma compreensão abrangente dos cenários em que esse fenômeno desempenha papéis distintos, desde eventos fisiológicos normais até situações patológicas, como no câncer. O primeiro tipo de TEM está relacionado à implantação, formação de embriões e desenvolvimento de órgãos. O segundo tipo está ligado à cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e fibrose de órgãos. Por fim, o terceiro tipo ocorre em células neoplásicas, sendo associado à progressão do câncer (KALLURI; WEINBERG et al., 2009). A capacidade migratória aumentada das células epiteliais cancerígenas destaca a relevância do terceiro tipo de TEM.

Células cancerígenas que expressam características de adesão epiteliais e habilidades migratórias mesenquimais revelam um fenótipo híbrido, incorporando elementos de ambos os tipos celulares de forma parcial. Células tumorais circulantes (CTCs) malignas que adotam esse fenótipo híbrido E/M possuem a habilidade de migrar de forma individual ou coletiva na matriz extracelular (MEC) através do sistema circulatório (GARG, 2017), ampliando significativamente seu potencial metastático, chegando a ser até 50 vezes maior em comparação com células migratórias individuais que exibem um fenótipo mesenquimal completo (ACETO et al., 2014).

As matrizes extracelulares (MECs), constituem redes tridimensionais organizadas, meticulosamente dispostas para desempenhar funções estruturais e funcionais cruciais na organização e remodelação de tecidos, além de regular processos celulares. Essas MECs operam como mediadores de comunicação entre as células nos órgãos e tecidos, orques-

trando uma variedade de sinais que fluem tanto do ambiente celular para o exterior quanto vice-versa (MANOU et al., 2019; THEOCHARIS et al., 2012). Durante condições patológicas, as MECs passam por remodelação, influenciando a progressão de diversas doenças (THEOCHARIS; MANOU; KARAMANOS, 2019), englobando aterosclerose, patologias autoimunes e inflamatórias, bem como câncer (THEOCHARIS et al., 2016).

Experimentos revelam a influência crucial do microambiente biofísico na regulação da transição epitelial mesenquimal. Esses experimentos envolvem efeitos dependentes da rigidez do fator transformador de crescimento β (TGF- β), resultando em apoptose em ambientes de MEC mole, em contraste com a indução da TEM em substratos rígidos (LEIGHT et al., 2012). Contudo, ainda carecemos de um modelo mecanicista preditivo capaz de reproduzir e antecipar os impactos do ambiente biomecânico em uma única célula, considerando seu comportamento em diversos contextos de sinalização, como diferentes estímulos de crescimento ou sinais de transformação.

Com isso em mente, este trabalho buscou investigar a dinâmica da transição epitelial mesenquimal através de modelagem lógica. Incluindo a consideração da influência de novas moléculas na matriz extracelular e a análise da evolução temporal do sistema, utilizando como base uma rede previamente proposta para o câncer de mama.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

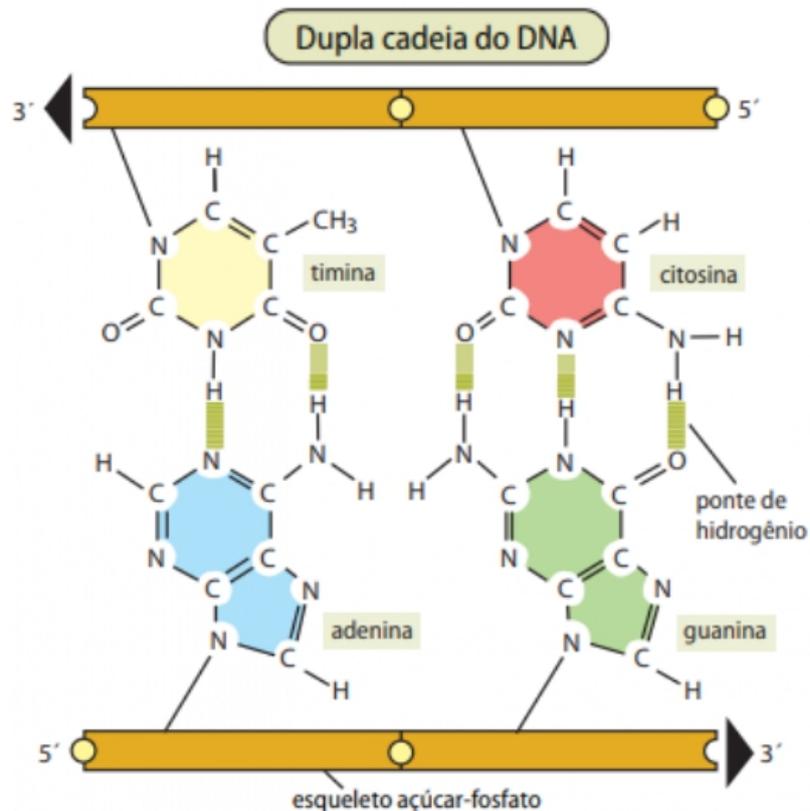
Este capítulo oferece uma visão geral dos conceitos teóricos e fundamentos relevantes ao estudo nesta área. Essa parte introdutória estabelece a base conceitual para o estudo, fornecendo uma compreensão do contexto e das estruturas que serão exploradas ao longo do trabalho, abordando tópicos sobre conceitos de biologia molecular, redes de regulação genética, transição epitelial mesenquimal e matriz extracelular.

2.1 CONCEITOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Os sistemas de biologia molecular desempenham a função essencial de armazenar e transmitir informações através do código genético. Em 1953, a estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico) foi proposta por Watson e Crick, consolidando sua identificação como o material genético primordial (WATSON; CRICK, 1953). Com base nesse entendimento, os cientistas puderam desvendar o mecanismo que rege a herança e expressão do genoma. O genoma de uma célula engloba toda a sua informação genética, a qual está codificada no DNA, localizado no núcleo da célula, em sua maioria (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

Segundo o modelo proposto, a alta densidade da molécula de DNA indicava a presença de mais de uma cadeia de nucleotídeos, ligadas por meio do grupo fosfato e da hidroxila da pentose (desoxirribose). A estrutura molecular revelou que a característica mais fascinante do DNA é sua natureza de fita dupla, em que as cadeias estão dispostas em orientações opostas, ou seja, são antiparalelas. Essas duas cadeias são mantidas unidas por meio de pontes de hidrogênio, e há uma complementaridade entre os nucleotídeos das duas cadeias, ou seja, adenina (A) é complementar a timina (T), enquanto citosina (C) é complementar a guanina (G). Esse arranjo implica que a informação contida na molécula de DNA está codificada na sequência específica de nucleotídeos (RIBEIRO, 2009). A fita ser antiparalela significa que uma cadeia corre no sentido 3' para 5', enquanto a outra corre no sentido oposto, de 5' para 3'. Essa orientação antiparalela é fundamental para a replicação do DNA e a síntese de proteínas. A figura 1 ilustra que a ligação entre os nucleotídeos na cadeia se estabelece através de uma ligação fosfodiéster, proporcionando uma notável resistência química à molécula. Essa ligação robusta viabiliza a continuidade da sequência, sendo que a singularidade de cada molécula de DNA é determinada pela ordem específica dos nucleotídeos.

Figura 1 – Modelo para estrutura da molécula de DNA.



Fonte: Adaptado de (RIBEIRO, 2009).

Os genes presentes no DNA codificam moléculas de proteínas, as quais realizam todas as funções necessárias para a vida. Isso inclui a produção de enzimas, que desempenham diversas funções, desde metabolizar nutrientes até sintetizar novos componentes celulares. Entre essas enzimas, destacam-se aquelas envolvidas no processamento de DNA, como as DNA polimerases, que desempenham um papel crucial na replicação durante a divisão celular. Em suma, as proteínas desempenham um papel multifacetado e essencial na execução das diversas atividades necessárias para a vida celular (CLANCY; BROWN, 2008).

Embora o ácido ribonucleico (RNA) compartilhe uma composição de nucleotídeos semelhante ao DNA, inicialmente não se percebia seu papel na transmissão de informações genéticas entre gerações, embora vírus de RNA tenham sido descobertos posteriormente. A partir dos anos 1920, a genética microbiana estabeleceu que alguns genes codificam proteínas, mas o mecanismo pelo qual isso ocorria permanecia desconhecido. Aos poucos, surgiu a perspectiva de que o RNA poderia desempenhar um papel nesse processo, uma inferência sustentada por estudos histoquímicos, de ultracentrifugação e espectroscópicos na década de 1940. Essas pesquisas revelaram a presença de RNA em microsomas citoplasmáticos, conhecidos como ribossomos, que estavam sendo reconhe-

cidos como os locais onde a síntese de proteínas ocorria (MATTICK; AMARAL, 2023).

Em resumo, o RNA mensageiro (mRNA) desempenha o papel de transportar as instruções genéticas do DNA de uma célula até seus ribossomos, que atuam como máquinas responsáveis pela síntese de proteínas. O RNA transportador (tRNA) entra em cena transportando os aminoácidos adequados até o ribossomo, onde são incorporados na formação da nova proteína. Enquanto isso, os próprios ribossomos são compostos principalmente por moléculas de RNA ribossômico (rRNA). Entretanto, ao longo do último meio século desde a primeira elucidação da estrutura do DNA, os cientistas avançaram significativamente na compreensão das funções do RNA. Foi revelado que o RNA desempenha um papel muito mais abrangente do que simplesmente participar na síntese de proteínas. Notavelmente, descobriu-se que diversos tipos de RNA possuem propriedades catalíticas, executando reações bioquímicas de maneira semelhante às enzimas. Além disso, foram identificadas várias outras variantes de RNA que desempenham funções regulatórias complexas dentro das células. Essas descobertas ampliaram consideravelmente nossa percepção sobre a versatilidade e a complexidade das funções do RNA no contexto celular (CLANCY, 2008).

A expressão gênica refere-se ao processo pelo qual um gene é acionado, resultando na produção da proteína associada a ele. Para que isso ocorra, um processo composto por duas etapas é desencadeado, a transcrição e a tradução. Genes apresentam variações nas taxas de transcrição e tradução, proporcionando à célula a capacidade de sintetizar quantidades significativas de algumas proteínas, ao passo que produz quantidades mínimas de outras. Adicionalmente, a célula possui a habilidade de regular (alterar) a expressão de cada um de seus genes conforme suas necessidades, predominantemente através do controle na produção de moléculas de RNA (ALBERTS et al., 2017).

A etapa inicial da expressão gênica, conhecida como transcrição, é um processo cíclico de síntese de RNA composto por três fases distintas: o início, a fase de alongamento e a terminação (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014). A fita de DNA, na orientação 3' para 5' (conhecida como fita de codificação), desempenha o papel de molde para a transcrição do DNA em RNA, realizado pela RNA polimerase. Durante esse processo, a síntese do RNA ocorre na direção 5' para 3'.

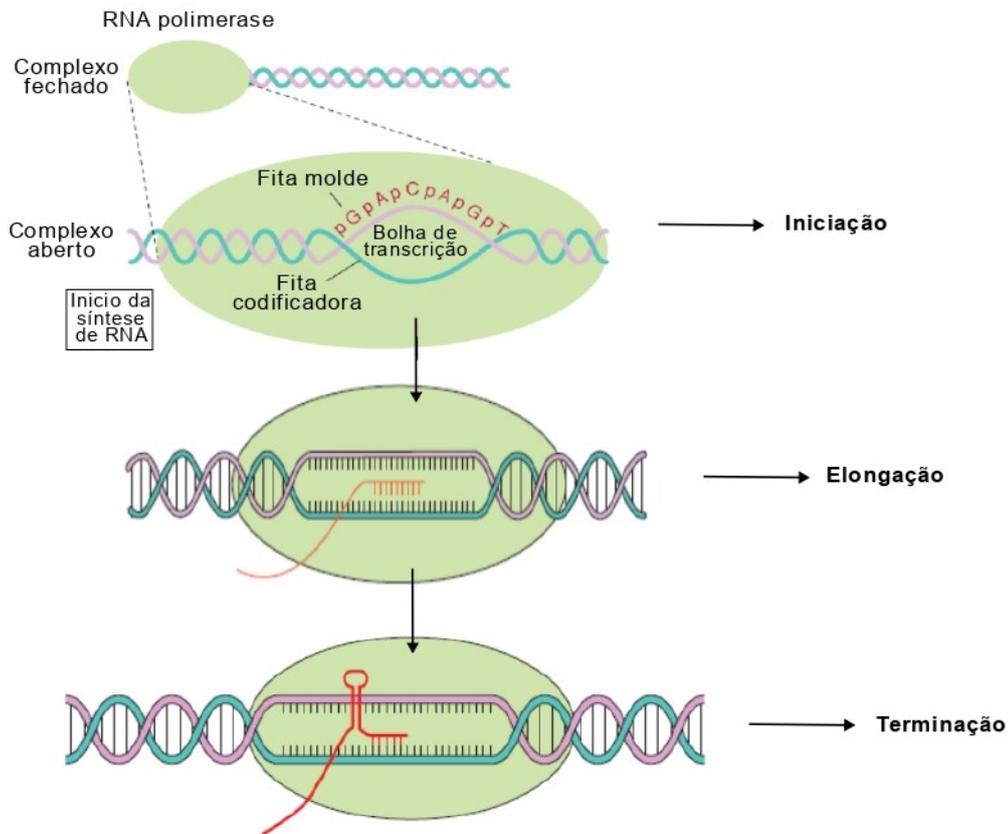
Durante o início da transcrição, uma enzima chamada RNA-polimerase identifica e se une a um local específico denominado promotor, situado na dupla fita do DNA. Após essa ligação, a enzima separa as duas fitas de DNA, tornando as bases da fita-molde acessíveis para o emparelhamento com os nucleosídeos trifosfato que serão polimerizados. A RNA-polimerase desassocia de 12 a 14 pares de bases de DNA ao redor do ponto de início da transcrição, localizado na região promotora da fita-molde. Essa separação permite que a fita-molde entre no sítio catalítico da enzima, que catalisa a formação da ligação fosfodiéster entre os ribonucleotídeos trifosfato complementares ao promotor no ponto inicial da transcrição da fita-molde. A porção desassociada de pares de bases na RNA-polimerase

é conhecida como bolha de transcrição. O término do início da transcrição é alcançado quando os dois primeiros ribonucleotídeos da cadeia de RNA são conectados por uma ligação fosfodiéster (LODISH et al., 2014).

No decorrer da fase de alongamento da cadeia, a RNA-polimerase movimenta-se ao longo da fita molde do DNA, percorrendo uma base por vez. Durante esse processo, ela desdobra a fita dupla de DNA à frente de sua direção de movimento, coordenando a interação das fitas de DNA para promover a hibridização na extremidade a montante da bolha de transcrição. Na etapa de terminação da transcrição, que representa o estágio final da síntese de RNA, a molécula de RNA concluída é liberada pela RNA-polimerase, que, por sua vez, se desvincula do DNA-molde. Após essa liberação, a RNA-polimerase fica disponível para transcrever novamente o mesmo gene ou outro gene (LODISH et al., 2014).

A figura 2 mostra, de forma resumida, as 3 etapas da transcrição. Durante a iniciação, a RNA polimerase identifica as sequências do promotor e se associa ao DNA, formando um complexo fechado de transcrição. Em seguida, a enzima desenrola as fitas do DNA, originando o que é conhecido como bolha de transcrição. À medida que a RNA polimerase se move, mantém as fitas do DNA separadas e utiliza a fita molde como guia para posicionar corretamente os ribonucleotídeos. A síntese do RNA ocorre na extremidade 3', resultando no crescimento da fita de RNA. Esse processo culmina na síntese do mRNA, seguindo a direção 5'-3'. Ao longo do alongamento, a RNA polimerase libera progressivamente a fita de mRNA. Isso ocorre à medida que a enzima continua a sintetizar o RNA mensageiro, deslocando-se ao longo da cadeia de DNA. Ocorre um terminador intrínseco durante a transcrição quando uma estrutura característica de alça e haste, assemelhando-se a um grampo, é formada no mRNA, seguida por múltiplas uracilas. Essa estrutura peculiar se desenvolve dentro do complexo composto por DNA, RNA polimerase e mRNA. A presença dessa estrutura induz a separação da RNA polimerase do complexo e, conseqüentemente, marca o término da transcrição. Esse mecanismo intrínseco de terminação é essencial para regular de maneira precisa o processo de transcrição, garantindo a formação adequada do RNA mensageiro e a finalização eficiente da síntese do RNA.

Figura 2 – Visão geral das etapas da transcrição.



Fonte: Adaptado de (MENCK; SLUYS, 2017).

A fase subsequente no processo de expressão gênica, conhecida como tradução, envolve a decodificação da molécula de RNA mensageiro e a partir dessa informação, a síntese de uma cadeia de aminoácidos gerará uma proteína. Assim como a transcrição, a tradução também é dividida em: iniciação, alongamento e terminação (COOPER, 2000). No processo de tradução, o mRNA é interpretado no sentido 5' para 3' em grupos de três bases conhecidos como códon. Esses códon, por sua vez, determinam a sequência de aminoácidos que compõem as proteínas. Dessa forma, a sequência de bases na fita codificadora do DNA pode ser empregada para deduzir a sequência de aminoácidos na proteína.

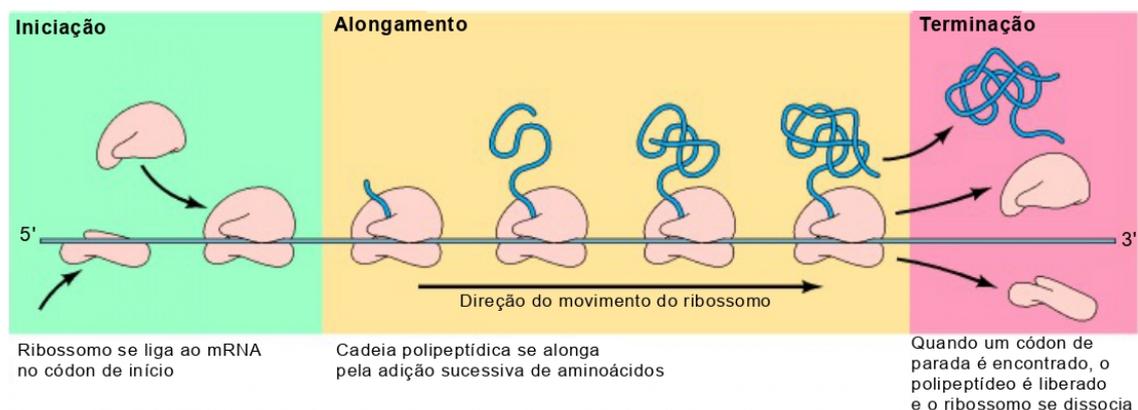
Na fase inicial da tradução, as subunidades ribossomais grande e pequena se unem ao redor de um mRNA. Este mRNA contém um tRNA iniciador devidamente ativado e posicionado corretamente no códon de início, localizado no sítio P do ribossomo. Posteriormente, o complexo de iniciação percorre a molécula de mRNA associada. O processo de escaneamento é interrompido assim que o anticódon do tRNA reconhece o códon de início. Este códon de início, geralmente o primeiro AUG a jusante da extremidade 5' em muitos mRNAs eucarióticos, desempenha um papel crucial nessa etapa do processo (LODISH et

al., 2014).

Em seguida, a tradução avança por meio do alongamento da cadeia polipeptídica. Nessa fase, o mRNA é lido um códon por vez, e o aminoácido correspondente a cada códon é incorporado à cadeia de proteína em formação. Os tRNAs se conectam ao ribossomo à medida que este se desloca ao longo do mRNA, transitando pelos sítios A (aminoacil), P (péptido) e E (exit). Esse processo se repete iterativamente, à medida que novos códons são decifrados e novos aminoácidos são acrescentados à crescente cadeia polipeptídica. O processo de alongamento da cadeia polipeptídica persiste até que um códon de parada (UAA, UAG ou UGA) seja deslocado para o sítio A do ribossomo. Notavelmente, as células não possuem tRNAs com anticódons complementares a esses sinais de terminação. Em vez disso, dispõem de fatores de liberação que identificam esses sinais, desencadeando uma série de eventos que encerram a síntese proteica. Esse processo resulta na separação da cadeia polipeptídica do seu tRNA, permitindo que ela se desloque para fora do ribossomo (COOPER, 2000).

A figura 3 resumidamente ilustra as três etapas da tradução. Inicialmente, durante a fase de iniciação, o ribossomo se conecta ao mRNA no códon de início. Em seguida, ocorre o processo de alongamento, caracterizado pela adição sequencial de aminoácidos à cadeia polipeptídica em formação. A terminação da síntese ocorre quando um códon de parada é identificado, desencadeando a liberação do polipeptídeo. Esse evento culmina na dissociação do ribossomo, finalizando assim o processo de tradução.

Figura 3 – Visão geral das etapas da tradução.



Fonte: Adaptado de (COOPER, 2000).

Além dos processos de transcrição e tradução, diversas modificações pós-tradução influenciam a localização, ativação ou inativação das funções de uma proteína. Essas modificações englobam processos como oxidação, fosforilação, desfosforilação, ligação molecular e transporte. A oxidação está relacionada à perda de elétrons de uma molécula, frequentemente causada por espécies reativas de oxigênio, que são moléculas instáveis e

altamente reativas presentes no organismo (RAY; HUANG; TSUJI, 2012). A fosforilação, por sua vez, implica a adição de um grupo fosfato a uma proteína ou outra molécula (RUBIN; ROSEN, 1975). A desfosforilação é o processo inverso, envolvendo a remoção de um grupo fosfato de uma molécula (DENU et al., 1996). A ligação molecular refere-se a uma associação estável entre duas moléculas por meio de uma interação atrativa (SMITH et al., 2009). Por fim, o transporte envolve a capacidade de uma proteína movimentar uma molécula para diferentes regiões da célula (XIAO et al., 2007). Esses processos desempenham papéis cruciais na regulação e funcionalidade das proteínas dentro do contexto celular.

Os microRNAs (miRNAs), com cerca de 22 nucleotídeos, constituem um grupo de pequenos RNAs não-codificantes¹ responsáveis por facilitar a desestabilização e a inibição da tradução de RNAs subsequentes no nível pós-transcricional. A expressão desses miRNAs pode ser generalizada ou específica do contexto, como durante o desenvolvimento ou em determinados tecidos. Eles desempenham papéis diversos em uma ampla gama de funções fisiológicas. Assim, a desregulação dos miRNAs pode perturbar a harmonia da atividade genética normal, levando a diversas doenças, incluindo o câncer. Estudos recentes identificaram que mais de 50% dos miRNAs apresentam desregulação em casos de câncer humano. Adicionalmente, assinaturas prognósticas e preditivas de miRNA têm sido observadas em diferentes tipos de câncer (CALIN; CROCE, 2006).

Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs), com um tamanho superior a 200 nucleotídeos, representam uma nova categoria de RNAs não-codificantes que desempenham um papel significativo no desenvolvimento e progressão do câncer (GIBB; BROWN; LAM, 2011; HUARTE; RINN, 2010). Diversos lncRNAs foram caracterizados por seu envolvimento em diferentes tipos de câncer, e estratégias direcionadas a esses lncRNAs têm demonstrado efeitos inibitórios sobre as células malignas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essas descobertas destacam o potencial dos lncRNAs como alvos terapêuticos promissores em contextos cancerígenos (LI; CHEN, 2013). Pesquisas evidenciam que os lncRNAs têm funções biológicas cruciais na embriogênese (PAULI; RINN; SCHIER, 2011), na biologia de células-tronco e no desenvolvimento celular (GUTTMAN et al., 2011). Além disso, eles exibem padrões específicos de expressão relacionados a tecidos e desenvolvimento (MERCER; DINGER; MATTICK, 2009; PONTING; OLIVER; REIK, 2009).

2.2 REDES DE REGULAÇÃO GENÉTICA

As células habitam um ambiente complexo e têm a capacidade de perceber uma variedade de sinais. Esses sinais englobam parâmetros físicos, como temperatura e pressão osmótica, moléculas de sinalização biológica provenientes de outras células, nutrientes benéficos e substâncias químicas prejudiciais. Informações cruciais sobre o estado interno

¹RNA não-codificantes são moléculas de RNA que não são traduzidas em proteína.

da célula, como os níveis de metabólitos essenciais e danos internos, como aqueles no DNA, membrana ou proteínas, também desempenham um papel significativo. Em resposta a esses sinais, as células elaboram a produção de proteínas específicas, as quais agem tanto no ambiente interno quanto externo da célula (ALON, 2019).

Os sistemas complexos que controlam o desenvolvimento humano provavelmente passaram por mais de um bilhão de anos de evolução, regulando a expressão de genes de qualquer processo. Esses sistemas, em essência, representam códigos regulatórios genômicos pré-programados, destinados a especificar quais conjuntos de genes devem ser ativados em padrões específicos (DAVIDSON; LEVIN, 2005). A teoria das redes complexas desempenha um papel crucial em diversas áreas do conhecimento, abrangendo desde ciência da computação, sociologia, física e biologia molecular e populacional. Nas esferas da biologia e medicina, a análise de redes possui aplicações abrangentes, incluindo a identificação de potenciais alvos para medicamentos, a explicação da função de proteínas ou genes, o desenvolvimento de estratégias eficazes para o tratamento de diversas doenças e a facilitação de diagnósticos precoces de distúrbios (PAVLOPOULOS et al., 2011).

Dada a natureza dos dados de expressão genética, que se limitam a fornecer informações sobre a abundância de mRNAs, as redes reguladoras de genes (RRG) oferecem informações valiosas sobre as interações regulatórias entre os reguladores e seus alvos potenciais. Isso inclui interações gene-gene e possíveis ligações proteína-proteína, como em um complexo. Em contraste com dados de ligação, essas redes se concentram em revelar padrões de regulação, fornecendo uma visão abrangente das dinâmicas regulatórias em jogo (SIMOES; DEHMER; EMMERT-STREIB, 2013).

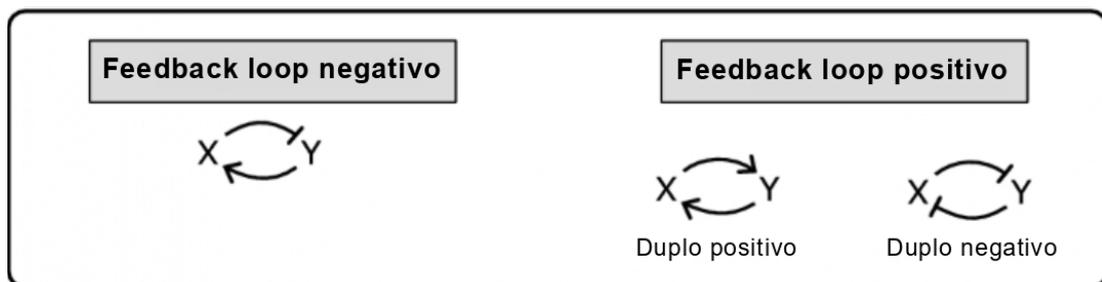
As redes biológicas estão se tornando cada vez mais essenciais para a análise e interpretação de conjuntos de dados extensos gerados por tecnologias de alto rendimento. Em geral, uma rede é representada por um conjunto de elementos distintos, os nós, e interações entre esses elementos, as arestas. Quando aplicado à biologia, os nós podem representar genes, proteínas ou estruturas modulares que são uma combinação de muitas unidades co-dependentes. As arestas correspondem a interações biológicas, conectando os nós e formando uma rede funcional que governa o processamento celular. Redes de interação geralmente dependem do ambiente habitado pelo organismo em estudo. Isso implica muitas possíveis configurações de rede, cada uma facilitando os processos biológicos mais adequados às condições externas. Os dados dos quais as redes são geradas devem, portanto, ser identificados com o(s) ambiente(s) experimental(is) correspondente(s). Na prática, isso tem se mostrado uma tarefa difícil devido a limitações em métodos experimentais e gerenciamento de dados (CARTER, 2005).

Grandes redes frequentemente apresentam uma complexidade que torna desafiadora sua análise em termos de topologia e uma abordagem recomendada para superar essas dificuldades é a identificação e caracterização de motivos de rede. Os motivos de rede são conjuntos pequenos de nós com padrões específicos de conectividade. A supor-

sição subjacente é que, ao identificar e caracterizar um número suficiente de motivos em termos de seu comportamento dinâmico, torna-se possível reconstruir o comportamento de toda a rede. De fato, diversos pesquisadores sustentam que a análise de motivos de rede não apenas é a abordagem mais eficaz, mas também a única viável para analisar redes extensas e complexas. Uma classe de motivos de rede que, teoricamente, desperta interesse particular para aqueles envolvidos na dinâmica de redes é a classe dos *feedback loops* (HALLINAN; JACKWAY, 2005).

Um *feedback loop* descreve um circuito fechado de interações que independentemente de seu comprimento se origina e termina no mesmo nó. A natureza dos circuitos de *feedback*, se positivo ou negativo, está associada à paridade das interações negativas presentes no circuito (HALLINAN; JACKWAY, 2005), mostrado na figura 4. Um circuito negativo é definido por um número ímpar de interações negativas no *loop*, enquanto um circuito positivo é definido por um número par de interações negativas.

Figura 4 – Exemplos de *feedback loops*. À esquerda, um *feedback loop* negativo composto por duas moléculas. À direita, um *feedback loop* duplo positivo, formado apenas por interações positivas, enquanto um *feedback loop* duplo negativo contém um número par de interações negativas.



Fonte: Adaptado de (DALCHAU et al., 2018).

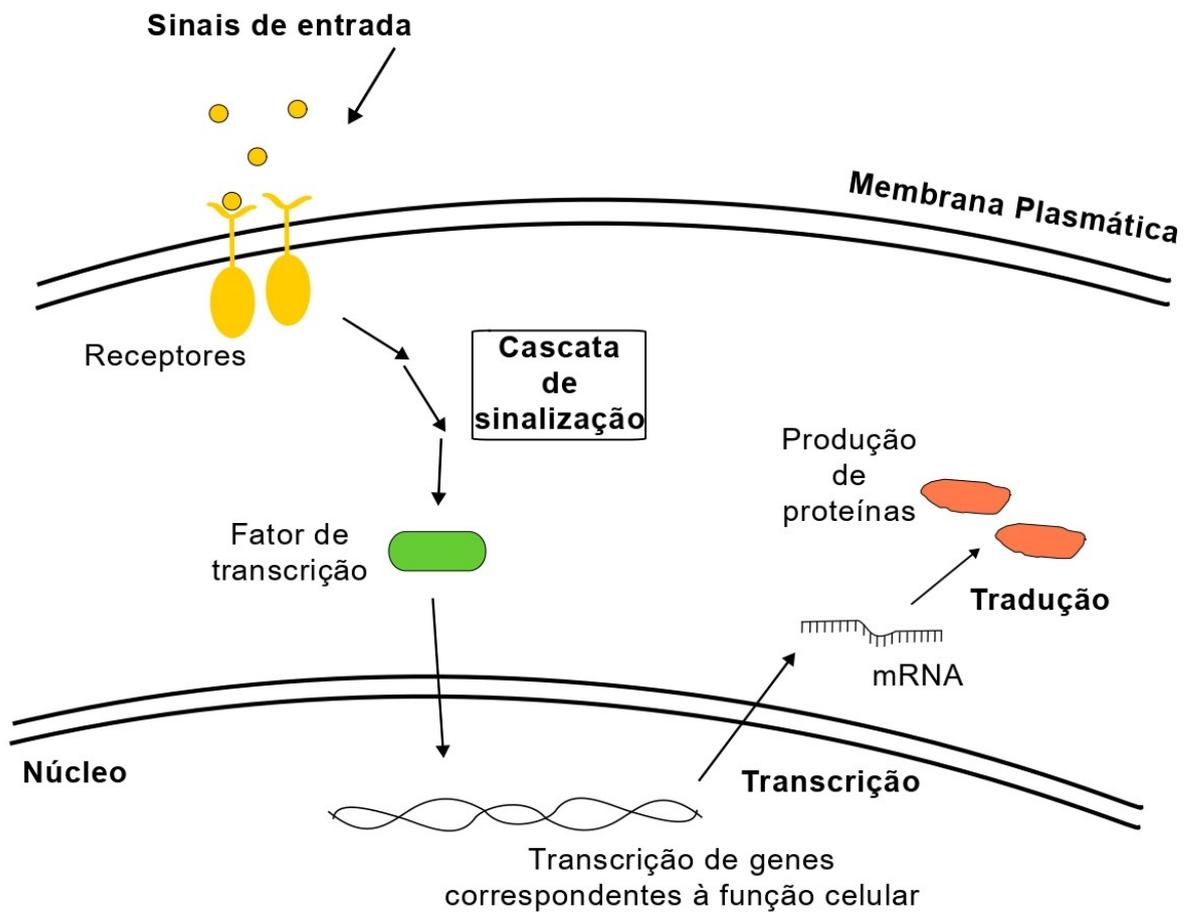
As redes reguladoras de genes diferem das redes de interação proteína-proteína mais amplamente reconhecidas por sua natureza bipartida e direcional. Essas redes são bipartidas, pois apresentam dois tipos distintos de nós: os genes e os reguladores. É importante notar que alguns genes atuam como reguladores de outros genes ou proteínas, contribuindo para a complexidade dessa bipartição. Além disso, a natureza direcional das redes reguladoras genéticas é evidente no fato de que os reguladores exercem controle sobre os genes, geralmente sem uma influência recíproca (WALHOUT, 2011).

Na figura 5, temos um exemplo de uma RRG. Nesse contexto, a célula recebe um sinal de entrada, detectado por proteínas receptoras na membrana plasmática. Esse sinal é então transmitido por meio de uma cascata de sinalização, envolvendo proteínas e moléculas citoplasmáticas, culminando na ativação de um fator de transcrição (FT). O FT, por sua vez, migra para o núcleo celular e se vincula a uma sequência específica de DNA, desencadeando a expressão do gene associado a essa sequência.

O gene expresso é transcrito em um mRNA, que, por sua vez, é traduzido em uma

proteína alvo. Essa proteína desempenha um papel crucial na ativação da função celular determinada pelo sinal de entrada original. Vale ressaltar que, durante o processo de tradução, a presença de miRNAs pode interromper a tradução do mRNA (LING; FABBRI; CALIN, 2013), proporcionando um mecanismo regulatório adicional. Essa regulação por miRNAs acrescenta uma camada de complexidade ao controle da expressão gênica, possibilitando ajustes finos e resposta adaptativa às condições celulares.

Figura 5 – Exemplo de uma rede de regulação gênica.



Fonte: A autora

2.3 TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL

Células epiteliais e mesenquimais são caracterizadas por seus fenótipos únicos e pela morfologia das estruturas multicelulares que elas criam (SHOOK; KELLER, 2003).

O epitélio é o tecido primordial do organismo, que recobre todas as superfícies corporais, incluindo tanto as internas quanto as externas. As células do tecido epitelial são ligadas por complexos de adesão intercelular em sua membrana que auxiliam na sustentação do citoesqueleto. Os diversos tipos de junções desempenham não apenas o papel de pontos de adesão, mas também podem atuar como vedantes, impedindo o fluxo de materiais através do espaço intercelular. Além disso, essas junções têm a capacidade de proporcionar canais para a comunicação entre células adjacentes. Do ponto de vista funcional, podemos classificar as junções em categorias como junções de adesão, que incluem zônulas de adesão, desmossomos² e hemidesmossomos³; junções impermeáveis, conhecidas como zônulas de oclusão; e junções de comunicação, como as junções comunicantes ou junções gap (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018). Essas junções intercelulares permitem que o epitélio forme uma superfície que envolve volumes tridimensionais e fornece integridade estrutural. Células epiteliais normalmente se associam firmemente com seus vizinhos, inibindo seu potencial de movimento e dissociação da camada epitelial (LEE; NELSON, 2012).

Em contraste, células mesenquimais não formam uma camada regular de células ou complexos de adesão intercelulares especializados. Esse tipo celular tem uma forma alongada em relação às células epiteliais e exibem polaridade de ponta a ponta e adesões focais, permitindo uma capacidade migratória aumentada. Além disso, as células mesenquimais migram facilmente dentro dos tecidos individualmente ou coletivamente, formando uma cadeia de células migratórias. Elas são essenciais para o desenvolvimento, pois podem migrar grandes distâncias pelo embrião para dar origem a um órgão específico. No adulto, a função principal dos fibroblastos, células mesenquimais prototípicas que existem em muitos tecidos, é manter a integridade estrutural pela secreção de matriz extracelular (MEC) (LEE; NELSON, 2012).

Em muitas células epiteliais, a organização de organelas na região do citoplasma que se apoia na lâmina basal (polo basal da célula), a qual é a parte inferior ou mais próxima da base da célula, difere da disposição observada no citoplasma da região livre da célula (polo apical), que é a parte superior ou voltada para a cavidade ou superfície livre do tecido. Essa distinta organização, que permanece consistente em vários tipos de epitélios, é conhecida como polaridade das células epiteliais. Esse fenômeno implica que diferentes partes dessas células podem desempenhar funções distintas. Além disso, a composição molecular da membrana plasmática nas células epiteliais pode variar entre seus polos específicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018).

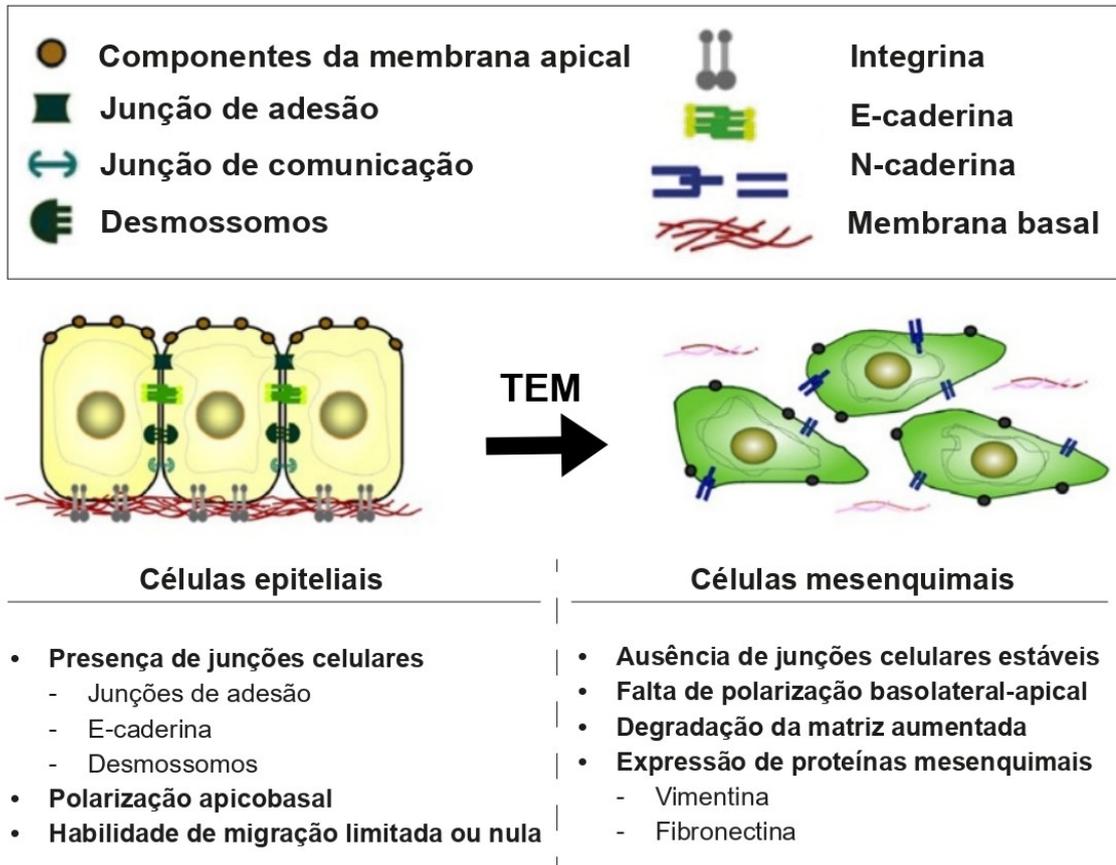
A figura 6 resume as características que distinguem as células epiteliais das células

²Desmossomos, conhecidos também como junções de ancoragem, desempenham o papel de rebites, solidificando a união das células. Essas estruturas são responsáveis por conectar as células musculares entre si em um tecido muscular (REECE et al., 2010).

³Os hemidesmossomos são estruturas assimétricas que ancoram a porção basal das células epiteliais à lâmina basal subjacente (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

mesenquimais.

Figura 6 – As células epiteliais possuem proteínas juncionais especializadas, apresentam polaridade apicobasal e têm uma capacidade limitada de dissociação e migração. Por outro lado, as células mesenquimais não formam complexos especializados de adesão, têm uma forma irregular com polaridade de ponta a ponta e aderências focais, o que resulta em uma capacidade aumentada de migração.



Fonte: Adaptado de (LEE; NELSON, 2012).

No final dos anos 1960, a primeira descrição formal da transição epitelial mesenquimal (TEM) foi publicada, com evidências substanciais que indicam a capacidade das células epiteliais de realizar uma transição para um fenótipo mesenquimal, destacando a significância desse processo durante a embriogênese normal em aves (TRELSTAD; HAY; REVEL, 1967; HAY, 1968). Já na década de 1980, Greenburg e Hay detalharam as alterações epiteliais-mesenquimais observadas nos fenótipos celulares de epitélios tanto adultos quanto embrionários e apenas nos anos 1990, o acúmulo de evidências passou a indicar que um processo semelhante, inicialmente observado durante a embriogênese, também estava associado à progressão do câncer (GREENBURG; HAY, 1982; THIERY, 2002).

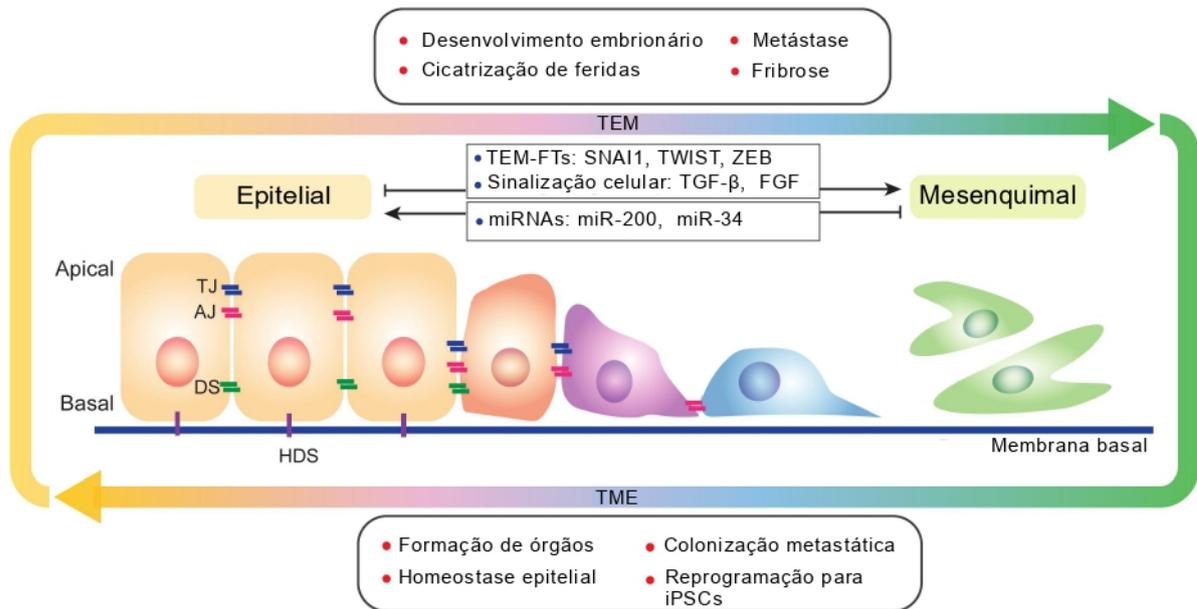
A transição epitelial mesenquimal é um processo biológico no qual uma camada polarizada de células epiteliais passa por diversas alterações bioquímicas, resultando em

um fenótipo mesenquimal. Esse fenótipo é caracterizado por células com adesões celulares mais frágeis e maior capacidade migratória. Adicionalmente, essas células exibem morfologia alterada, assim como resistência à quimioterapia (ISER et al., 2017). A degradação da membrana basal é o indicativo da conclusão do processo de TEM, que facilita a migração da célula mesenquimal para sítios distantes da camada epitelial originária. A TEM é categorizada em três subtipos distintos com base no contexto biológico em que ocorre. O primeiro tipo de TEM está associado à implantação, formação de embriões e desenvolvimento de órgãos, o segundo tipo de TEM é vinculado à cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e fibrose de órgãos e por fim, o terceiro tipo ocorre em células neoplásicas, sendo associado à progressão do câncer. Essa classificação proporciona uma compreensão mais abrangente dos diferentes cenários em que a TEM desempenha papéis distintos, desde eventos fisiológicos normais até situações patológicas, como no contexto do câncer (KALLURI; WEINBERG et al., 2009).

O câncer é uma doença na qual algumas células do corpo crescem incontrolavelmente. Existem muitos tipos diferentes de câncer, e cada um começa quando uma única célula adquire uma alteração genômica (ou mutação) que permite que a célula se divida e se multiplique sem controle. Tais mutações podem originar-se de erros durante a replicação do DNA ou ser provocadas por danos ao DNA resultantes de exposições ambientais, como a exposição à fumaça do tabaco ou aos raios ultravioleta do sol (National Human Genome Research Institute, 2023). A metástase, que envolve a propagação de células malignas de um tumor inicial para áreas distantes, emerge como o principal desafio no tratamento do câncer e constitui a causa primária de óbito em pacientes diagnosticados com essa doença (GEIGER; PEEPER, 2009). Devido ao aumento na capacidade migratória das células epiteliais cancerígenas, há uma considerável ênfase na pesquisa do terceiro tipo de TEM.

A figura 7 exhibe o processo da TEM e seu processo inverso, (TME). Durante a TEM, as células epiteliais perdem não apenas a sua polaridade apical-basal, mas também as conexões entre si e com a membrana basal.

Figura 7 – A transição epitelial mesenquimal (TEM) e seu processo inverso, a transição mesenquimal epitelial (TME), ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, apresentando uma característica espectral distintiva. A regulação da TEM envolve diversos fatores, como fatores de transcrição, sinalização celular e modificações epigenéticas. Os termos técnicos incluem TJ, referente à junção apertada (*tight junction*); AJ, à junção aderente (*adherens junction*); DS, ao desmossomo; e HDS, ao hemidesmossomo.



Fonte: Adaptado de (LAI et al., 2020).

É crucial ressaltar que, antes de as células cancerígenas conseguirem iniciar o processo de metastatização, é essencial que elas vençam o desafio do anoikis, uma forma de morte celular programada que é acionada quando células dependentes de ancoragem, como as integrinas, se desprendem da matriz extracelular (MEC) circundante (KIM et al., 2012). Em situações normais, quando as integrinas na superfície da célula epitelial estabelecem contato com a MEC, ocorre a ativação da FAK⁴, desencadeando uma cascata de fosforilação que culmina na ativação da Akt, promovendo, assim, a sobrevivência celular. No entanto, se a integrina perde o contato com a MEC, os sinais de sobrevivência celular são interrompidos, permitindo que proteínas pró-apoptóticas fiquem desinibidas e iniciem o processo de morte celular (HEERBOTH et al., 2015).

As células cancerígenas empregam diversas estratégias para evitar o anoikis, muitas vezes associadas à TEM. Por exemplo, a diminuição da expressão da E-caderina e o aumento na expressão da N-caderina estão correlacionados com a resistência ao anoikis e um incremento na invasividade. Além disso, evidências sustentam que a desregulação dos receptores do fator de crescimento pode levar à resistência ao anoikis (DERKSEN et al., 2006).

⁴Quinase de adesão focal. FAK é uma proteína que desempenha um papel crucial como mediador intracelular de modificações provenientes do ambiente extracelular (YOON et al., 2015).

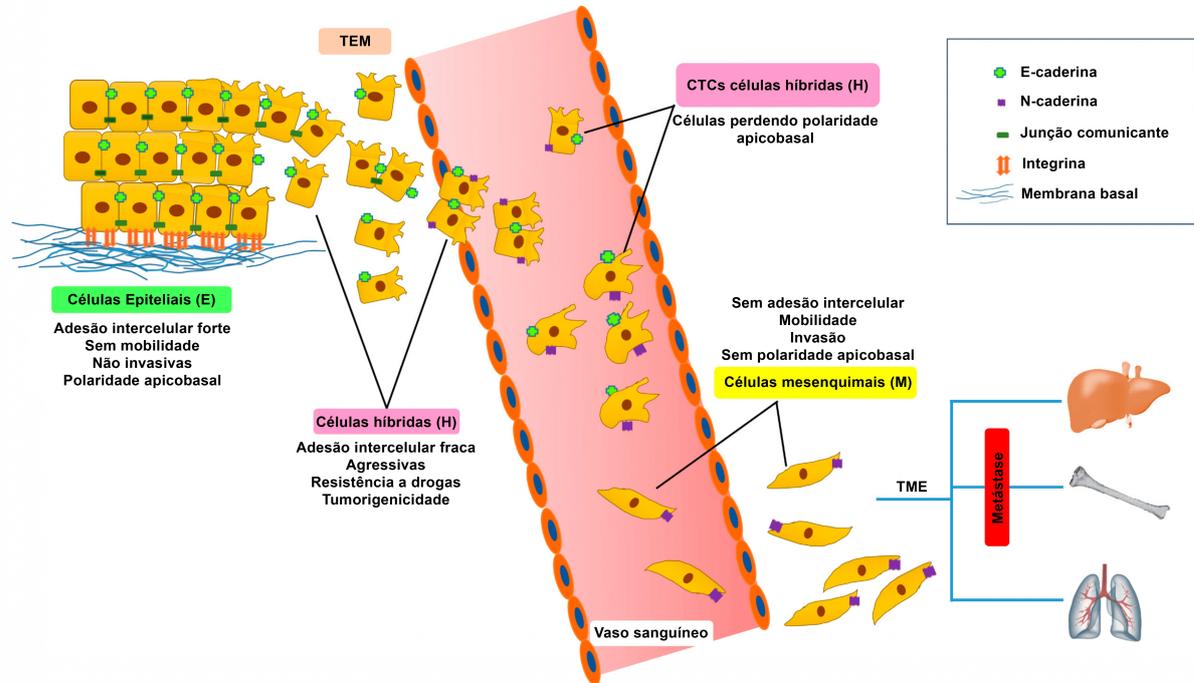
2.4 FENÓTIPOS HÍBRIDOS

As células tumorais são reconhecíveis por compartilharem diversas características moleculares e morfológicas com os fibroblastos estromais circunvizinhos. Simultaneamente, o microambiente em constante evolução no tumor possibilita que essas células adotem um fenótipo híbrido entre epitelial e mesenquimal (E/M), conferindo-lhes uma notável plasticidade celular (REVENU; GILMOUR, 2009). Consequentemente, as células tumorais adquirem um potencial migratório, atravessam a membrana basal, adentram os vasos sanguíneos periféricos e transformam-se em células tumorais circulantes (CTCs). Estas células passam pelo processo de transição mesenquimal epitelial, viajam para órgãos distantes ou auto-semeiam-se de volta ao órgão alvo original. Uma vez estabelecidas, extravasam e proliferam para formar metástases secundárias (KIM et al., 2009).

Células cancerígenas que exibem um fenótipo E/M parcial ou híbrido demonstram características epiteliais, como adesão célula-célula, e mesenquimais, incluindo migração, durante um período transitório durante a transição epitelial mesenquimal. CTCs malignas com esse fenótipo híbrido E/M têm a capacidade de migrar individualmente ou de maneira coletiva na matriz extracelular (MEC) através do sistema circulatório (GARG, 2017). Por conta disso, as células que exibem um fenótipo híbrido podem demonstrar um potencial metastático até 50 vezes maior do que as células migratórias individuais que apresentam um fenótipo mesenquimal completo (ACETO et al., 2014).

A figura 8 mostra a migração de células com fenótipo híbrido, as características específicas de cada fenótipo e seus marcadores. A TEM confere características agressivas às células cancerígenas, como resistência a medicamentos, supressão da senescência, evasão da anoiquis, escape da vigilância imunológica e aquisição de propriedades semelhantes às células-tronco cancerígenas (CSC) (SAITOH, 2018). A definição clássica da TEM frequentemente se baseia na alteração do marcador de adesão celular E-caderina (E-cad), indicando a sua depleção, e no ganho do marcador neural N-caderina (N-cad) (LINTZ; MUÑOZ; REINHART-KING, 2017). Notavelmente, CTCs foram identificadas exibindo fenótipos híbridos E/M, capazes de transição para estados mesenquimais e de induzir metástases por meio da TEM em locais distantes (SINHA et al., 2020).

Figura 8 – Células com fenótipo híbrido E/M representam um estado de transição durante o processo de transição epitelial mesenquimal. Diversos marcadores e características específicas identificam os estados epitelial (E), mesenquimal (M) e híbrido (H) em diferentes fases da transição. A perda das aderências celulares nas células E desencadeia a TEM, permitindo que essas células se libertem na circulação sanguínea como células tumorais circulantes (CTCs).



Fonte: Adaptado de (SINHA et al., 2020)

O estado híbrido da transição epitelial mesenquimal é coordenado por diversos elementos, entre eles os fatores de estabilidade fenotípica (PSFs), fatores de transcrição (FTs), proteínas de junção aderente, notadamente E-caderina (E-cad) e N-caderina (N-cad), reguladores epigenéticos, modificações pós-traducionais e o microambiente tumoral. Reguladores epigenéticos, como metilação, acetilação e RNAs não-codificantes, juntamente com modificações pós-traducionais, como fosforilação e ubiquitinação, desempenham papéis cruciais na regulação da expressão de diversos fatores de transcrição, incluindo SNAI1, Twist1, ZEB1 e ZEB2. Estes FTs, por sua vez, potencializam o processo de TEM e, conseqüentemente, contribuem para a subsequente formação de metástases (SINHA et al., 2020).

Os sinais de ativação como TGF- β e Wnt, recebidos pelas células no seu microambiente, colaboram de maneira sinérgica com as vias de sinalização intrínsecas dessa para induzir a expressão de diversos FTs indutores da transição epitelial mesenquimal (KRÖGER et al., 2019).

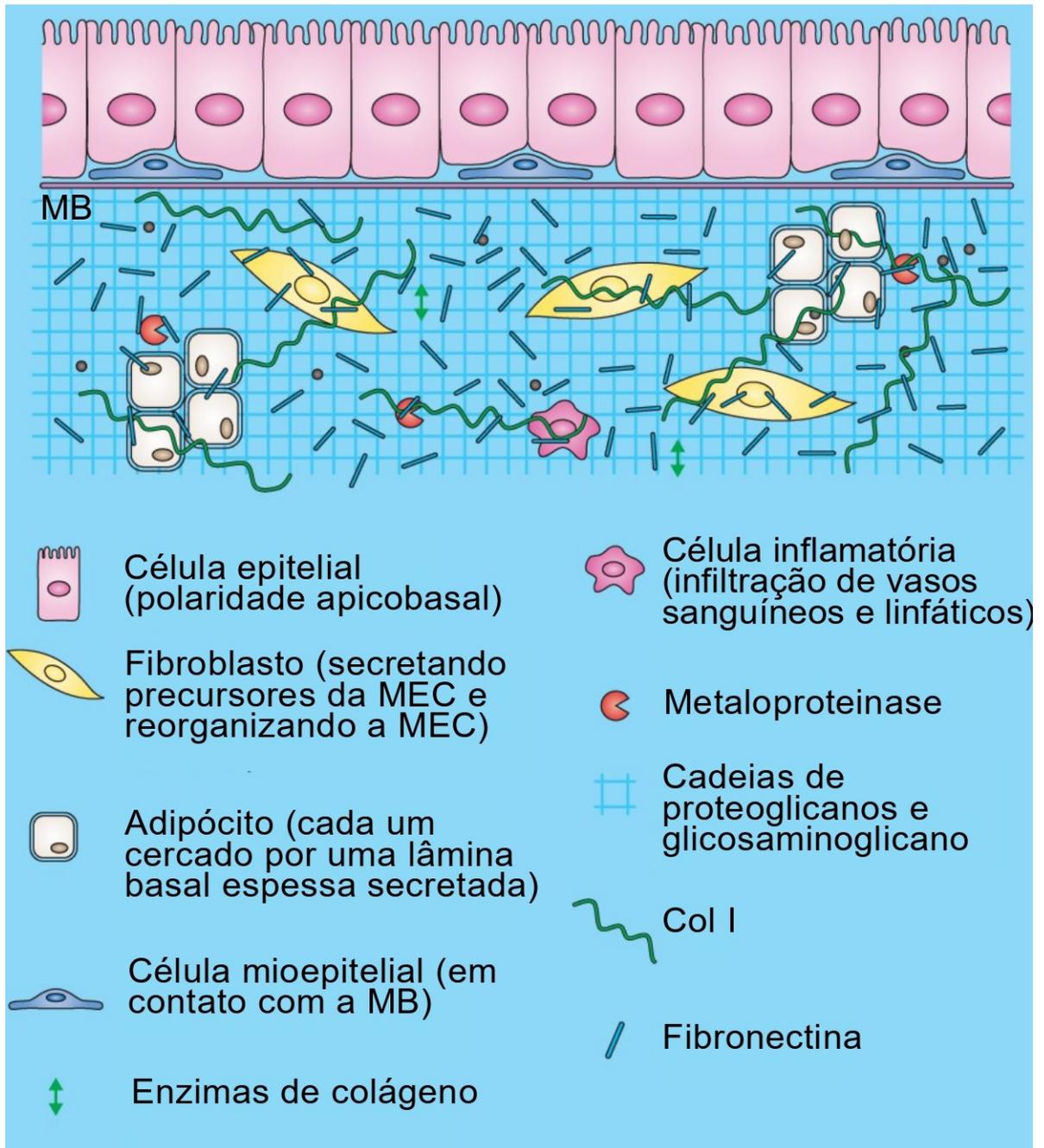
2.5 MATRIZ EXTRACELULAR

Matrizes extracelulares (MECs) constituem redes arquitetônicas tridimensionais meticulosamente organizadas, desempenhando papéis estruturais e funcionais cruciais na organização e remodelação de tecidos, assim como na regulação de processos celulares. Estas MECs funcionam como mediadores de comunicação entre as células em órgãos e tecidos, orquestrando uma série de sinais que fluem tanto do ambiente celular para o exterior quanto vice-versa (MANOU et al., 2019; THEOCHARIS et al., 2012). Como resultado, as MECs direcionam a morfogênese, o desenvolvimento e a homeostase dos tecidos, regulando aspectos fundamentais da fisiologia celular, crescimento, sobrevivência, diferenciação e adesão. Durante condições patológicas, as MECs passam por extensa remodelação, desempenhando um papel crucial na progressão de diversas doenças (THEOCHARIS; MANOU; KARAMANOS, 2019), englobando aterosclerose, patologias autoimunes e inflamatórias, e também incluindo o câncer (THEOCHARIS et al., 2016). Fenótipos específicos da MEC moldam as características distintas dos vários tipos de tecidos, como epiteliais, nervosos, musculares e conjuntivos, atendendo às demandas específicas de suas funções ideais (IOZZO et al., 2020).

É importante notar que a formulação das MECs pode ser continuamente adaptada em resposta a sinais bioquímicos ou mecânicos, resultando em um processo de remodelação dinâmico e ajustado (KARAMANOS et al., 2019).

A figura 9 apresenta a estrutura da matriz extracelular. Embora, em sua essência, a MEC seja constituída por água, proteínas e polissacarídeos, cada tecido apresenta uma MEC única em termos de composição e topologia. Essa singularidade é gerada durante o desenvolvimento do tecido por meio de um diálogo dinâmico e recíproco, tanto bioquímico quanto biofísico, entre os diversos componentes celulares, como células epiteliais, fibroblastos, adipócitos e elementos endoteliais, e o microambiente em constante evolução, composto por proteínas. É importante destacar que a composição física, topológica e bioquímica da MEC não apenas varia entre tecidos, mas também apresenta uma notável heterogeneidade. Esse caráter heterogêneo reflete a interação complexa entre os componentes celulares e a matriz extracelular em constante evolução, resultando em uma MEC única para cada tipo de tecido. Esse fenômeno sublinha a sofisticação do processo de desenvolvimento tecidual, onde a dinâmica interativa entre células e ambiente circundante desempenha um papel fundamental na determinação das características distintas da matriz extracelular em diferentes contextos fisiológicos (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

Figura 9 – Estrutura da matriz extracelular e suas componentes.



Fonte: Adaptado de (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010)

3 METODOLOGIA

A bioquímica, que se dedica ao estudo dos processos e princípios químicos nos organismos vivos, serve como alicerce fundamental para a compreensão da vida em sua totalidade, abrangendo doenças complexas como o câncer ou a diabetes. A abordagem científica mais eficaz na bioquímica ainda é o reducionismo, caracterizado pela reconstrução gradual de processos complexos, partindo de elementos fundamentais, por meio da acumulação de conhecimento sobre fatos elementares, tais como as transformações químicas. Esses fatos, essenciais para o entendimento, necessitam de uma organização adequada, e a modelagem matemática emerge como uma ferramenta valiosa para auxiliar no raciocínio sobre esses elementos. Dessa forma, a aplicação dessa abordagem não apenas amplia nosso entendimento dos mecanismos bioquímicos subjacentes, mas também proporciona uma base sólida para a investigação e compreensão de doenças complexas que afetam os organismos vivos. A aplicação da modelagem matemática em redes biológicas emerge como uma perspectiva promissora para desvendar a intrincada complexidade da progressão do câncer. Essa abordagem possibilita a compreensão das anormalidades que se acumulam na cinética da bioquímica celular (CALZONE; BARILLOT; ZINOVYEV, 2018). A modelagem computacional tem se destacado como uma abordagem amplamente adotada no cenário científico contemporâneo, facilitando a análise de dados gerados por redes biológicas complexas, isso inclui investigações sobre destino celular, transição epitelial mesenquimal, ciclo celular, entre outros processos biológicos (SILVEIRA; GUPTA; MOMBACH, 2020a; SILVEIRA; GUPTA; MOMBACH, 2020b; GUPTA; SILVEIRA; MOMBACH, 2018; ISSLER; MOMBACH, 2017).

A representação dinâmica da expressão gênica pode ser alcançada por meio de equações diferenciais, onde variáveis específicas são empregadas para descrever as alterações nos padrões de expressão gênica ao longo do tempo e do espaço. Esse enfoque permite capturar e modelar de maneira eficiente as complexas dinâmicas que caracterizam a regulação gênica, o qual facilita a observação sobre as variações temporais e espaciais nos níveis de expressão dos genes (ARNOSTI; AY, 2012).

3.1 MODELAGEM LÓGICA

O uso do formalismo lógico na biologia teve início nas décadas de 60 e 70, com as contribuições de Sugito, Kauffman e R. Thomas, demonstrando que os estados estáveis derivados dessa modelagem podem ser vinculados a distintos fenótipos celulares, e que as transições entre esses estados lógicos podem ser correlacionadas com alterações na expressão gênica (SUJITA, 1963; KAUFFMAN, 1969; THOMAS, 1973). Na biologia de sis-

temas contemporânea, essa estratégia tem sido aplicada com êxito na análise de extensas redes moleculares regulatórias, englobando genes, proteínas e microRNAs, para descrever comportamentos complexos e decisões relacionadas ao destino celular (NOVERE, 2015; WYNN et al., 2012; ABOU-JAOUDE et al., 2016).

Em síntese, essa estratégia envolve o desenvolvimento e a análise de modelos lógicos que descrevem uma ou mais propriedades fenomenológicas, pressupondo uma regulação não linear dos componentes regulatórios, dependentes apenas da presença ou ausência de reguladores (THOMAS, 1991). Esse modelo é uma representação abstrata da rede regulatória, materializada por meio de um grafo, conhecido como grafo regulatório.

Nesse grafo regulatório, as arestas refletem os efeitos de influência entre os componentes da rede, chamados de nós, representando processos de ativação ou inibição, sendo frequentemente binários (*booleanos*), descrevendo dois estados qualitativos de atividade biológica ou concentração para os respectivos componentes moleculares, ligados ou desligados. Alternativamente, os nós podem também ser multi-valorados, associando múltiplos graus discretos e finitos de atividade/concentração aos componentes moleculares.

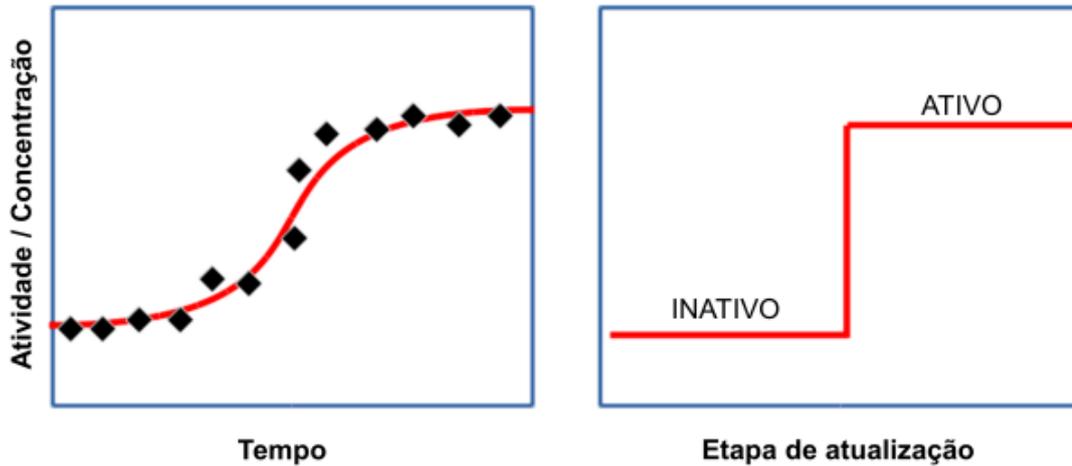
No contexto da modelagem lógica, os genes (ou componentes reguladores) são associados a valores discretos que representam seus níveis funcionais de expressão ou atividade. Uma função reguladora determina como o nível do gene evolui, dependendo dos estados dos nós que controlam sua atividade. Esse modelo estabelece um sistema dinâmico em que o estado da rede, ou seja, os níveis de cada componente, evolui de maneira discreta. Essa representação abstrata dos mecanismos moleculares é particularmente útil ao lidar com redes para as quais faltam dados cinéticos precisos (CHAOUUIYA; REMY, 2013).

Na figura 10 as linhas vermelhas representam valores teóricos tanto pelos modelos cinético quanto lógico. Os pontos correspondem aos valores observados experimentalmente ao longo do tempo para uma molécula biológica. A maioria dos processos biológicos resulta em saturação de um produto durante sua produção ou durante uma transformação química da molécula ao longo do tempo (comportamento sigmoide). Isso ocorre quando a taxa de produção de uma espécie química biológica é igual à taxa de consumo. Por exemplo: A produção de uma proteína por meio da ativação de seu gene atinge seu limite quando sua taxa de produção é igual à taxa de degradação da proteína; A fosforilação de uma proteína por quinases (ativação/inibição) em sinalização é limitada pela concentração constante de proteínas; Reações químicas e ligação molecular de proteínas quando atingem o equilíbrio (PAIS, 2018).

A abordagem mais comum na modelagem de redes é por meio do desenvolvimento de modelos cinéticos, que dependem de conhecimento detalhado sobre as leis de taxa e constantes cinéticas de cada processo individual. A modelagem lógica tem a vantagem de não exigir conhecimento preciso sobre a cinética dos processos individuais na rede (NOVERE, 2015; WYNN et al., 2012). Isso é particularmente vantajoso para a maioria das

redes moleculares que envolvem processos de sinalização, pois suas leis de taxa cinética e parâmetros cinéticos geralmente são desconhecidos.

Figura 10 – Modelagem cinética ao longo do tempo usando um modelo cinético e a abstração lógica correspondente.



Fonte: Adaptado de (PAIS, 2018)

A evolução na estrutura lógica é executada por meio das chamadas de atualização das variáveis, definidas por regras lógicas, sem acessar as taxas dos processos. Os comportamentos dos modelos lógicos são governados por funções lógicas (também denominadas regras lógicas), que definem a evolução das variáveis em direção a atratores, seguindo um esquema de atualização.

Ademais, a modelagem lógica introduz a noção de valores de limiar, que definem mudanças na atividade dos componentes do modelo conforme as funções lógicas. Desse modo, a modelagem lógica proporciona uma análise discreta e qualitativa de redes moleculares, em contraste com a modelagem cinética baseada em equações diferenciais ordinárias (ODE), comumente utilizada e contínua (WYNN et al., 2012; ABOU-JAOUDE et al., 2016).

Do ponto de vista matemático, a elaboração do modelo lógico de uma rede regulatória (G, K) é guiada por informações bioquímicas previamente publicadas na literatura. Essas informações são definidas por um conjunto de n componentes reguladores discretos, $G = (g_1, g_2, \dots, g_n)$, onde cada g_i tem valores em $(0, \dots, Max_i)$, representando o nível de ativação do componente, onde Max_i é o valor máximo definido para g_i . Esses componentes podem ser equivalentes às concentrações de moléculas ou estados biológicos, processos biológicos, ou fenótipos. Um g_i multivalorado será considerado quando a variável atua em níveis diferentes em alvos distintos ou tem efeitos diferentes em um alvo.

Em um modelo lógico o espaço de estados S , o qual é representado por um grafo de

transições de estados (GTE) é finito e um nó é definido como um vetor $g = [g_1, g_2, \dots, g_n]$. Uma função lógica K_i define os valores de cada g_i em termos de interações ativadoras ou inibidoras que ligam o g_i . Isso caracteriza um grafo direcionado. A função de transição K é definida como $K(g) = (K_1(g), \dots, K_n(g))$. Variáveis com múltiplos valores são aumentadas ou diminuídas passo a passo.

Os operadores lógicos são o AND, OR e NOT, utilizados para especificar os momentos nos quais uma função de estado assume valores discretos, particularmente, no contexto *booleano*, quando a função é nula ou igual a 1. Por exemplo, considere $F(a, b)$ como uma função de estado definida por $F = a\bar{b}$. Podemos observar que $F(a, b)$ é diferente de zero se, e somente se, a estiver presente e b estiver desativada. A tabela 1 a seguir apresenta os casos possíveis para a função F .

Tabela 1 – Tabela verdade do uso dos operadores lógicos. O emprego do sobrescrito representa o NOT, o "+" o OR e escrever uma variável ao lado da outra, como ab , indica o operador AND.

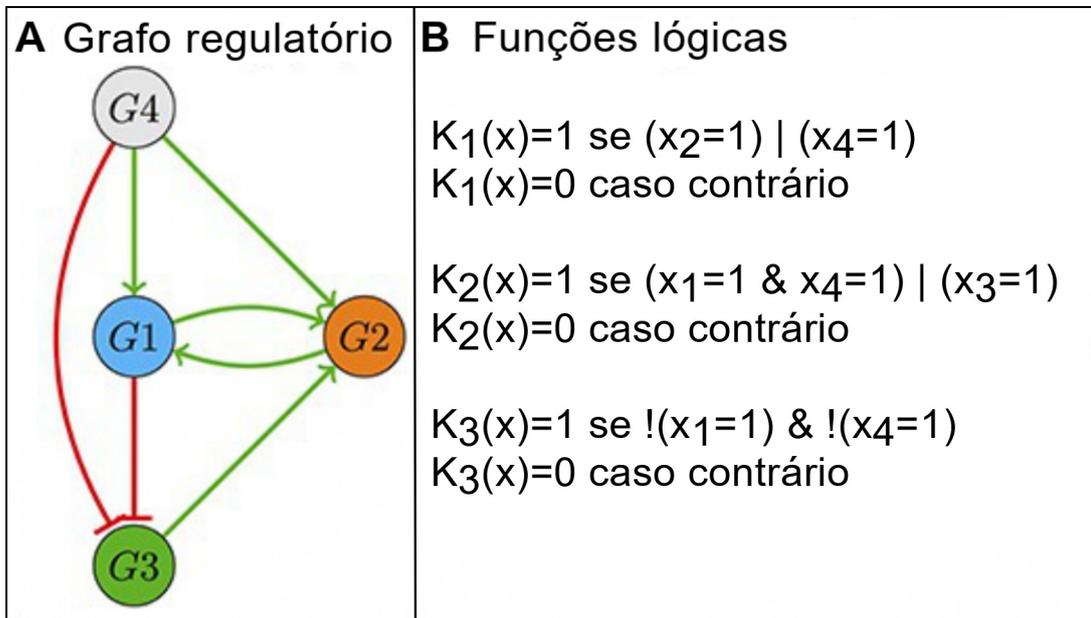
a	b	\bar{a}	\bar{b}	ab	$a + b$	$\bar{a}\bar{b}$	$\bar{a} + \bar{b}$	$\overline{a + b}$	$\bar{a}\bar{b}$
0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
1	0	0	1	0	1	1	1	0	0

Fonte: (THOMAS; D'ARI, 1990)

Os GTEs são usados para descrever os atratores, que são comportamentos assintóticos na dinâmica de modelos lógicos. Em resumo, a rede de transição de estados abrange todas as trajetórias potenciais que um estado inicial pode percorrer até chegar a um estado final. Os vetores terminais que não possuem estados sucessores são denominados atratores estáveis, isto é, quando $K(g) = g$. Por outro lado, um conjunto de vetores terminais que formam uma trajetória cíclica entre si constitui um atrator cíclico (ABOU-JAOUDE et al., 2016).

A figura 11 mostra o grafo regulatório que define a topologia da estrutura regulatória, onde os nós representam componentes regulatórios e as arestas representam os efeitos regulatórios (ativações são indicadas por arestas verdes, enquanto inibições são representadas em vermelho) (A). A evolução das variáveis associadas aos componentes regulatórios é governada por funções lógicas específicas que determinam como os sinais de entrada afetam seu estado, que são expressas na forma de regras lógicas. $\&$, $|$ e $!$ representam os operadores lógicos AND, OR e NOT, respectivamente (B). Essa abordagem lógica permite traduzir o complexo arranjo de interações genéticas em uma representação formal compreensível, onde as funções lógicas capturam as relações de ativação e inibição entre os genes na rede de regulação.

Figura 11 – Exemplo de aplicação do formalismo lógico em uma rede de regulação genética. (A) O grafo regulatório é delineado pelas interações entre as componentes G4, que atua como sinal de entrada, G1, G2 e G3. (B) As funções lógicas correspondentes controlam os estados dos nós da rede apresentada em A.



Fonte: Adaptado de (ABOU-JAOUDE et al., 2016)

A figura 12 mostra a tabela verdade relacionada ao grafo da figura 11 para $x_4 = 0$.

Figura 12 – Exemplo de tabela verdade para a $x_4 = 0$.

Tabela verdade ($x_4 = 0$)

x_1	x_2	x_3	$K_1(x)$	$K_2(x)$	$K_3(x)$
0	0	0	0	0	1
0	0	1	0	1	1
0	1	0	1	0	1
0	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0
1	0	1	0	1	0
1	1	0	1	0	0
1	1	1	1	1	0

Fonte: Adaptado de (ABOU-JAOUDE et al., 2016)

Os tipos de atualizações das variáveis são os métodos síncrono e assíncrono. No método síncrono, as variáveis são atualizadas simultaneamente a cada etapa do tempo,

o que gera uma dinâmica completamente determinística. No método assíncrono, cada variável é atualizada independentemente, e pode gerar comportamento estocástico. De maneira geral, os sistemas biológicos exibem um comportamento estocástico em suas dinâmicas evolutivas. Portanto, o esquema assíncrono é considerado mais realista devido à sua dinâmica estocástica (SÁNCHEZ; CHAOUIYA, 2016; MENDES et al., 2018).

Aqui usamos a atualização assíncrona, na qual cada estado g , da componente do modelo i , dependendo do tempo t , evolui ao longo de cada etapa de tempo $(t + 1)$ da seguinte forma:

$$g_i(t + 1) = g_i(t) + \text{sign}[K_i(g(t))g_i(t)], \quad (3.1)$$

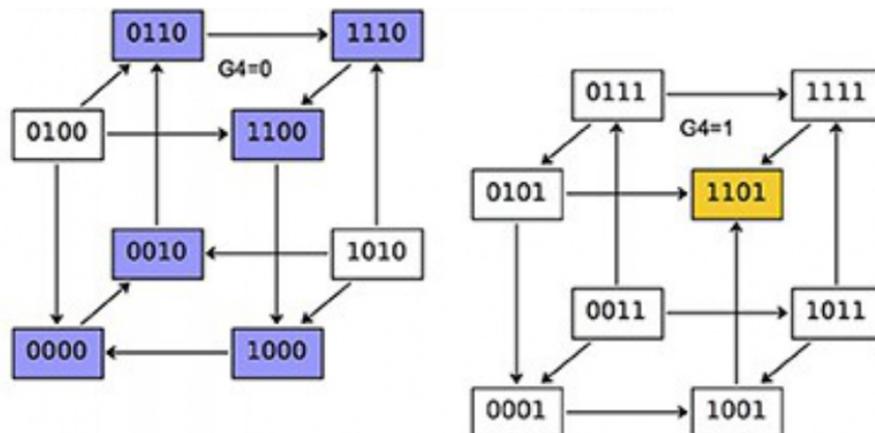
$$g_j(t + 1) = g_j(t), \quad (3.2)$$

para todo $i \neq j$, onde $\text{sign}[K_i(g_i(t))g_i(t)]$ é a função sinal dependente da função lógica $K_i(g_i(t))$ e estado inicial $g_i(t)$. A função sinal $\text{sign}(p)^1$ é igual a 1 se $p > 0$, -1 se $p < 0$ e $\text{sign}(0) = 0$, para $p = 0$. O índice j representa os componentes que não foram selecionados para o esquema de atualização.

Com base nas funções ilustradas na figura 11(B), é possível construir o grafo de transição de estados correspondente, adotando a abordagem de atualização assíncrona. Conforme o estado do sinal de entrada (G_4), é possível identificar dois atratores distintos: um cíclico, representado pela cor roxa, e outro estável, visualizado em amarelo, como destacado na figura 13.

Figura 13 – GTE relacionado ao método assíncrono do correspondente grafo da figura 11.

Grafo de transição de estados com atualização assíncrona



Fonte: Adaptado de (ABOU-JAOUDE et al., 2016)

A dinâmica de uma rede regulatória pode ser influenciada pelos circuitos que a compõem. Para avaliar o impacto desses circuitos na dinâmica, a abordagem lógica pos-

sibilita perturbações simuladas (*in silico*) nos valores das componentes do modelo. Esse tipo de abordagem permite explorar virtualmente os efeitos resultantes da restrição de uma variável para seus extremos, proporcionando informação sobre como tais perturbações podem influenciar a dinâmica do sistema modelado. Tais perturbações são implementadas restringindo o valor de uma componente específica do modelo. Por meio de uma perda de função (PF), a componente é forçada a permanecer no valor zero, indicando um estado desativado. Por outro lado, um ganho de função (GF) impõe que a componente permaneça em um valor maior que zero, conforme os valores predefinidos para essa componente. Essas estratégias de perturbação, simbolizadas por PF e GF, permitem uma análise sistemática dos efeitos dessas alterações virtuais na dinâmica da rede regulatória, contribuindo para uma compreensão mais profunda do comportamento do sistema (ABOU-JAOUDE et al., 2016).

A simulação de Monte Carlo, em sua essência, consiste na geração de objetos ou processos aleatórios por meio de computação. O método de Monte Carlo envolve a amostragem aleatória de distribuições de probabilidade específicas. Tanto em contextos naturais quanto artificiais das técnicas de Monte Carlo, a abordagem fundamental é a repetição do experimento em várias iterações (ou através de uma simulação suficientemente longa). Ao empregar a Lei dos Grandes Números e outros métodos de inferência estatística, o objetivo é obter várias quantidades de interesse. Essencialmente, a simulação de Monte Carlo é uma ferramenta poderosa para explorar e compreender fenômenos complexos, utilizando o poder da aleatoriedade e da estatística para extrair informações valiosas a partir de experimentos simulados (KROESE et al., 2014). Quanto à determinação da alcançabilidade do atrator em modelos lógicos, isso implica percorrer trajetórias aleatórias ao longo da dinâmica assíncrona, representada pelo GTE. Em cada simulação, o processo é interrompido ao atingir um estado estável (sem sucessor) ou ao alcançar a profundidade máxima predefinida. Realizando um grande número de simulações, é possível estimar as probabilidades de alcançar os estados estáveis, proporcionando uma visão probabilística do comportamento dinâmico do sistema. Assim, se permite explorar eficazmente a diversidade de trajetórias possíveis e avaliar a frequência relativa de diferentes estados estáveis ao longo da dinâmica do modelo lógico (MENDES et al., 2018).

3.2 MODELAGEM CONTÍNUA

A modelagem matemática é uma ferramenta essencial na Biologia de Sistemas, utilizada para abordar questões biológicas e, mais especificamente, validar redes que descrevem observações biológicas e prever os efeitos de perturbações. Nela, existem duas abordagens principais: a modelagem quantitativa e a modelagem qualitativa.

A modelagem quantitativa envolve a representação de várias concentrações de es-

pécies químicas por números reais. Geralmente, essa abordagem utiliza equações diferenciais e segue o formalismo da cinética química para descrever o comportamento dinâmico do sistema ao longo do tempo. Nesse contexto, as interações entre as espécies são expressas numericamente e pode descrever com mais precisão o comportamento dinâmico dos processos biológicos, pois acompanha a evolução da concentração ou das atividades das espécies químicas em função do tempo, mas requer uma quantidade importante de informações sobre os parâmetros difíceis de encontrar na literatura.

Por outro lado, a modelagem qualitativa representa concentrações ou atividades de espécies químicas por um conjunto finito de valores discretos. Essa abordagem simplifica a descrição do sistema, muitas vezes categorizando as concentrações em estados discretos, como ativo ou inativo, em vez de utilizar valores contínuos. A modelagem qualitativa é valiosa para entender padrões emergentes e comportamentos globais do sistema, sem a necessidade de uma precisão numérica extensa, proporciona uma descrição mais simples e menos detalhada dos sistemas biológicos, sendo eficaz na identificação de estados estáveis, mas apresenta limitações na descrição da cinética transitória que leva a esses estados.

Ambas as abordagens têm aplicações específicas, sendo a modelagem quantitativa adequada para análises detalhadas de sistemas complexos, enquanto a modelagem qualitativa oferece informações valiosas em situações em que uma descrição mais simplificada é suficiente.

As equações diferenciais ordinárias (EDOs) têm desfrutado de uma ampla aplicação na modelagem de vias de sinalização. Esse formalismo é considerado o mais natural para converter redes de reações detalhadas em modelos matemáticos. De fato, as equações podem ser derivadas de maneira direta ao empregar leis de ação de massa, cinética de Michaelis-Menten ou funções de Hill para cada reação, alinhando-se com os comportamentos observados (STOLL et al., 2012). Essa abordagem permite a representação matemática precisa das dinâmicas envolvidas nas vias de sinalização, facilitando a análise do sistema ao longo do tempo. A escolha de leis cinéticas específicas para cada reação proporciona uma correspondência mais fiel com os mecanismos bioquímicos subjacentes, destacando a robustez e flexibilidade das EDOs como uma ferramenta fundamental na modelagem matemática de processos biológicos complexos.

O formalismo *booleano* representa outra abordagem amplamente utilizada na modelagem de vias de sinalização, em que genes ou proteínas são caracterizados apenas por 0s e 1s, como mencionado anteriormente. Esse formalismo é considerado o mais natural para traduzir uma rede de influências em um modelo matemático. Em um modelo *booleano*, a cada nó é atribuída uma regra lógica que conecta suas entradas. Dessa forma, não são necessários valores reais de parâmetros para ajustar, sendo suficiente escolher as regras lógicas apropriadas que melhor descrevem o sistema. Em contraste com modelos contínuos, nos quais valores numéricos precisam ser ajustados, tanto as estruturas lógicas

quanto as contínuas apresentam vantagens e desvantagens. No formalismo *booleano*, a simplicidade do sistema, representado por valores binários, facilita a interpretação e análise direta. No entanto, essa simplicidade também implica em uma descrição mais abstrata, perdendo nuances presentes em modelos contínuos que capturam variações mais sutis. Portanto, a escolha entre esses formalismos depende das características específicas do sistema em estudo e dos objetivos da modelagem.

Boolean Kinetic Monte-Carlo (BKMC) é um algoritmo proposto para abordar tanto as estruturas lógicas quanto as contínuas (STOLL et al., 2012). Trata-se de uma generalização natural da dinâmica *booleana* assíncrona (THOMAS, 1991), incorporando uma interpretação probabilística direta. Na estrutura BKMC, a dinâmica é parametrizada pelo tempo biológico, e a ordem de atualização é sujeita a ruídos, apresentando uma flexibilidade maior. Esse modelo especificado por regras lógicas como nos modelos *booleanos* regulares, mas com informações mais precisas: uma taxa numérica é adicionada para cada transição de cada nó e nesse contexto, o tempo é representado por etapas discretas.

O algoritmo BKMC foi concebido seguindo uma série de princípios fundamentais:

- Cada nó no sistema é representado por um valor *booleano* (0 ou 1), denominado estado do nó;
- O estado global da rede é determinado pelo conjunto de estados individuais dos nós, referido como o estado da rede;
- A atualização do estado de um nó é realizada com base nos sinais provenientes das setas de entrada conectadas a esse nó, levando em consideração a lógica específica envolvida;
- O tempo é representado por um número real, proporcionando uma dimensão temporal ao processo;
- A evolução do sistema é caracterizada como estocástica, indicando que os eventos ocorrem de maneira probabilística.

Esses princípios estabelecem as bases do algoritmo BKMC, permitindo uma representação robusta e dinâmica da evolução de redes com elementos *booleanos*. O uso de valores *booleanos* simplifica a descrição do estado de cada nó, enquanto a abordagem estocástica adiciona um componente probabilístico à dinâmica do sistema, tornando-o mais adequado para modelar processos estocásticos na evolução de redes.

A modelagem, conforme visto, utiliza o processo de Markov de tempo contínuo dentro de um espaço de estados *booleano*. Ao descrever a evolução temporal do processo biológico a ser modelado, as taxas de transição para cada nó são explicitamente especificadas. Para realizar isso, é elaborada uma linguagem que pode ser interpretada como uma generalização de equações *booleanas*. De uma perspectiva matemática, essa abordagem

pode ser traduzida em um conjunto de equações diferenciais ordinárias que operam sobre distribuições de probabilidade.

O Monte-Carlo Cinético, também conhecido como algoritmo de Gillespie, constitui uma abordagem simples para explorar o espaço de probabilidade de um processo de Markov definido por um conjunto de taxas de transição. Essencialmente, pode ser interpretado como uma formalização de um processo de Markov de tempo contínuo. Esse algoritmo gera um conjunto de realizações ou trajetórias estocásticas do processo de Markov, sendo alimentado por um conjunto de números aleatórios uniformemente distribuídos no intervalo de $[0, 1]$. Em termos mais práticos, o algoritmo de Gillespie oferece uma ferramenta valiosa para simular eventos estocásticos em sistemas dinâmicos. Ao empregar números aleatórios como entrada, o algoritmo é capaz de capturar a natureza probabilística inerente a muitos processos biológicos e químicos. Dessa forma, ele se destaca como uma abordagem eficaz para a análise e compreensão de processos complexos, fornecendo trajetórias estocásticas que refletem as flutuações inerentes a sistemas dinâmicos.

Por definição, uma trajetória $\hat{S}(t)$ é uma função definida no intervalo $[0, t_{max}]$. O conjunto de trajetórias estocásticas representa o processo de Markov, indicando que essas trajetórias podem ser empregadas para calcular probabilidades. O algoritmo segue uma abordagem iterativa: a partir de um estado S no tempo t_0 , utilizando dois números aleatórios uniformes, produz um tempo de transição δt e um novo estado S' , com a seguinte interpretação: a trajetória $\hat{S}(t)$ é tal que $\hat{S}(t) = S$ para $t \in [t_0, t_0 + \delta t]$ e $\hat{S}(t_0 + \delta t) = S'$. A etapa iterativa é realizada até atingir um tempo máximo especificado. O estado inicial de cada trajetória é determinado pela condição inicial (probabilística), que também precisa ser previamente definida.

Dado S e dois números aleatórios uniformes $u, u' \in [0, 1]$, a interação é dada por:

1. Cálculo da taxa total de possíveis transições para sair do estado S : $\rho_{tot} \equiv \sum_{S'} \rho_{(S \rightarrow S')}$.
Determinação da soma das taxas de transição $\rho_{(S \rightarrow S')}$ para todos os possíveis novos estados S' , essa soma representa a taxa total de transições possíveis para deixar o estado S ;
2. Cálculo do tempo da transição: $\delta t \equiv -\frac{\log(u)}{\rho_{tot}}$;
3. Disposição dos possíveis novos estados $S^{(j)}$, $j = 1 \dots$ e suas respectivas taxas de transição $\rho^{(j)} = \rho_{(S \rightarrow S^{(j)})}$;
4. Cálculo do novo estado $S^{(k)}$ de tal modo que $\sum_{j=0}^{k-1} \rho_j < (u' \rho_{tot}) \leq \sum_{j=0}^k \rho_j$ (por convenção $\rho^{(0)} = 0$).

Esses passos constituem um procedimento completo para simular transições estocásticas em um processo de Markov contínuo, proporcionando uma representação clara e ordenada do processo (STOLL et al., 2012).

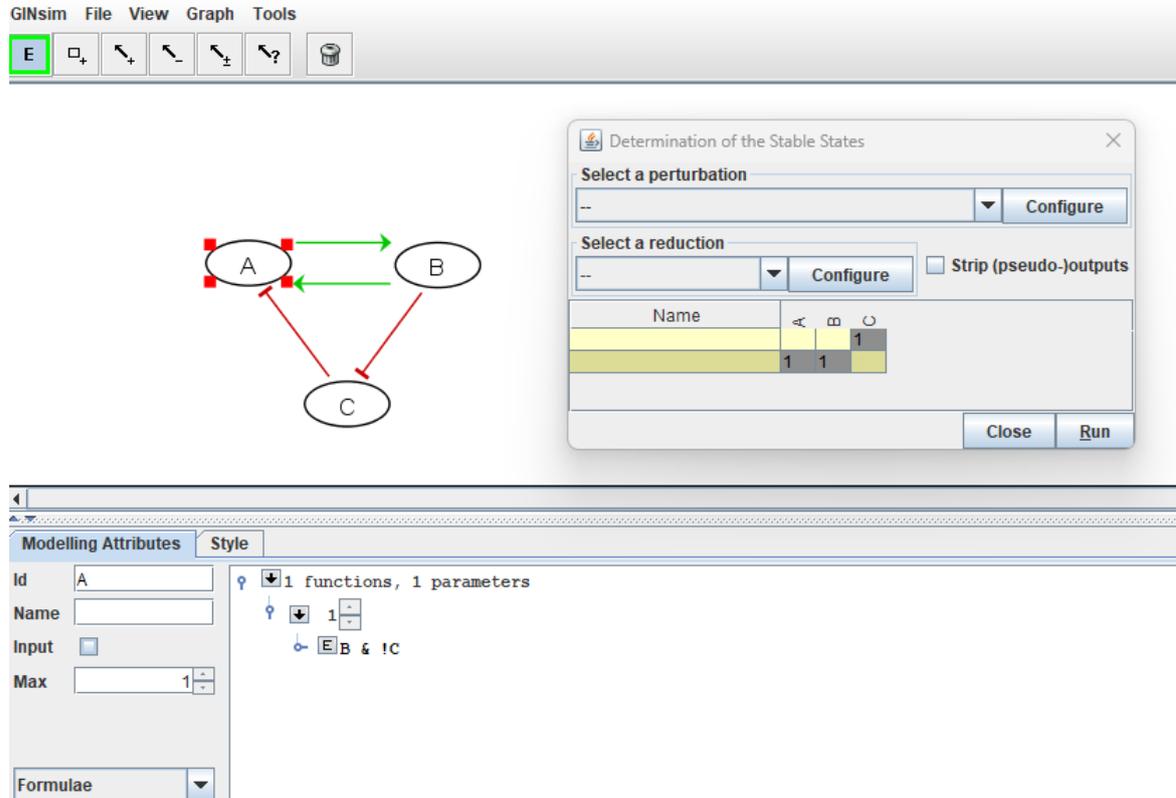
3.3 GINSIM

A complexidade das redes delineadas frequentemente desafia a compreensão intuitiva, o que, por sua vez, requer o desenvolvimento de ferramentas computacionais apropriadas (GONZALEZ et al., 2006). Foram sugeridas diversas abordagens matemáticas para modelar redes genéticas e simular sua dinâmica, abrangendo desde formalismos quantitativos, como conjuntos de equações diferenciais ou estocásticas, até modelos *booleanos* mais simplificados (JONG, 2002).

O GINsim (Gene Interaction Network Simulation)¹, uma ferramenta de software dedicada à análise de redes regulatórias genéticas por meio da modelagem lógica (CHAOUIYA; NALDI; THIEFFRY, 2012), desenvolvido em Java para a construção e análise de modelos lógicos de múltiplos valores, baseado na lógica cinética generalizada de René Thomas e de Richard D'ARI (1990). (THOMAS; D'ARI, 1990). Com essa ferramenta, é possível projetar o grafo regulatório e formular o modelo lógico correspondente. Esse software oferece suporte a variáveis *booleanas* e multi-valoradas, a dinâmica do modelo pode ser gerada tanto sob esquemas de atualização síncrona quanto assíncrona, incluindo a opção de definir classes de prioridade.

¹GINsim está disponível em: <http://ginsim.org>

Figura 14 – A interface do GINsim. Vê-se um modelo discreto *booleano*, especificamente para os estados estáveis no caso assíncrono. Ao selecionar o nó A, o usuário pode definir a regra lógica associada a esse nó. Como resultado, o GINsim apresenta os valores de B e C para os quais o nó A mantém um valor lógico não nulo. Essa funcionalidade oferece uma visão clara das interações lógicas entre os nós do modelo, facilitando a compreensão dos estados estáveis e suas dependências.



Fonte: A autora

O software oferece diversos métodos para analisar as propriedades do modelo e suporta múltiplos formatos de modelo, possibilitando sua integração com outras ferramentas de software (BÉRENGUIER et al., 2013; FAURÉ et al., 2006; CHAOUIYA; NALDI; THIEFFRY, 2012). Entre as análises estáticas do modelo proporcionadas pelo GINsim, destacam-se a determinação analítica de todos os estados estáveis, independentemente de suas condições de alcançabilidade, e a identificação de condições para circuitos funcionais positivos e negativos. Foram incorporados ao GINsim também métodos para estimar as probabilidades de alcançabilidade de estados estáveis, como Avatar, MonteCarlo e FireFront.

Além disso, o GINsim permite ao usuário definir perturbações simplesmente fixando os valores das variáveis e explorar as mudanças nas propriedades estáticas e dinâmicas. Por exemplo, é possível fixar um nó com valor 0 ou 1 para simular o efeito de um potencial knockout ou superativação de um gene, respectivamente. No GINsim, também é viável realizar knockout ou ativar ectopicamente o efeito de interações específicas de maneira semelhante. Essa capacidade é particularmente interessante para investigar a importância

de uma interação regulatória nas propriedades da rede.

O software realiza, adicionalmente, o cálculo das probabilidades associadas aos estados estáveis utilizando o algoritmo Monte Carlo. O método Monte Carlo é tradicionalmente empregado para estimar a probabilidade de um determinado resultado, especialmente no contexto da acessibilidade de atratores em modelos lógicos. Cada simulação é encerrada quando se alcança um estado estável (sem sucessores) ou atinge a profundidade máxima predefinida. A execução de um elevado número de simulações possibilita a estimativa das probabilidades relacionadas à alcançabilidade dos estados estáveis.

3.4 MABOSS

O software MaBoSS (Markovian Boolean Stochastic Simulator)² é uma ferramenta em C++ projetada para simulações de processos de Markov, tanto de tempo contínuo quanto discreto. Ele opera com base em um grafo de transição de estados, descrevendo a dinâmica de uma rede *booleana*. O arquivo de configuração do MaBoSS inclui taxas de aumento (transição de OFF para ON) e redução (transição de ON para OFF) para cada nó, juntamente com funções lógicas, permitindo uma explícita consideração do tempo físico (COHEN et al., 2015).

A probabilidade de alcançar um fenótipo é calculada como a probabilidade de a variável do fenótipo estar no estado ON. Isso é realizado por meio da simulação de caminhadas aleatórias no grafo probabilístico de transição de estados. As probabilidades associadas a fenótipos específicos são relatadas para cada mutante, com base em condições iniciais predefinidas, que podem incluir elementos aleatórios.

O MaBoSS possibilita a previsão de como a probabilidade de um fenótipo pode aumentar ou diminuir quando variáveis do modelo são alteradas, refletindo o efeito de mutações específicas ou tratamentos medicamentosos. Por exemplo, se uma mutação A aumenta a probabilidade de Apoptose em comparação com o tipo selvagem, podemos inferir que o mutante A favorece a ocorrência da apoptose (COHEN et al., 2015).

Para realizar uma simulação de um modelo no MaBoSS, é crucial ajustar um conjunto de parâmetros. Embora o MaBoSS forneça valores padrão, é essencial adaptá-los para cada modelo, visando atingir um equilíbrio ideal entre a convergência das estimativas e o tempo de computação. Dessa forma, diversas simulações devem ser executadas, variando os conjuntos de parâmetros para encontrar o ajuste mais adequado (STOLL et al., 2012).

Os nós internos, identificados pela propriedade *node.is_internal*, desempenham

²MaBoSS está disponível em: <https://maboss.curie.fr/> e na versão web: <https://webmaboss.vincent-noel.fr/model/maboss/simulation/>. O CoLoMoTo fornece um ambiente unificado para modelos qualitativos de redes biológicas: <https://colomoto.github.io/colomoto-docker/>.

um papel crucial na convergência do algoritmo BKMC. Em geral, um maior número de nós internos contribui para uma melhor convergência do processo.

A janela de tempo para probabilidades, controlada pelo parâmetro *timetick*, é essencial para calcular as estimativas de probabilidades de estado da rede. Definir essa janela como o tempo mínimo necessário para a alteração de estados dos nós impacta diretamente na convergência das estimativas de probabilidade, sendo uma escolha crítica para otimizar o desempenho do modelo (STOLL et al., 2012).

O tempo máximo, determinado pelo parâmetro *max_time*, influencia a produção de trajetórias ao longo de um período pré-definido. Sua escolha depende do conhecimento do tempo do processo biológico em questão. Um tempo máximo ligeiramente maior que o inverso da menor taxa de transição é aconselhável, impactando diretamente o tempo de computação e a qualidade das estimativas da distribuição estacionária.

O número de trajetórias, controlado por *sample_count*, é diretamente relacionado à qualidade do algoritmo BKMC. Aumentar esse número contribui para uma convergência mais eficiente das estimativas.

Para as estimativas de distribuição estacionária, os parâmetros *staddist_traj_count* e *staddist_cluster_threshold* são cruciais. O primeiro representa um subconjunto de trajetórias usado exclusivamente para essas estimativas, e é importante que seja menor que o número total de trajetórias. Já o segundo corresponde ao limite para a construção de clusters nas estimativas de distribuição estacionária, sendo recomendável definir um valor alto, próximo de 1, para otimizar o algoritmo de agrupamento, embora seja importante evitar valores excessivamente altos para garantir eficiência computacional.

3.5 COMO FUNCIONAM OS CIRCUITOS POSITIVOS E NEGATIVOS E COMO ELES AFETAM A REDE

Os esquemas regulatórios biológicos descritos na literatura frequentemente incluem representações gráficas com setas que denotam diversos processos moleculares, como reações metabólicas, regulação transcricional, degradação, transporte, entre outros. Para explorar os papéis dinâmicos dos circuitos reguladores, é necessário traduzir esses esquemas regulatórios em um formalismo matemático homogêneo (THIEFFRY, 2007).

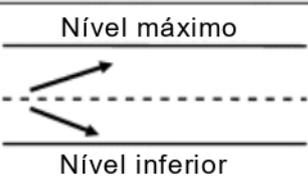
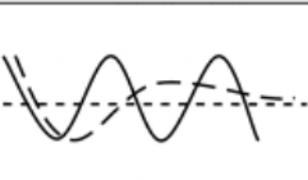
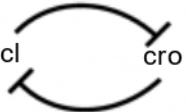
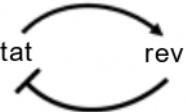
Quando se utiliza uma representação baseada em grafos, a ideia de um circuito regulador é derivada diretamente do conceito de circuito na teoria dos grafos, onde os sinais de interação são então definidos como rótulos de arco. Através de regras lógicas específicas que delineiam o comportamento de cada componente regulatório, é viável deduzir as interações regulatórias, incluindo os sinais associados.

Definidos como sequências circulares simples de interações direcionadas, os circuitos de feedback podem ser categorizados como positivos ou negativos, dependendo da

paridade do número de interações negativas (ou seja, o sinal de um circuito é determinado pelo produto dos sinais de suas interações constituintes). Circuitos positivos são essenciais para a criação de estados celulares alternativos, muitas vezes referidos como atratores múltiplos no contexto de sistemas dinâmicos (KAUFMAN; SOULE; THOMAS, 2007). Por outro lado, circuitos negativos desempenham um papel crucial na promoção de homeostase ou na sustentação de comportamentos oscilatórios (PIGOLOTTI; KRISHNA; JENSEN, 2007).

A figura 15 apresenta a classificação dos circuitos regulatórios com base na paridade do número de interações negativas envolvidas, dividindo-os em circuitos positivos e negativos, cada um com propriedades dinâmicas e biológicas notavelmente distintas. Na última linha, são fornecidos exemplos simples de circuitos positivos e negativos retirados de redes regulatórias que controlam o desenvolvimento do bacteriófago lambda e do vírus HIV, respectivamente. As setas normais indicam ativações, enquanto as setas truncadas representam inibições.

Figura 15 – Circuitos positivos e negativos e suas interpretações biológicas.

	Circuitos positivos	Circuitos negativos
Propriedades dinâmicas		
Interpretação biológica	Diferenciação	Homeostase/oscilação
Número de interações negativas	Par	Ímpar
Exemplos		

Fonte: Adaptado de (THIEFFRY, 2007)

As regras lógicas estabelecidas para as componentes do circuito têm implicações diretas em suas restrições de funcionalidade, conforme definido pelos seus reguladores. Cada restrição é fundamentada na formulação das regras lógicas, as quais determinam as relações entre as funções lógicas das componentes do circuito e de seus reguladores, de acordo com suas interdependências.

4 REVISÃO DE ARTIGOS

4.1 MODELO: *TGF- β -INDUCED EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION PROCEEDS THROUGH STEPWISE ACTIVATION OF MULTIPLE FEEDBACK LOOPS*

O modelo de Zhang et al. (2014) aborda a transição epitelial mesenquimal (TEM) e destaca três fenótipos celulares durante esse processo, incluindo o estado de TEM parcial, que apresenta características tanto epiteliais quanto mesenquimais. A análise quantitativa do TGF- β 1-induzido TEM na linhagem celular MCF10A revelou a formação de três *clusters* auto-organizados, representando os fenótipos E, H e M, com diferentes padrões de abundância de E-caderina e vimentina (VIM).

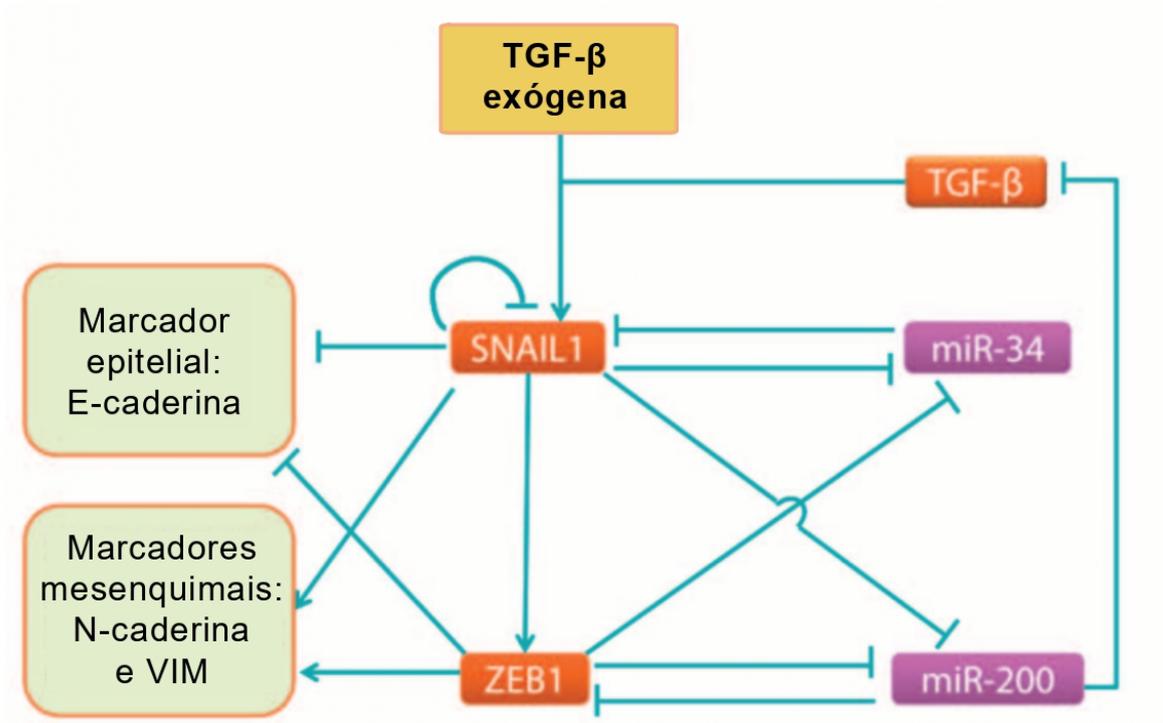
A dinâmica da TEM pode ser delineada considerando a rede regulatória apresentada na figura 16. Nessa representação, os sinais de entrada são dados pela presença exógena de TGF- β . Essa sinalização desencadeia a ativação de marcadores tanto mesenquimais quanto epiteliais por meio de uma sub-rede interna composta por SNAIL1, miR-34, ZEB1, miR-200 e TGF- β endógeno. Notavelmente, essa sub-rede é caracterizada principalmente por circuitos positivos, como ZEB1/miR-200 e SNAIL1/miR34. A funcionalidade desses circuitos foi observada experimentalmente por meio de estudos realizados em células epiteliais da mama humana da linhagem MCF10A, nas quais foram aplicados tratamentos com a proteína hTGF- β 1.

O aumento da concentração de TGF- β induziu dinâmicas sequenciais passando do fenótipo epitelial para o híbrido e, em seguida, para o fenótipo mesenquimal. A reversibilidade do processo diminuiu à medida que mais células adquiriram o estado mesenquimal. O estado híbrido de TEM pode ser mantido por um período prolongado, indicando sua estabilidade sob certas condições.

O estado mesenquimal é considerado condicionalmente irreversível, dependendo do tipo celular e das condições experimentais. A remoção do TGF- β exógeno pode permitir uma transição mesenquimal epitelial, e a irreversibilidade pode variar entre diferentes tipos celulares. O estudo destaca a complexidade da rede regulatória envolvida na TEM, sugerindo que o circuito SNAIL1/miR-34 é um módulo regulatório, mas não o único, e enfatiza a necessidade de investigações adicionais em redes biológicas expandidas.

Células tratadas com concentrações como 0,5 ng/ml e 1 ng/ml de hTGF-1 apresentaram uma dinâmica tri-estável, a qual é representada pela estabilização nos diferentes estados da TEM. Dessa forma, esses dados sugerem que o estado final das células epiteliais não é completamente determinado pelas condições iniciais impostas e, assim, indicando que a dinâmica de transição entre os fenótipos é estocástica.

Figura 16 – O fator de transformação de crescimento β (TGF- β) desencadeia a transição epitelial mesenquimal. A rede regulatória central da TEM induzida por TGF- β exógeno é composta por dois fatores de transcrição (SNAIL1 e ZEB1), duas famílias de microRNAs (miRNAs; miR-34 e miR-200) e TGF- β endógeno.



Fonte: Adaptado de (ZHANG et al., 2014)

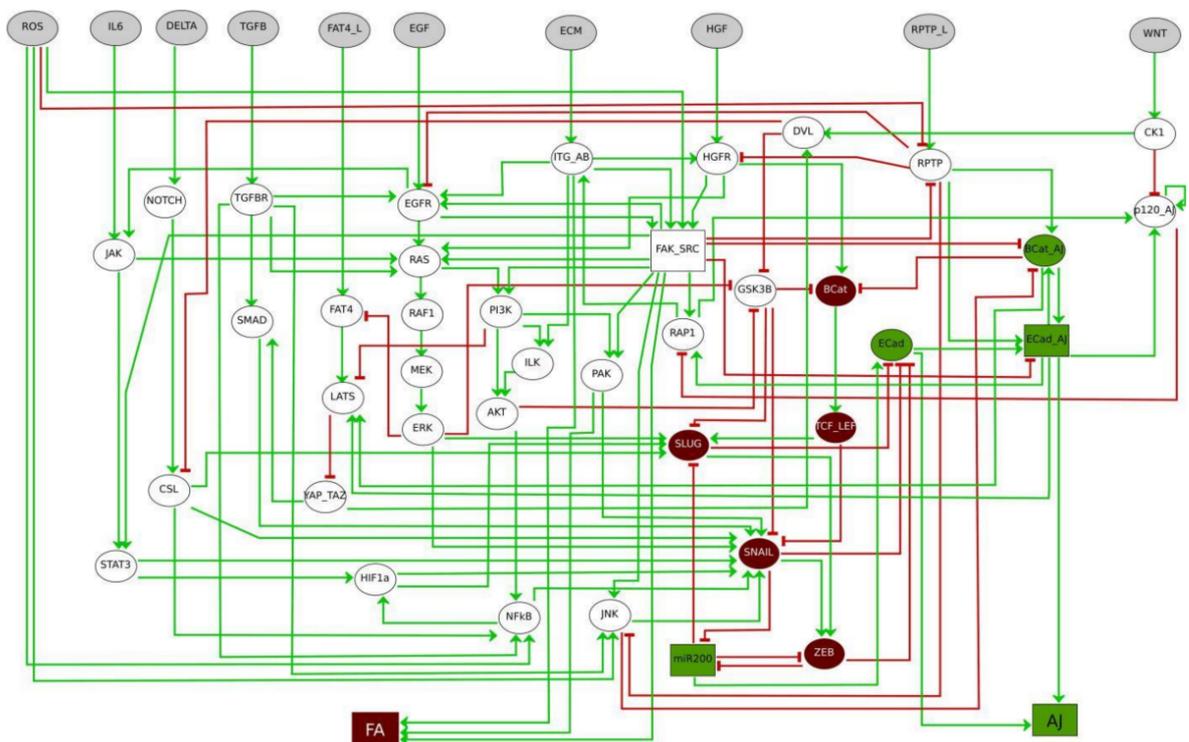
4.2 MODELO: *IN SILICO* LOGICAL MODELLING TO UNCOVER COOPERATIVE INTERACTIONS IN CANCER

O modelo de Selvaggio, Chaouiya e Janody, 2021 discute o uso de modelos computacionais, especificamente modelos lógicos de interações em redes para compreensão e tratamento do câncer. Exploram a cooperatividade na transição epitelial mesenquimal entre RPTP_L, NOTCH e outros *inputs* do microambiente tumoral. Esses modelos computacionais têm o poder de antecipar comportamentos sinérgicos já relatados experimentalmente e propor novos mecanismos cooperativos. Há uma necessidade de compreender uma variedade de determinantes celulares autônomos e não autônomos, que, sob diferentes condições, podem cooperar ou antagonizar-se na geração de fenótipos cancerígenos.

A rede regulatória apresentada na figura 17, mostra o modelo lógico da rede celular que governa a transição epitelial mesenquimal, abrangendo 39 nós intracelulares, incluindo

fatores de transcrição da TEM, marcadores epiteliais (E-Cad e miR200) e mesenquimais (SNAIL, SLUG, ZEB, TCF/LEF, BCat), além de vias de sinalização conhecidas da TEM (RAS, NOTCH, WNT, TGFB, JAK/STAT, Hippo, Integrinas e AKT). Esses elementos são influenciados por 10 sinais provenientes do microambiente tumoral (HGF, EGF, rigidez da matriz extracelular, TGFB, IL6, DELTA, ROS, WNT e os ligantes para RPTP e FAT4).

Figura 17 – Rede regulatória das propriedades de adesão celular controlada pelo microambiente durante a TEM. As entradas do microambiente tumoral são indicadas em cinza, marcadores epiteliais estão em verde, enquanto marcadores mesenquimais estão em marrom escuro. Nós ovais representam componentes *booleanos*, enquanto os retangulares representam componentes de múltiplos valores. As setas verdes indicam interações ativadoras, e as setas vermelhas indicam interações inibitórias. Duas leituras do modelo fornecem os estados da montagem da junção de adesão (AJ) e da reciclagem da adesão focal (FA).



Fonte: Adaptado de (SELVAGGIO; CHAOUYIA; JANODY, 2021)

RPTPs foram previstos pelo modelo como sinergizantes com fatores de crescimento, rigidez da matriz extracelular (MEC) e TGF- β para promover a transição epitelial mesenquimal, mas também têm um papel crítico na estabilização de um fenótipo híbrido. Dependendo da interação envolvida, um oncogene pode resultar em diferentes fenótipos. Isso destaca a importância de considerar a heterogeneidade do ambiente tumoral ao planejar estratégias terapêuticas, evitando efeitos adversos.

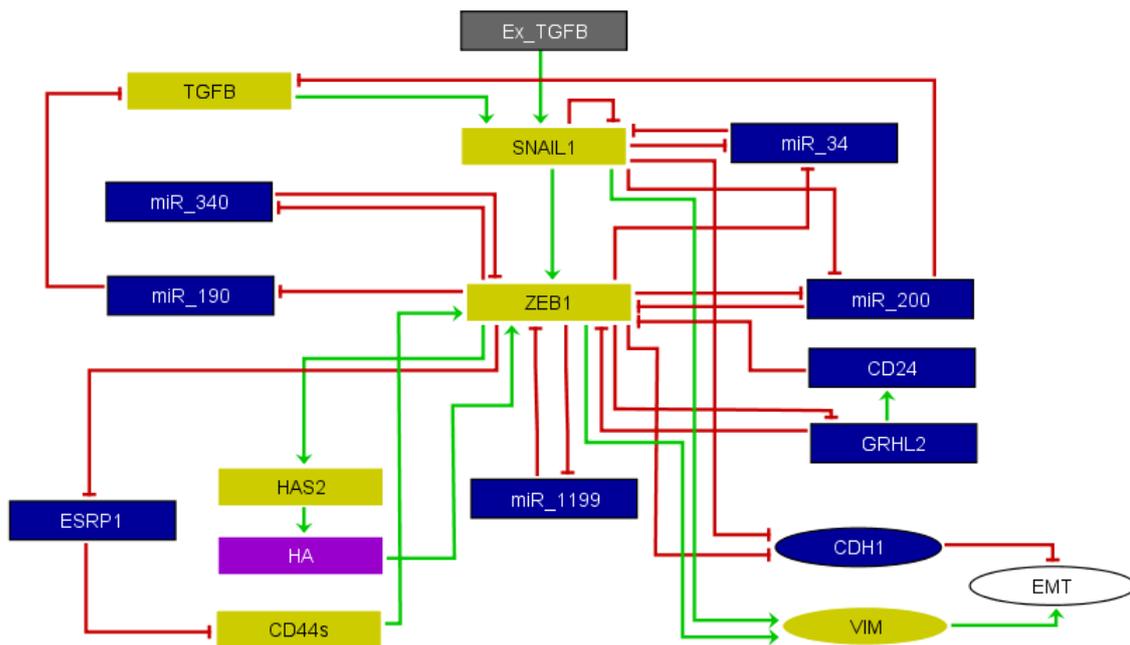
Observa-se a necessidade de modelos mais complexos que levem em conta a interação dinâmica entre células e seu ambiente, destacando a importância de abordagens de modelagem em múltiplas escalas.

4.3 MODELO: DYNAMICS OF THE FEEDBACK LOOPS REQUIRED FOR THE PHENOTYPIC STABILIZATION IN THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION

O modelo de Silveira e Mombach, 2020 aborda o processo de transição epitelial mesenquimal e a dinâmica dos circuitos de *feedback* envolvidos na estabilização fenotípica durante esse processo. Levando em consideração a TEM como um mecanismo essencial para a metastatização do câncer, o estudo destaca que ela, induzida por TGF- β resulta em três estados fenotípicos estáveis e distintos: E, H e M. Os estados E e M são caracterizados por marcadores fenotípicos específicos, enquanto o estado H apresenta características de ambos.

A rede regulatória proposta pelo artigo incorpora novas moléculas e circuitos descritos na literatura para explorar sua influência na dinâmica tríplice, mostrados na figura 18.

Figura 18 – Rede regulatória para a TEM em resposta ao TGF- β exógeno. As setas verdes e vermelhas indicam interações de ativação e inibição, respectivamente. Nós elípticos representam componentes de valor múltiplo, enquanto nós retangulares são *booleanos*. Nós em cores azul e amarelo representam marcadores epiteliais e mesenquimais, respectivamente. O nó de entrada em cinza indica TGF- β exógeno Ex-TGFB, enquanto o nó elíptico em branco representa a saída do modelo (TEM). O nó retangular em roxo denota ácido hialurônico (HA).



Fonte: Adaptado de (SILVEIRA; MOMBACH, 2020)

A análise experimental e do modelo revela um comportamento tríplice observado em células epiteliais de mama (MCF10A) tratadas com diferentes concentrações de TGF- β . A predominância do estado H sobre os outros dois fenótipos é consistente com observações experimentais.

Perturbações na rede indicam que o circuito SNAIL1/miR-34 controla a transição do fenótipo E para H, enquanto os circuitos mediados por ZEB1 controlam a transição do estado H para M. A estabilidade da dinâmica tríplice é atribuída à funcionalidade dos circuitos positivos, onde o sinal de entrada induz o comportamento de comutação bistável no circuito SNAIL1/miR-34. Destacando os microRNAs miR-340 e miR-1199 como importantes na estabilização do estado híbrido, com sua silenciamento resultando na desestabilização desse estado.

O modelo contribui para a compreensão da TEM em células cancerígenas de mama, apresentando uma boa concordância quantitativa com dados experimentais. A identificação de microRNAs como potenciais reguladores e a previsão de seu papel na estabilização fenotípica podem fornecer conhecimento para estratégias terapêuticas alternativas no câncer.

4.4 IMPORTÂNCIA DE CONTEMPLAR A MATRIZ EXTRACELULAR

O modelo de Sullivan et al. 2023 aborda o efeito dos sinais mecanossensíveis na TEM, e os examinando em matriz extracelular rígida e flexível.

A importância crucial do microambiente biofísico no controle da transição epitelial mesenquimal é evidenciada por uma série de experimentos publicados, que até o momento, o modelo de TEM não consegue reproduzir. Esses experimentos englobam efeitos dependentes da rigidez do TGF- β , resultando em apoptose em ambientes de matriz extracelular (MEC) mole, em contraste com a indução da TEM em substratos rígidos. Além disso, observou-se a ocorrência de TEM completa na ausência de qualquer sinal bioquímico de transformação em MECs rígidas com nanopadrões, sendo mediada por estresse mecânico que induz fatores de transcrição relacionados à TEM. Contudo, ainda nos falta um modelo mecanicista preditivo capaz de reproduzir e antecipar os impactos do ambiente biomecânico em uma única célula, considerando seu comportamento em diversos contextos de sinalização, como diferentes estímulos de crescimento ou sinais de transformação. Adicionalmente, os modelos computacionais existentes abordam apenas o processo de transição mesenquimal epitelial em resposta à retirada de sinais de entrada que ativam SNAIL1 ou em decorrência de drogas/mutações.

O estudo de Sullivan et al. reproduz fenótipos epiteliais, híbridos e mesenquimais, o papel da sinalização autócrina de TGF na manutenção de células mesenquimais na ausência de drivers externos, inibição da proliferação por TGF e seus efeitos apoptóticos na MEC mole. A rede regulatória é *booleana* composta por 136 nós para TEM parcial e total, impulsionado pelo ambiente biomecânico de uma célula na ausência de fatores de transformação, como TGF- β , Wnt, Notch, Hedgehog ou IL6. A ativação de Rac1/PAK1 e a sinalização de NF- κ B mediada por PI3K/AKT deram início à TEM, mostrando a capacidade

do modelo de manter estados epiteliais, híbridos e mesenquimais distintos.

Ainda, foi estendido para incluir um módulo de sinalização TGF- β , reproduzindo a necessidade de uma potente alça TGF- β autócrina para manter o estado mesenquimal na matriz extracelular mole. Oferece diversas previsões testáveis, incluindo a influência da densidade de junções aderentes na direção da TEM, a resposta bifásica à exposição ao sinal de crescimento e a capacidade do ambiente biomecânico por si só de desencadear a transição e silenciar a sinalização ERK/AKT.

Além de reproduzir comportamentos conhecidos, o modelo proporciona previsões mecanísticas que podem ser testadas experimentalmente, incluindo a relação entre a densidade celular e a exposição ao fator de crescimento na migração e transição de estados celulares. O estudo destaca a importância da integração correta de sinais de detecção mecânica e transformação para construir modelos preditivos de populações celulares em processos como cicatrização de feridas, início da invasão do câncer ou crescimento de lesões metastáticas (SULLIVAN et al., 2023).

5 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral estudar a dinâmica da transição epitelial mesenquimal por meio da modelagem lógica, levando em consideração a influência de novas moléculas da matriz extracelular e a evolução temporal do sistema, a partir de uma rede de câncer de mama proposta anteriormente. Esta abordagem visa contribuir com os estudos dessa transição.

Com base no objetivo geral os objetivos específicos deste trabalho são analisar:

1. a ativação da TEM em resposta à MEC juntamente com TGF- β ;
2. o comportamento do RNA longo não-codificante ATB na dinâmica;
3. a evolução temporal do modelo e sua relação com a metodologia atemporal;
4. os resultados provenientes do software GINsim (atemporal) de um estudo prévio e compará-los com os obtidos pelo software MaBoSS (temporal).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

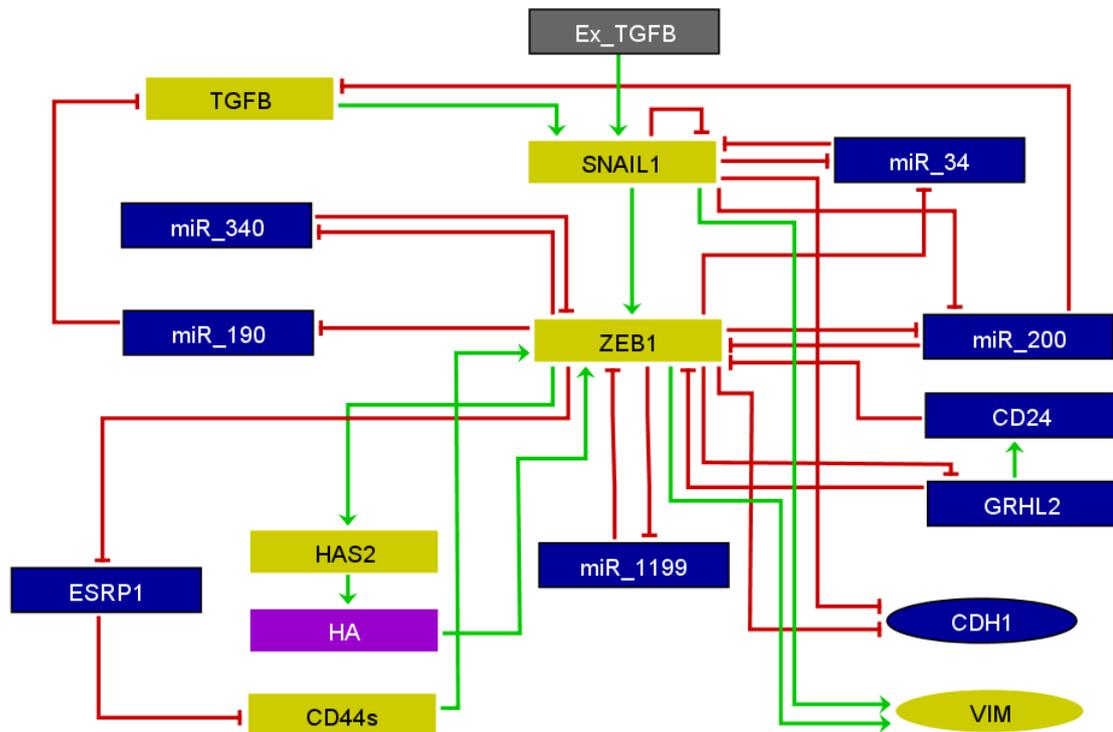
6.1 ANÁLISE PRÉVIA DO COMPORTAMENTO TEMPORAL DO MODELO PROPOSTO PARA TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL EM RESPOSTA À TGF- β EXÓGENO

O modelo proposto por Silveira e Mombach em 2020, aborda a dinâmica de circuitos de *feedback* que estabilizam os fenótipos durante a transição epitelial mesenquimal. A rede regulatória referida analisa a TEM em resposta ao fator transformador de crescimento β e indica que o circuito SNAIL1/miR-34 controla a transição do fenótipo E para H, enquanto os circuitos mediados por ZEB1 controlam a transição do estado H para M.

Os resultados alcançados neste estudo servirão como base para uma análise mais aprofundada, que será conduzida por meio de uma abordagem temporal. Essa análise adicional permitirá uma compreensão mais detalhada e abrangente dos fenômenos observados. Além disso, o embasamento fornecido por este trabalho fornecerá uma sólida base para a exploração da influência de novas moléculas na continuidade da pesquisa.

Inicialmente, foi conduzida uma análise dos resultados obtidos no modelo proposto citado anteriormente, conforme descrito no artigo intitulado "Dynamics of the feedback loops required for the phenotypic stabilization in the epithelial-mesenchymal transition". Essa etapa envolveu a utilização do software MaBoSS para replicar e examinar os resultados apresentados no referido estudo.

A rede original foi ajustada para um formato *booleano*, modificando os nós CDH1 e VIM para apresentarem apenas dois valores, zero e um, mostrada na figura 19. O nó que anteriormente representava TEM (originalmente denotado por EMT na rede) foi excluído. Essa adaptação possibilita agora a análise dos estados epitelial, mesenquimal e híbrido apenas por meio dos dois nós de saída (*outputs*). É necessário que o modelo seja adaptado ao formato *booleano*, já que a modelagem no MaBoSS utiliza um processo de Markov de tempo contínuo dentro de um espaço de estados *booleano*.

Figura 19 – Rede original adaptada para uma rede *booleana*

Na tabela 2, encontram-se as regras lógicas correspondentes aos nós do modelo original que passaram por adaptação para o formato *booleano*.

Tabela 2 – Regras lógicas adaptadas de CDH1 e VIM

Nó	Regra lógica
CDH1	$(!ZEB1 \ \& \ !SNAIL1) \ \ (!(ZEB1 \ \& \ SNAIL1) \ \& \ (ZEB1 \ \ SNAIL1))$
VIM	$(SNAIL1 \ \& \ ZEB1) \ \ ((SNAIL1 \ \ ZEB1) \ \& \ !(ZEB1 \ \& \ SNAIL1))$

Por meio do MaBoSS, é viável realizar uma análise da evolução temporal da distribuição de probabilidade dos nós contidos na rede. Durante essa análise, a proteína CDH1 (Caderina 1) atua como uma representação do fenótipo epitelial, uma vez que essa proteína é reconhecida como um marcador epitelial. Por outro lado, a proteína VIM (Vimetina) funciona como um marcador mesenquimal, representando, assim, o fenótipo mesenquimal. Quando existem ambas proteínas presentes no estado [CDH1 - - VIM] esse é considerado um fenótipo híbrido. As figuras 20 e 21 mostram essa evolução no tempo quando os nós da rede começam em uma probabilidade de 50% ou 0,5, isso significa que a simulação está em seu estado selvagem.

Os gráficos resultantes das simulações no MaBoSS exibem a progressão temporal das probabilidades associadas a cada fenótipo ou nó analisado. No eixo vertical, encontra-

mos a distribuição de probabilidades, enquanto o eixo horizontal representa a simulação do tempo.

A partir das trajetórias visíveis nessas imagens, é viável compará-las com os resultados do modelo original. Na condição natural, ou estado selvagem, a pesquisa revela a presença de quatro estados estáveis prováveis: um epitelial, um mesenquimal e um híbrido quando o TGF- β exógeno está ativado, além de um estado epitelial quando o TGF- β exógeno está inativo. Uma observação semelhante pode ser feita ao examinar os gráficos das figuras 20 e 21, onde se identificam três estados prováveis para o TGF- β exógeno ativado (E, M e H), enquanto é observado um estado epitelial para o TGF- β exógeno desativado.

Figura 20 – Trajetórias de probabilidades dos estados em 0.5. Ex_TGFB ON

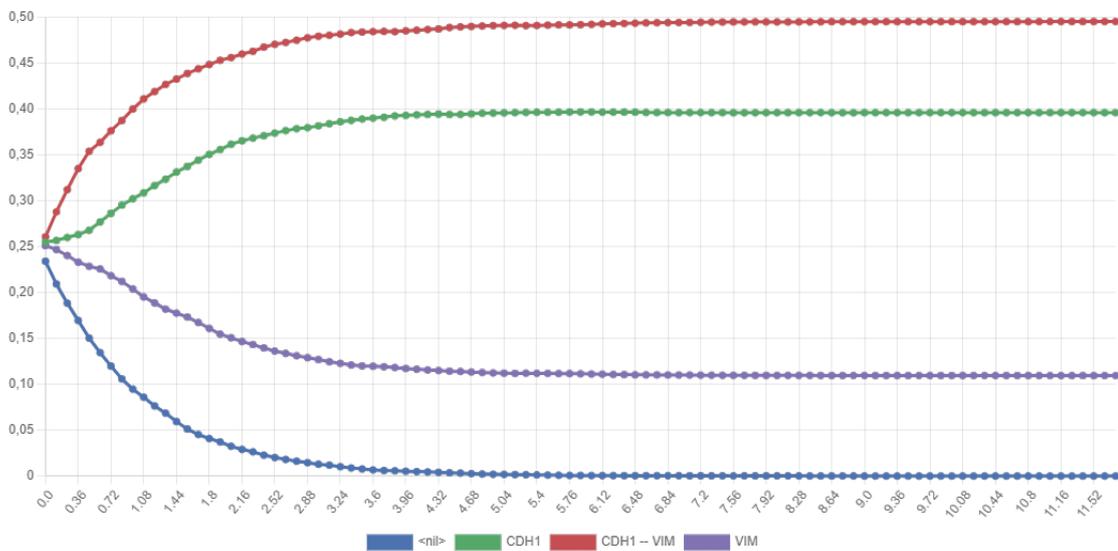
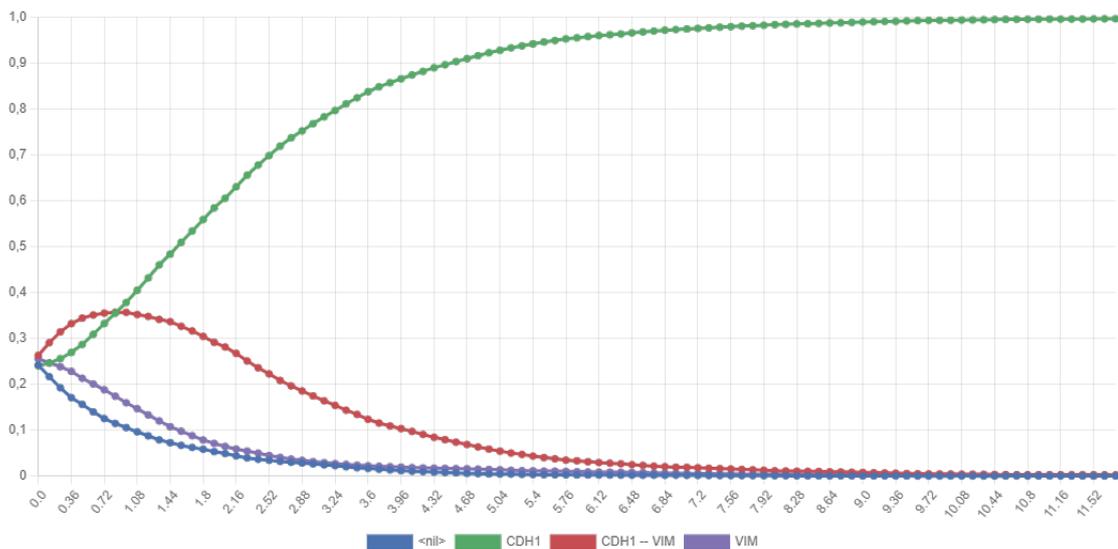


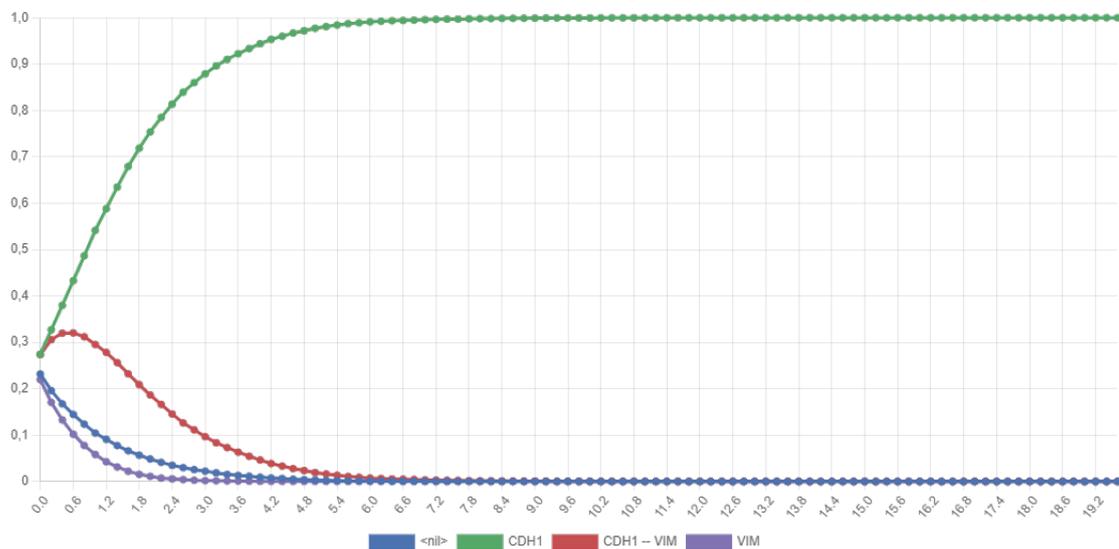
Figura 21 – Trajetórias de probabilidades dos estados em 0.5. Ex_TGFB OFF



A análise dos circuitos funcionais na rede permite observar seus comportamentos e compreender como essas dinâmicas impactam o sistema. Isso inclui a identificação das mudanças que ocorrem em relação ao estado selvagem por meio de perturbações nas moléculas desses circuitos. Para realizar essa comparação, foram aplicadas perturbações idênticas àquelas realizadas pelo software GINsim no artigo original.

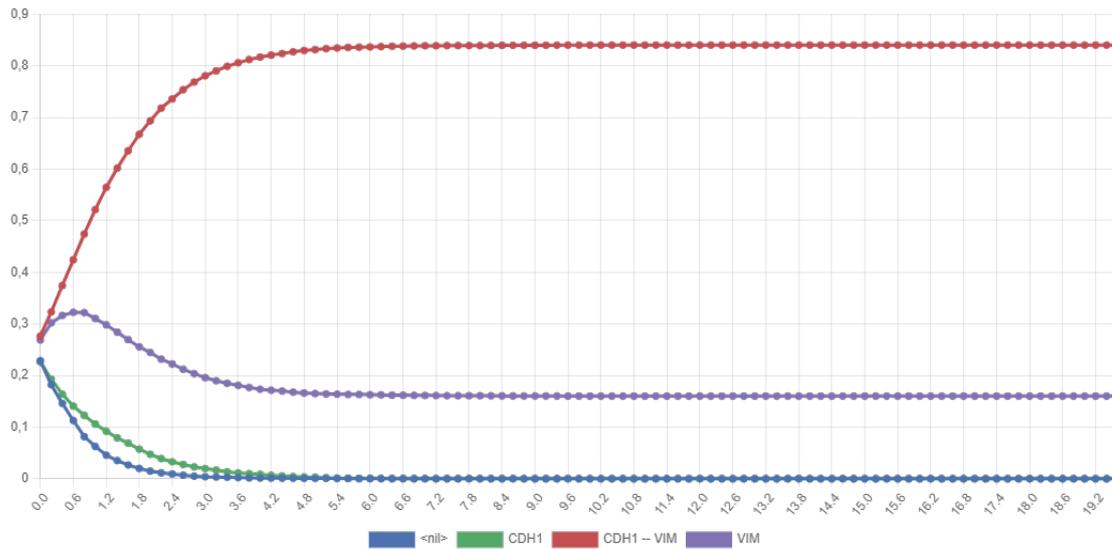
O primeiro circuito funcional submetido à análise foi o circuito positivo envolvendo miR_34 e SNAIL1. A figura 22 ilustra a trajetória das probabilidades quando miR_34 permanece ativado e SNAIL1 permanece inativo. Notavelmente, observa-se que o estado epitelial atinge 100% ao longo do tempo e da mesma forma, nas simulações originais do GINsim, foi encontrado apenas um estado final epitelial.

Figura 22 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_34 ON - SNAIL1 OFF.



Em contrapartida, quando é feita a perturbação em que miR_34 permanece inativo e SNAIL1 permanece ativo, mostrada na figura 23, vê-se o fenótipo híbrido próximo de 85% e o mesenquimal próximo de 15%, enquanto o estado epitelial se torna não provável. Similarmente, são dois os estados estáveis encontrados através do GINsim, um híbrido e outro mesenquimal.

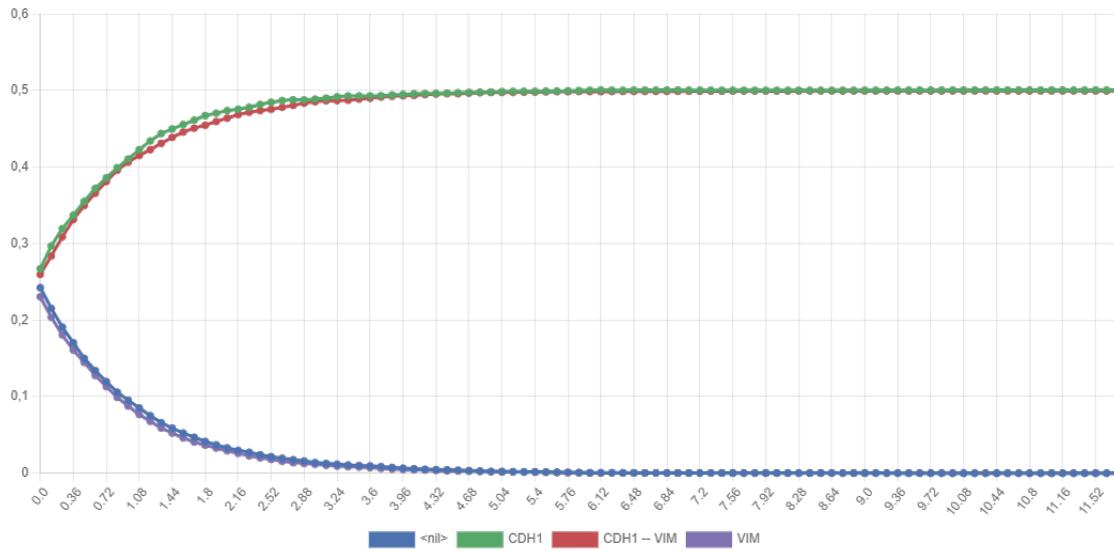
Figura 23 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_34 OFF - SNAIL1 ON.



Os próximos circuitos funcionais a serem examinados são os circuitos positivos envolvendo ZEB1, que são: ZEB1 e GRHL2, ZEB1 e miR_340, ZEB1 e miR_200 e ZEB1 e miR_1199. No entanto, é relevante observar que, quando esses circuitos são perturbados simultaneamente, os resultados obtidos são idênticos aos observados quando cada circuito é perturbado de forma isolada. Dessa forma, serão analisados de forma conjunta para simplificar.

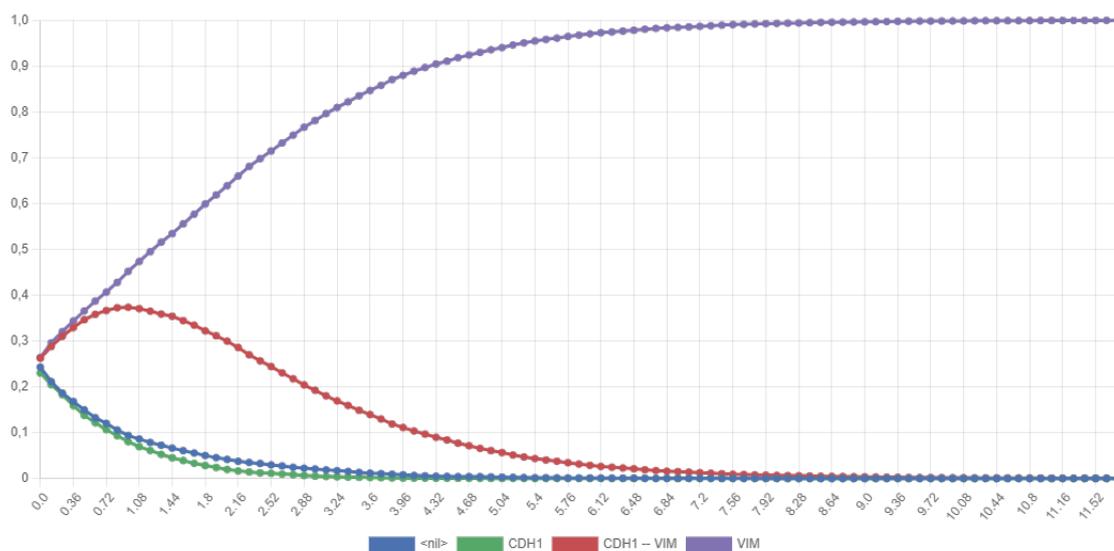
A figura 24 ilustra a trajetória das probabilidades quando miR_200, miR_1199, GRHL2 e miR_340 permanecem ativados, ao passo que ZEB1 permanece desativado. Nessa análise, destaca-se que os fenótipos híbrido e epitelial convergem para 50% cada, enquanto as demais probabilidades diminuem para 0%. Na simulação realizada no GINsim, observa-se um padrão semelhante de estados estáveis prováveis, com a presença de um estado estável epitelial e um estado híbrido.

Figura 24 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_200 ON - miR_1199 ON - GRHL2 ON - miR_340 ON - ZEB1 OFF.



Ao manter ZEB1 ativado e desativar miR_200, miR_1199, GRHL2 e miR_340, como evidenciado na figura 25, observa-se um aumento da probabilidade do fenótipo mesenquimal para 100%, ao passo que as probabilidades dos demais fenótipos diminuem. É perceptível que o estado híbrido inicia sua trajetória de forma ascendente, porém não consegue se manter e experimenta um declínio ao longo do tempo. De forma similar, nas simulações originais observa-se apenas o estado mesenquimal estável.

Figura 25 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_200 OFF - miR_1199 OFF - GRHL2 OFF - miR_340 OFF - ZEB1 ON.



Os resultados restantes das perturbações no MaBoSS mostraram-se consistentes com os resultados originais, e estão documentados no Apêndice B.

A análise da distribuição de probabilidades do estado selvagem da rede original é viabilizada pelo gráfico apresentado na figura 26. A tabela 3 detalha as probabilidades obtidas pelo MaBoSS, conforme ilustrado na figura 26, e as compara com as probabilidades derivadas do GINsim na pesquisa original.

Figura 26 – Distribuição de probabilidades final dos estados para Ex_TGFB ON. Estado selvagem.

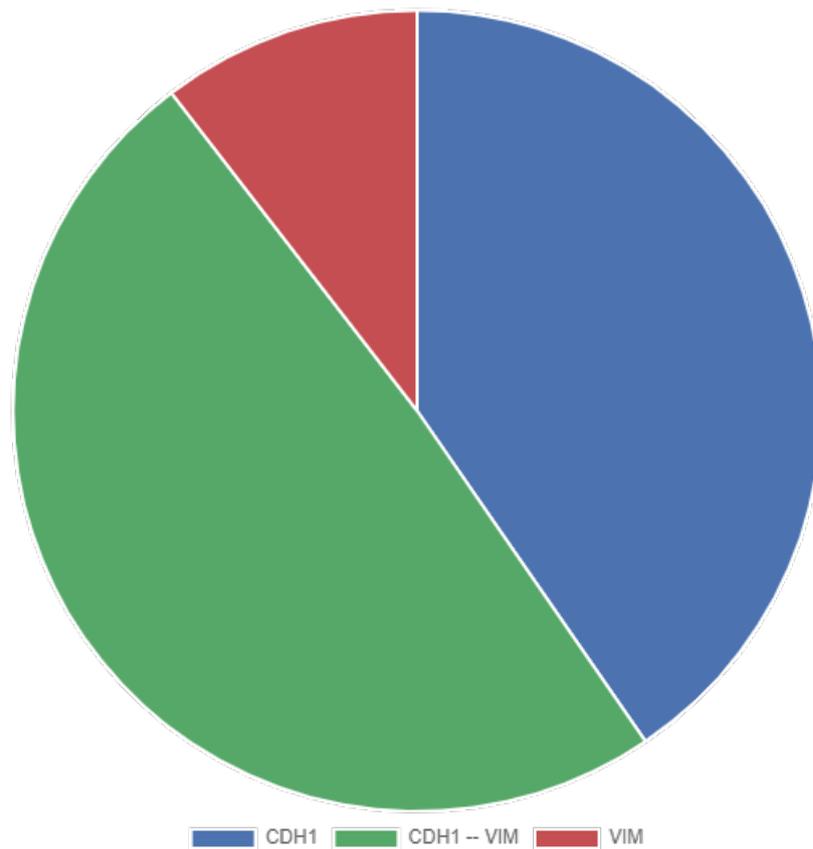


Tabela 3 – Probabilidade dos fenótipos para o estado selvagem.

Fenótipo	Probabilidade MaBoSS (%)	Probabilidade GINsim (%)
Mesenquimal	10	10,23
Epitelial	40,1	40,61
Híbrido	49,9	49,16

Observa-se uma proximidade notável entre as probabilidades dos estados obtidas no software MaBoSS e aquelas originalmente derivadas no GINsim, evidenciando sua compatibilidade.

6.2 MODELO PROPOSTO

O presente estudo elaborou um novo modelo, construído sobre a fundação do trabalho anterior de Silveira e Mombach, detalhado na seção precedente. Esse modelo incorpora dois elementos adicionais de relevância: a influência da matriz extracelular (MEC) e do RNA longo não-codificante ATB (lncRNA-ATB).

A matriz extracelular (MEC) é uma rede de proteínas que preenche os espaços entre as células nos tecidos e órgãos, indo além de fornecer simples suporte estrutural. Ela passa por alterações drásticas na composição e organização durante a progressão do câncer, que contribui para a invasão celular. As proteínas presentes na MEC atuam como reguladores, ativando ou desligando caminhos específicos dessa regulação e influenciando a TEM. A importância do microambiente biofísico no controle da TEM é ressaltada por uma série de experimentos publicados. Estes experimentos abordam efeitos associados à rigidez induzida pelo TGF- β , resultando em apoptose em ambientes de MEC mais flexíveis, em contraste com a indução da TEM em substratos mais rígidos. Além disso, observou-se a ocorrência de TEM completa na ausência de qualquer sinal bioquímico de transformação em MECs rígidas com nanopadrões, sendo mediada por estresse mecânico que induz fatores de transcrição relacionados à TEM. Essas discrepâncias destacam a necessidade premente de refinamento e expansão dos modelos existentes para capturar a complexidade do papel do microambiente biofísico na regulação da TEM (SULLIVAN et al., 2023).

O lncRNA-ATB, um RNA longo não codificante, é designado como tal devido ao seu papel crucial na via de sinalização do TGF- β (YUAN et al., 2014). Sua função no contexto do câncer indicam que esse RNA longo desempenha um papel significativo na metástase e na invasão celular ao regular a transição epitelial mesenquimal. Evidências acumuladas revelam que o lncRNA-ATB exerce um papel regulador na estabilidade dos estados celulares, impactando a capacidade das células de completar ou interromper a TEM. Portanto, considerar a relevância do lncRNA-ATB em modelos de simulação da TEM é essencial para uma compreensão mais abrangente desses processos biológicos. Mecanicamente, o lncRNA-ATB é induzido por TGF- β e acelera a TEM a partir do microRNA 34 (XU et al., 2021).

A partir da estrutura da rede representada na figura 19, foi desenvolvido um novo modelo de regulação molecular, conforme apresentado na figura 27. Esta nova configuração incorpora a presença de novas moléculas, como o RNA longo não-codificante ATB, além de introduzir novas moléculas reguladas por um *input* adicional proveniente da matriz extracelular. Essa expansão na rede molecular busca capturar e modelar de maneira mais abrangente os elementos e as interações relevantes no contexto biológico em estudo.

A MEC foi incluída ao modelo adicionando uma série de moléculas que são reguladas pela sua influência. Essas componentes ativam uma cascata de sinalização com a

qual, dependendo da sua ativação ou inibição, podem induzir uma mudança fenotípica na célula.

Há uma variedade de proteínas que desempenham o papel de conectar a matriz extracelular à célula, operando tanto fora quanto dentro da célula. Essas moléculas interagem de diversas maneiras entre si, incluindo processos como fosforilação, atuação como agentes de ligação entre múltiplas moléculas (*binding*), e função como ativadores transcricionais que regulam a expressão gênica.

Algumas moléculas da rede regulatória do modelo proposto exercem suas funções em diferentes compartimentos celulares. Por exemplo, a AKT1 desempenha seu papel no citoplasma, onde fosforila CTNNB1 e GSK3B. Por sua vez, GSK3B também atua no citoplasma, fosforilando CTNNB1 e VIM. Além disso, GSK3B exerce sua função dentro do núcleo, onde fosforila SNAI1. Enquanto isso, CDH1, localizada na membrana plasmática, atua como agente de ligação com CTNNB1 no citoplasma e com TCF7L2_LEF1 no núcleo. Por sua vez, TCF7L2_LEF1, presente no núcleo, funciona como ativador de transcrição de SNAI2, que, por fim, atua sobre ZEB1. Essas interações entre moléculas em diferentes compartimentos celulares são essenciais para regular os processos de transição epitelial mesenquimal. As referências biológicas dos circuitos são mostradas na tabela 5 no apêndice D.

Os nós coloridos em amarelo no diagrama simbolizam os marcadores mesenquimais, enquanto aqueles em azul representam os marcadores epiteliais. Os dois nós de entrada em cinza denotam o fator transformador de crescimento β (TGF- β) e a MEC, o nó em roxo é atribuído ao ácido hialurônico (HA) e o nó rosa ao lncRNA-ATB. Todos os nós do grafo são *booleanos*, o que significa que eles podem assumir apenas valores de zero ou um. As setas vermelhas com cabeças em forma de martelo indicam interações de inibição, enquanto as setas verdes representam interações de ativação. Além disso, as linhas pontilhadas são utilizadas para representar interações indiretas entre as moléculas.

Tabela 4 – Regras lógicas. Os operadores lógicos NOT, AND e OR são retratados por !, & e |, respectivamente.

Nó	Regra lógica
AKT1	ECM
CTNNB1	CDH1 & !GSK3B & (AKT1 !MIR200 !MIR34A)
TCF7L2_LEF1	CTNNB1
SNAI2	TCF7L2_LEF1
GSK3B	!AKT1
lncRNA_ATB	Ex_TGFB TGFB
TGFB	!(MIR200 MIR190A)
SNAI1	((TGFB & !SNAI1) Ex_TGFB) & !MIR34A & !GSK3B & !TCF7L2_LEF1
MIR340	!ZEB1
MIR190A	MIR190A
SNAI1	((TGFB & !SNAI1) Ex_TGFB) & !MIR34A & !GSK3B & !TCF7L2_LEF1
MIR34A	!SNAI1 & !ZEB1 & !lncRNA_ATB
ZEB1	!CD24 & !GRHL2 & !MIR340 & !MIR200 & !MIR1199 & ((CD44s & HA) SNAI1 SNAI2)
MIR200	!SNAI1 !ZEB1
CD24	GRHL2
GRHL2	!ZEB1
ESRP1	!ZEB1
HAS2	ZEB1
HA	HAS2
CD44s	!ESRP1
MIR1199	!ZEB1
CDH1	((GSK3B & !ZEB1) (!SNAI1 & GSK3B)) & !(ZEB1 & !SNAI1 & GSK3B) (ZEB1 & !SNAI1 & GSK3B)
VIM	((SNAI1 ZEB1 AKT1) & !(ZEB1 & SNAI1 & AKT1)) (SNAI1 & ZEB1 & AKT1)

Ao fazer a análise dos estados estáveis no modelo em seu estado selvagem, vê-se apenas estados epiteliais e mesenquimais, com um aumento significativo no número de fenótipos M, como visto na figura 28. Percebe-se que as mudanças feitas no modelo desestabilizaram um estado híbrido e contribuíram para a estabilização de novos estados

mesenquimais. É interessante levar em consideração que os dois primeiros estados estáveis M mostrados na figura 28 têm diversos marcadores epiteliais ativados, mesmo sendo considerado um fenótipo M pela ativação de VIM e desativação de CDH1.

Figura 28 – Estados estáveis do caso tipo selvagem.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNNB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL				1	1	1	1	1	1	1	1	1								1				
MESENQUIMAL		1		1	1	1	1	1	1	1	1		1											1
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1	1								1	1				
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1			1	1					1					1
MESENQUIMAL	1	1	1										1	1	1	1	1	1						1

Com o objetivo de identificar a influência de cada novo elemento no grafo nas modificações observadas, foram realizadas perturbações no sistema.

Inicialmente, conduziu-se uma simulação na qual o lncRNA-ATB foi mantido desativado, conforme demonstrado na figura 29. Dessa maneira, foi possível avaliar o efeito dessa molécula no sistema como um todo. Notavelmente, observa-se o surgimento de um novo estado estável associado ao fenótipo M quando o RNA longo em questão não exerce influência na rede. Essa observação sugere que o lncRNA-ATB pode desempenhar um papel na desestabilização da transição, uma vez que sua presença interfere na estabilidade do estado M, impedindo-o de passar pela transição.

Figura 29 – Estados estáveis para lncRNA-ATB KO.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNNB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL				1	1	1	1	1	1	1	1	1								1				
MESENQUIMAL		1		1	1	1	1	1	1	1	1		1											1
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1	1									1				
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1			1	1										1
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1		1											1
MESENQUIMAL	1	1	1										1	1	1	1	1	1						1

Posteriormente, foram introduzidas perturbações no nó que representa a matriz extracelular. Quando a MEC é mantida desativada, como ilustrado na figura 30, observa-se exclusivamente a presença de fenótipos estáveis epiteliais. Por outro lado, ao manter a MEC ativada, é possível constatar a ocorrência apenas de fenótipos mesenquimais, visto na figura 31.

Figura 30 – Estados estáveis para ECM KO.

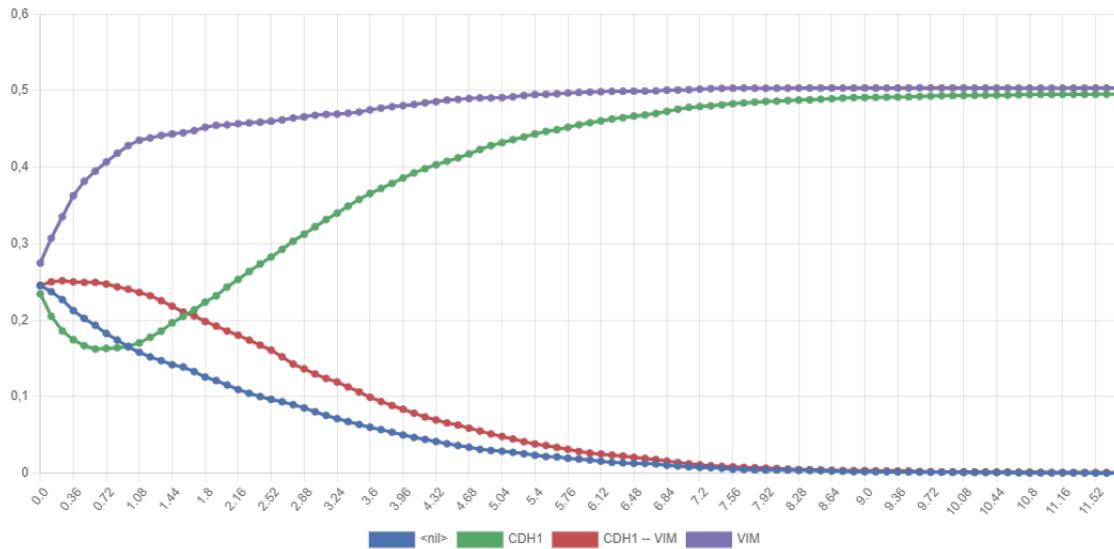
Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNMB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1							1	1				
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1							1	1				

Figura 31 – Estados estáveis para ECM E1.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNMB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
MESENQUIMAL		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1						1					1
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1						1					1
MESENQUIMAL	1	1	1									1	1	1	1	1	1	1	1					1

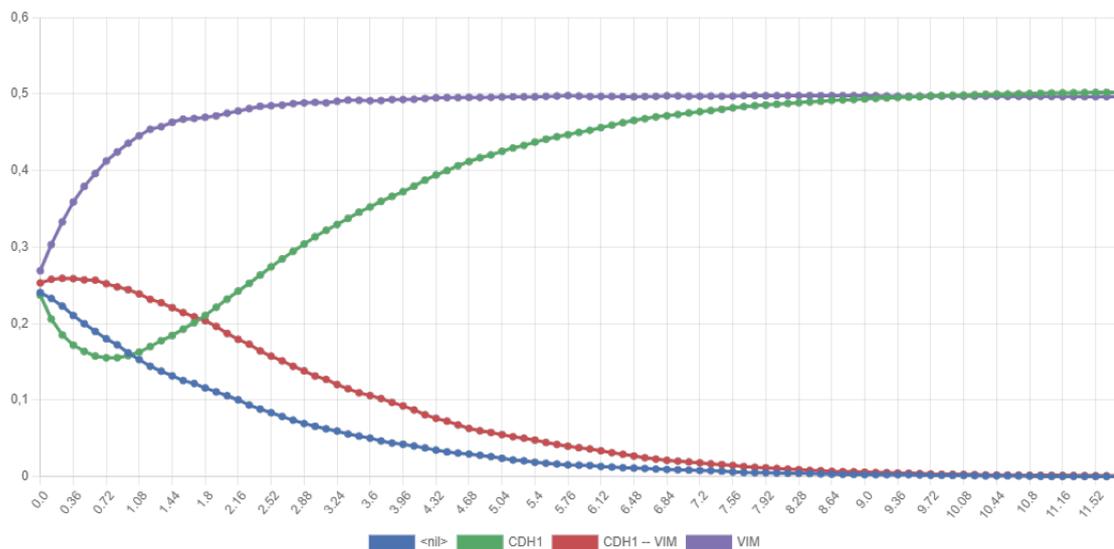
Ao examinar os efeitos de ativação e inibição na matriz extracelular, observa-se que sua ativação, indicada pelo valor 1, corresponde a uma matriz rígida; em contrapartida, a inibição, representada pelo valor 0, corresponde a uma matriz flexível. Nota-se, portanto, uma congruência com a literatura (LEIGHT et al., 2012), uma vez que estudos experimentais indicam que uma matriz extracelular rígida induz a transição epitelial mesenquimal, em conjunto com a sinalização de TGF- β . As figuras 30 e 31 essencialmente demonstram que, quando a matriz está flácida (ou seja, inativa), o modelo exibe apenas estados E, sugerindo que a transição não ocorreu, nem de forma completa para o fenótipo M, nem parcialmente para um fenótipo H. Por outro lado, quando a matriz está rígida (ativada), o modelo apresenta uma transição completa da TEM, resultando em células do fenótipo M.

Posteriormente, foram examinadas as evoluções probabilísticas utilizando o software MaBoSS. A evolução dos estados quando os *inputs* possuem uma probabilidade de 50% é mostrada na figura 32. É perceptível que os fenótipos epitelial e mesenquimal aumentam até aproximadamente 0.5, ao passo que os outros estados diminuem para zero. Essa simulação mostra o estado selvagem do modelo, que pode ser comparado com a figura 28, obtida através do GINsim. Ambas as representações apresentam exclusivamente os estados E e M. Nota-se também, uma rápida diminuição do estado epitelial antes de seu subsequente crescimento.

Figura 32 – Trajetória de probabilidade dos estados para *inputs* 0.5.

A partir daqui, são investigadas as evoluções quando são feitas perturbações no sistema. Ao examinar a evolução probabilística dos estados com a desativação do RNA longo não codificante, conforme apresentado na figura 33, observa-se o estado mesenquimal atingindo 50%, enquanto o estado epitelial também alcança 50% após uma queda inicial. Todos os outros estados decaem para zero.

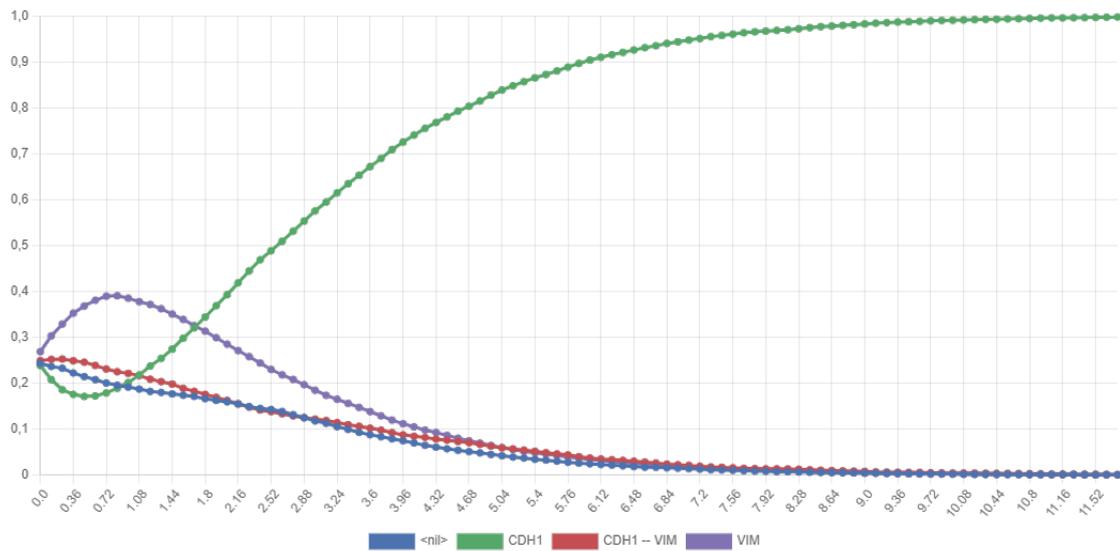
Figura 33 – Trajetória de probabilidade dos estados para lncRNA-ATB OFF.



Na figura 34, é apresentada a trajetória das probabilidades dos estados quando a matriz extracelular permanece inativa. Nessa condição, a MEC é considerada flexível, e nota-se o aumento do estado epitelial atingindo 100%, após uma diminuição inicial. O fenótipo mesenquimal exibe um aumento da probabilidade no início da trajetória, para depois

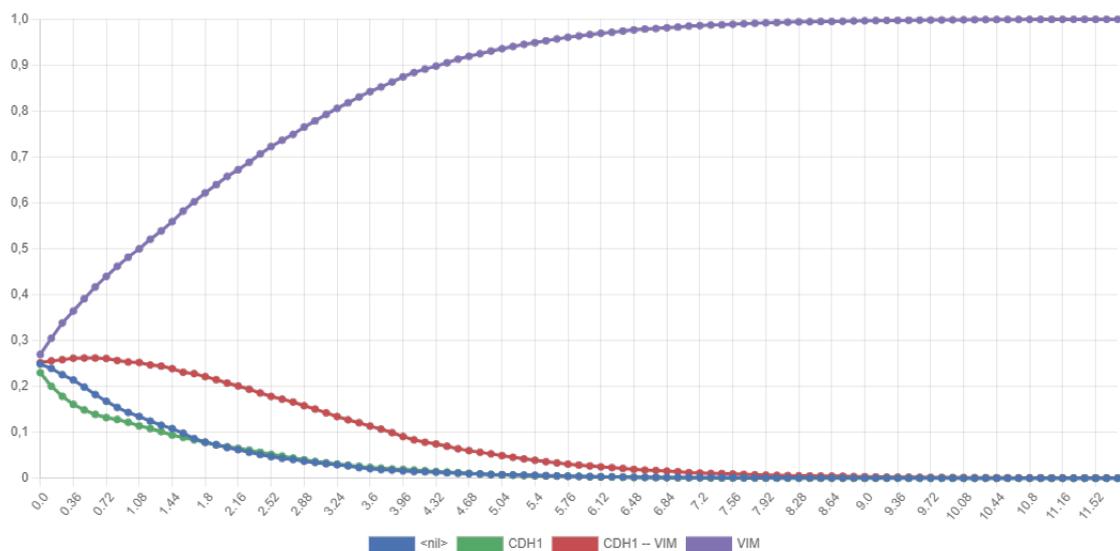
convergir para zero, juntamente com os demais fenótipos.

Figura 34 – Trajetória de probabilidade dos estados para ECM OFF.



No entanto, ao ativar a matriz extracelular, observa-se que a trajetória da probabilidade do fenótipo mesenquimal aumenta para 100% enquanto o restante dos fenótipos atingem zero, como ilustrado na figura 35. Conforme previamente apontado, estudos experimentais sugerem que uma MEC rígida, representada pela sua ativação ou valor 1, induz a TEM em conjunto com a sinalização de $TGF-\beta$. Isso está em consonância com o resultado obtido, onde são identificados apenas estados M prováveis, indicando uma transição completa, de maneira similar ao que foi encontrado pelo software GINsim.

Figura 35 – Trajetória de probabilidade dos estados para ECM ON.



O desenvolvimento de um novo modelo de regulação molecular, baseado na estru-

tura de rede apresentada na figura 19 e expandido na figura 27, integra novos elementos, como o RNA longo não codificante ATB, e incorpora a influência de moléculas adicionais provenientes da matriz extracelular. Esse modelo ampliado busca representar de maneira mais abrangente as interações relevantes no contexto biológico da transição epitelial mesenquimal. A análise dos estados estáveis do modelo revela que a presença do lncRNA-ATB desempenha um papel na estabilidade dos fenótipos celulares, interferindo na transição epitelial mesenquimal.

Perturbações no nó que representa a matriz extracelular revelaram resultados significativos: quando a MEC é ativada, indicando uma condição de matriz extracelular rígida, observa-se que isso conduz predominantemente à transição completa da TEM. Isso significa que as células passam por mudanças fenotípicas substanciais, adquirindo características mesenquimais. Por outro lado, quando a MEC é desativada, indicando uma matriz extracelular mais flexível, os fenótipos celulares tendem a permanecer predominantemente epiteliais, com uma ausência significativa da transição mesenquimal. Esses resultados sugerem que a rigidez ou flexibilidade da matriz extracelular desempenha um papel crucial na regulação da TEM, influenciando diretamente o comportamento e o destino das células. As simulações realizadas com o software MaBoSS corroboram os resultados obtidos, demonstrando que a ativação da MEC leva predominantemente à transição mesenquimal, enquanto sua inativação mantém os fenótipos celulares predominantemente epiteliais.

Ao realizar uma análise comparativa entre os dois modelos apresentados neste estudo, observamos mudanças significativas nas probabilidades e fenótipos resultantes. Especificamente, ao examinarmos os circuitos associados à molécula ZEB1, notamos um aumento notável na ocorrência do fenótipo híbrido, juntamente com o fenótipo mesenquimal, algo que não era observado anteriormente. Anteriormente, os fenótipos híbrido e epitelial cresciam simultaneamente, porém, com as alterações implementadas, observa-se uma competição entre esses fenótipos. Conforme a probabilidade de se obter um estado epitelial aumenta, há uma diminuição correspondente na ocorrência do fenótipo híbrido.

Examinando o papel da molécula ESRP1, que participa de circuitos funcionais em ambas as redes, observa-se uma dinâmica semelhante de competição entre os fenótipos híbrido e epitelial no novo modelo, o fenótipo híbrido era mais prevalente sem as mudanças implementadas. Além disso, ao excluir ZEB1 das perturbações, observa-se uma estabilização do estado híbrido, o qual anteriormente não conseguia manter-se estável.

7 CONCLUSÃO

A transição epitelial mesenquimal (TEM) é um processo biológico fundamental caracterizado por alterações fenotípicas nas células epiteliais, levando à aquisição de características mesenquimais. Essas mudanças são classificadas em três subtipos, correlacionados a diferentes contextos biológicos, proporcionando uma compreensão abrangente da fisiopatologia envolvida, particularmente em condições como o câncer. A expressão de fenótipos híbridos durante a TEM, onde as células cancerígenas adquirem tanto características epiteliais quanto mesenquimais, é associada à progressão do câncer e à disseminação metastática, devido à perda de adesão celular e ao aumento da capacidade migratória. Especificamente, as células tumorais circulantes (CTCs) que apresentam um fenótipo híbrido têm uma maior capacidade de migração, tanto de forma individual quanto coletiva na matriz extracelular (MEC), o que intensifica seu potencial metastático. Durante a progressão do câncer, as alterações na composição e organização da MEC contribuem para a invasão celular, com proteínas específicas desempenhando papéis regulatórios na sinalização celular e na modulação da TEM. A influência do microambiente biofísico na regulação da TEM é destacada por experimentos que demonstram os efeitos da rigidez da MEC, induzida pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β), afetando diretamente o comportamento celular. Diante dessas descobertas, a consideração do lncRNA-ATB, um importante mediador da sinalização do TGF- β , é essencial, dada sua associação com metástase e invasão celular, sugerindo um papel significativo na regulação da TEM e na estabilidade dos estados celulares.

Constatou-se que a TEM completa pode ocorrer mesmo na ausência de qualquer sinal bioquímico de indução, especialmente em células epiteliais submetidas a substratos rígidos com nanopadrões. Nesses cenários, a transição é mediada por estresse mecânico, o qual induz a expressão de fatores de transcrição relacionados à TEM. No entanto, ainda carecemos de um modelo mecanicista preditivo abrangente, capaz de reproduzir e anteciper os efeitos do ambiente biomecânico em nível celular. Este modelo ideal deveria considerar o comportamento celular em diferentes contextos de sinalização, abrangendo uma variedade de estímulos de crescimento ou sinais de transformação (SULLIVAN et al., 2023). Assim, a aplicação da modelagem matemática em redes biológicas surge como uma abordagem promissora para desvendar a complexidade intrincada da progressão do câncer.

Em suma, este trabalho buscou investigar a dinâmica da TEM levando em consideração a influência de algumas moléculas da matriz extracelular, além da evolução temporal do sistema a partir de um software que simula o tempo. O modelo foi baseado em uma rede de câncer de mama proposta anteriormente pelo grupo de sistemas complexos. Ao longo do estudo, foi observada a correspondência entre os modelos. Os resultados evi-

denciaram que a rede proposta neste estudo reflete a conformidade entre as moléculas analisadas e os resultados esperados, conforme observado em pesquisas experimentais.

Os resultados obtidos por meio da utilização do software GINsim, em um estudo anterior, foram confrontados com aqueles gerados pelo software MaBoSS. A análise comparativa revelou consistências e semelhanças entre os modelos desenvolvidos em ambas as plataformas, destacando a capacidade de cada uma delas em simular e representar com precisão os processos biológicos investigados, visto na seção 6.1. Este estudo contribui não apenas para a validação dos resultados anteriores, mas também para a compreensão mais aprofundada da dinâmica dos sistemas biológicos sob investigação, ao incorporar diferentes ferramentas computacionais.

O desenvolvimento bem-sucedido e os testes efetuados na rede de regulação para simulação da TEM em uma linhagem de células epiteliais da mama humana representam um marco significativo neste estudo. A introdução de novas moléculas de sinalização provenientes da MEC e do RNA longo não-codificante ATB proporcionou uma abordagem abrangente na análise dos efeitos desses elementos. A validação do modelo, realizada mediante a comparação entre diferentes softwares, reforça a confiabilidade da rede proposta. As simulações conduzidas revelaram de maneira consistente a influência conjunta da MEC e do fator de crescimento transformador beta na promoção da transição celular, tanto no modelo temporal quanto no atemporal, na seção 6.2. Notavelmente, observou-se que uma matriz extracelular rígida atua como um indutor eficaz do fenótipo mesenquimal, visto na figura 31, facilitando a transição completa das células. Em contraste, uma matriz flexível apresenta uma maior resistência à alteração do fenótipo, refletindo uma menor propensão à transição celular, notado na figura 30. A concordância excepcional entre esses resultados simulados e dados experimentais realça a validação do modelo proposto e a sua capacidade de representar fielmente os processos biológicos investigados. Esse alinhamento robusto entre a simulação e dados experimentais fortalece a confiança nas conclusões obtidas, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada da dinâmica da TEM em células epiteliais mamárias humanas. Em conjunto, os resultados deste estudo não apenas validam a rede de regulação proposta, mas também oferecem revelações valiosas sobre os mecanismos subjacentes à transição celular e suas interações complexas com a matriz extracelular.

Diante do objetivo de investigar o comportamento do RNA longo não-codificante ATB na dinâmica, os resultados revelaram o seguinte cenário. Ao isolar a influência do lncRNA-ATB na rede, foi possível observar o surgimento de um novo estado estável associado ao fenótipo M, visto na figura 29 (seção 6.2). Essa constatação indica que, quando o lncRNA-ATB não exerce sua influência sobre a rede, há a formação de um estado estável que está diretamente vinculado ao fenótipo M. Essa evidência sugere uma relação entre o lncRNA-ATB e a desestabilização da transição, uma vez que sua presença interfere na estabilidade do estado M, impedindo-o de completar a transição. Entretanto, a inclusão de

outros fatores na rede podem mostrar resultados contrários.

A rede desenvolvida e seus resultados obtidos no trabalho servem como uma nova peça para o quebra cabeça da biologia celular do câncer de mama, podendo ser utilizada como uma base para futuras investigações de redes de simulação, bem como pesquisas experimentais que podem aprofundar ainda mais nossa compreensão da regulação da TEM em resposta à interação entre a MEC, o fator de crescimento transformador beta e o RNA longo não codificante ATB. Sugere-se que pesquisas adicionais explorem a dinâmica de outras moléculas, incluindo outros lncRNAs com potencial papel na regulação da TEM em contextos patológicos, como o câncer.

A compreensão aprimorada desses mecanismos, incluindo o papel de lncRNAs, pode potencialmente informar abordagens terapêuticas inovadoras visando a inibição ou promoção controlada da TEM, com implicações significativas para o tratamento de doenças associadas a esse processo celular, destacando a relevância clínica deste trabalho. É importante destacar que este estudo apresenta algumas limitações. Os estudos a respeito dos RNAs longos não-codificantes ainda são restritas, mesmo que pesquisas já mostrem seu potencial envolvimento na dinâmica de processos biológicos, incluindo o câncer. Futuras pesquisas podem se concentrar em abordar essas limitações e explorar mais a fundo os mecanismos de abrangência dos lncRNAs na transição epitelial mesenquimal.

7.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Prosseguir com investigações adicionais é importante a respeito da relação entre a redução da rigidez da matriz extracelular e a indução da apoptose, especialmente quando associada ao fator de crescimento beta. Estudos sobre os marcadores de fenótipo epitelial e mesenquimal são importantes, já que identificar marcadores específicos que caracterizam de forma conclusiva a transição completa é fundamental. Portanto, investigar a interação entre diversos marcadores, como E-caderina, N-caderina, Vimentina e outros associados à TEM, pode esclarecer quais são essenciais para validar a ocorrência de uma transição completa. Além disso, a exploração de novos marcadores emergentes pode contribuir para a definição mais precisa do estado fenotípico, auxiliando na diferenciação entre transições parciais e completas. Ademais, uma investigação mais detalhada sobre alguns outros lncRNAs que são mostrados como podendo regular a TEM interferindo na função de microRNAs (miRNAs) e proteínas, como NEAT1 e ROR são de grande importância, pois se sugere que os lncRNAs têm potencial como alvos terapêuticos e biomarcadores para pacientes com câncer de mama metastático (JIN et al., 2021). Também deve-se considerar que diferentes interações realizadas pelo lncRNA-ATB podem resultar em resultados distintos dos encontrados nesse trabalho, como sua interação com a família do microRNA-200, Twist1 e ZEB1/2 (SHI et al., 2015; LI et al., 2018; ZHAOYU et al., 2022), que devem

ser levadas em conta em estudos posteriores.

Assim, ao finalizar esta pesquisa, reforça-se a importância de abordagens complementares na modelagem de processos biológicos complexos, aprimorando nossa compreensão e fornecendo uma base sólida para futuras investigações.

REFERÊNCIAS

ABOU-JAOUDE, W. et al. Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. **Frontiers in genetics**, Frontiers Media SA, v. 7, p. 94, 2016.

ACETO, N. et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. **Cell**, Elsevier, v. 158, n. 5, p. 1110–1122, 2014.

ALBERTS et al. **Biologia molecular da célula**. Traduzido por Ardala Elisa Breda Andrade [et al.]. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 299-368 p.

ALON, U. **An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits**. 2. ed. Reino Unido: CRC Press, 2019.

ARNOSTI, D. N.; AY, A. Boolean modeling of gene regulatory networks: Driesch redux. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 109, n. 45, p. 18239–18240, 2012.

BÉRENGUIER, D. et al. Dynamical modeling and analysis of large cellular regulatory networks. **Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science**, AIP Publishing, v. 23, n. 2, 2013.

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nature reviews cancer**, Nature Publishing Group UK London, v. 6, n. 11, p. 857–866, 2006.

CALZONE, L.; BARILLOT, E.; ZINOVYEV, A. Logical versus kinetic modeling of biological networks: applications in cancer research. **Current Opinion in Chemical Engineering**, Elsevier, v. 21, p. 22–31, 2018.

CARTER, G. W. Inferring network interactions within a cell. **Briefings in Bioinformatics**, v. 6, n. 4, p. 380–389, 2005.

CHAOUIYA, C.; NALDI, A.; THIEFFRY, D. Logical modelling of gene regulatory networks with ginsim. **Bacterial Molecular Networks: Methods and Protocols**, Springer, p. 463–479, 2012.

CHAOUIYA, C.; REMY, E. **Logical modelling of regulatory networks, methods and applications**. [S.l.]: Springer, 2013. 891–895 p.

CLANCY, S. Rna functions. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 102, 2008.

CLANCY, S.; BROWN, W. Translation: Dna to mrna to protein. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 101, 2008.

COHEN, D. P. et al. Mathematical modelling of molecular pathways enabling tumour cell invasion and migration. **PLoS computational biology**, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 11, n. 11, p. e1004571, 2015.

COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. 2. ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. Translation of mRNA. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9849/>>.

DALCHAU, N. et al. Computing with biological switches and clocks. **Natural computing**, Springer, v. 17, p. 761–779, 2018.

DAVIDSON, E.; LEVIN, M. Gene regulatory networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 4935, 2005.

DENU, J. M. et al. Form and function in protein dephosphorylation. **Cell**, Elsevier, v. 87, n. 3, p. 361–364, 1996.

DERKSEN, P. W. et al. Somatic inactivation of e-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. **Cancer cell**, Elsevier, v. 10, n. 5, p. 437–449, 2006.

FAURÉ, A. et al. Dynamical analysis of a generic boolean model for the control of the mammalian cell cycle. **Bioinformatics**, Oxford University Press, v. 22, n. 14, p. e124–e131, 2006.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, Company of Biologists, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

GARG, M. Epithelial, mesenchymal and hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes and their clinical relevance in cancer metastasis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge University Press, v. 19, p. e3, 2017.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, Elsevier, v. 1796, n. 2, p. 293–308, 2009.

GIBB, E. A.; BROWN, C. J.; LAM, W. L. The functional role of long non-coding rna in human carcinomas. **Molecular cancer**, BioMed Central, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2011.

GONZALEZ, A. G. et al. Ginsim: A software suite for the qualitative modelling, simulation and analysis of regulatory networks. **Biosystems**, v. 84, n. 2, p. 91–100, 2006. Dynamical Modeling of Biological Regulatory Networks.

GREENBURG, G.; HAY, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. **The Journal of cell biology**, v. 95, n. 1, p. 333–339, 1982.

GUPTA, S.; SILVEIRA, D. A.; MOMBACH, J. C. M. Modeling the role of microrna-449a in the regulation of the g2/m cell cycle checkpoint in prostate Incap cells under ionizing radiation. **PloS one**, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 13, n. 7, p. e0200768, 2018.

GUTTMAN, M. et al. lincrnas act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. **Nature**, Nature Publishing Group UK London, v. 477, n. 7364, p. 295–300, 2011.

HALLINAN, J.; JACKWAY, P. Network motifs, feedback loops and the dynamics of genetic regulatory networks. In: **2005 IEEE Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology**. [S.l.: s.n.], 2005. p. 1–7.

HAY, E. Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In: WILLIAMS & WILKINS. **Epithelial-Mesenchymal Interactions; 18th Hahnemann Symposium, 1968**. [S.l.], 1968.

HEERBOTH, S. et al. Emt and tumor metastasis. **Clinical and translational medicine**, SpringerOpen, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2015.

HUARTE, M.; RINN, J. L. Large non-coding rnas: missing links in cancer? **Human molecular genetics**, Oxford University Press, v. 19, n. R2, p. R152–R161, 2010.

IOZZO, R. V. et al. Complexity of matrix phenotypes. **Matrix Biology Plus**, Elsevier, v. 6, p. 100038, 2020.

ISER, I. C. et al. The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma: an updated systematic review and in silico investigation. **Medicinal Research Reviews**, Wiley Online Library, v. 37, n. 2, p. 271–313, 2017.

ISSLER, M. V. C.; MOMBACH, J. C. M. Microrna-16 feedback loop with p53 and wip1 can regulate cell fate determination between apoptosis and senescence in dna damage response. **PLoS One**, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 12, n. 10, p. e0185794, 2017.

JIN, H. et al. Incrna and breast cancer: Progress from identifying mechanisms to challenges and opportunities of clinical treatment. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, Elsevier, v. 25, p. 613–637, 2021.

JONG, H. de. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: A literature review. **Journal of Computational Biology**, v. 9, n. 1, p. 67–103, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia Básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, Am Soc Clin Investig, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KARAMANOS, N. K. et al. Matrix modeling and remodeling: a biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. **Matrix Biology**, Elsevier, v. 75, p. 1–11, 2019.

KAUFFMAN, S. A. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. **Journal of Theoretical Biology**, v. 22, n. 3, p. 437–467, 1969.

KAUFMAN, M.; SOULE, C.; THOMAS, R. A new necessary condition on interaction graphs for multistationarity. **Journal of theoretical biology**, Elsevier, v. 248, n. 4, p. 675–685, 2007.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: Uma Introdução à Patologia**. Traduzido por Claudia Coana [et al.]. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 704 p.

KIM, M.-Y. et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. **Cell**, Elsevier, v. 139, n. 7, p. 1315–1326, 2009.

KIM, Y.-N. et al. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. **International journal of cell biology**, Hindawi, v. 2012, 2012.

KROESE, D. P. et al. Why the monte carlo method is so important today. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, Wiley Online Library, v. 6, n. 6, p. 386–392, 2014.

KRÖGER, C. et al. Acquisition of a hybrid e/m state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 116, n. 15, p. 7353–7362, 2019.

LAI, X. et al. Epithelial-mesenchymal transition and metabolic switching in cancer: lessons from somatic cell reprogramming. **Frontiers in cell and developmental biology**, Frontiers Media SA, v. 8, p. 760, 2020.

LEE, K.; NELSON, C. M. Chapter four - new insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis. In: JEON, K. W. (Ed.). Academic Press, 2012, (International Review of Cell and Molecular Biology, v. 294). p. 171–221. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123943057000045>>.

LEIGHT, J. L. et al. Matrix rigidity regulates a switch between $\text{tgf-}\beta\text{1}$ -induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. **Molecular biology of the cell**, Am Soc Cell Biol, v. 23, n. 5, p. 781–791, 2012.

LI, C. H.; CHEN, Y. Targeting long non-coding rnas in cancers: progress and prospects. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Elsevier, v. 45, n. 8, p. 1895–1910, 2013.

LI, R.-H. et al. Long noncoding rna atb promotes the epithelial- mesenchymal transition by upregulating the mir-200c/twist1 axe and predicts poor prognosis in breast cancer. **Cell death & disease**, Nature Publishing Group UK London, v. 9, n. 12, p. 1171, 2018.

LING, H.; FABBRI, M.; CALIN, G. A. Micrnas and other non-coding rnas as targets for anticancer drug development. **Nature reviews Drug discovery**, Nature Publishing Group UK London, v. 12, n. 11, p. 847–865, 2013.

LINTZ, M.; MUÑOZ, A.; REINHART-KING, C. A. The mechanics of single cell and collective migration of tumor cells. **Journal of biomechanical engineering**, American Society of Mechanical Engineers, v. 139, n. 2, p. 021005, 2017.

LODISH, H. et al. **Biologia celular e molecular**. Traduzido por Adriana de Freitas Schuck Bizarro [et al.]. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 115-170 p.

MANOU, D. et al. The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues. **The extracellular matrix: Methods and protocols**, Springer, p. 1–20, 2019.

MATTICK, J.; AMARAL, P. **RNA, the epicenter of genetic information: a new understanding of molecular biology**. 1. ed. [S.l.]: Taylor & Francis, 2023.

MENCK, C. F. M.; SLUYS, M.-A. V. **Genética molecular básica: dos genes aos genomas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 181-206 p.

MENDES, N. D. et al. Estimating attractor reachability in asynchronous logical models. **Frontiers in physiology**, Frontiers Media SA, v. 9, p. 1161, 2018.

MERCER, T. R.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. Long non-coding rnas: insights into functions. **Nature reviews genetics**, Nature Publishing Group UK London, v. 10, n. 3, p. 155–159, 2009.

National Human Genome Research Institute. **Talking Glossary of Genetic Terms**. 2023. Acesso em 04 dez. 2023. Disponível em: <<https://www.genome.gov/genetics-glossary>>.

NOVERE, N. L. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. **Nature Reviews Genetics**, Nature Publishing Group UK London, v. 16, n. 3, p. 146–158, 2015.

PAIS, R. J. F. T. G. **How cells initiate Epithelial-to-Mesenchymal Transition?** 2018. Tese (Doutorado) — Universidade Nova de Lisboa, 2018.

PAULI, A.; RINN, J. L.; SCHIER, A. F. Non-coding rnas as regulators of embryogenesis. **Nature Reviews Genetics**, Nature Publishing Group UK London, v. 12, n. 2, p. 136–149, 2011.

PAVLOPOULOS, G. A. et al. Using graph theory to analyze biological networks. **BioData Mining**, v. 4, p. 1–27, 2011.

PIGOLOTTI, S.; KRISHNA, S.; JENSEN, M. H. Oscillation patterns in negative feedback loops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 104, n. 16, p. 6533–6537, 2007.

PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Evolution and functions of long noncoding rnas. **Cell**, Elsevier, v. 136, n. 4, p. 629–641, 2009.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ros) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling**, Elsevier, v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012.

REECE, J. B. et al. **Campbell Biology**. 9. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2010. 1464 p.

REVENU, C.; GILMOUR, D. Emt 2.0: shaping epithelia through collective migration. **Current opinion in genetics & development**, Elsevier, v. 19, n. 4, p. 338–342, 2009.

RIBEIRO, M. C. M. **Genética molecular**. Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2009.

RUBIN, C. S.; ROSEN, O. M. Protein phosphorylation. **Annual review of biochemistry**, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 44, n. 1, p. 831–887, 1975.

SAITOH, M. Involvement of partial emt in cancer progression. **The Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 4, p. 257–264, 2018.

SÁNCHEZ, L.; CHAOUIYA, C. Primary sex determination of placental mammals: a modelling study uncovers dynamical developmental constraints in the formation of sertoli and granulosa cells. **BMC systems biology**, BioMed Central, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2016.

SELVAGGIO, G.; CHAOUIYA, C.; JANODY, F. In silico logical modelling to uncover cooperative interactions in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI, v. 22, n. 9, p. 4897, 2021.

SHI, S.-J. et al. Lncrna-atb promotes trastuzumab resistance and invasion-metastasis cascade in breast cancer. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 6, n. 13, p. 11652, 2015.

SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 11, p. 1351–1383, 2003. ISSN 0925-4773. The Cell in Development. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477303002090>>.

SILVEIRA, D. A. **Modelagem da dinâmica do processo de transição epitélio-mesenquimal em câncer**. 2021. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Maria, 2021.

SILVEIRA, D. A.; GUPTA, S.; MOMBACH, J. C. M. p53/e2f1/mir-25 axis regulates apoptosis induction in glioblastoma cells: A qualitative model. **Journal of Physics: Complexity**, IOP Publishing, v. 1, n. 3, p. 035001, 2020.

_____. Systems biology approach suggests new mirnas as phenotypic stability factors in the epithelial–mesenchymal transition. **Journal of the Royal Society Interface**, The Royal Society, v. 17, n. 171, p. 20200693, 2020.

SILVEIRA, D. A.; MOMBACH, J. C. M. Dynamics of the feedback loops required for the phenotypic stabilization in the epithelial-mesenchymal transition. **The FEBS journal**, Wiley Online Library, v. 287, n. 3, p. 578–588, 2020.

SIMOES, R. de M.; DEHMER, M.; EMMERT-STREIB, F. Interfacing cellular networks of *s. cerevisiae* and *e. coli*: Connecting dynamic and genetic information. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–23, 2013.

SINHA, D. et al. Emerging concepts of hybrid epithelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. **Biomolecules**, MDPI, v. 10, n. 11, p. 1561, 2020.

SMITH, A. J. et al. Beyond picomolar affinities: quantitative aspects of noncovalent and covalent binding of drugs to proteins. **Journal of medicinal chemistry**, ACS Publications, v. 52, n. 2, p. 225–233, 2009.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. Traduzido por Ângela de Mattos Dutra [et al.]. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 207-221 p.

STOLL, G. et al. Continuous time boolean modeling for biological signaling: application of gillespie algorithm. **BMC systems biology**, BioMed Central, v. 6, n. 1, p. 1–18, 2012.

SUJITA, M. Functional analysis of chemical systems in vivo using a logical circuit equivalent. ii. the idea of a molecular automaton. **Journal of Theoretical Biology**, v. 4, n. 2, p. 179–192, 1963.

SULLIVAN, E. et al. Boolean modeling of mechanosensitive epithelial to mesenchymal transition and its reversal. **Iscience**, Elsevier, v. 26, n. 4, p. 106321, 2023.

THEOCHARIS, A. et al. **Extracellular matrix: a functional scaffold Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling**. [S.l.]: Berlin, Germany: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2012.

THEOCHARIS, A. D.; MANOU, D.; KARAMANOS, N. K. The extracellular matrix as a multi-tasking player in disease. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 15, p. 2830–2869, 2019. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.14818>>.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, Elsevier, v. 97, p. 4–27, 2016.

THIEFFRY, D. Dynamical roles of biological regulatory circuits. **Briefings in bioinformatics**, Oxford University Press, v. 8, n. 4, p. 220–225, 2007.

THIERY, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature reviews cancer**, Nature Publishing Group UK London, v. 2, n. 6, p. 442–454, 2002.

THOMAS, R. Boolean formalization of genetic control circuits. **Journal of Theoretical Biology**, v. 42, n. 3, p. 563–585, 1973.

_____. Regulatory networks seen as asynchronous automata: a logical description. **Journal of theoretical biology**, Elsevier, v. 153, n. 1, p. 1–23, 1991.

THOMAS, R.; D'ARI, R. **Biological feedback**. [S.l.]: CRC press, 1990.

_____. Biological feedback. In: **Introduction to part ii**. Florida: CR Press, 1990. cap. 2, p. 125–131.

TRELSTAD, R. L.; HAY, E. D.; REVEL, J.-P. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. **Developmental biology**, Elsevier, v. 16, n. 1, p. 78–106, 1967.

WALHOUT, A. J. Gene-centered regulatory network mapping. **Methods in cell biology**, Elsevier, v. 106, p. 271–288, 2011.

WATSON, J. D.; CRICK, F. A structure for deoxyribose nucleic acid. Macmillan, 1953.

WYNN, M. L. et al. Logic-based models in systems biology: a predictive and parameter-free network analysis method. **Integrative biology**, Oxford University Press, v. 4, n. 11, p. 1323–1337, 2012.

XIAO, K. et al. Role of p120-catenin in cadherin trafficking. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Elsevier, v. 1773, n. 1, p. 8–16, 2007.

XU, Q. et al. Lncrna-atb regulates epithelial-mesenchymal transition progression in pulmonary fibrosis via sponging mir-29b-2-5p and mir-34c-3p. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Wiley Online Library, v. 25, n. 15, p. 7294–7306, 2021.

YOON, H. et al. Understanding the roles of fak in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 63, n. 2, p. 114–128, 2015.

YUAN, J.-h. et al. A long noncoding rna activated by $\text{tgf-}\beta$ promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. **Cancer cell**, Elsevier, v. 25, n. 5, p. 666–681, 2014.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Biologia molecular básica. In: **Transcrição**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap. 10, p. 205–231.

ZHANG, J. et al. Tgf- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. **Science signaling**, American Association for the Advancement of Science, v. 7, n. 345, p. ra91–ra91, 2014.

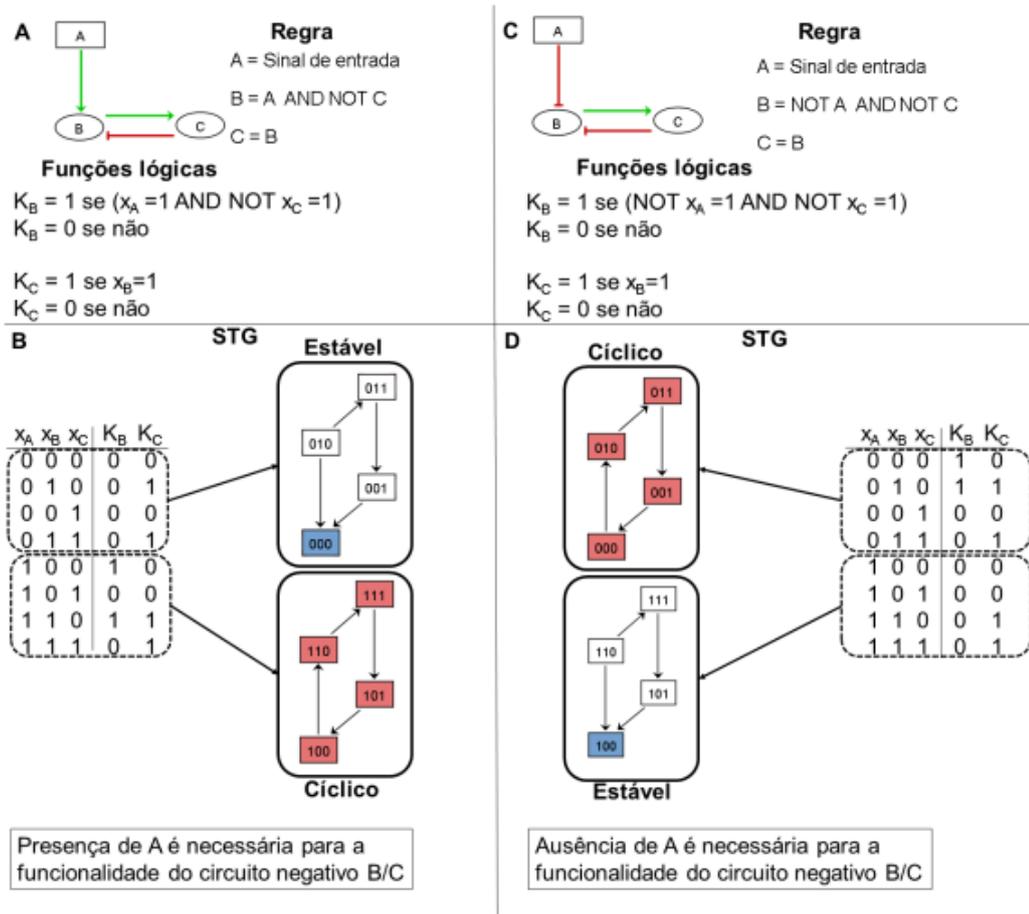
ZHAOYU, Z. et al. Study on the expression of lncrna atb and nek9 in breast cancer patients based on q-pcr technology and its relationship with the disease. **Contrast Media & Molecular Imaging**, Hindawi, v. 2022, 2022.

APÊNDICE A – REGRAS LÓGICAS E A FUNCIONALIDADE DOS CIRCUITOS

As regras lógicas definidas para as componentes do circuito determinam suas funcionalidades, influenciadas diretamente pelos reguladores associados. Restrições de funcionalidade são formuladas com base na relação entre as funções lógicas das componentes e de seus reguladores, refletindo suas dependências.

Por exemplo, na figura 36, a presença de um regulador A implica em restrições na funcionalidade do circuito negativo B/C. O grafo regulatório é caracterizado por um circuito negativo entre os nós B e C, com regulação por meio do nó A, que é o sinal de entrada, afetando diretamente o nó B. As regras lógicas para os nós B e C são determinadas pela interação entre A e B. No caso de uma regulação positiva entre A e B (A), onde A ativa B, o estado ativo de A é essencial para a funcionalidade do circuito A/B, conforme a dinâmica do GTE (B). Por outro lado, em uma regulação negativa (C), onde A inibe B, o comportamento é inverso, com A inativo associado à funcionalidade do circuito (D). A aplicação do operador AND entre as funções de A e C aplicadas em B implica que a atividade de A é necessária para a ativação de B, definindo assim as condições de funcionalidade do circuito.

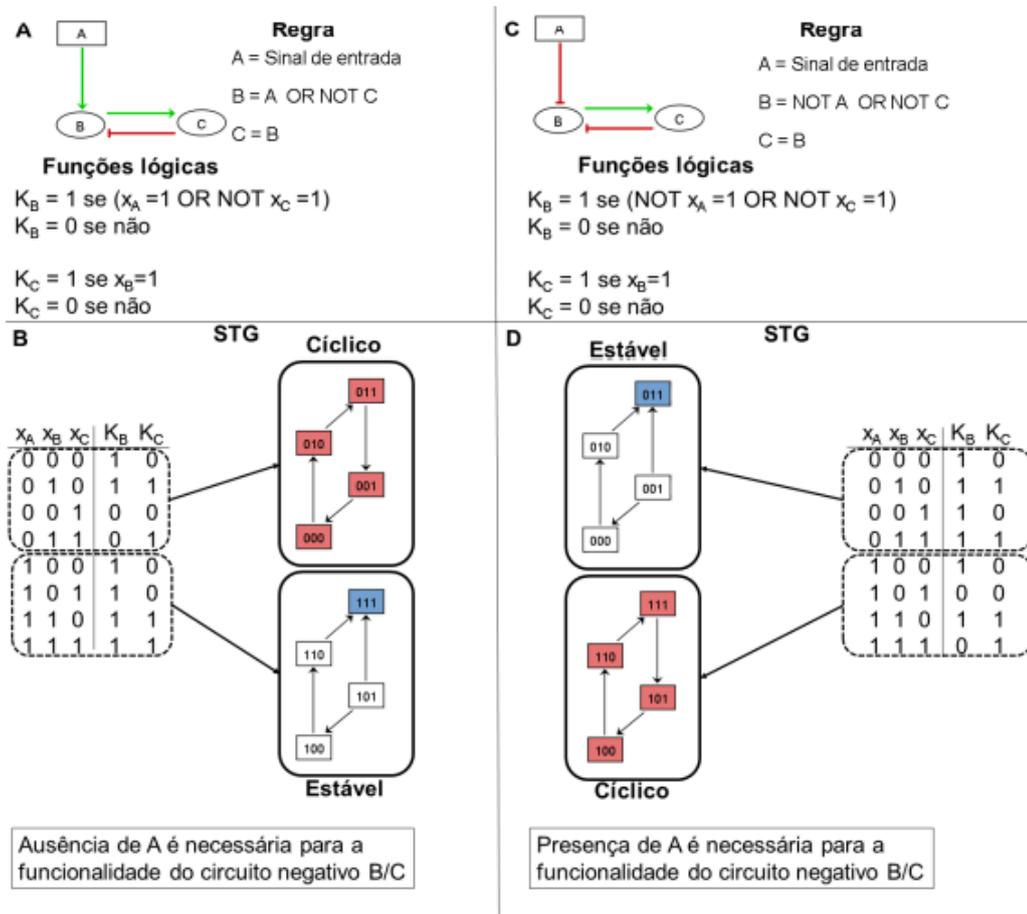
Figura 36 – Exemplo de relação de regras lógicas e contexto de funcionalidade de circuitos através do uso do operador AND.



Fonte: Autorizado por Daner A. Silveira (SILVEIRA, 2021)

Similarmente, a troca de operadores, como de AND para OR, na figura 37, resulta em diferentes padrões de funcionalidade, refletindo a independência ou dependência de A em relação a B. O grafo regulatório apresenta um circuito negativo entre os nós B e C, com regulação por meio do nó A, que é o sinal de entrada, influenciando diretamente o nó B, em que as regras lógicas são estabelecidas para os nós B e C com base na interação entre A e B. No caso de uma regulação positiva entre A e B (A), onde A ativa B, é necessário que A esteja inativo para a funcionalidade do circuito A/B, conforme a dinâmica do GTE (B). Por outro lado, em uma regulação negativa (C), onde A inibe B, o comportamento é oposto, com A ativo associado à funcionalidade do circuito (D).

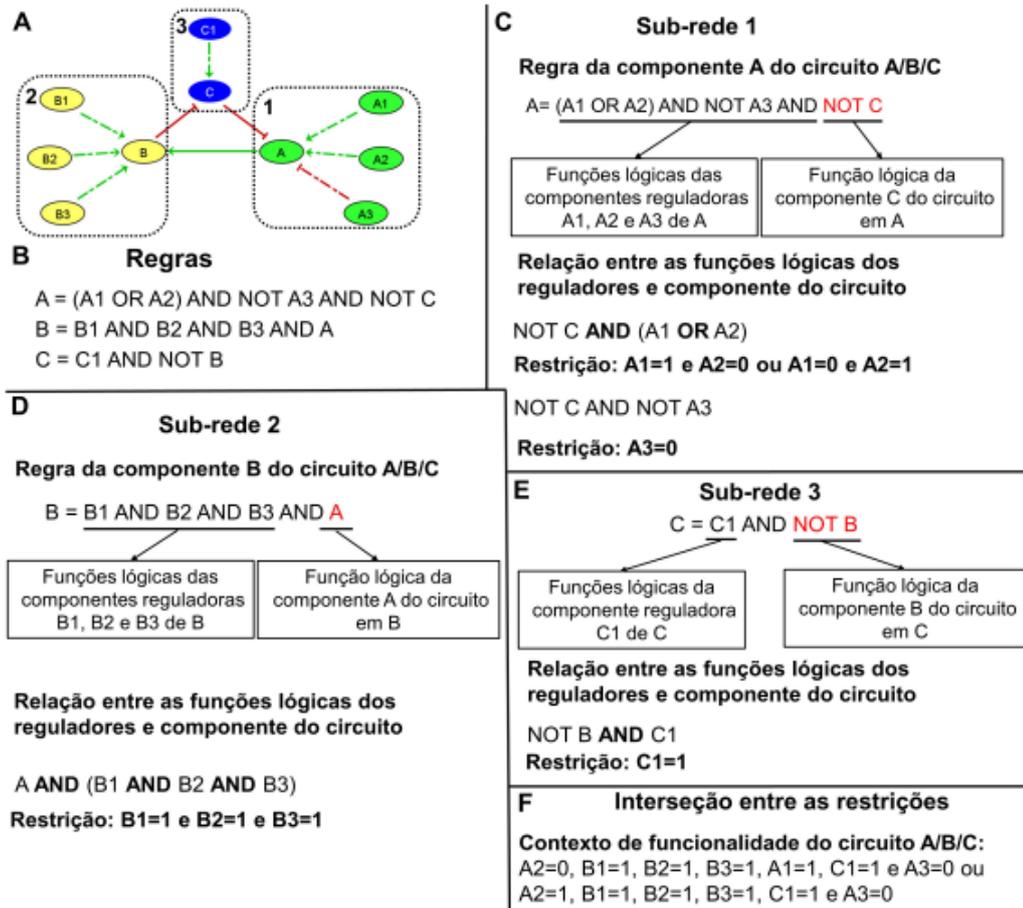
Figura 37 – Exemplo de relação de regras lógicas e contexto de funcionalidade de circuitos através do uso do operador OR.



Fonte: Autorizado por Daner A. Silveira (SILVEIRA, 2021)

Por fim, na figura 38, um exemplo mais complexo envolve múltiplos reguladores influenciando o comportamento dinâmico do circuito A/B/C, onde as restrições são determinadas pela interseção das condições estabelecidas pelos reguladores e componentes do circuito. O grafo regulatório (A) consiste em um circuito positivo envolvendo os nós A, B e C, juntamente com seus respectivos reguladores, representados por A1, A2, A3, B1, B2, B3 e C1, que são os sinais de entrada. As regras lógicas (B) são estabelecidas para os nós A, B e C. Cada componente do circuito e seus reguladores são divididos em sub-redes, conforme ilustrado nas figuras C, D e E e essas subdivisões permitem definir as restrições de cada componente do circuito com base nas regras estabelecidas, relacionando as funções lógicas dos reguladores e componentes do circuito, mostradas em vermelho. A interseção dessas restrições define o contexto de funcionalidade do circuito A/B/C.

Figura 38 – Exemplo de relação de regras lógicas e contexto de funcionalidade de circuitos para uma rede complexa.



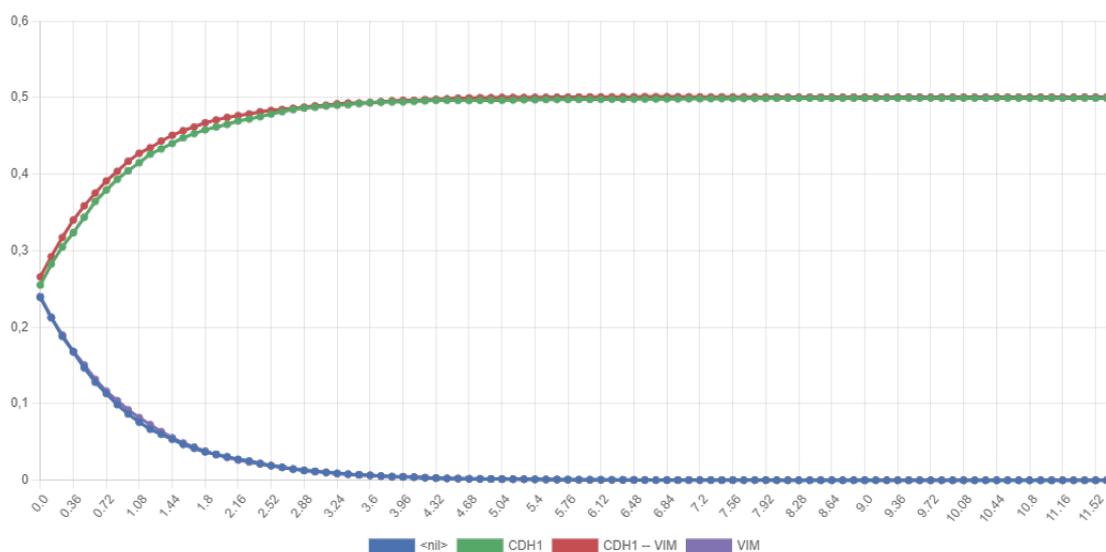
Fonte: Autorizado por Daner A. Silveira (SILVEIRA, 2021)

APÊNDICE B – DEMAIS RESULTADOS: MODELO ORIGINAL UTILIZANDO O SOFTWARE MABOSS

A seguir, são apresentados os resultados adicionais das perturbações realizadas no modelo original pelo MaBoSS. Os circuitos funcionais analisados incluem: o circuito positivo envolvendo HAS2, HA e ZEB1, o circuito positivo entre ESRP1, CD44s e ZEB1, a desativação das moléculas mediadas por ZEB1 e a desativação de ESRP1.

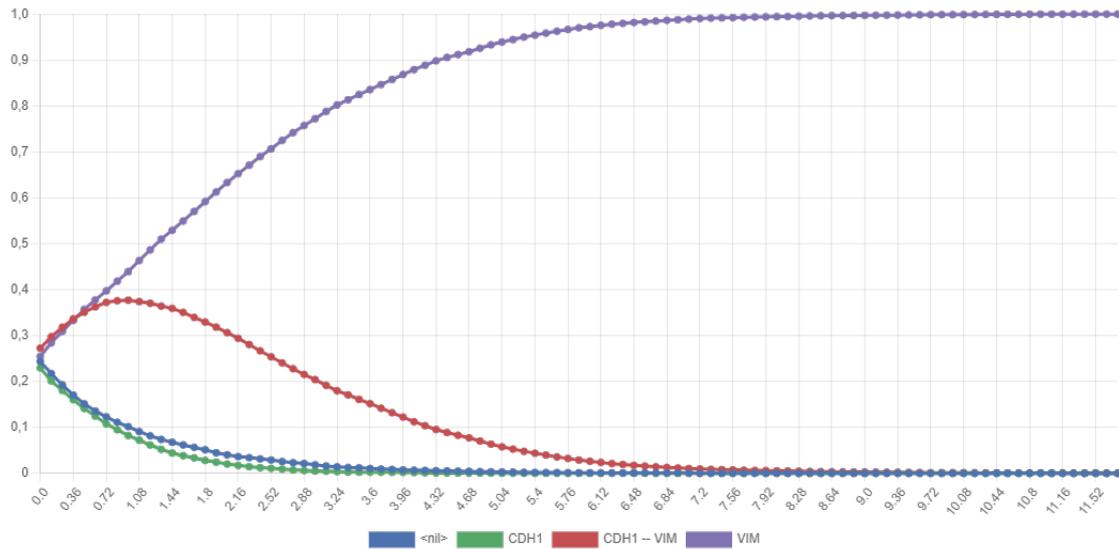
O circuito funcional que abrange as moléculas HAS2, HA e ZEB1 foi submetido a simulação onde essas moléculas foram mantidas desativadas. A trajetória das probabilidades dos estados é apresentada conforme ilustrado na Figura 38. Observa-se que os estados híbrido e epitelial crescem para uma probabilidade de 50% cada, enquanto as probabilidades dos demais estados decaem para zero. Esse comportamento de estados estáveis é visto no estudo original, onde encontra-se apenas um estado estável epitelial e um mesenquimal provável.

Figura 39 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 OFF - HA OFF - ZEB1 OFF.



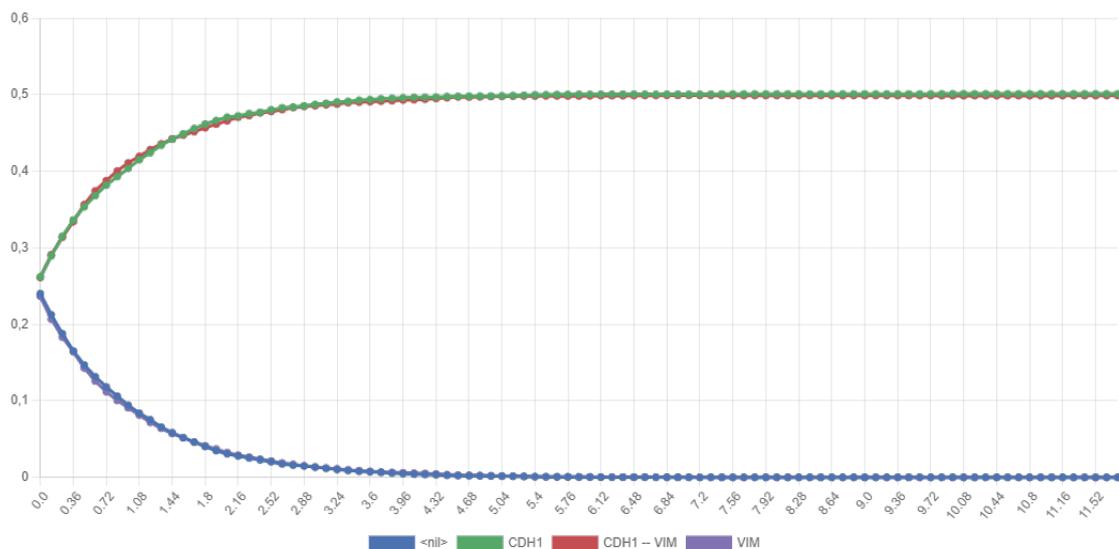
Por outro lado, ao ativar essas moléculas, as trajetórias das probabilidades exibem um aumento contínuo ao longo do tempo para o fenótipo mesenquimal, eventualmente atingindo uma probabilidade de 100%. Observa-se um aumento sutil no estado híbrido antes de sua posterior diminuição para zero, como evidenciado na Figura 39. O trabalho original encontrou apenas um estado estável mesenquimal ao fazer a simulação com o software GINsim, dessa forma os resultados são correspondentes.

Figura 40 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 ON - HA ON - ZEB1 ON.



Após, foi examinado o circuito funcional envolvendo ESRP1, ZEB1 e CD44s. A figura 40 mostra a trajetória de probabilidades dos estados quando CD44s e ZEB1 permanecem desativados enquanto ESRP1 está ativado, nota-se que as probabilidades associadas aos estados híbrido e epitelial aumentam para 50% cada, ao passo que as probabilidades dos demais estados decrescem até atingir zero. Em conformidade com isso, os resultados encontrados através do software GINsim mostram dois estados estáveis possíveis, um estado epitelial e um híbrido.

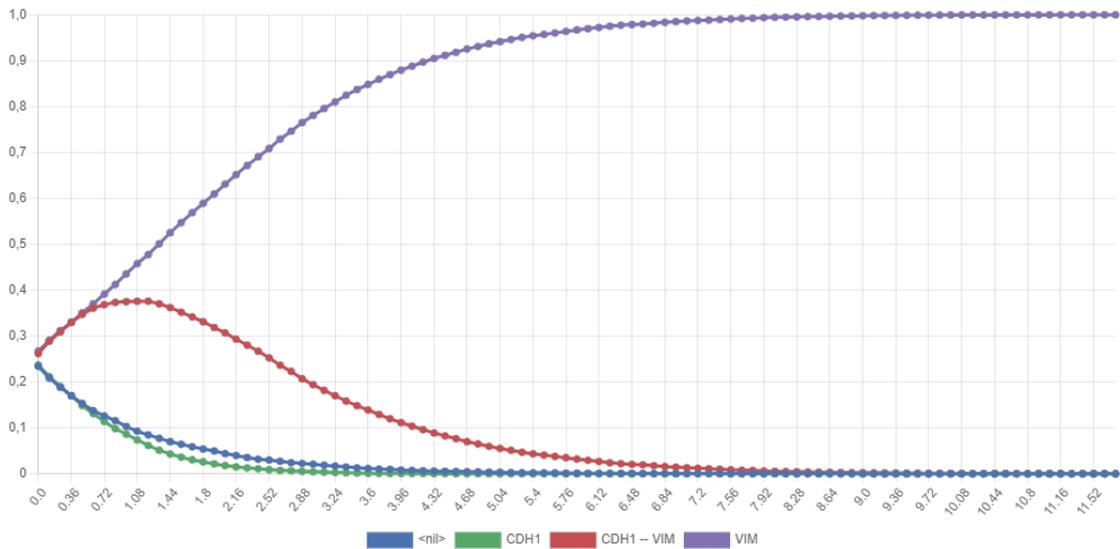
Figura 41 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 ON - ZEB1 OFF - CD44s OFF.



Quando CD44s e ZEB1 permanecem ativados enquanto ESRP1 está desativado, há uma progressiva elevação ao longo do tempo na probabilidade associada ao fenótipo

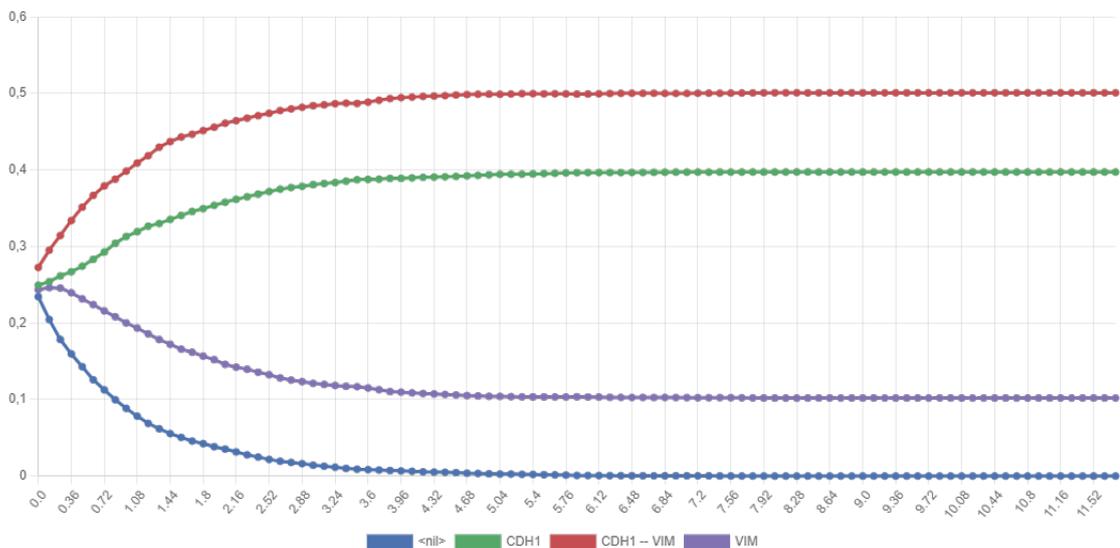
mesenquimal, culminando eventualmente em uma certeza de 100%. É possível notar um aumento leve no estado híbrido antes de sua subsequente redução a zero, apresentadas na figura 41. Esse resultado é equivalente com o observado originalmente.

Figura 42 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF - ZEB1 ON - CD44s ON.



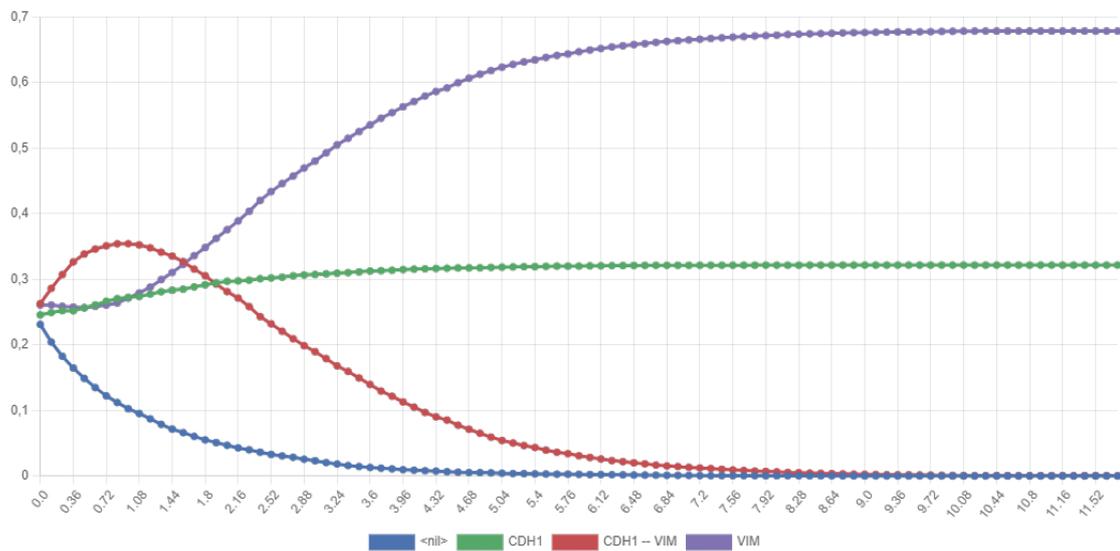
A trajetória das probabilidades dos estados, quando a molécula ESRP1 é mantida desativada, é apresentada na figura 42. Vê-se que o fenótipo híbrido se torna mais provável, atingindo 50% ao longo do tempo, seguido pelo estado epitelial com 40%, e, posteriormente, pelo estado mesenquimal, que diminui para 10%. De forma correspondente, a pesquisa original identificou três estados estáveis prováveis para essa simulação: um estado epitelial, um estado mesenquimal e um estado híbrido.

Figura 43 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF.



Ao manter GRHL2, miR_340, miR_200 e miR_1199 desativados, é possível avaliar a contribuição dessas moléculas para a estabilização do estado híbrido, uma vez que sua eliminação preserva apenas os estados E e M. Na figura 43, é evidente a trajetória de probabilidades dos estados associados a essas moléculas, onde o fenótipo mesenquimal cresce para quase 70%, o epitelial atinge um pouco mais de 30%, enquanto as probabilidades dos outros fenótipos decaem para zero. Observa-se um aumento inicial na probabilidade do estado híbrido durante a simulação, no entanto, esse fenótipo não se mantém ao longo do tempo. O estudo feito no software GINsim mostra, similarmente, um estado estável epitelial e um mesenquimal.

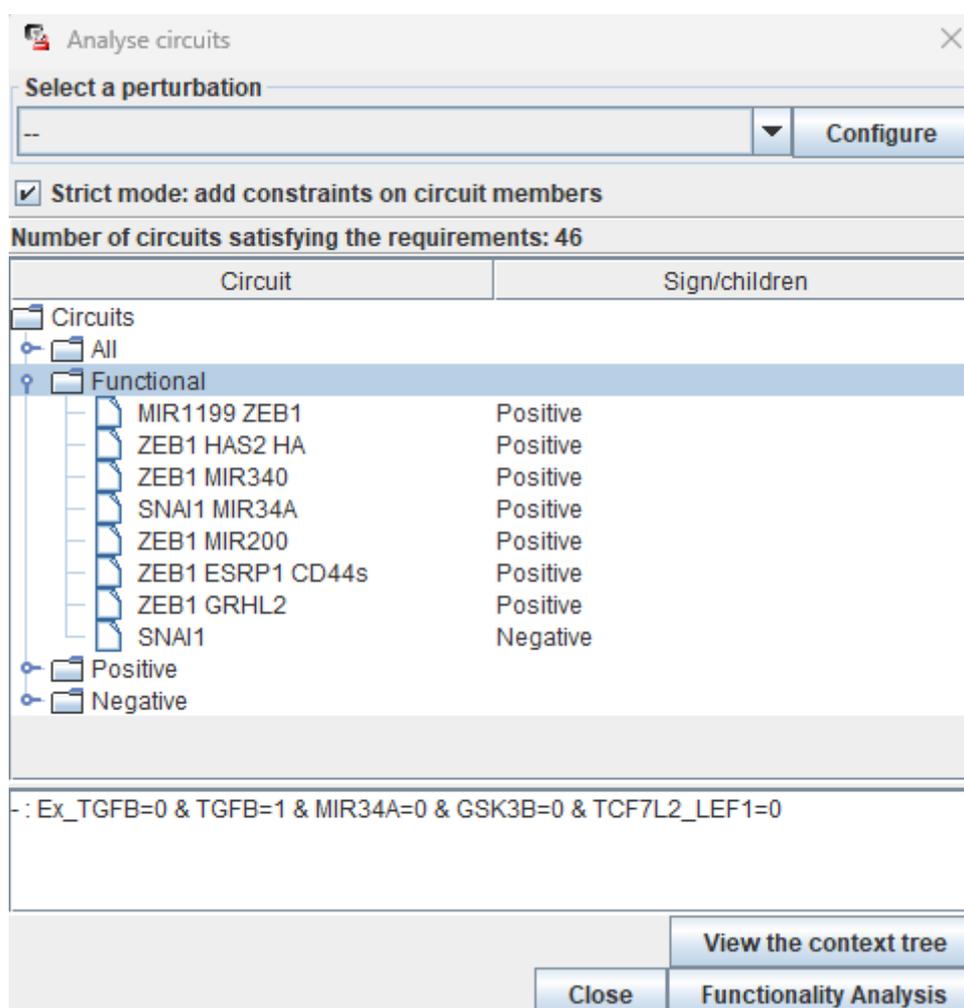
Figura 44 – Trajetória de probabilidades dos estados para miR_200 OFF - miR_1199 OFF - GRHL2 OFF - miR_340 OFF.



APÊNDICE C – DEMAIS RESULTADOS: SIMULAÇÕES DOS CIRCUITOS FUNCIONAIS DO NOVO MODELO

Neste apêndice, é apresentado uma extensão dos resultados discutidos, fornecendo uma visão mais abrangente da pesquisa. Percebe-se pela figura 42, que os circuitos funcionais da rede não apresentam modificações em comparação com os da rede original. Todas as perturbações foram feitas mantendo TGF- β exógeno ativado.

Figura 45 – Janela de circuitos funcionais do GINsim.



O circuito funcional que abrange as moléculas SNAI1 e MIR34A foi submetido a simulação onde SNAI1 foi mantido ativado enquanto MIR34A permanecia desativado. Vê-se na figura 43 que o fenótipo mesenquimal se torna mais provável, atingindo quase 60% ao longo do tempo, seguido pelo estado híbrido com pouco mais de 40%, a medida que o restante dos fenótipos decaem para zero. De forma correspondente, esse resultado foi obtido pelo GINsim, apresentado na figura 44, que exibe estados estáveis prováveis mesenquimais e híbrido com probabilidades 63% e 37% respectivamente.

Figura 46 – Trajetória de probabilidades dos estados para SNAI1 ON - MIR34A OFF.

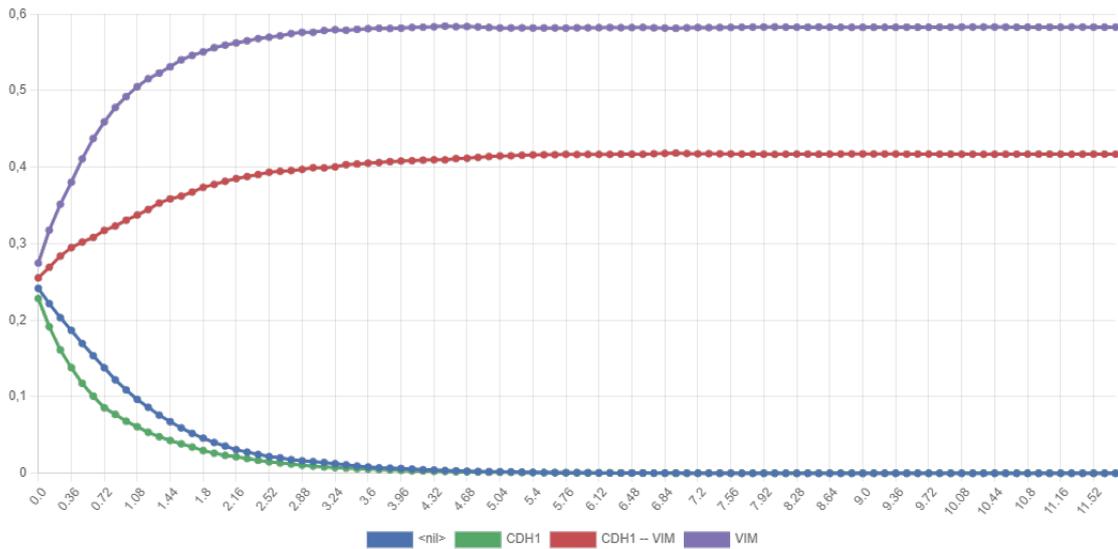


Figura 47 – Estados estáveis para SNAI1 ON - MIR34A OFF.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNNB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
HIBRIDO	1			1	1	1	1	1	1	1		1	1	1					1	1				
MESENQUIMAL	1		1									1	1	1	1	1	1	1	1	1				
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1			1	1						1					1
MESENQUIMAL	1	1	1									1	1	1	1	1	1	1	1					1

Por outro lado, quando SNAI1 é mantido desativado enquanto MIR34A permanece ativado, vê-se na trajetória apenas estados mesenquimal e epitelial prováveis, mostrados na figura 45, que crescem ao longo do tempo até próximo de 50%, enquanto os outros fenótipos decaem para zero. Esse resultado é visto de forma equivalente na figura 46, quando a simulação é feita no software GINsim, onde encontra-se estados estáveis epitelial e mesenquimal prováveis, com 50%.

Figura 48 – Trajetória de probabilidades dos estados para SNAI1 OFF - MIR34A ON.

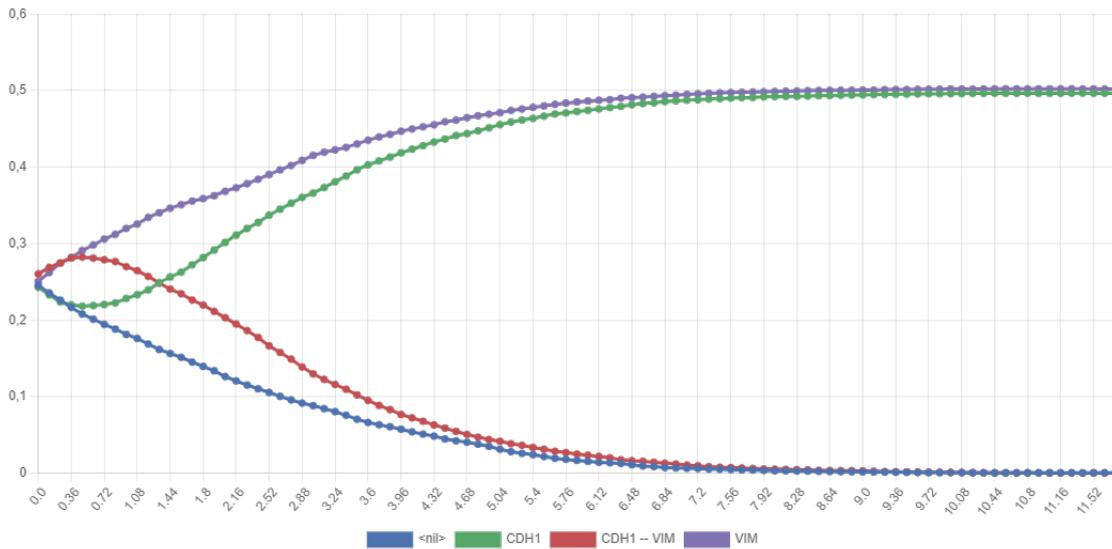


Figura 49 – Estados estáveis para SNAI1 OFF - MIR34A ON.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNMB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1							1	1				
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1		1						1					1

Quando o circuito funcional que abrange as MIR200, MIR1199, GRHL2, MIR340 e ZEB1 é simulado, na qual MIR200, MIR1199, GRHL2 e MIR340 foram mantidos ativados e ZEB1 permanecia desativado. Vê-se na trajetória apenas estados mesenquimal e epitelial prováveis, mostrados na figura 47, que crescem até em torno de 50%, enquanto os outros fenótipos decaem para zero. Da mesma forma, esse resultado foi obtido pelo GINsim, apresentado na figura 48, que exhibe estados estáveis epitelial e mesenquimal prováveis, com 50%.

Figura 50 – Trajetória de probabilidades dos estados para MIR200 ON - MIR1199 ON - GRHL2 ON - MIR340 ON - ZEB1 OFF.

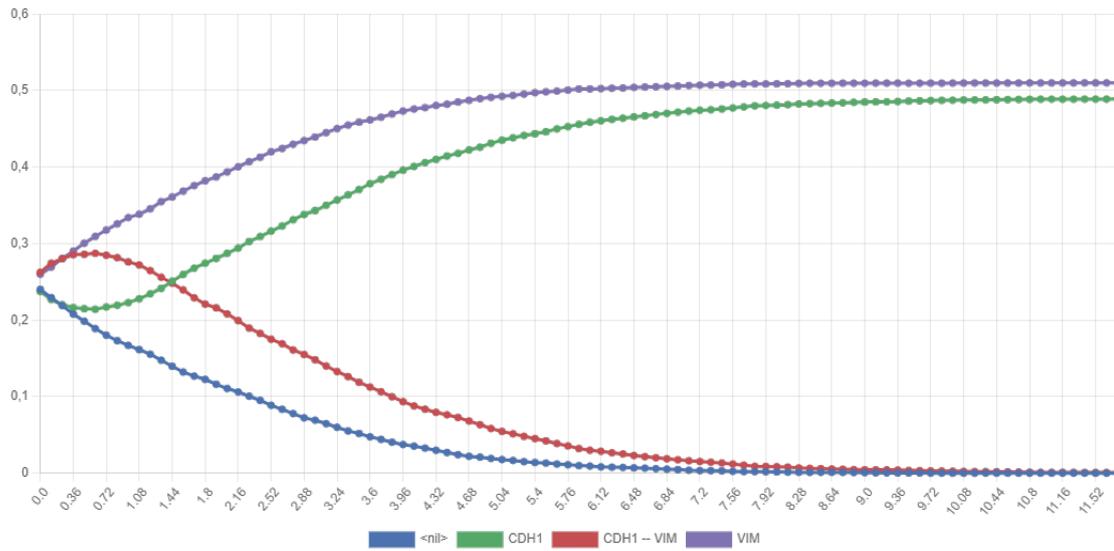


Figura 51 – Estados estáveis para MIR200 ON - MIR1199 ON - GRHL2 ON - MIR340 ON - ZEB1 OFF.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNIB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1							1	1				
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1		1						1					1

Por outro lado, quando MIR200, MIR1199, GRHL2 e MIR340 são mantidos desativados e ZEB1 ativado vê-se o fenótipo híbrido crescendo até cerca de 50% próximo do estado mesenquimal e o restante dos fenótipos decaem a zero, como mostrado na figura 49. Esse mesmo resultado é encontrado fazendo a simulação de perturbação no GINsim, em que são mostrados estados estáveis híbrido e mesenquimal, vistos na figura 50, com probabilidades próximas de 50% cada.

Figura 52 – Trajetória de probabilidades dos estados para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF - ZEB1 ON.

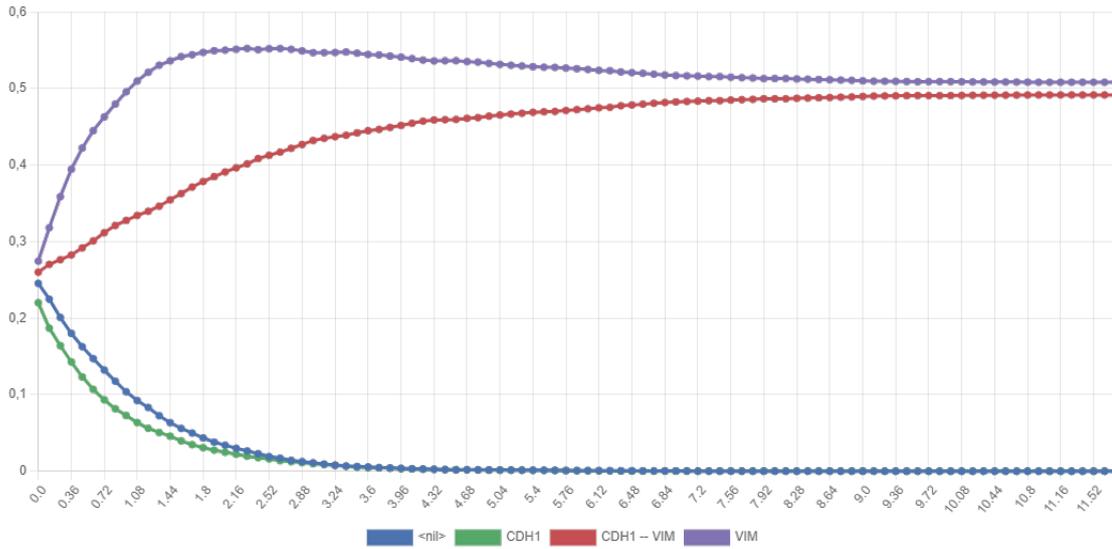


Figura 53 – Estados estáveis para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF - ZEB1 ON.

Name	EX_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	IncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNNB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
HIBRIDO	1	1	1									1	1	1	1	1	1	1	1	1				
MESENQUIMAL	1	1	1									1	1	1	1	1	1	1	1					1

Posteriormente, foram simuladas perturbações no circuito funcional envolvendo as moléculas HAS2, HA e ZEB1. Ao manter essas moléculas desativadas, observa-se o crescimento dos fenótipos epitelial e mesenquimal até aproximadamente 50%, enquanto os demais fenótipos decaem para zero, conforme ilustrado na figura 51. Esses mesmos resultados são replicados ao realizar simulações de perturbação no GINsim, onde são evidenciados estados estáveis epitelial e mesenquimal, como apresentado na figura 52, com probabilidades próximas de 50% cada.

Figura 54 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 OFF - HA OFF - ZEB1 OFF.

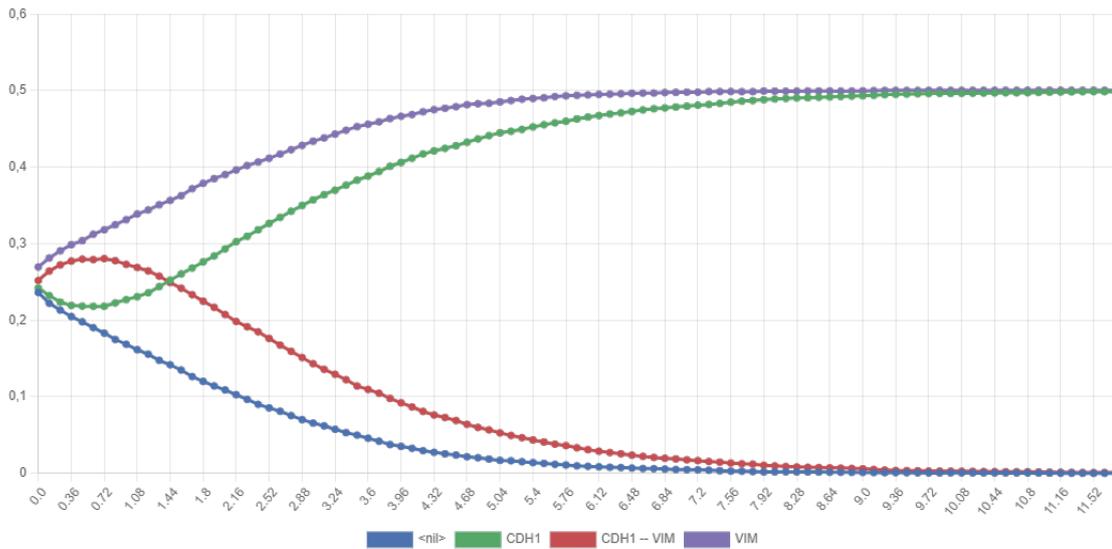


Figura 55 – Estados estáveis para HAS2 OFF - HA OFF - ZEB1 OFF.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNNB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1		1							1	1				
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1			1	1					1					1

Todavia, quando HAS2, HA e ZEB1 são mantidas ativadas vê-se os fenótipos híbrido e mesenquimal crescendo ao longo do tempo até próximo de 50%, enquanto o restante dos fenótipos decaem para zero, visto na figura 53. De maneira análoga, o GINsim também produziu esse resultado, conforme mostrado na figura 54, onde são visualizados estados estáveis híbrido e mesenquimal, ambos com uma probabilidade de 50%.

Figura 56 – Trajetória de probabilidades dos estados para HAS2 ON - HA ON - ZEB1 ON.

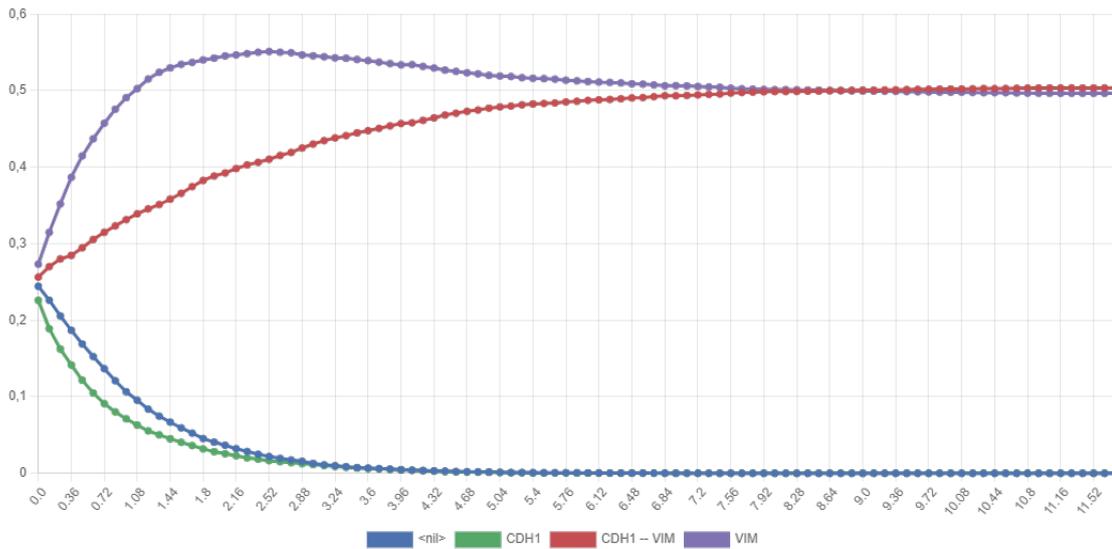


Figura 57 – Estados estáveis para HAS2 ON - HA ON - ZEB1 ON.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNMB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
HIBRIDO	1							1				1	1	1	1	1	1	1	1	1				
MESENQUIMAL	1	1	1										1	1	1	1	1	1	1					1

O próximo circuito funcional a ser perturbado foi aquele envolvendo ESRP1, ZEB1 e CD44s. A figura 55 mostra a trajetória de probabilidades dos estados quando CD44s e ZEB1 permanecem desativados enquanto ESRP1 está ativado, nota-se que as probabilidades associadas aos estados epitelial e mesenquimal aumentam para próximo de 50% cada, ao passo que as probabilidades dos demais estados decrescem até atingir zero. Em conformidade com isso, os resultados encontrados através do software GINsim mostram dois estados estáveis possíveis, um estado epitelial e mesenquimal, mostrados na figura 56, ambos com uma probabilidade cerca de 50%.

Figura 58 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 ON - ZEB1 OFF - CD44s OFF.

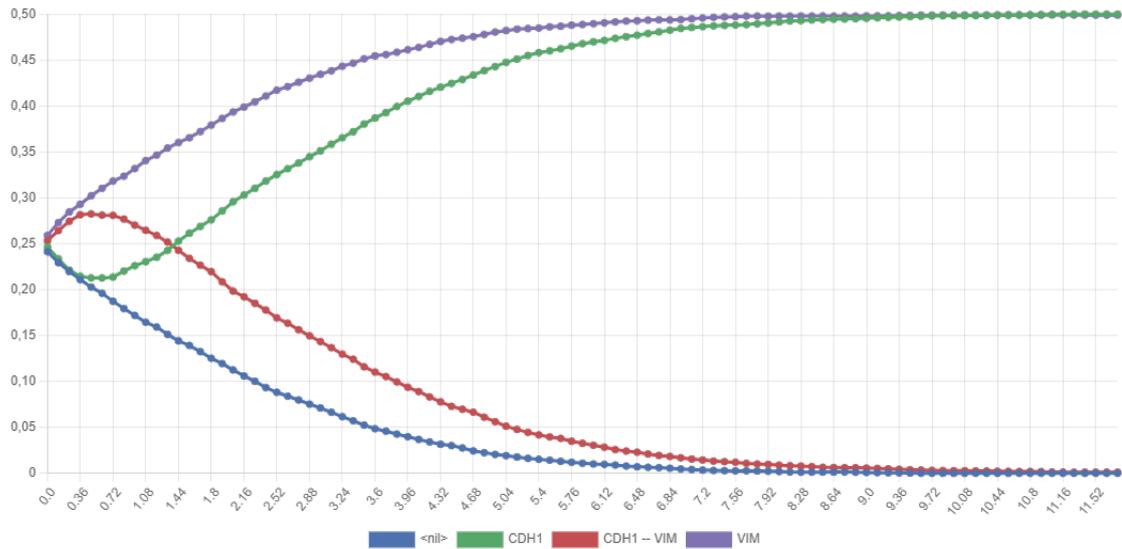


Figura 59 – Estados estáveis para ESRP1 ON - ZEB1 OFF - CD44s OFF.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNNB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL	1			1	1	1	1	1	1	1		1							1	1				
MESENQUIMAL	1	1		1	1	1	1	1	1	1			1	1					1					1

Mantendo CD44s e ZEB1 ativados e ESRP1 desativado, observa-se um aumento nas probabilidades associadas aos estados híbrido e mesenquimal, chegando próximo de 50%, enquanto as probabilidades dos demais estados decaem até atingir zero, mostrados na figura 57. Os resultados obtidos pelo software GINsim também revelam dois estados estáveis possíveis, um híbrido e um mesenquimal, conforme apresentado na figura 58, ambos com uma probabilidade em torno de 50%.

Figura 60 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF - ZEB1 ON - CD44s ON.

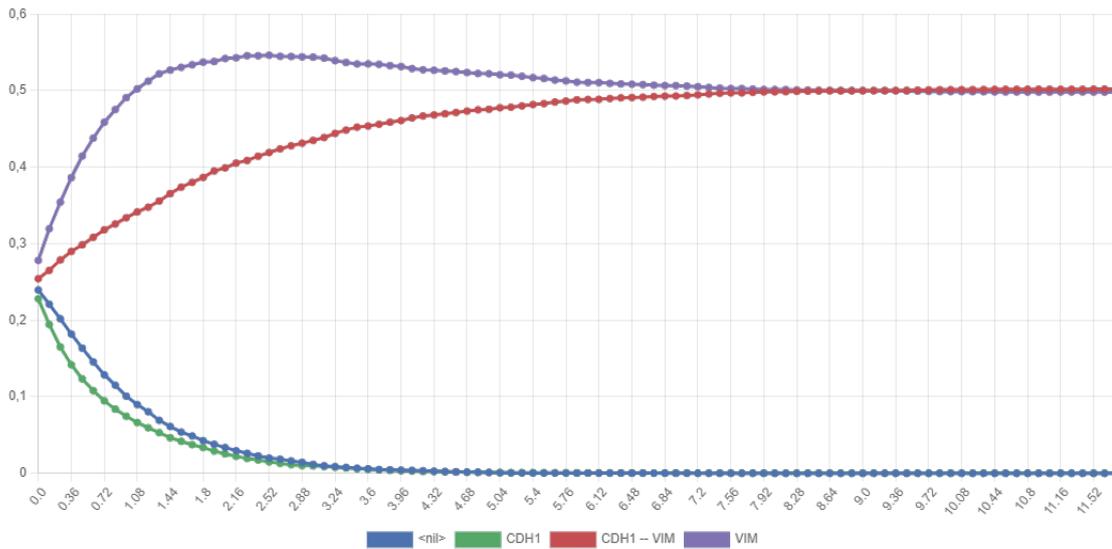


Figura 61 – Estados estáveis para ESRP1 OFF - ZEB1 ON - CD44s ON.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNA1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNA2	CTNMB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
HIBRIDO	1							1				1	1		1	1	1	1	1	1				
MESENQUIMAL	1	1	1										1	1	1	1	1	1	1					1

A trajetória das probabilidades dos estados, quando a molécula ESRP1 é mantida desativada, é ilustrada na figura 59. Observa-se que os fenótipos epitelial e mesenquimal, alcançam 50% ao longo do tempo, enquanto o restante dos estados decaem para zero. Em conformidade com isso, a simulação realizada no GINsim identificou dois fenótipos prováveis para essa configuração: epitelial e mesenquimal. A figura 60 mostra um estado estável epitelial e dois estados mesenquimais estáveis, onde a probabilidade do estado epitelial se aproxima de 50%, e a soma das probabilidades dos dois estados mesenquimais também totaliza 50%.

Figura 62 – Trajetória de probabilidades dos estados para ESRP1 OFF.

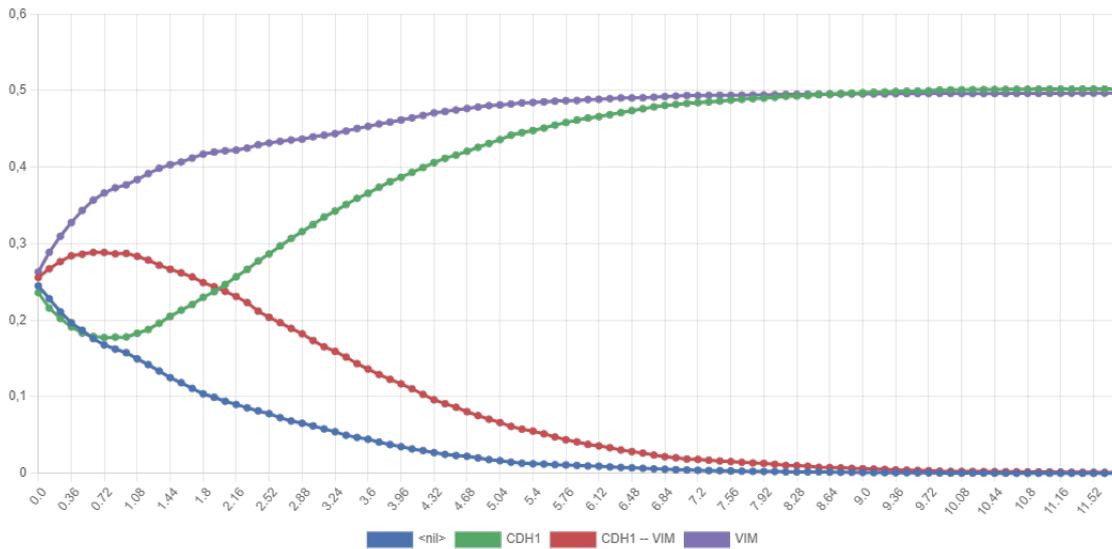


Figura 63 – Estados estáveis para ESRP1 OFF.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR34A	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNNB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL	1				1	1	1	1	1	1		1							1	1				
MESENQUIMAL	1	1			1	1	1	1	1	1			1	1			1		1					1
MESENQUIMAL	1	1	1										1	1	1	1	1	1	1					1

A última perturbação realizada no modelo envolveu as moléculas MIR200, MIR1199, GRHL2 e MIR340, mantendo-as desativadas. Conforme evidenciado na figura 61, observa-se que o fenótipo mesenquimal torna-se mais provável, atingindo 50% ao longo do tempo, seguido pelo estado híbrido com 30%, e, posteriormente, pelo estado epitelial com 20%. De maneira análoga, a simulação no GINsim apresenta três estados estáveis prováveis, com fenótipos epitelial, híbrido e mesenquimal, conforme demonstrado na figura 62. Nessa representação, as probabilidades são proporcionais, sendo o estado mesenquimal o mais provável, seguido pelo estado híbrido, e o menos provável sendo o epitelial.

Figura 64 – Trajetória de probabilidades dos estados para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF.

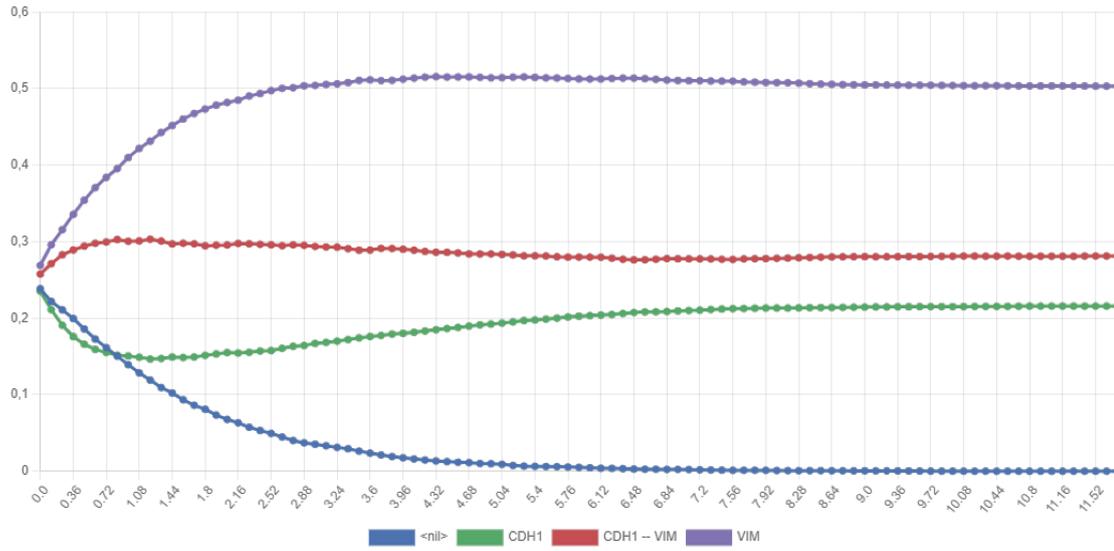


Figura 65 – Estados estáveis para MIR200 OFF - MIR1199 OFF - GRHL2 OFF - MIR340 OFF.

Name	Ex_TGFB	ECM	TGFB	ESRP1	MIR190A	CD24	GRHL2	MIR200	MIR1199	MIR340	MIR344	CDH1	VIM	SNAI1	ZEB1	HAS2	CD44s	HA	lncRNA_ATB	GSK3B	SNAI2	CTNIB1	TCF7L2_LEF1	AKT1
EPITELIAL	1			1	1							1							1	1				
HIBRIDO	1		1									1	1		1	1	1	1	1	1				
MESENQUIMAL	1	1	1										1	1	1	1	1	1	1					1

APÊNDICE D – REFERÊNCIAS BIOLÓGICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE AS MOLÉCULAS

Os artigos de referência dos quais as informações para construção da nova rede regulatória estudada nesse trabalho estão mostradas na tabela 5, abaixo.

Tabela 5 – Referências biológicas

Interação	Referência
ECM → AKT1	PMID: 16169468 PMID: 12642872 PMID: 8538749 PMID: 22310280
TGFB → lncRNA-ATB	PMID: 24768205
AKT1 → CTNNB1	PMID: 17287208
AKT1 – GSK3B	PMID: 9373175 PMID: 23552696 PMID: 15829723
AKT1 → VIM	PMID: 20856200
TCF7L2_LEF1 → SNAI2	PMID: 14623871
CTNNB1 → TCF7L2_LEF1	PMID: 23024173 PMID: 20492721 PMID: 15735151 PMID: 21078818 PMID: 23151663
CDH1 → CTNNB1	PMID: 21255999
GSK3B – SNAI1	PMID: 15448698
SNAI2 → ZEB1	PMID: 21593765
GSK3B → CDH1	PMID: 10671552
GSK3B – CTNNB1	PMID: 11955436 PMID: 19303846 PMID: 23151663 PMID: 16293724
TCF7L2_LEF1 – SNAI1	PMID: 20372961 PMID: 21633953
lncRNA-ATB – MIR34A	PMID: 34180127
MIR200 – CTNNB1	PMID: 19703993 PMID: 19931509 PMID: 22211245 PMID: 28302418
MIR34A – CTNNB1	PMID: 22421157 PMID: 21566225