

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

**MODELAGEM LÓGICA DE SENESCÊNCIA
CELULAR HUMANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cecília Perobelli Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

MODELAGEM LÓGICA DE SENESCÊNCIA CELULAR HUMANA

Cecília Perobelli Ferreira

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós
Graduação em Física, pela Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Física

Orientador: Dr. José Carlos M. Mombach

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

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

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

MODELAGEM LÓGICA DE SENESCÊNCIA CELULAR HUMANA

elaborada por
Cecília Perobelli Ferreira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Física

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Fábio M. Zimmer, Dr. (UFSM)

Ricardo Vêncio, Dr. (USP)

Santa Maria, 12 de dezembro de 2012.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Física
Universidade Federal de Santa Maria

MODELAGEM LÓGICA DE SENESCÊNCIA CELULAR HUMANA

AUTORA: Cecília Perobelli Ferreira

ORIENTADOR: José Carlos M. Mombach

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de dezembro de 2012

Após o progressivo encurtamento dos telômeros em sucessivas divisões celulares, as células somáticas normais se submetidas a uma parada do crescimento chamado senescência celular que ocorre devido à replicação incompleta do DNA. A senescência também pode ser ativada por diversos tipos de estímulos estressantes, incluindo sinalização oncogênica aberrante, estresse oxidativo e danos ao DNA. Células senescentes têm capacidade proliferativa limitada e parecem desempenhar um papel importante na tumorigênese. Elas também estão envolvidas na inflamação associada com o envelhecimento e progressão do câncer. As vias de senescência variam significativamente entre as células, mas os caminhos diversos para a senescência, no entanto, convergem para p53 e pRb. A simulação é baseada no modelo proposto por Porath usando um modelo booleano para representar o estado de ativação dos genes envolvidos, incluindo as vias p16-pRb e a p53-p21. A simulação inclui 23 nós representando os genes da rede regulatória onde um deles representa o estado celular senescente que pode assumir estados Verdadeiro ou Falso como resultado do processamento de rede. Experiências com fibroblastos humanos indicam que a inativação de ambos os genes, p53 e pRb, é necessária para bloquear a senescência. As simulações confirmam que essas vias são capazes de acionar a senescência independentemente. A simulação mostra que pRb é essencial para a manutenção do estado senescente mesmo se p16 e p53 forem desligados, no entanto a inativação simultânea de ambos p53 e pRb bloqueia senescência. Além disso, a simulação mostra que a inativação da via p16-pRb não é essencial para preservar o estado senescente, no entanto, quando a via p53-p21 é inativada, o estado senescente é preservado.

Palavras-chave: Senescência Celular. Tumorigênese. Câncer. Modelo Booleano.

ABSTRACT

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Física
Universidade Federal de Santa Maria**

LOGIC MODELING OF HUMAN CELL SENESENCE

**AUTORA: Cecília Perobelli Ferreira
ORIENTADOR: José Carlos M. Mombach
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de dezembro de 2012**

After the progressive telomere shortening in successive cell divisions, normal somatic cells undergo a growth arrest called cellular senescence that occurs due to incomplete DNA replication. Senescence can also be activated by various types of stressful stimuli, including aberrant oncogenic signaling, oxidative stress and DNA damage. Senescent cells have limited proliferative capacity and seems to play an important role in tumorigenesis. They are also involved in the inflammation associated with aging and cancer progression. The process of senescence vary significantly between cells, but the different paths for the aging, however, converge to p53 and pRB. The network simulation is based on the model proposed by Porath using a Boolean model to represent the state of activation of genes involved, including the p16-pRb and p53-p21 pathways. The simulation includes 23 nodes representing the genes of the regulatory network where one of them represents the activation of the senescent state as a result of network processing. Experiments with human fibroblasts indicate that inactivation of both genes, p53 and pRB is necessary to block senescence. The simulations confirms that these pathways are able to trigger senescence independently. The simulation shows that pRb is essential to maintain the senescent state even when p16 and p53 are switched off, but the simultaneous inactivation of both p53 and pRB blocks senescence. In addition, the simulation shows that inactivation of the p16-pRb pathway is not essential to preserve the senescent state, however when p53-p21 pathway is inactivated, the senescent state is preserved.

Keywords: Cellular Senescence. Tumorigenesis. Cancer. Boolean Model.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação bidimensional da estrutura de uma molécula de DNA composta de cadeias complementares de nucleotídeos. (b) Uma molécula de DNA mostrada como uma dupla hélice. Fonte: SNUSTAD e SIMMONS, 2008.13
- Figura 2 – Os estágios do ciclo celular, O ciclo celular inicia em G0 e G1 com as sínteses moleculares, fase S onde há a duplicação do DNA, seguido pela fase G2 até chegar na fase M, onde há a segregação cromossômica. Fonte: VERMEULEN *et al.*, 2003, SNUSTAD *et al.*, 2008.14
- Figura 3 – Um esquema hipotético de um processo de sinal de transdução com diversas interações dos componentes celulares. Fonte: ALBERT *et al.*, 2009.....21
- Figura 4 – Um diagrama ilustrativo de um exemplo da regulação do ciclo celular. As setas representam a ativação do gene. As linhas, com barras, nas suas terminações, representam as inibições (SHMULEVICH *et al.*, 2002).....23
- Figura 5 – a. Causas. b. Mecanismo c. Resultado. Fonte: Kyle, L. W 2010.....25
- Figura 6 – Efeitos da proteína INK4 sobre a progressão das fases G1/S (Gil *et al.*, 2006).30
- Figura 7 – Modelo de Equações Diferenciais Ordinárias: a) uma rede de três genes é modelada usando equações diferenciais ordinárias(ODE's). Taxas de reações são constantes e denotadas por “k”, um parâmetro cinético. b) A relação regulatória é representada graficamente. c) As trajetórias do modelo. Cada equação mostra a mudança no nível de um gene como uma diferença na síntese e degradação. Fonte: KARLEBACH *et al.*, 2008.....37
- Figura 8 – Modelo Lógico: uma rede Booleana. Para cada entidade a, b e c, na rede, podem ser os estados 0 ou 1. A transição dos estados obedece à função da regulação mostrada na direita, que descreve as regras do modelo. Por exemplo, se ‘a’ está no estado 1 e ‘c’ está no estado 0, para o próximo estado, ‘b’ será 0. As setas finas indicam a regulação de cada nó. Os espaços de tempo são representados pelas setas largas. O estado global do modelo é a combinação dos arranjos. O ciclo do sistema é acompanhado através dosséis estados globais, nos quais a sequência dos estados globais é uma trajetória (KARLEBACH *et al.*, 2008).38
- Figura 9 – Um exemplo de rede de sinalização do modelo de rede Booleana. a) nó I é a entrada e O é a saída; as setas indicam ativação e as linhas, com barras, indicam a inibição. b) As funções de transferências Booleanas para cada componente, nós, e sua sinalização (ALBERT, 2005).41
- Figura 10 – Circuito molecular de Senescência Celular. (PORATH.,*et al*, 2005)44

LISTA DE ABRIVEATURAS E SIGLAS

OIS	Senescência oncogene induzida
ROS	Espécie reativa ao oxigênio
SDF	Senescência associada ao acúmulo de danos no DNA
CDK	Ciclina dependente de quinase inibidora
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
RNA	Ácido ribonucleíco
PEST	Segmento rico em prolina, Ácido Glutâmico, Serina e Treonina
CKI	Ciclina dependente de quinase inibidora
P16(INK4a)	Ciclina dependente de quinase inibidora 2 A
P19(INK4d)	Ciclina dependente de quinase inibidora 2 D
P21(WAF1/CIP1)	Ciclina dependente de quinase inibidora 1 A
P53	Tumor supressor 53
PRB	Proteína Retinoblastoma
DDR	Reparação ao dano do DNA
MKK7	Quinase ativada por mitogeno quinase 7
SASP	Fenótipo secretor associado ao estado senescente
SAHF	Senescência associada ao acúmulo de heterocromatina
E2F	Fator de transcrição
RF1/2	Repetição telomérica ligada ao fator 1 e 2
POT1	Proteção de telômeros 1
TIN2	Proteção de interação nuclear 2
RAP1	Ativador de proteína 1
MDM2	Murinedouble minutes (ratos) HDM2 (humanos)
PCNA	Proliferação do antígeno nuclear da célula
ATM	Ataxia telangiectasiamutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
DSB	Quebra em fitas duplas no DNA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.2 Objetivos	11
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	12
2.1 A organização do Ciclo Celular	12
2.1.1 Apoptose	18
2.1.3 Câncer	19
2.2 Rede de Sinalização Celular	20
2.2.1 Redes Biológicas	22
2.3 Senescência Celular	23
2.3.1 Marcadores de Senescência Celular	25
2.2.1.2 Senescência Associada à Beta-Galactosidase	26
2.2.1.4 Gamma-H2A.X - Biomarcador do Dano no DNA	27
2.2.1.5 Senescência Associada ao Acúmulo de Heterocromatina	28
2.2.2 Tipos de senescência	28
2.3.1 Vias de Sinalização em Senescência Celular	33
2.4 Modelagem e Análise de Redes Regulatórias	35
2.4.1 Modelos Contínuos	36
2.4.2 Modelos Lógicos	37
2.5 Redes Lógicas Booleanas	39
3 METODOLOGIA	43
3.1 Rede Regulatória	43
3.2 Modelo de Senescência Sugerido por Porath e Weinberg	44
3.3 Simulação	45
3.3.1 Simulação do Algoritmo	45
3.3.2 Análise da Rede	46
4 RESULTADOS	48
4.1 Análise da Simulação Rede de Senescência Celular	48
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	54
ANEXO	58
ANEXO 1 – Algoritmo da Rede Regulatória de Senescência Celular no Mathematica 7.0	59

1 INTRODUÇÃO

Vários modelos computacionais estão sendo desenvolvidos para analisar redes regulatórias. Estes modelos podem apresentar dados qualitativos ou quantitativos. Os modelos lógicos descrevem redes regulatórias de uma forma qualitativa, proporcionando um entendimento básico das diferentes funcionalidades de uma dada rede sobre diferentes condições; com uma natureza qualitativa, torna flexível e fácil a adaptação de fenômenos biológicos. Para entender os modelos que dependem de uma manipulação mais delicada, com mais citações e riqueza de detalhes, como exata concentração molecular, são usados os modelos quantitativos ou modelos contínuos (KARLEBACH et al., 2008). Desta forma, métodos matemáticos e computacionais são desenvolvidos, a fim de construir modelos formais de interação genética (SHMULEVICH et al., 2002), os quais, neste trabalho, são ambos importantes para construir, compreender e relacionar a dinâmica de interação entre o modelo teórico e o experimental.

Considerando essa possível correlação, um dos desafios da biologia atual é compreender a estrutura e a dinâmica de uma complexa teia de interações intercelular que contribuem para a estrutura e a função de uma célula viva. Em torno disso, as novas plataformas tecnológicas, tais como chips de proteínas, ajudam a determinar como e quando estas moléculas interagem umas com as outras. As interações - proteína-proteína, redes de sinalização metabólica e transcrição/regulação - são dependentes de outras interações, que são responsáveis pelo comportamento das células. Nesse sentido, a biologia tenta conciliar um programa que integre o Teórico e o Experimental mapeando, compreendendo e modelando, em termos quantificáveis, a topologia e a dinâmica das propriedades das várias redes que controlam o comportamento das células. (BARABÁSI et al., 2004). Sendo assim, as redes regulatórias possuem um importante papel em todos os processos celulares, incluindo diferenciação celular, metabolismo, transdução de sinal e ciclo celular, com o objetivo de analisar as suas funcionalidades e integrar uma grande quantidade de dados experimentais; para isso, conta-se com a ajuda de ferramentas computacionais (KARLEBACH et al., 2008), as quais contribuem para elucidar níveis de sistema da dinâmica dos processos celulares.

Para estudar as funções celulares, é necessário estudar o comportamento dos genes de uma maneira mais ampla, considerando que a expressão e suas atividades não são isoladas ou independentes umas das outras (SHMULEVICH et al., 2002). O ciclo celular se refere a uma sequência de eventos que levam a uma correta duplicação da célula. Durante este processo, a célula pode replicar seu DNA, fase S, e distribuir propriedades em duas cópias: duas células filhas, fase M. Durante este tempo, a célula necessita dobrar proteínas, ribossomos e todos os seus demais componentes. As células possuem duas fases GAP (G1 e G2), entre as fases S e M, as quais asseguram que a duplicação das células está coordenada da mesma forma que o ciclo, replicação-divisão (CSIKÁSZ-NAGY, 2009). Essa coordenação é obtida a partir de sinalização extracelular positiva e negativa, cujo saldo determina se a célula irá se dividir ou permanecerá em repouso (quiescência G0), o que pode ocorrer na fase G1 do ciclo celular (FAURÉ et al., 2006).

Esta sinalização só é obtida através da parceria entre as proteínas ciclinas (por exemplo, CCND1 ou ciclina D), sendo esta combinação reguladora das proteínas chamadas cinase dependente de ciclina (CDK). A partir disso, observa-se que as proteínas (ciclinas) são as responsáveis pelo início do ciclo, assim como também podem inibir os seus passos finais. A transição-chave do ciclo celular está na regulação, realizada pelos pontos de checagem (*checkpoints*) e fatores de crescimento. Se o ciclo for devidamente concluído, os cromossomos irão se separar, considerando que os fusos mitóticos devem estar intactos para que o processo se desencadeie com sucesso (CSIKÁSZ-NAGY, 2009).

Essas interações, proteína-proteína, garantem o desenvolvimento correto da célula e em condições normais. Se houver qualquer sinalização de dano ao DNA, desencadeia-se uma resposta específica da célula com o objetivo de eliminar esses danos. Caso isso ainda não seja possível, algumas outras respostas são ativadas para que pelo menos seja mantida, em parcial, a integridade da célula, podendo esta optar pela morte celular programada, apoptose, ou pela parada permanente do ciclo celular, senescência celular, impedindo que qualquer tipo de mutação seja transmitida para as células filhas.

Nesse contexto, é pertinente ressaltar que a senescência celular é um processo que pode resultar de diferentes estímulos, como, por exemplo, alguma sinalização aberrante, estresses oxidativos, estímulos oncogênicos, danos no DNA, tornando sua capacidade de proliferação limitada e até desempenhando um papel

significante na tumorigenese¹, no envelhecimento e na progressão do câncer (RODIER et al., 2011).

1.2 Objetivos

O estudo sobre senescência celular está relacionado com diversos mecanismos da regulação celular, o que implica diretamente na proliferação celular. Os motivos que podem desencadear a senescência celular são diversos, porém o encurtamento de telômeros, estresse oncogênico e dano no DNA são os principais e podem alterar a capacidade proliferativa. No entanto, essa capacidade, apesar de limitada, pode desempenhar um papel importante na tumorigênese, promovendo a reparação de tecidos que estão associados à inflamação, envelhecimento e progressão do câncer.

A objetivo é simular, através de uma rede lógica Booleana, o modelo para a regulação da senescência celular, proposto por Porath e Weinberg (PORATH et al., 2005). A partir dessa simulação, estudar-se-á o papel dos genes envolvidos no processo regulatório.

¹ Para Carvalho et al., 2007. A tumorigênese representa um momento em que câncer começa a se constituir. Ela é um processo através do qual as células, consideradas normais, são transformadas em células cancerosas. A tumorigênese ocorre, portanto, em função de uma sucessão de mudanças no nível celular, o qual reprograma uma célula para sofrer uma divisão celular descontrolada, o que desencadeia uma então massa maligna.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 A organização do Ciclo Celular

A vida depende da capacidade que as células possuem de armazenar, recuperar e traduzir as instruções necessárias para produzir e manter o organismo vivo. Essa informação hereditária é passada de uma célula-mãe para a célula-filha durante a divisão celular, o que ocorre de geração para geração dos organismos, por meio de suas células reprodutivas. Essas instruções estão armazenadas dentro de cada célula viva em seus genes², os quais possuem elementos que contêm as informações, as quais determinam as características de uma espécie, como um todo e em cada indivíduo. No entanto, no início do século XX, os cientistas se questionavam sobre a natureza química dos genes: como a informação dos genes é copiada e transmitida de uma célula-mãe para a célula-filha, milhões de vezes, durante a vida do organismo multicelular e sobreviver a esse processo praticamente sem alteração (ALBERTS et al., 2006)?

Na metade do século XX, ocorreu o reconhecimento de que o ácido desoxirribonucléico (DNA) era, provavelmente, o portador dessa informação genética. Mais tarde, foi determinada a estrutura do DNA, por Watson e Crick (1953), a qual revelou como o DNA pode ser copiado ou replicado, fornecendo os primeiros indícios a respeito de como a molécula de DNA pode codificar as instruções para a produção de proteínas. Entretanto, muito antes, já era sabido que os genes estavam localizados nos cromossomos e que essa era uma estrutura em forma de cordão do núcleo das células eucariotas, as quais se tornavam visíveis quando algumas células começam a se dividir. No momento da realização da análise bioquímica, foi descoberto que os cromossomos continham DNA e as proteínas. No entanto, os biólogos encontraram dificuldade para aceitar que o DNA continha o material genético devido a sua aparente simplicidade química. Sendo assim, foi constatado que o DNA é tão simples quanto um polímero composto de somente quatro tipos de

²Para Alberts et al., 2006, um gene é normalmente definido como um segmento do de DNA que contém as instruções para produzir uma determinada proteína (ou até uma série de proteínas relacionadas), embora ainda seja possível que alguns genes controlem a produção de molécula de RNA em vez de proteína como um produto final.

subunidade, as quais se unem umas às outras quimicamente (ALBERTS et al., 2006).

A partir disso, no início dos anos 50, foi observado que os genes são constituídos de substâncias chamadas ácidos nucleicos, que são organizados por blocos estruturais elementares, os nucleotídeos. Cada molécula é composta por: uma molécula de açúcar, uma molécula de fosfato - que tem propriedades químicas ácidas - e uma molécula contendo nitrogênio, a qual tem propriedades químicas levemente básicas (SNUSTAD et al., 2008).

No ácido ribonucleico, ou RNA, o açúcar constituinte é a ribose; no ácido desoxirribonucleico, ou DNA, o açúcar constituinte é a desoxirribose. No DNA, um nucleotídeo é distinto do outro por sua base nitrogenada. No RNA, os quatro tipos de bases são adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracil (U); no DNA, elas (bases) são A, G, C e timina (T). Assim, tanto o DNA, quanto no RNA contêm quatro tipos de nucleotídeos, sendo três deles compartilhados por ambos os tipos de moléculas de ácido nucleico (SNUSTAD et al., 2008).

O DNA é contido por duas cadeias de nucleotídeos, que são mantidas juntas por atrações químicas fracas entre as bases particulares, conforme pode ser visto na figura 1a, formando uma molécula bifilamentar. Esta molécula, para o DNA, é chamada de dupla hélice ou de dupla fita, sendo esta molécula helicoidizada, como é mostrado na figura 1b (SNUSTAD et al., 2008).

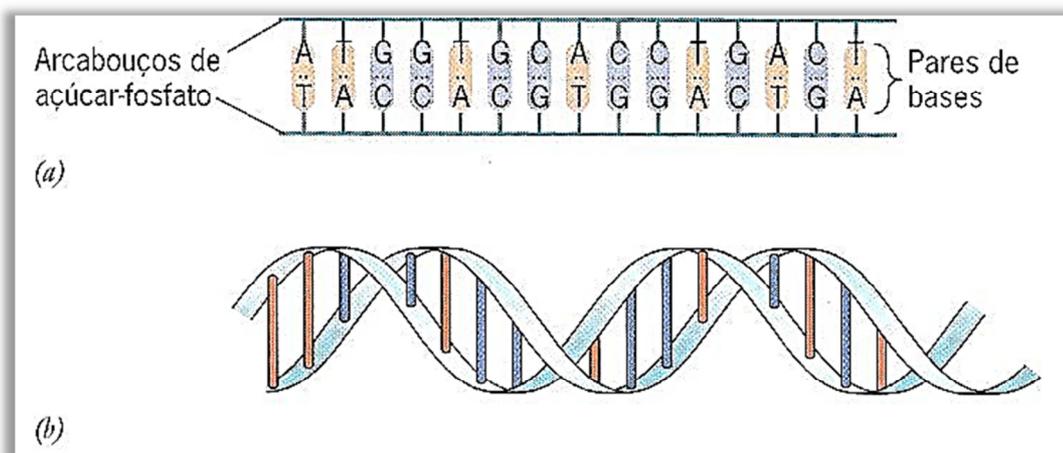


Figura 1 – Representação bidimensional da estrutura de uma molécula de DNA composta de cadeias complementares de nucleotídeos. (b) Uma molécula de DNA mostrada como uma dupla hélice. Fonte: SNUSTAD e SIMMONS, 2008.

Esse ciclo celular consiste em um período de crescimento, síntese de DNA e divisão. O tamanho desse ciclo e a duração de cada um dos seus componentes são controlados por sinais químicos, externos e internos. A transição de cada fase do ciclo requer a integração dos sinais químicos, específicos, bem como de respostas precisas a estes sinais. Se os sinais forem incorretamente percebidos ou se a célula não estiver apropriadamente preparada para responder, a célula pode se tornar cancerosa, sofrer apoptose ou senescência celular.

O ciclo celular de uma célula eucariótica é dividido em fases, conforme mostrado na figura 2 e a sua progressão ocorre na sequência G₁-> S->G₂->M.

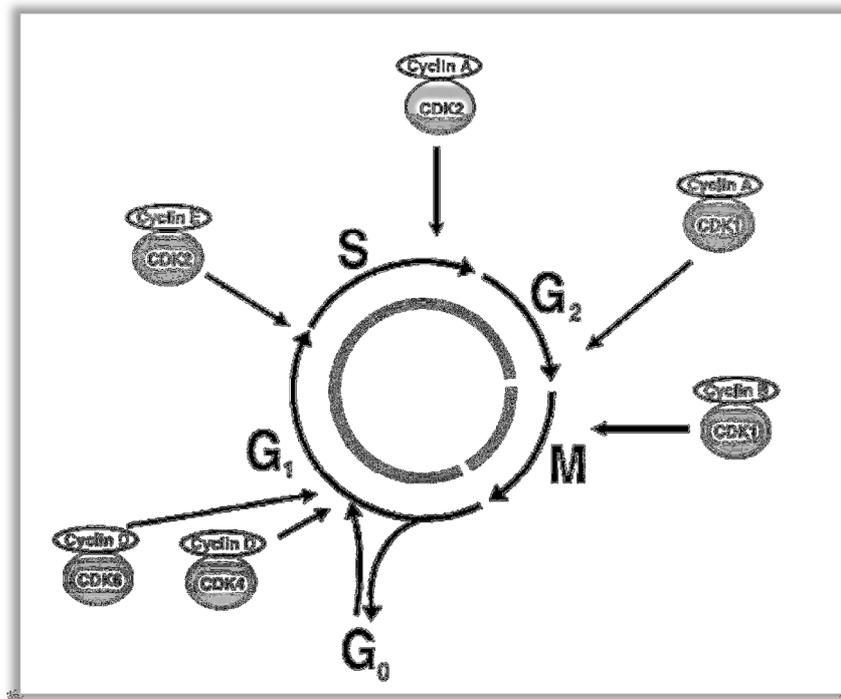


Figura 2 – Os estágios do ciclo celular, O ciclo celular inicia em G₀ e G₁ com as sínteses moleculares, fase S onde há a duplicação do DNA, seguido pela fase G₂ até chegar na fase M, onde há a segregação cromossômica. Fonte: VERMEULEN *et al.*, 2003, SNUSTAD *et al.*, 2008.

Nessa progressão, S é o período no qual os cromossomos são duplicados, situando-se como um evento que requer a síntese de DNA, representado pela letra S. A fase M, no ciclo celular, é a ocasião em que a célula-mãe se divide. As fases G₁ e G₂ são as do crescimento e metabolismo, também chamadas de GAP (G, do inglês *gap* = intervalo) (SNUSTAD *et al.*, 2008).

As células, na fase G1, antes do compromisso da replicação do DNA, podem entrar em um período de repouso G0, chamado de quiescência. Células em G0 não crescem e não proliferam no corpo humano. (VERMEULEN et al., 2003).

Na fase S, quando ocorre o processo de duplicação ou replicação do DNA, o material genético é transmitido de uma célula-mãe para duas células-filhas; essa transmissão é exata, ou seja, o material genético de uma célula ou organismo é baseado na capacidade bifilamentar de ser replicado. No final desse processo de replicação, cada filamento molde é pareado com um novo filamento complementar sintetizado. Assim, são criados dois DNAs bifilamentares idênticos a partir da dupla hélice original (SNUSTAD et al., 2008).

Dessa forma, as moléculas de DNA determinam o desenvolvimento dos organismos oriundos destas células, sendo tais informações codificadas em sequências de nucleotídeos. Cada gene é um trecho de pares de nucleotídeo ao longo de uma molécula de DNA, possuindo a maioria dos genes as instruções para a síntese de proteínas. Estas consistem em um ou mais polipeptídeos, que são cadeias de aminoácidos, compostos de sequência característica, específica de uma sequência de elementos codificantes dentro do gene. Estas codificantes são chamadas de códons, trincas de nucleotídeos, especificando a incorporação de um aminoácido em um polipeptídeo.

A síntese de um polipeptídeo, ou seja, de uma proteína é dada em duas etapas: primeiramente, a informação contida no DNA de um gene é copiada em uma molécula de RNA. O RNA é montado gradativamente, ao longo de um dos filamentos da dupla hélice do DNA, ou seja, em pareamento. Assim, a sequência de nucleotídeos do RNA é determinada pela sequência de nucleotídeos de um filamento do DNA. Esse processo, que produz esta molécula de RNA, é chamado de transcrição, e o RNA é chamado de transcrito. O RNA transcrito acaba por se separar de seu DNA molde e, em alguns organismos, é alterado pela adição, pela deleção ou pela modificação de nucleotídeos. A partir disso, a molécula terminada é chamada de RNA mensageiros ou então mRNA, onde contém toda a informação necessária para a síntese de um polipeptídeo, ou uma proteína (SNUSTAD et al., 2008).

O segundo estágio é chamado de tradução; neste o mRNA de um gene atua como um molde para a síntese de polipeptídeo. Cada um dos códons do gene, agora presentes na sequência do mRNA, especifica a incorporação de um

determinado aminoácido na cadeia de polipeptídica. Assim, o polipeptídeo é produzido gradativamente, lendo os códons de uma ponta à outra do mRNA. Ao seu final, ele se dissocia do mRNA e desempenha o seu papel na célula (SNUSTAD et al., 2008).

Dessa forma, compreende-se que as proteínas possuem papel fundamental na regulação do ciclo celular. A transição de uma fase do ciclo para outra ocorre de maneira ordenada e é regulada por diferentes proteínas. Essas proteínas são as cinases dependentes de ciclinas (CDK), as quais são componentes cataliticamente ativos do mecanismo do ciclo celular. Tais proteínas regulam outras proteínas, transferindo grupos de fosfato para elas. Entretanto, a atividade de fosforilação³ das CDK's depende da presença de ciclinas, as quais capacitam as CDK's a desempenhar a sua função, formando o complexo ciclina/CDK. Quando as ciclinas estão ausentes, este complexo não pode ser formado e as CDK's são inativadas (SNUSTAD et al., 2008). As CDK's pertencem a uma família de serina/treonina cinase, que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular, pois este requer a formação e a degradação alternadas de complexos ciclina/CDK. (SNUSTAD et al., 2008). Das nove CDK's identificadas, cinco são ativadas durante o ciclo celular, em G1 (CDK4, CDK6, CDK2), S(CDK2), G2 e M(CDK1). Quando ativado, CDK é induzida depois do processo de fosforilação das proteínas selecionadas. O nível de CDK permanece estável durante o ciclo celular em contraste com a sua proteína ciclina. O nível desta proteína aumenta e diminui durante o ciclo celular e, dessa maneira, ativa periodicamente CDK. Diferentes ciclinas são requeridas para diferentes fases do ciclo celular, conforme está ilustrado na tabela 1. As ciclinas D1, D2, D3 estão vinculadas com CDK4 e CDK6. Esse complexo formado por CDK-ciclina é essencial para a entrada da fase G1, estando a ciclina E associada com CDK2, o que regula a progressão de G1 para S. A ciclina A está vinculada a CDK2, o que é requerido pela fase S. CDK1 promove a entrada na fase M, sendo esse complexo regulado pela ciclina B. A ciclina D e E possuem a sequência PEST (segmento rico em Prolina, Ácido Glutâmico, Serina e Treonina). Nesse processo, existem também sequências de proteínas requeridas para a eficiência da proteólise de ciclinas mediadoras ubiquitinas; proteína responsável por marcar proteínas

³Carvalho et al., 2007 coloca que Fosforilação é adição de um grupo de fosfato (PO₄) a uma proteína ou outra molécula, participa dos mecanismos de regulação das proteínas, também é importante nos mecanismos de reações da qual participa o trifosfato de adenosina (ATP), que funciona com um potencializador de energia nas células dos organismos vivos.

indesejadas para que sejam degradadas por organelas, as proteossomas, que finalizam as fases do ciclo celular. (VERMEULEN et al., 2003).

Tabela 1 – O complexo ciclina/CDK's são ativados em pontos específicos do ciclo celular. Fonte: VERMEULEN *et al.*, 2003.

CDK		Cyclin	Cell cycle phase activity
CDK4		Cyclin D1, D2, D3	G ₁ phase
CDK6		Cyclin D1, D2, D3	G ₁ phase
CDK2		Cyclin E	G ₁ /S phase transition
CDK2		Cyclin A	S phase
CDK1	(cdc2)	Cyclin A	G ₂ /M phase transition
CDK1	(cdc2)	Cyclin B	Mitosis
CDK7		Cyclin H	CAK, all cell cycle phases

A atividade da cinases dependente de ciclinas pode ser inibida por outras proteínas, chamadas CDK inibidoras (CKI), que estão relacionadas ou com cinases dependente de ciclinas, ou com o complexo ciclina/CDK, regulando a atividade de CDK. Conforme pode ser observado, na tabela 2, as proteínas inibidoras de CDK são INK4 e CIP/KIP. INK4 inclui p15(INK4b), p16(INK4a), p18(INK4c), p19(INK4d) que especificamente inativam CDK (CDK4,6). A família CIP/KIP inclui p21(Waf1,CIP1), p27(CIP2), p57(KIP2). Estes inibidores inativam o complexo ciclina/CDK, inibindo a fase G₁; já o complexo ciclina B/CDK1 inibe em menor grau. A CDK inibidora pode ser regulada tanto por sinais externos, como internos. A P21 também inibe a síntese de DNA inibindo PCNA⁴. A expressão de p21 está sob o controle da transcrição do gene supressor de tumor p53(VERMEULEN et al., 2003, CARVALHO et al., 2007)

⁴Carvalho et al., 2007 coloca que Antígeno Nuclear de Células Proliferantes é uma proteína que atua como um fator de processabilidade do DNA polimerase em células eucariotas, em resposta ao dano no DNA. Esta proteína sofre degradação pelo sistema ubiquitina-proteossoma.

Tabela 2 – Cinases dependente de ciclinas inibidora (Cki) se liga a CDK sozinha, ou ao complexo ciclina-CDK, regulando a atividade de CDK. P19(ARF) é também codificado pelo locus INK4, mas não reconhece a atividade CDK (VERMEULEN et al., 2003).

CKI family	Function	Family members
INK4 family	Inactivation of G ₁ CDK (CDK4, CDK6)	p15 (INK4b) p16 (INK4a) p18 (INK4c) p19 (INK4d)
Cip/Kip family	Inactivation of G ₁ cyclin-CDK complexes and cyclin B-CDK1	p21 (Waf1, Cip1) p27 (Cip2) p57 (Kip2)

O controle do ciclo celular é a transição das suas diferentes fases que são reguladas em “pontos de verificação ou controle (*checkpoint*)” (SNUSTAD et al., 2008), assegurando a sequência ordenada dos eventos do ciclo celular (VERMEULEN et al., 2003). Esse mecanismo é capaz de parar a progressão pelo ciclo até que um processo crítico, tal como síntese do DNA esteja completo ou até que o DNA danificado seja reparado (SNUSTAD et al., 2008). O reparo (*checkpoint*) ou ponto de verificação do dano no DNA pode estar posicionado antes de a célula entrar na fase S (G1-S *checkpoint*), ou após a replicação do DNA (G2-M *checkpoint*).

No *checkpoint* G1/S, a parada do ciclo celular induzida pelo dano no DNA é dependente de p53. Geralmente, o nível celular de p53 é baixo, mas o dano no DNA pode levar à indução da atividade de p53. P53 estimula diferentes transcrições de diferentes genes, incluindo p21, Hdm2, (VERMEULEN et al., 2003).

2.1.1 Apoptose

A apoptose é reconhecida e aceita como uma distinta e importante forma de morte celular programada, que envolve, geneticamente, a eliminação de determinadas células. Contudo, é importante lembrar que existem outras formas de

morte celular programada, bem como outras mortes celulares⁵ ainda a serem descobertas. A apoptose ocorre, geralmente, durante o desenvolvimento e o envelhecimento; como esse processo é um mecanismo de manutenção da população celular nos tecidos, ele ocorre como um mecanismo de defesa, quando as células estão danificadas, por doenças e agentes nocivos. Embora exista uma ampla variedade de estímulos e condições, ambos fisiológicos e patológicos, que podem desencadear apoptose, não necessariamente todas as células morrem pelo mesmo estímulo. Esse é um processo coordenado e frequentemente envolve a ativação de um grupo de cisteínas proteases chamadas de “caspases”. Tal processo envolve uma cascata complexa de eventos que ligam estímulos iniciais aos finais da célula (ELMORE 2007). As enzimas proteolíticas, chamadas Caspases, desempenham um papel crucial no fenômeno de morte celular. As Caspases removem pequenas partes de outras proteínas, cortando ligações peptídicas; por meio disso, as proteínas-alvo são inativadas. Se esse mecanismo apoptótico for prejudicado ou inativado, uma célula, que de outro modo seria morta, pode sobreviver e proliferar, com o seu respectivo potencial de formar um clone, o qual pode tornar-se canceroso, se obtiver a capacidade de se dividir descontroladamente (SNUSTAD et al., 2008).

2.1.3 Câncer

Considerando essa questão de forma inicial, o câncer ocorre quando existem alterações fundamentais no controle genético, resultando em uma proliferação descontrolada de células anômalas. As mutações principalmente ocorrem em duas classes de genes: proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Nas células normais, a produção de proto-oncogenes age em diferentes níveis ao longo de vias que estimulam a proliferação do gene supressor de tumor, como pRb e p53 resultado da disfunção da proteínas, normalmente inibindo a progressão do ciclo celular. O ciclo celular desregulado, associado com câncer, ocorre através das

⁵Para Grivicichet al., 2007 “Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica, e senescência celular. Alterações na coordenação desses tipo de morte celular estão implicadas na tumorigenese.”

mutações de proteínas importantes para níveis diferentes do ciclo celular. Em câncer, as mutações foram observadas em genes que codificam CDK's, em ciclinas, em enzimas ativando CDK's, em CDK inibidoras, em CDK substratos e proteínas de *checkpoint* (VERMEULEN et al., 2003).

2.2 Rede de Sinalização Celular

Considerando que as células são capazes de receberem diversos estímulos externos, estes são convertidos em respostas intracelulares, sendo os mesmos conhecidos como sinais de transdução. Resultada das interações químicas e moleculares, tais como enzimas e proteínas, essa sinalização é extremamente importante, pois ela mantém o equilíbrio da célula com o seu entorno, bem como as ações coordenadas e atividades básicas da célula. Decisões, como proliferação, diferenciação, apoptose e até senescência celular, são dependentes da sinalização de transdução, situando assim que a sinalização celular é um importante mecanismo para se entender o sistema celular.

A sinalização celular pode ser resumida em três passos. O primeiro corresponde ao processo da sinalização de transdução ativado por moléculas sinalizadoras, extracelulares, ligadas a receptores na superfície da célula. Posteriormente, esses sinais são transferidos para dentro da célula, desencadeando uma sequência de reações químicas, tais como ativação de adaptadores de sinais e fosforilação de enzimas, que ocorrem no citoplasma. Os sinais são amplificados, passados para o núcleo da célula e para outros genes, através de uma série de reações bioquímicas. A partir disso, as células respondem aos sinais alterando a função celular através da expressão gênica, como é possível visualizar na figura 3 (ALBERT et al., 2009).

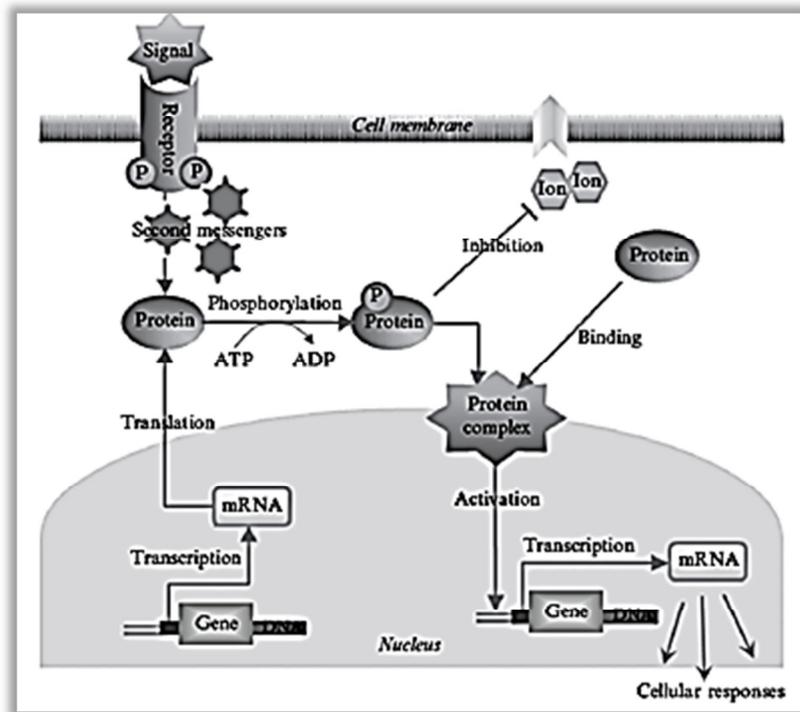


Figura 3 – Um esquema hipotético de um processo de sinal de transdução com diversas interações dos componentes celulares.
 Fonte: ALBERT et al., 2009.

Toda essa sinalização celular é possível de ser representada diretamente através de um grafo, a ser visualizado na figura 4, onde a orientação é direcionada através de arestas, as quais representam as interações, sinalizações entre componentes, tais como proteínas-proteína, formações complexas, regulação de transcrição, fosforilação de proteínas e catalisação de enzimas. Nas redes de sinalização, existem um ou mais nós iniciais, que, segundo Albert (2009), podem ser compreendidos como “enzimas, proteínas, genes, etc”, bem como existem também um ou mais nós de saída, representando o sinal de resposta celular. Entre esses nós, existem outros nós que consistem em segundos mensageiros, que também podem ser entendidos por enzimas, proteínas, genes, íons, etc, que estão envolvidos na transferência de sinais.

A partir desse processo descrito, entende-se que as redes de sinalização são frequentemente complexas em sua organização, bem como difíceis de serem compreendidas pela mente humana. Posto isso, entende-se que a análise das redes sinalizadoras requer uma combinação iterativa, aproximando o teórico e o experimental, o que inclui o desenvolvimento de modelos adequados, os quais têm a

capacidade de gerar dados quantitativos. Sendo assim, a modelagem matemática das redes celulares ajuda no entendimento subjacente da estrutura da rede sinalizadora da célula.

Uma outra ocorrência que torna necessária a aplicação da modelagem matemática está no fato de que a atividade dinâmica de sinalização das moléculas, em sistemas celulares, não é experimentalmente acessível. Mesmo quando dados temporais são avaliados para níveis de transcriptomas e proteomas, eles não refletem a atividade real das moléculas de sinalização, pois há vários fatores de regulação e modificação, cujo efeito ainda dificulta quantitativamente o acesso atual às tecnologias biológicas. Diante de tais problemas descritos, redes sinalizadoras celulares podem ser construídas e qualitativamente modeladas, utilizando a modelagem dinâmica Booleana (ALBERT et al., 2009).

2.2.1 Redes Biológicas

Um sistema biológico pode ser representado como uma rede biológica (NEWMAN, 2003) que consiste em diversas interações entre proteínas. Essas interações podem desencadear modificações em alguma proteína, bem como podem modificar funções ou até mesmo formar proteínas mais complexas, totalizando um processo chamado rede de interação proteína-proteína. Dentro dessa rede, se dois nós de um grafo estão conectados e se existe uma sequência adjacente de outros nós para ligá-los, então tem-se uma via. Assim, uma via pode significar um percurso de transformações, a partir de nutrientes para um produto final, em uma rede metabólica; por exemplo, arestas diretas são adequadas para representar o fluxo de informações e são usadas para representar interações mútuas, tais como ligação proteína-proteína, conforme pode ser observado na figura 4 (ALBERT, 2005).

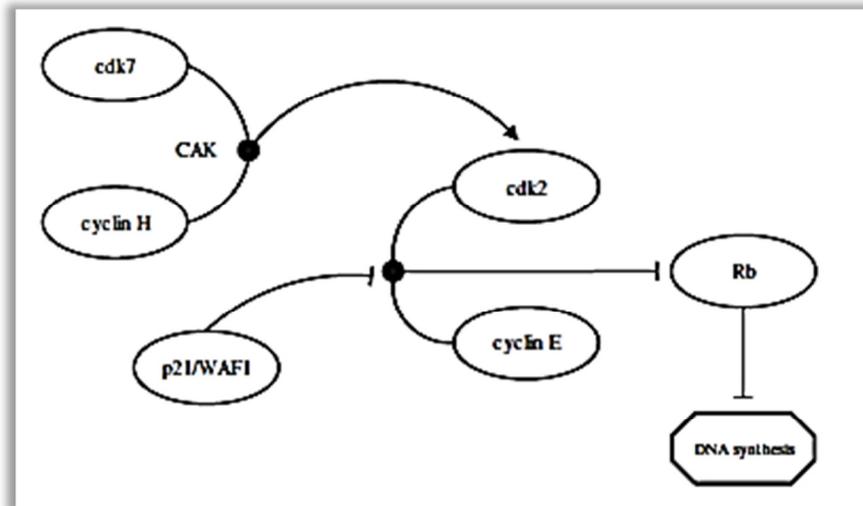


Figura 4 – Um diagrama ilustrativo de um exemplo da regulação do ciclo celular. As setas representam a ativação do gene. As linhas, com barras, nas suas terminações, representam as inibições (SHMULEVICH et al., 2002).

Em uma rede biológica, a expressão de um gene pode ser controlada pela presença de outras proteínas, ambas ativadoras e inibidoras, de modo que seu genoma forma uma rede, com nós, os quais representam a proteína, e as arestas representam a dependência da produção da proteína sobre outra proteína. Essas redes genéticas regulatórias são de fato sistemas de redes dinâmicas que possibilitam o uso de modelos de grande escala. Portanto, a rede aleatória Booleana é um clássico exemplo da modelagem dinâmica (NEWMAN, 2005).

2.3 Senescência Celular

O DNA nuclear é a parte mais importante de uma célula e qualquer alteração desencadeará uma série de reações celulares. O dano no DNA é conservado e esta informação é levada através da célula, por uma amplificação de sinal em cascata, conhecido como resposta, ao dano no DNA (DDR). Esta resposta é capaz de evitar ou parar a duplicação do dano no DNA, na célula-filha, impedindo a propagação das informações genéticas corrompidas, coordenando a célula a reparar esse dano no DNA e mantendo a integridade genômica. A ação desenvolvida para garantir a progressão do ciclo celular é conhecida como ponto de verificação *checkpoint*.

Juntamente com a reparação do DNA, temos a resposta ao dano do DNA (DDR). Quando o dano no DNA é agressivo, a célula pode sofrer a morte programada (apoptose), removendo essas células da população celular (FAGAGNA, 2008). Essa renovação de tecidos é essencial para a viabilidade de organismos complexos, tais como mamíferos. Apesar disso, ela promove a tumorigênese, a qual motiva os tecidos renováveis ao desenvolvimento de câncer. Além disso, o início do câncer ocorre devido ao progresso de mutações somáticas (CAMPISI et al., 2007). O perigo que o câncer causa à longevidade é atenuado por supressores de tumor e, da mesma forma, uma das respostas contra a apoptose é a senescência celular, uma parada natural do ciclo celular, induzida por sinalizações das DDR.

Senescência celular é, assim, um processo de transdução de sinal que leva a uma parada irreversível do crescimento, sendo esta acompanhada por específicas morfologias e expressões gênicas padrões. Essas células permanecem metabolicamente ativas, (SARETZKI, 2010), ficando em uma parada irreversível do ciclo celular em que perdem a habilidade replicativa (KONG et al., 2011). Algumas células entram no estado de parada do crescimento, mas não perdem a capacidade proliferativa devido a sinais fisiológicos; essas células são chamadas de Quiescentes (G0).

Células mitóticas podem senescer quando se encontrarem em uma situação potencialmente oncogênica. Nesse caso, a célula cessa sua proliferação, conhecida como parada irreversível do crescimento. Inicia uma resistência à apoptose, adquirindo uma mudança generalizada na expressão gênica. Juntas essas características compreendem um fenótipo senescente (SARETZKI, 2010). A estratégica característica da senescência - a parada do crescimento - depende da espécie e genética da célula; geralmente a parada acontece na fase G1-S do ciclo celular para fibroblastos, mas um defeito, uma sinalização de estresse cinase (MKK7) pode induzir uma parada em G2-M.

Por sofrerem mudanças distintas em sua morfologia, células senescentes são frequentemente acompanhadas pela indução à atividade de senescência associada à beta-galactosidase. Em nível molecular, alterações específicas na expressão gênica para células senescentes têm sido identificadas, incluindo a senescência associada a fenótipo secretor (SASP), no qual podem se desencadear mudanças significativas ao redor da célula e em seu micro desenvolvimento. As mudanças, na expressão gênica em células senescentes, podem ser parcialmente explicadas pela

alteração da estrutura da cromatina, incluindo a formação de senescência associada ao acúmulo de heterocromatina (SAHF). A formação de SAHF requer o recrutamento de pRb e o promotor que é responsável pela repressão estável do gene alvo E2F (fator de transcrição), possivelmente contribuindo para a irreversibilidade da parada do crescimento (KONG et al., 2011).

2.3.1 Marcadores de Senescência Celular

A execução de senescência está associada com a aparência de marcadores, que são comumente usados para identificar células senescentes *in vivo* e *in vitro* (KUILMAN, *et al.*, 2010). Os marcadores podem ser usados como ferramentas de diagnóstico e prognóstico para monitorar a eficácia do potencial nas terapias antitumorais, resultando em fenótipos senescentes, conforme breve ilustração demonstrativa na figura 5. A indução de senescência celular é estabelecida a partir de vários estímulos, sendo assim consequência de um mecanismo regulatório, que leva a uma resposta celular pré-programada. (KYLE, L. W 2010). Para se verificar a ocorrência da senescência celular, alguns marcadores são a seguir mencionados.

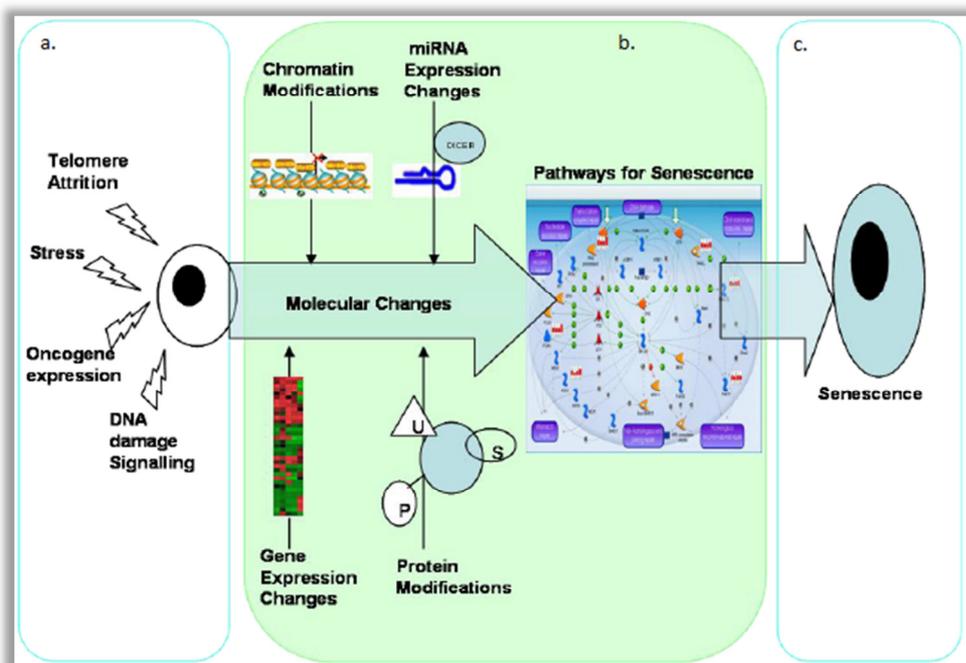


Figura 5 – a. Causas. b. Mecanismo c. Resultado. Fonte: Kyle, L. W 2010.

2.3.1.1 Morfologia

Células senescentes adquirem algumas mudanças morfológicas que podem ser percebidas com um microscópio. Apresentam estrutura achatada, aumentam seu volume (em até 10 vezes) e mostram um vacúolo rico em citoplasma; no núcleo, aumentam-se a taxa de citoplasma e massa mitocondrial (CAMPISI et al., 2007).

2.2.1.2 Senescência Associada à Beta-Galactosidase.

O aumento dessa atividade em células senescentes deriva da proteína beta-D-galactosidase lisossomal. Esta detecção requer que o tecido esteja congelado para preservar a atividade enzimática. Células não senescentes também dispõem de beta-galactosidase no lisossoma, a qual está funcionalmente otimizada a um pH 4,0. No entanto, o aumento, na atividade de senescência associada, em beta-galactosidase, em células senescentes, ocorre devido a uma expansão do compartimento lisossomal que pode ser medido a pH 6,0 (KUILMAN, 2010). A presença deste biomarcador é independente da síntese do DNA e geralmente distingue células senescentes de células quiescentes (CAMPISI et al., 2007).

2.2.1.3 Ativação dos Supressores de Tumor

As duas maiores vias p53-p16/pRb são responsáveis pela execução da parada proliferativa que caracteriza a senescência humana. Em fibroblastos humanos, o acúmulo de pRb está ativo; paralelamente a isso, p53 aumenta sua atividade. Assim, p53 serve como um nó, sinalizando a emergência da pró-senescência mediando e desprogramando a ativação oncogênica, a disfunção dos telômeros e o dano no DNA. Uma das funções da ativação do supressor pRb é desencadear a senescência em células humanas.

O ativador p16 é comumente indutor em células senescentes em contexto *in vitro*. Outras proteínas, nas vias p16-pRb e p53, observadas p21 e p15^{INK4b}, frequentemente também estão acumuladas em células senescentes, sendo usadas como marcadoras, refletindo a ativação destas vias na senescência. A presença do marcador p16 é percebida também em lesões senescentes em ratos e humanos também *in vivo* (KUILMAN et al., 2010).

Em resposta ao dano do DNA, o nível de expressão da proteína p53 aumenta, o que reforça o nível de expressão de p16 e de ARF (CDKN2D), sendo esses três supressores de tumor encontrados em tecidos embrionários de murinos ((MEF) ratos), bem como em células humanas sobre senescência oncogênica induzida. Nas lesões neoplásicas pré-malignas, ARF é expressa de forma diferente em ratos e humanos (KUILMAN et al., 2010; CAMPISI et al., 2007).

2.2.1.4 Gamma-H2A.X - Biomarcador do Dano no DNA

Gamma-H2A.X é descrito como marcador de senescência celular, pois após o dano no DNA, muitas moléculas da histona H2A.X, presentes na cromatina para o conjunto de quebras, são rapidamente fosforiladas. A fosforilação derivada de gamma-H2A.X forma um acúmulo de dano, o qual aumenta em proporção rapidamente, permanecendo presente até que a quebra ou que o dano seja reparado. O encurtamento de telômeros, bem como o desnivelamento podem induzir ao acúmulo de gamma-H2A.X (CAMPISI et al., 2007; FAGAGNA, 2008, SARETZKI, 2010). A sinalização de vias ativada pelo dano no DNA tem que estar em manutenção para manter a célula em um estado de senescência, o que pode estar relacionado com a conservação do estado de senescência e da resposta ao dano do DNA (FRAGKOS et al., 2009, SARETZKI, 2010). Portanto, o acúmulo de gamma-H2A.X pode ser um marcador para senescência celular replicativa e senescência induzida por estresse (SARETZKI, 2010).

2.2.1.5 Senescência Associada ao Acúmulo de Heterocromatina

Senescência celular pode estar associada com uma alteração na estrutura da cromatina em *in vitro*. As células senescentes apresentam uma notável diferença em sua coloração. No entanto, em comparativo com as outras células, estas apresentam uma coloração homogênea (KUILMAN et al., 2011). O papel da formação SAHF é contribuir como supressor de tumor, implicando a inativação da produção de genes que são requeridos pela formação de SAHF, tais como HIRA, ASF1a e HMGA2, os quais podem contribuir para o desenvolvimento de câncer humano (SARETZKI, 2010).

2.2.2 Tipos de senescência

2.2.2.1 Senescência Replicativa

A senescência celular replicativa apresenta um estável e longo período de perda da capacidade proliferativa, apesar da viabilidade e atividade metabólica. A propagação das células humanas, em cultura, telômeros (parte final do cromossomo) é progressivamente encurtado. Esta barreira é denominada senescência celular replicativa, uma vez que é provocada pela replicação. Nesse processo, os telômeros estão sujeitos a atrito devido ao fato de que DNA polimerase falha completamente, atrasando a replicação das fitas de DNA. Diante disso, tem-se o “problema na replicação final”, que contribui para o encurtamento dos telômeros (KUILMAN et al., 2010). Por ser um tipo de cromossomo linear, composto por repetidas sequências do DNA 5'-TTAGGG-3', o encurtamento do telômero ativa a resposta ao dano no DNA (DDR) e conseqüentemente não ativa a sequência, paralisando o ciclo celular, apesar de ser a parte física final do DNA. Isto pode ocorrer devido a inúmeras razões, tais como a estrutura da cromatina e até a configuração do DNA (FAGAGNA, 2008). A repetição final TTAGGG, em cromossomos de mamíferos, está associada com um complexo de seis proteínas,

complexo shelterin. O complexo shelterin permite às células a distinção natural do final dos cromossomos para a quebra do DNA, reprimindo a reação de reparação do DNA e regulando a telomerase, manutenção dos telômeros (LANGE, 2009).

As células humanas, nas quais a telomerase está desregulada, podem acumular uma erosão de telômeros, como uma consequência da contínua divisão celular, desencadeando a resposta ao dano no DNA, o qual evita que a célula continue se dividindo e mantenha intacta a parte final do cromossomo (WU et al., 2009)

A habilidade de p53 para eliminar excessos é vital para as propriedades de regulação da célula na proliferação de organismos multicelulares. P53 é ativado por sinais internos e externos da célula, acumulando uma atividade, também sendo capaz de agir ou na parada do crescimento, ou na viabilização da apoptose. Esta escolha dependerá de um somatório de sinais. O atraso na atividade é crucial para o supressor de tumor. A atividade inibitória de crescimento de p53 evita a proliferação de células danosas e também contribui em processos de diferenciação e reparação de DNA.

Sendo um ponto inicial na resposta para o estresse celular, p53 serve como a maior obstrução para tumorigenese; este obstáculo tem de ser removido de modo a permitir o desenvolvimento da tumorigenese. A mutação do gene p53 é encontrada na maioria dos casos de câncer; a atividade de p53 é comprometida por mecanismos alternativos, o que envolve a elevação da expressão dos inibidores de p53, tal como Mdm2 e coativadores, como ARF.

Sob uma condição normal, p53 é uma proteína de vida curta. O inibidor de p53, Mdm2 (em humanos Hmd2), é o maior responsável por manter esse estado; Mdm2 inibe a atividade de transcrição de p53 e, além disso, promove a degradação por proteossoma.

P53 é um fator de transcrição que ativa procedimentos concomitantemente vitais para restringir o crescimento aberrante na célula, na resposta do dano no DNA. Essa restrição no crescimento celular induz à senescência, parada do ciclo celular em G1/S ou G2/M.(HAUPT et al., 2003).

A proteína p21 contribui para a resposta ao dano no DNA, por meio de um processo fundamental de regulação, como a progressão do ciclo celular, apoptose e transcrição. No entanto, a participação de p21 pode não somente ocorrer após o dano no DNA, mas também em condições fisiológicas. P21 é o primeiro identificado

como inibidor do complexo cinase dependente de ciclina (CDK). A progressão do ciclo celular pode ser também regulada por p21 independentemente das ciclinas.

Em contraste com a regulação negativa do ciclo celular, p21 pode também servir como um fator de sinalização para ciclina D-CDK4/6, assim promovendo pouca concentração de ciclina-D e o atraso da ativação da ciclina-E-CDK2.

O principal papel de p21(CDKN1a), em checkpoint G1, encontra-se na habilidade de inibir a ativação da ciclina E e da ciclina A/CDK2, em função de que é solicitado para a transição da fase G1/S, assim contribuindo para a parada na fase G1. Conseqüentemente, a proteína retinoblastoma pRb permanece hipofosforilada, sequestrando o fator de transcrição (E2F), cuja atividade é necessária para entrar na fase S (ZHENG, *et al.*, 2006). Para evitar a fosforilação de pRb, a atividade de CDK é inibida pela família p21 e pela família p16, inibidores que incluem CIP/KIP. P16 tem convenientes propriedades bioquímicas para funcionar como supressoras de tumor por agirem como inibidoras das cinases dependentes de ciclinas(CDK's, CDK4 e CDK6 bloqueando a sua associação com a ciclina regulatória D, ciclina D). Estas regulam a progressão do ciclo celular, através da fase G1, como é mostrado na figura 6 (GIL *et al.*, 2006).

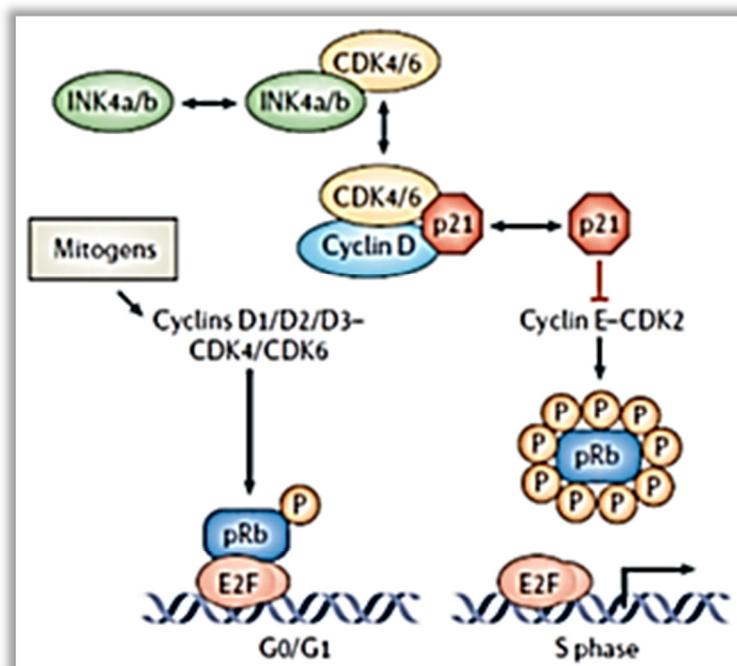


Figura 6 – Efeitos da proteína INK4 sobre a progressão das fases G1/S (GIL *et al.*, 2006).

A expressão de p16 é vista de forma aumentada em alguns fibroblastos senescentes humanos, mas várias linhas de evidência indicam que isso é diferente quando relacionado com o encurtamento de telômeros. O aumento da expressão de p16 ocorre após a senescência já estabelecida em cultura, contrastando com o rápido aumento da expressão de p21, em células que abordam senescência replicativa (ZHANG, 2007).

Em células, vários mecanismos de *checkpoint* operam para evitar a disseminação de erros genéticos de células que sofrem lesões em seu DNA. Duas *phosphoinositides kinases-related kinases* (PIKKs), conhecidas por ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) e ATR (*rad3-related*), possuem função próxima à via do ponto de verificação, *checkpoint*. ATM está envolvida na detecção de duplas quebras do DNA (*double-stranded breaks DNA(DSB's)*), e ATR responde principalmente pelo aumento da replicação; também junto com ATM respondem as DSB's (YOO, *et al.* 2009). Assim, ATM e ATR são responsáveis por governar uma cascata de sinalizações que respondem à manutenção da estabilidade genômica, através da resposta aos danos no DNA, para elucidar respostas, tais como a parada do ciclo celular, mudanças no transcriptoma e reparação do DNA (BURROWS e ELLEDGE, 2008).

2.2.2.2 Senescência Celular Induzida por Oncogene

Um importante mecanismo causador do desenvolvimento do câncer, juntamente com a inativação do supressor de tumor, p53, é a ativação de oncogene que estimula a proliferação celular. Embora a ativação de oncogene seja um evento promotor de tumor e um passo necessário para tumorigênese, em muitos tipos de câncer, a proliferação induzida e a promoção do tumor dependem das condições, das propriedades oncogênicas e do contexto genético das células, onde elas estão ativas. A ativação dos mediadores de oncogene promove tumorigênese e aumenta a proliferação oncogênica em células normais, induzindo-as a uma permanente proliferação (SARETZKI, 2010). Células normais, em cultura, sofrem senescência ou em resposta à super expressão do oncogene RAS, que é um transdutor de sinal extracelular, ou em resposta ao atraso de efetores, tais como RAF. Estas respostas

têm sido sugeridas por representarem um mecanismo supressor de tumor, no qual células evitam um descontrole proliferativo em resposta às ativações aberrantes da proliferação, que conduzem a oncogene (SARETZKI, 2010).

P53 está frequentemente envolvido em senescência induzida por oncogene, mas não necessariamente em todas as situações. Existem diferenças significativas sobre a dependência da oncogene no tecido em que é estudado. RAF induz senescência em ambos: em fibroblastos e em células epiteliais de mamíferos, independentemente da função de p53. Em fibroblastos, o oncogene RAF aumenta a expressão de p16, no entanto, em células epiteliais de mamíferos, a indução de senescência por RAF é independente de ambos, p53 e p16.

As células que sofrem senescência celular induzida por oncogene possuem uma alteração na estrutura da cromatina. Este processo pode ser detectado pela formação nas estruturas densas subnucleares, ou seja, senescência associada ao acúmulo de heterocromatina (SAHF). O mecanismo de SAHF propõe a ação de reprimir a expressão dos genes envolvidos com a proliferação celular, tais como gene de regulação E2F. As funções de SAHF e sua formação estão sob o controle de genes supressores de tumor. Além disso, para SAHF aparecer, a ativação do oncogene induzirá a formação de senescência associada ao acúmulo de dano no DNA (SDF); em resposta a este dano, tem-se a parada do ciclo celular. O dano no DNA sinaliza uma cascata de eventos, como a ocorrência de gama-H2AX e o resultado da expressão de outros oncogenes, tais como Myc, Ras, E2F, etc, que estão associados com a senescência celular (SARETZKI, 2010).

2.2.2.3 Senescência Induzida por Estresse

In vitro, a senescência prematura pode resultar de uma cultura celular inadequada. Quando as células são coletadas e colocadas em cultura, elas necessitam se adaptar ao meio, à concentração de nutrientes, a fatores de crescimento e à presença de níveis oxigênio, bem como à ausência de alguns tipos de células e componentes da matriz extracelular. Um ou mais desses fatores podem induzir a um choque na cultura, resultando em senescência induzida por estresse. Este tipo de senescência é independente do comprimento dos telômeros, ocorrendo

tanto para células de roedores, como para células humanas. Consistente com isto, o estresse oxidativo induz à cessação da replicação, em cultura, para células humanas, caso o potencial replicativo dos melanócitos humanos e das células epiteliais dependa, largamente, da composição da cultura em que está, bem como da concentração. A senescência em MEF (fibroblastos embrionários de ratos) pode ser ignorada também pela inativação de p53 ou/e pRb. Assim, a imortalização das células não requer somente a manutenção dos telômeros, mas também a ótima condição das células quando coletadas em cultura. (KUILMAN et al., 2010).

2.3.1 Vias de Sinalização em Senescência Celular

Em fibroblastos humanos, senescência celular acontece após várias divisões da célula em cultura, e a expressão da telomerase é capaz de suprimir a parada. Já células epiteliais mais rapidamente se encontram sob a parada do crescimento que não está associado com encurtamento de telômeros, e sim com a regulação de p16. Mesmo assim, é possível associar a parada do ciclo celular a partir de duas vias ATR-chk1 e ATM-chk2, pois ATR e ATM fosforilam Chk1 e Chk2, que podem bloquear a progressão do ciclo celular nas fases G1/S ou G2/M. Essas fases são paradas através da inibição de Cdc25, que é requerido para a ativação das CDK's. Nesse processo, ATM e ATR contribuem para a ativação p53 que inibe a progressão do ciclo celular, através da indução das CDKs inibidoras de p21 (SANGAR et al., 2004).

Partindo de uma rede regulatória, é possível determinar quatro vias a partir de ATM e ATR para a parada permanente do ciclo celular. A partir disso Chk1 e Chk2 estão relacionadas com uma sinalização para outras duas vias p16 e p53.

2.3.1.1 Vias Chk1/2

A ativação de ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), a partir de TRF2, fosforila outras moléculas, p53 e Chk2. Esta fosforilação resulta na ativação de dois sinais de

transdução: um para iniciar e outro para manter a parada da fase G1/S. A reação que inicia a parada de G1/S é a fosforilação de Chk2. A fosforilação de p53 ativa p21, o qual inibe o complexo CDK2-Cyclin-E, promovendo a entrada da fase S e mantendo a parada em G1/S. P21 também pode se ligar ao complexo CDK4-CyclinD, evitando a fosforilação de pRb; a fosforilação de pRb resulta em liberar o fator de transcrição (E2F), desencadeando a entrada da fase S (SANCAR et al., 2004).

Chk1 é rapidamente fosforilado por muitos conjuntos dependentes de ATR, de forma a inibir a replicação do DNA. Estas modificações pós-traducionais são requeridas para desencadear o ciclo celular em S e G2. O papel de Chk1, ponto de verificação, sobrepõe-se a outras vias de respostas do dano, no DNA, controladas pela proteína ATM, o que atrasa a fosforilação de Chk2. O recrutamento de ATR, a partir da proteína de interação ATRIP, é devido à proteína de replicação A (RPA) que reveste a fita simples do DNA (SANCAR et al., 2004, MEUTH, 2004).

2.2.3.2 Via p53

Diferentes fatores podem desencadear a resposta para várias sinalizações de estresses intrínsecos e extrínsecos, provocando um impacto no mecanismo homeostático, que monitora a replicação do DNA, segregação dos cromossomos e a divisão celular. Em resposta a isso, a proteína p53 ativa, em maneiras específicas; isto leva à parada irreversível do ciclo celular (senescência celular), à reversível (quiescência) ou à apoptose celular (HARRIS et al., 2005). A manutenção do estado senescente é devido ao aumento da expressão de p21, através da via ATM/ATR-p53-p21 (ZUCKERMAN et al., 2009), que controla a progressão do ciclo, inibindo a fosforilação de pRb através do complexo ciclina E/CDK2. Outro motivo que leva à ativação de p53 é o aumento da expressão de ARF(p14 ARF em humanos e p19ARF em ratos), um supressor de tumor codificado pelo INK4a(p16)-ARF locus. ARF estimula a atividade de p53, sequestrando HMD2 (MDM2 em ratos), a partir de degradação proteossomal, pois HMD2 é um regulador negativo de p53 (ZUCKERMAN et al., 2009). Essa degradação também pode ser mostrada a partir de CARF (colaborador de ARF), agindo na via ARF-p53-HDM2-p21. A sua regulação

depende do tipo de célula e também do estado de p53. Isso sugere que a regulação de p53 pode depender diretamente da ação de CARF. ARF e CARF formam um mecanismo redundante, pois, em células normais, HDM2 provoca a degradação de p53 por sua inibição e, em células em estado senescente, garante que p53 não seja degradado, assim provocando a parada do ciclo celular (CHEUNG et al., 2009).

A regulação de p53, em senescência celular, envolve outros marcadores, como p38MAPK, que induz o atraso do estado de senescência em fibroblastos humanos, garantindo a inibição de p16 e ARF (ZUCKERMAN et al., 2009).

2.2.3.3 Via p16

p16 promove a ativação de pRb, porém p16 é inibidor do complexo ciclina D-CDK4/6. A inibição de CDK's bloqueia a progressão do ciclo celular em G1 pela manutenção de pRb, que está na forma ativada. P16, em células humanas, pode causar o atraso da entrada na senescência celular; isso indica que p16 está relacionado à indução do estresse, um dos estágios de células senescentes. O complexo CDK's é regulador de pRb, atuando na promoção do fator de transcrição, E2F, induzindo a expressão do gene necessária para preparar a célula a iniciar a fase S (PORATH et al., 2005).

2.4 Modelagem e Análise de Redes Regulatórias

Considerando que os modelos computacionais, como já referido no início do texto, são responsáveis por analisar redes regulatórias, estão, assim, divididos em dados qualitativos ou quantitativos. Em se tratando do modelo lógico, este descreve as redes regulatórias, proporcionando um entendimento básico das diferentes funcionalidades de uma dada rede sobre diferentes condições. Com uma natureza qualitativa, torna flexível e fácil a adaptação de fenômenos biológicos. Com uma natureza quantitativa (modelos contínuos), esses modelos possuem uma dependência sobre o tempo, bem como uma necessidade de manipulação mais

detalhada, uma concentração molecular mais exata. Sendo assim, esse modelo quantitativo torna mais restrita a simulação dos efeitos regulatórios, como é possível observar ao simular os efeitos das restrições alimentares das células de leveduras sob diferentes concentrações de nutrientes (KARLEBACH et al., 2008).

A modelagem dinâmica, constituída pela abordagem dos modelos qualitativos e quantitativos, serve como uma ferramenta para elucidar a dinâmica dos processos celulares desse trabalho. Os modelos são capazes de descrever diversas interações, contando com as características fenotípicas e fazendo novas previsões que levam a novas explorações experimentais (ALBERT, 2005). Para constatar melhor esse funcionamento dos modelos, a seguir, serão descritos mais detalhadamente.

2.4.1 Modelos Contínuos

Os modelos quantitativos dinâmicos requerem muitos parâmetros cinéticos que geralmente ou são insuficientes, ou não são conhecidos, tornando-se um obstáculo para a modelagem quantitativa de sistemas de larga escala (ALBERT, 2005). Apesar disso, têm sido amplamente usados em vários modelos de sistemas biológicos e podem, assim, ser descritos através de equações diferenciais, como será visto a seguir.

Equações diferenciais ordinárias (EDO) descrevem quase que instantaneamente, as mudanças em suas entidades, como, por exemplo, uma mudança de nível em algumas redes, conforme é mostrado na figura 7. Para um sistema simples, a EDO, uma solução analítica ou um valor real podem ser formulados. Com isso, o conjunto de resultados da equação algébrica então descreve a mudança do nível da entidade. Derivadas de uma EDO, a equação pode descrever a mudança de concentração da espécie de molécula envolvida sobre algumas suposições simplificadas, como exemplificado na figura 7 (KARLEBACH et al., 2008).

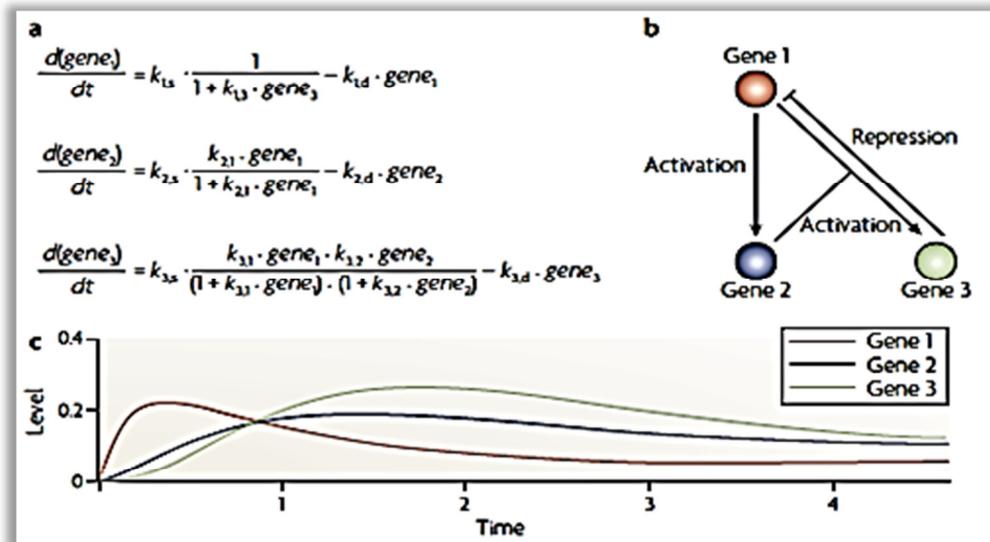


Figura 7 – Modelo de Equações Diferenciais Ordinárias: a) uma rede de três genes é modelada usando equações diferenciais ordinárias (ODE's). Taxas de reações são constantes e denotadas por "k", um parâmetro cinético. b) A relação regulatória é representada graficamente. c) As trajetórias do modelo. Cada equação mostra a mudança no nível de um gene como uma diferença na síntese e degradação. Fonte: KARLEBACH et al., 2008.

2.4.2 Modelos Lógicos

A mais básica e simples metodologia de modelagem é discreta e de base lógica. Modelos lógicos representam o estado local para cada entidade do sistema (por exemplo, genes, proteínas e pequenas moléculas) para qualquer tempo como um nível discreto, e o desenvolvimento temporal do sistema é frequentemente assumido para ocorrer de forma síncrona, *synchronous*, discreto espaço de tempo, como é mostrado na figura 8, (um discreto espaço de tempo ou passo de tempo). Essas entidades são atualizadas a cada passo ou espaço de tempo, de acordo com a função da regulação. Modelagem discreta permite o conhecimento puramente qualitativo (KARLEBACH et al., 2008).

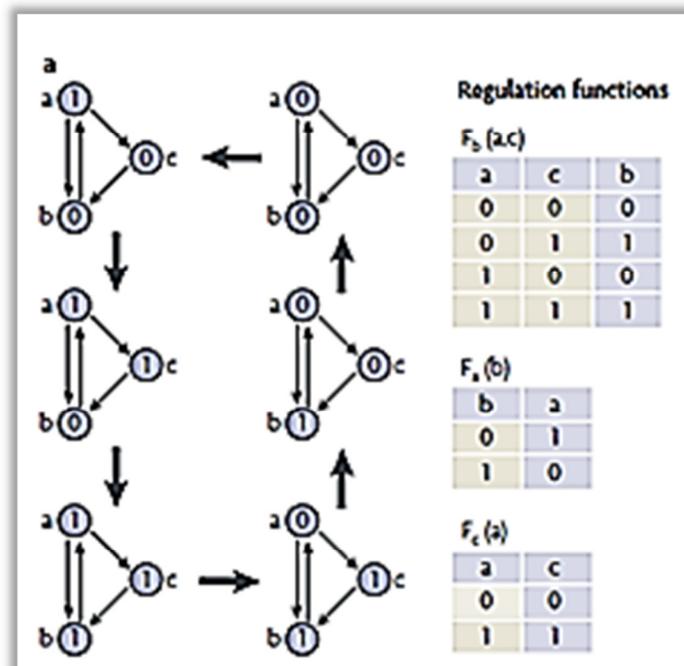


Figura 8 – Modelo Lógico: uma rede Booleana. Para cada entidade a, b e c, na rede, podem ser os estados 0 ou 1. A transição dos estados obedece à função da regulação mostrada na direita, que descreve as regras do modelo. Por exemplo, se 'a' está no estado 1 e 'c' está no estado 0, para o próximo estado, 'b' será 0. As setas finas indicam a regulação de cada nó. Os espaços de tempo são representados pelas setas largas. O estado global do modelo é a combinação dos arranjos. O ciclo do sistema é acompanhado através de seis estados globais, nos quais a sequência dos estados globais é uma trajetória. Fonte: (KARLEBACH et al., 2008).

Muitos conhecimentos de componentes individuais e interações causais, num processo biológico, podem ser inferidos pelas literaturas experimentais, como dados qualitativos (KARLEBACH et al., 2008).

Modelagem dinâmica discreta, particularmente modelagem dinâmica Booleana, tem sido aplicada, com sucesso, em muitos modelos de redes regulatórias de genes, bem como em redes de sinalização, especialmente naqueles sistemas, onde a organização da rede é mais importante do que os detalhes cinéticos das interações individuais (KARLEBACH et al., 2008).

Redes regulatórias de alguns sistemas biológicos são capazes de mostrar um módulo de desenvolvimento robusto que pode funcionar, apesar das variações dos parâmetros cinéticos, que, através de um modelo dinâmico booleano desenvolvido, é capaz de prever a expressão gênica deste módulo. A modelagem dinâmica booleana tem sido igualmente aplicada para diferentes sistemas biológicos dentro da biologia celular (ALBERT, 2005).

2.5 Redes Lógicas Booleanas

Modelagem de Métodos Booleanos é usada tanto para observar relações causais de dados de expressão, como para analisar o comportamento dinâmico dos sistemas, cuja rede de interações é conhecida pela literatura.

Muitos modelos e experimentos sugerem que redes regulatórias mantenham suas funções mesmo quando confrontadas com flutuações e taxas de reações. Estas observações levam a suportar a aplicabilidade de outros modelos, bem como o modelo Booleano.

A Modelagem Booleana não incorpora explicitamente os detalhes bioquímicos subjacentes da análise, produzindo um panorama significativo dentro do sistema complexo biológico. Assim, permite entender os princípios evolutivos das redes biológicas, tendo como uma de suas vantagens ser um método mais específico por fornecer informações mais pontuais, sendo assim facilmente estendido para estudar sistemas fisiológicos. Este sistema também, assim como outros, consegue descrever a interação entre duas proteínas, a ativação de um fator de transcrição ou a regulação da expressão por um fator de transcrição.

No que tange à sua representação, o sistema Booleano pode ocorrer em uma rede ou grafo,

$$G=(V,E)$$

em que os nós representam os componentes do grafo

$$V = \{ v_1, v_2, v_3... \}$$

Observando os elementos da rede de uma lista de transferências de funções Booleanas, as arestas

$$F = \{ f_1, f_2, f_3.. \}$$

descrevem a conexão E entre os nós. Os nós são caracterizados por estados binários e a relação entre os nós é incorporada a partir das funções atualizadas para os estados dos nós.

O nó da rede v_i suporta um gene, uma proteína ou um estímulo com um nível de expressão associada X_i , representando a concentração de um gene (proteína) ou a quantidade de estímulos presentes na célula. Este nível é aproximado de dois estados qualitativos $X_i = 1$, significa que o nó v_i está expresso ou em ON (alta concentração) e $X_i = 0$ significa que não está expresso ou em OFF (concentração sub limiar); F representa um conjunto lógico de funções atribuído para cada nó. Essa é a regra de regulação entre componentes das redes e determina a evolução do sistema de um estado para outro. O futuro estado de cada nó é determinado pelo atual estado dos nós através da função de transferência Booleana:

$$X_i^* = F_i (x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$$

onde o "*" demonstra o estado futuro e $i = 1, 2, 3, \dots, n$, número total de nós (ALBERT, R. et, al. 2009). A partir disso, existem duas maneiras para representar o modelo Booleano. No primeiro, F_i é baseado nos operadores Booleanos (lógicos) AND, OR, NOT. No segundo, é chamado de rede booleana limiar; F_i é uma soma ponderada dos sinais para um nó específico, através de um valor, como pode ser demonstrado na figura 9. Em ambos os casos, a função saída é 1(0), correspondendo a verdadeiro (falso).

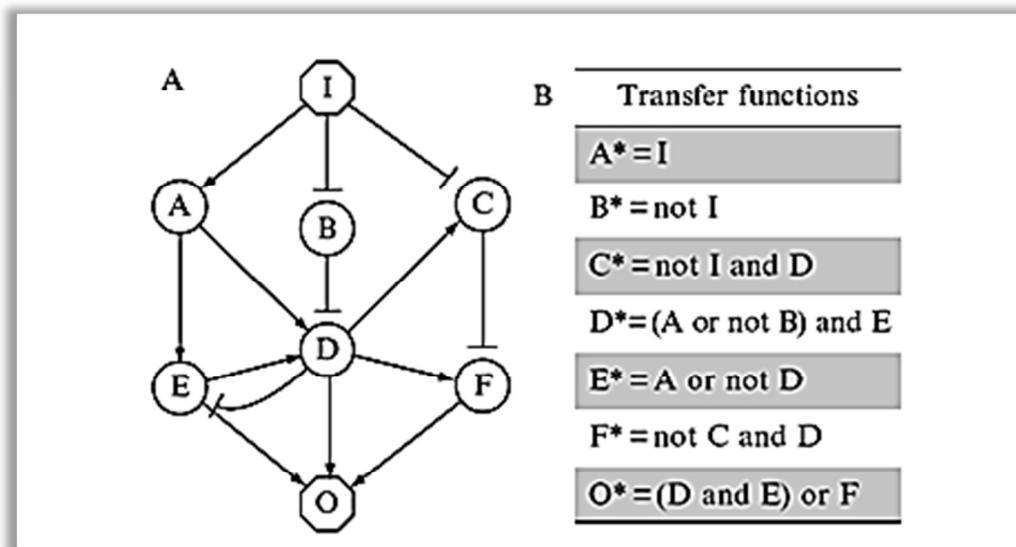


Figura 9 – Um exemplo de rede de sinalização do modelo de rede Booleana. a) nó I é a entrada e O é a saída; as setas indicam ativação e as linhas, com barras, indicam a inibição. b) As funções de transferências Booleanas para cada componente, nós, e sua sinalização. Fonte: (ALBERT, 2005).

Nos modelos Booleanos, o tempo é dito como quantizado ou discreto; assim, o próximo estado é o estado para o próximo passo de tempo e assim sucessivamente. Dada a condição inicial, a rede então produz uma sequência dinâmica de estados da rede, atingindo eventualmente um atrator (ciclo limite) ou um ponto fixo (GROS, C. 2008).

O modelo síncrono, a cada passo de tempo, permite que as ordens de atualização sejam chamadas para a mudança de nível de expressão de um subconjunto de genes. Esse processo fornece uma série de dados, que são executados simultaneamente. Como resultado, cada estado tem exatamente um sucessor (CHAQUIYA et al., 2003), conforme pode ser demonstrado na fórmula a seguir.

$$X_i(t+1) = F_i(X_2(t), X_3(t) \dots X_n)$$

Este método de atualização implícito assume que a escala de tempo de todos os processos biológicos, nos quais os componentes de sinalização estão envolvidos, são similares. O benefício dos modelos síncronos é que a dinâmica da sequência dos estados é determinística; assim, uma condição inicial leva para o mesmo atrator em diferentes simulações replicativas.

Considerando que processos biológicos, em sistemas celulares, são complicados e muito frequentes, a escala de tempo desses processos é diferente e pode variar largamente de segundos para horas. Um exemplo é a fosforilação de proteínas, que é mais rápida do que a síntese de proteína. No entanto, apesar de o modelo síncrono não representar adequadamente uma escala de tempo diferente sobre diversos processos biológicos, realizados no sistema celular, ele ainda assim assume a existência da sincronização perfeita sobre os estados de sinalização. Assim, a atualização do sistema precisa ser estendida para explicar as diferentes escalas de tempo (ALBERT et al., 2009). No modelo assíncrono, os nós são atualizados numa ordem não sincronizada, dependendo da informação de temporização, ou da falta dela, nos eventos individuais biológicos. Em um modelo assíncrono, aleatório, a próxima atualização, para cada componente, pode ser uma escolha aleatória para cada interação (ALBERT et al., 2009), como pode ser observado na equação.

$$X_i(t+1) = F_i (X_1(t_1), X_2(t_2) \dots), t_i \text{ pertence } \{ t, t+1 \}, i = 1, 2, 3 \dots$$

As múltiplas ordens de atualização ocorrem para um dado estado; essas informações adicionais são necessárias para selecionar uma transição específica (alguma relação de ordem). Um retardo específico, no decorrer, está associado com as reações (sínteses, degradação, ativação, inibição); se não existirem essas informações, todas as possíveis transições são generalizadas (CHAOUIYA et al., 2003), envolvendo estocasticamente a mesma condição inicial, podendo levar para diferentes estados e, por extensão, para diferentes atratores, devido à escolha aleatória envolvida no estado de transição.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo, será proposta uma simulação de senescência que requer a integração de dados regulatórios aplicados a um modelo computacional dinâmico. Desta mesma forma, foi aplicada a ideia inicialmente formulada por (FAURÉ et al., 2006), que será direcionada ao modelo de Porath e Weinberg (PORATH et al., 2005). Na modelagem da rede regulatória sugerida por (FAURÉ et al., 2006), o modelo lógico envolve três passos: a construção de um grafo regulatório; a definição de parâmetros lógicos; e a especificação de atualizações, para o ciclo celular, cujo modelo matemático utilizado é o modelo Booleano.

3.1 Rede Regulatória

O corpo humano é compreendido de aproximadamente 10^{14} células com mais de 200 tipos diferentes delas. O genoma humano tem um repertório de aproximadamente 25000 genes, coordenados por processo que desenvolve o organismo com mecanismos homeostáticos, os quais são alcançados através da rede de sinalização. Esta rede de sinalização inclui cerca de 1540 receptores de sinalização, 518 proteínas cinases e aproximadamente 150 proteínas fosfatases. Estes componentes da rede de sinalização humana resultam na ativação ou inibição de 1850 fatores de transcrição no núcleo que, ao seu entorno, forma uma rede regulatória transcricional (PALSSON, 2007).

No modelo atual, com base na metodologia lógica de uma rede regulatória booleana, cada gene poderá ter apenas duas alternativas: ou estar ativo (1), ou estar inativo (0) (PALSSON, 2007). No grafo regulatório proposto, o cruzamento de regulação entre os componentes regulatórios do grafo está formalizado em termos de uma orientação, em que os vértices representam a diferença reguladora, atividade do gene, e os nós são os genes ou proteínas (FAURÉ et al., 2006).

3.2 Modelo de Senescência Sugerido por Porath e Weinberg

Assim como no estudo descrito, em capítulos anteriores, Porath e colaboradores também observaram que senescência celular é um programa celular fundamental, que é ativado em diversas situações fisiológicas, bem como a programação de morte da célula, apoptose. No entanto, Porath observou que as proteínas supressoras de tumor pRb e p53 têm um papel importante na indução de senescência celular, como mostrado no grafo proposto, na figura 10.

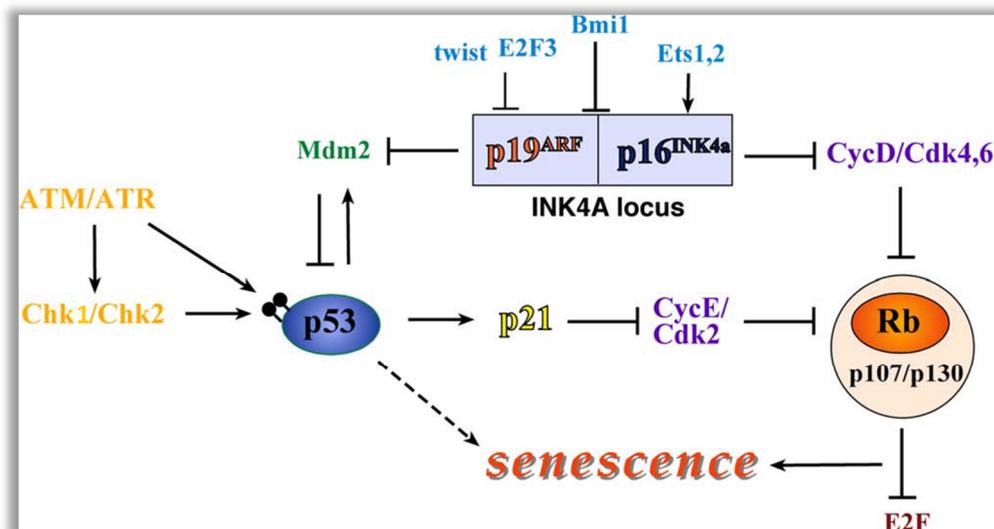


Figura 10 – Circuito molecular de Senescência Celular. (PORATH.,et al, 2005)

O autor descreve que, em fibroblastos de embriões de ratos (MEF), a inativação de p53 é suficiente para evitar senescência, permitindo que as células continuem se dividindo. Células com genes pRb mutados senescem normalmente, porém a inativação de membros da família pRb (p107ep130) é insuficiente para evitar senescência. Nesse caso, ambos p53 e pRb são necessários para iniciar senescência celular, considerando que os membros da família pRb são capazes de prover a redundância para a função de pRb. Isso sugere uma via linear, na qual a sinalização ativa p53, que torna a ativar pRb. A proteína p21, uma inibidora de ciclina E/CDK2, é uma candidata natural a relacionar a via linear de ativação de p53

e pRb. Em MEF, se p21 estiver alterado, a célula sofre senescência normalmente; isso indica que p21 não é um fator crucial nessa cadeia ou que outras proteínas podem compensar esta função.

Alguns estudos com fibroblastos humanos indicam que ao contrário do comportamento de células de ratos, a inativação de p53 e pRb é requerida para evitar senescência celular, enquanto a inativação de qualquer outra proteína pode apenas atrasar o início da senescência. Isto sugere que p53 e pRb são ativadas em paralelo em um desempenho parcialmente redundante. Em outros estudos, a inativação ou de p53, ou de pRb permanece suficiente para evitar a senescência ou, pelo menos, o seu atraso.

Seguindo o que a literatura afirma sobre o modelo de grafo, proposto por Porath e colaboradores, foi possível elaborar um algoritmo, considerando as particularidades das regras Booleanas e as condições iniciais, sendo desenvolvido através do software Mathematica 7.0.

3.3 Simulação

3.3.1 Simulação do Algoritmo

No algoritmo simulado, a dinâmica é simulada pela atualização de todos os elementos da rede sincronizada, considerando assim, as condições iniciais aleatórias, a partir de uma análise da convergência das dinâmicas para as diferentes condições iniciais, estas podem ser obtidas a partir de uma média dos números de estados, Verdadeiro ou Falso, em cada variável. A média nada mais é do que a representação da saída da rede regulatória, ou seja, a resposta final. A partir dessa resposta, o algoritmo permite construir um gráfico indicando a evolução da variável ou das variáveis para um determinado número de atualizações.

3.3.2 Análise da Rede

A rede proposta por Porath e Weinberg, descrita na tabela 3, contém 20 nós e 38 interações representadas no grafo, indicado na figura 10. Essas regras Booleanas também estão dispostas na tabela 3, concordando com a figura 10. As informações experimentais sobre o envolvimento de componentes específicos na rede foram consideradas para a construção das interações. A elaboração do algoritmo consiste em encontrar qual nó pode determinar o estado de senescência. Para isso, foram necessárias simulações, momento em que alguns elementos foram ignorados, ou seja, foi mantido o estado fixo (Falso) dos elementos, pois, de acordo com Porath e Weinberg, são necessárias algumas condições para que o estado de senescência seja alcançado. O algoritmo do Mathematica 7.0, desenvolvido para esse estudo, encontra-se em anexo.

Tabela 3 – Regras Booleanas para os elementos da rede indicada na figura 10. seta = and; barra para direita = or; linha com barra = not

01	ATM	ATM
02	ATR	ATR
03	C12	ATM or ATR
04	CHK1	CHK1
05	CHK2	CHK2
06	C34	CHK1 or CHK2
07	C34	C12
08	P53	C34 or C12
09	Mdm2	P53
10	TWISTE2F3	TWISTE2F3
11	BMIT	BMIT
12	EST2	EST2
13	P19	not TWISTE2F3 or not BMIT or EST2
14	P16	not TWISTE2F3 or not BMIT or EST2
15	CYCD	not P19 and P16
16	CDK6	not (P19 and P16)
17	P21	P53
18	CYCE	not P21
19	CDK2	not P21
20	CDK4	CDK4
21	RB	not CYCE and CDK2 or not (CYCD and CDK4 and CDK6)
22	E2F	not RB
23	SENESCENCIA	P53 or (RB and not E2F)

No artigo original de Porath e Weinberg, é estudada a importância dos ativadores de senescência celular, sendo p53 e pRb os principais deles. P53 pode ativar pRb através de p21, juntamente com outras proteínas não descritas; porém, senescência celular pode ser ativada independentemente de pRb. A ativação de pRb pode ser desencadeada pela inibição do fator de transcrição E2F. PRb também pode ser ativada a partir de p21 ou de p16. P53 pode ser ativado pelas vias ATM/ATR e também pelo locus ARF/INK4.

Considerando o estado para cada nó, foi possível identificar quais elementos seriam variados ou inibidos se mantidos no estado *FALSE*, e quais seriam mantidos em estado fixo, com estados *TRUE* ou *FALSE*. Considerando a dinâmica do tempo computacional, foi possível utilizar simulações com diferentes condições iniciais e diferentes números de interação, mas, para a definição dos resultados, no presente trabalho, as simulações foram realizadas com 200 condições iniciais e 20 condições de interação. Para $K1 = 200$ condições iniciais aleatórias, teremos 200 estados aleatórios (0,1) ou (TRUE, FALSE). Após reconhecer uma condição inicial, por exemplo, primeira condição inicial entre as 200, o algoritmo irá reconhecer a quantidade de iterações $K2 = 20$, ou seja, esse será o número de vezes que o algoritmo irá reiniciar, com a primeira condição inicial. Sendo assim, o estado de senescência celular é obtido a partir das simulações através da média entre os diferentes estados obtidos em cada atualização, considerando as 200 simulações. Para que essa evolução ocorra corretamente, são necessárias regras de atualização para os elementos que precisam de condições iniciais aleatórias.

O comportamento da rede de senescência é mostrado no capítulo de resultados, considerando as condições propostas para a simulação.

Posto isso, os resultados da simulação foram obtidos da seguinte forma:

Para o estado de senescência, nenhum dos nós foi inibido (estado false)

Foram inibidos, individualmente, p53, pRb, p21, p16.

Foram inibidas as vias que, segundo o artigo de Porath e Weinberg, são redundantes, via p53-p21, p16-pRb.

Foram inibidos simultaneamente os genes p53-pRb.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da Simulação Rede de Senescência Celular

Senescência celular é um dos mecanismos utilizados pela célula para restringir sua proliferação. Esses mecanismos, através de vários componentes, são responsáveis também pela regulação do ciclo celular, tendo a capacidade de controlar desde a progressão do ciclo celular até o acúmulo de mutações, que são responsáveis pelo desenvolvimento de câncer humano. (KHLEF, S. N. et al., 1996, RODIER, F. et al., 2011). Assim, o envelhecimento e o câncer implicam a deterioração das funções fisiológicas, após um período de desenvolvimento no organismo humano.

A manutenção funcional e homeostática do tecido é responsável pela taxa de perda e renovação celular (ZHANG 2007), que leva ao contínuo crescimento celular. Em se tratando de nível molecular, o desenvolvimento do câncer está relacionado a componentes-chave de proliferação e/ou vias de sinalização. As alterações genéticas e os mecanismos epigenéticos contribuem para as sinalizações das vias oncogênica, inativando inibidores de crescimento e vias de supressão de tumor. A senescência celular, que é caracterizada pela parada da proliferação, torna-se uma importante aliada nas defesas contra o câncer (CAINO, M. C et al., 2009).

Sendo assim, a relação entre senescência, envelhecimento e câncer, a partir do modelo proposto por Porath, considera que a topologia da rede foi descrita através das vias de ativação, garantindo um mecanismo em que a célula não seja prejudicada no recomeço do seu ciclo celular.

Diante disso, essa regulação da senescência foi descrita experimentalmente tanto para fibroblastos humanos, como para fibroblastos de ratos, e, em algumas situações, foi provada, sendo possível demonstrar, a partir do algoritmo escrito, a rede regulatória proposta.

- A inativação de ambos p53 e pRb é necessária para evitar senescência (PORATH et al 2005);

- A inativação de p21 é, em alguns casos, suficiente para prevenir a senescência (PORATH et al., 2005);
- A partir de vias redundantes ou independentes, é sugerido que ambos p53 e pRb sejam inibidos, estado Falso, para evitar a senescência (PORATH et al., 2005, ZHANG, 2007, KONG et al., 2011);
- A inativação de p16 é, em alguns casos, suficiente para prevenir a senescência (CAMPISI et al., 2003, PORATH et al., 2005, ZHANG, 2007);
- A inativação de pRb é suficiente para evitar a senescência (CAMPISI et al., 2003, PORATH et al., 2005, ZHANG, 2007);
- A inativação da via p53-p21 é, em alguns casos, suficiente para prevenir senescência (PORATH et al., 2005, ZHANG, 2007);
- A inativação da via p16 é, em alguns casos, suficiente para prevenir senescência (CAMPISI et al., 2003, MALLETTTE et al., 2004, PORATH et al., 2005, ZHANG 2007);

De acordo com as regras Booleanas (seta = and; barra para direita = or; linha com barra = not) os elementos da rede indicada, na figura 10, demonstram o estado de senescência celular como é possível observar no gráfico 1. Para esse resultado, o nó que representa o estado de senescência celular foi mantido ativo e se encontra na tabela 3 na linha 23, assim como os demais nós não sofreram alteração. De acordo com a proposta de Porath, é assegurado o estado de senescência celular.

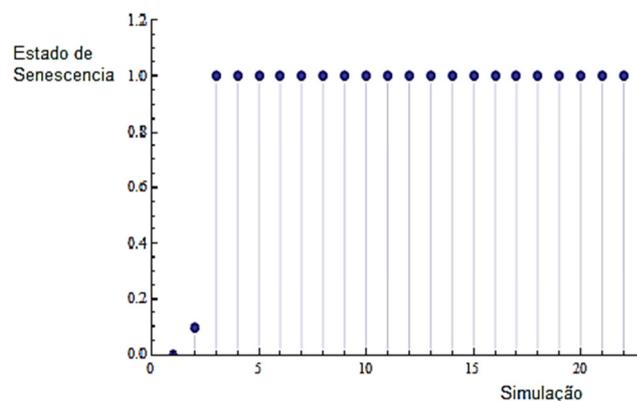


Gráfico 1 – Todos genes ativados resultando na ativação de senescência celular

Para a obtenção dos demais resultados dos gráficos, foi necessário mutar (FALSE) alguns genes. A partir da simulação proposta na tabela 3, foram mutados os genes p53, p16, pRb e p21; então, no algoritmo foram inativados estes genes, como é possível observar no gráfico 2, ou seja, para cada gráfico, foi realizada a simulação, inativando a linha correspondente ao gene que deveria ser inativado. Por exemplo, na tabela 3, para inativar o gene p53, a linha 08 foi inativada (FALSE), e o resultado é assim observado no gráfico 2 a), o que ocorre sucessivamente para os demais genes estudados, conforme é observado na tabela 3.

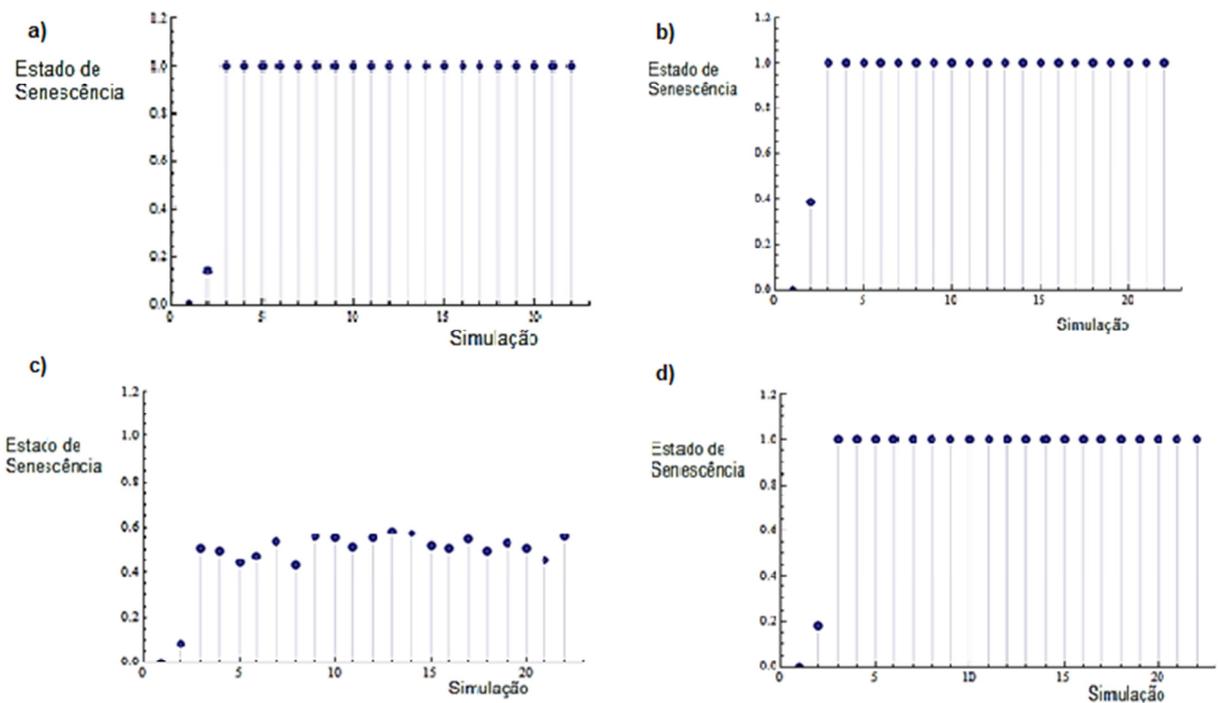


Gráfico 2 – No gráfico “a”, o gene p53 é inibido. No gráfico “b”, o gene é p16^{INK4a} inibido. No gráfico “c”, o gene é pRb inibido. No gráfico “d”, o gene p21 é inibido.

De acordo com a literatura, p53 e pRb formam vias redundantes; no entanto, quando mutadas, simultaneamente, são capazes de evitar a senescência celular, o que é possível observar no gráfico 3 e) (PORATH et al., 2005, ZHANG, 2007, KONG et al., 2011). Ainda segundo as observações de Porath, existe a redundância das vias que podem ativar senescência celular. Nessa observação, encontra-se a via p53-p21 que se mutada, é, em alguns casos, suficiente para prevenir

senescência celular, o que pode ser observado no gráfico 3 f). A via p16-pRb é, em alguns casos, suficiente para evitar a senescência celular, o que pode ser observado no gráfico 3 g).

Assim, em cada gráfico, foi executada a simulação, gerando a inativação da linha que corresponde aos genes da via, os quais precisavam ser inativados. Por exemplo, na tabela 3, para inativar o gene p53, a linha 08 foi inativada (FALSE), e para inativar o gene pRb, a linha 21 foi inativada (FALSE), ocorrendo esses processos simultaneamente. O resultado disso é verificado no gráfico 3 e), o que ocorre sucessivamente para os demais genes estudados, conforme é observado na tabela 3.

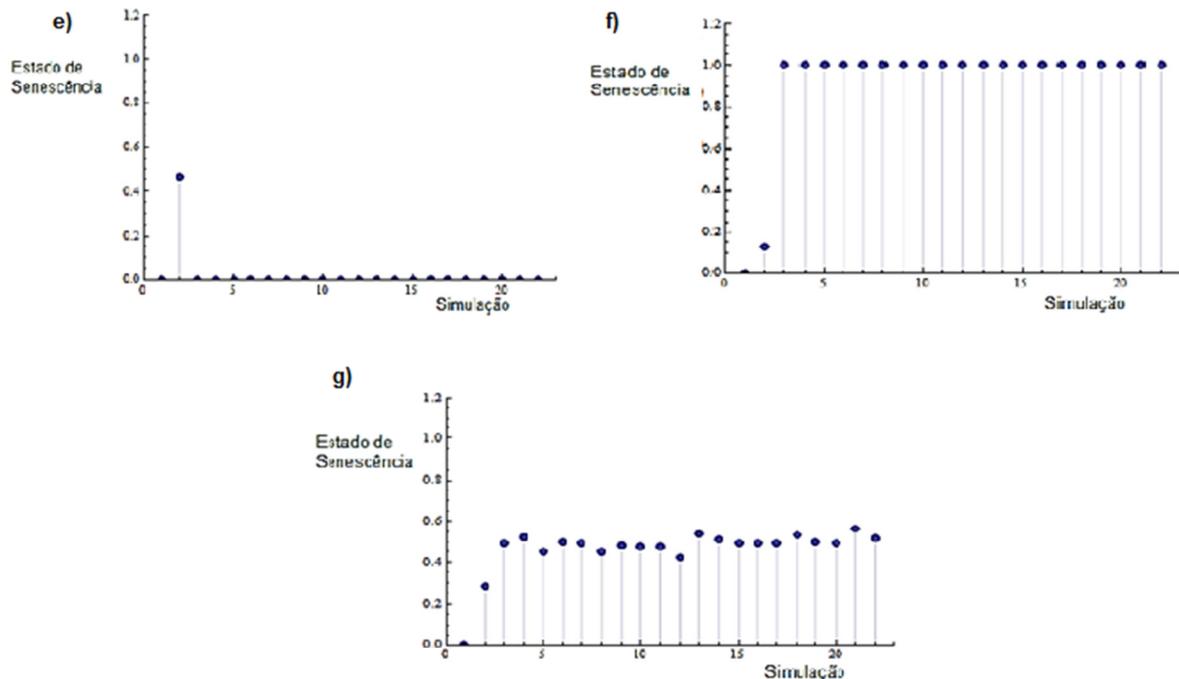


Gráfico 3 – No gráfico “e”, os genes p53 – pRb são simultaneamente inibidos. No gráfico “f”, os genes p53-p21 são simultaneamente inibidos, pertencentes a uma das vias redundantes da rede de senescência celular. No gráfico “g”, os genes p16 – pRb são simultaneamente inibidos pertencentes a uma das vias redundantes da rede de senescência.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi apresentada a integração teórica e experimental, compreendendo a dinâmica para a modelagem de uma rede regulatória de senescência celular. Com a ajuda de uma ferramenta computacional, foi possível comparar dois métodos de análise para a rede regulatória, levando em conta alguns tipos de sinalização. Com uso do software Mathematica 7.0, baseado em um modelo proposto por Porath e Weinberg, foi possível a construção de um algoritmo. A partir disso, a dinâmica da rede foi explorada através de uma modelagem lógica; através de uma revisão da literatura, identificaram-se as interações inibitórias e excitatórias entre os genes com operadores booleanos para desenvolver a rede regulatória. Assim, a construção do algoritmo possibilitou o entendimento de alguns mecanismos, como a compreensão do comportamento da rede regulatória em termos de mutações, que ocorrem com os principais reguladores do estado senescente. Nesse sentido, as simulações indicam que as vias são independentes para promover a parada do ciclo celular e a entrada da célula no estado senescente. Além disso, as simulações mostraram que a inibição de p53, p21 e p16 individualmente é, em alguns casos, suficiente para prevenir e não para evitar a senescência celular; no entanto, o desligamento de pRb é essencial para prevenir a senescência, pois com ele o estado de senescência se mantém em 50% das simulações. A simulação mostrou que a inativação simultânea de p53 e pRb é capaz de bloquear a senescência; porém, a via p16-pRb não é, em alguns casos, essencial para prevenir a senescência, enquanto que a via p53-p21, mesmo inativada, é, em alguns casos, suficiente para prevenir e não evitar estado de senescência, o que concorda com a literatura (DENG et al., 2008, ZHANG, 2007). Para entendermos melhor o funcionamento da rede regulatória, foi necessário também envolver os genes que podem influenciar a ativação da rede proposta por Porath e Weinberg. Segundo Lange 2009, em condições normais, ATM é reprimido por TRF2, uma proteína do complexo de sheltering, necessária para a manutenção da estrutura t-loop nos telômeros. O desgaste dos telômeros e a perda de TRF2 induz à ativação de ATM, observada no DNA telomérico, junto com acúmulo de danos no DNA e de gamma-H2AX. A resposta para danos no DNA, em função do desgaste dos

telômeros, não é completamente dependente de ATM, mas envolve também a fita simples do DNA telomérico, cuja exposição inicia a ativação de ATR, a partir de POT1; ATR depende de POT1. Sua deleção resulta em resposta ao dano em telômeros, evidenciando o acúmulo de dano no DNA. POT1 é proposto para bloquear a sinalização da cinase ATR, impedindo a ligação de RPA; as fitas simples de DNA ligam as proteínas que ativam a via da cinase ATR. Sabendo que p53 é ativado pela via ATM/ATR-Chk1/Chk2, ARF acaba tendo um papel importante na via, envolvendo p53, um fator de transcrição que regula genes envolvidos no checkpoint do ciclo celular. ARF (CDKN2D) é ligado à proteína HMD2, que é responsável pela degradação de p53, e assim resultando na sua instabilidade. P53 ativa p21 que é um inibidor do complexo CDK's, provocando assim paradas do ciclo ou em G1, ou em G2. Desta forma, é possível entender que ARF (CDKN2D), RAD50, RPA, estão em um nível de expressão alterado ou elevado em relação aos genes do complexo Sheltering, o que pode indicar a ativação da senescência celular.

Portanto, o estudo da Modelagem Lógica de Senescência Celular Humana representou uma oportunidade de relacionar dois estudos de tão grande importância, teórico e experimental (modelagem lógica Booleana e estudo do ciclo celular, senescência celular). Com esse trabalho, pode-se observar o funcionamento e atividade celular, no caso de senescência celular, o que oportuniza não só para os envolvidos nesse trabalho, mas também para a comunidade científica acadêmica verificar como ocorrem os processos de regulação celular. Com base nisso, pode-se dizer que esse estudo não se limita ao que foi aqui desenvolvido, mas pode ser ampliado para outros métodos mais aprofundados para a também construção de outras redes de regulação genética.

REFERÊNCIAS

ALBERT, R. Scale-Free Networks in Cell Biology. **J Cell Sci.** v 118, 4947-4957.(2005)

ALBERT, R., WANG, R. Discrete Dynamic Modeling of Cellular Signaling Networks. *Methods in Enzimology*. **Elsevier Inc.** v. 467, 281-306.2009.

ALBERTS, B., et al. *Fundamentos da Biologia Celular*. 2ªed Artmed. Porto Alegre Brasil. 2006.

BARABÁSI, A.L., OLTVAI,Z. Network biology: Understanding the cell's functional organization. **Nature Rev Genetics**, v. 5 p. 101-113. 2004.

BURROWS, A.E.; ELLEDGE, S. J. How ATR turns on: TopBP1 goes on ATRIP with ATR. **Genes Dev.**, v. 22, p. 1416–1421. 2008.

CAINO, M. C., et al, Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. **Springer Science Business Media**. v. 14, p. 392-408. 2009.

CAMPISI, J., FAGAGNA, F. D. Cellular Senescence: When bad things happen to good cells. **Nature Rev. Mol. Cell. Bio.**, v. 8, p. 729-740. 2007.

CHAOUIYA, O., et al. Qualitative analysis of Regulatory Graphs: A computational tool based on a discret formal framework. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. LNCIS, v. 294, p. 119-126.2003

CHEUNG, C. T. et al. Molecular bridging of aging and cancer. **Ann. N. Y Acad. Sci.**, v1197, p 129-133. 2010.

CSIKÁSZ-NAGY, A. Computational systems biology of the cell cycle. **Brief Bioinformatics** v. 10(4), p. 424-434. 2009.

ELMOLE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **NIH Public Access (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH) Toxicol Pthol.** v. 35(4), p. 495-516. 2007.

FAGAGNA, F. D. Living on a Break: cellular senescence as a DNA-damage response. **Nature Review.**, v. 8, p. 512-522. 2008.

FAURÉ, A., et al, Dynamical analysis of a generic Boolean Model for the control of the mammalian cell cycle. **Bioinformatics** v 22(14),p 124-131. 2006,
FRAGKOS, M. et al, H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway. **Molecular and Cellular Biology**. v. 29(10), p. 2828-2840.2009.

GIL, J.; PETERS, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4 a tumor supressor locus: all for one or one for all. **Nature Rev. Mol. Cell. Bio**, v. 7, p. 667-677. 2006.

GRIVICICH, I., et al. Programmed cell death. **Rev. Bras. De Cancerologia**. V 53(3) p. 335-343. 2007.

GROS, C. Complex and Adaptive Dynamical System.**Springer-Verlag Berlin Eidelberg**. 2008.

HARRIS, S.L., LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedbackloops.**Oncogene**, v. 24, p. 2899-2908. 2005

HAUPT, S. ET AL. Apoptosis – The p53 network. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 4077-4085. 2003.

KARLEBACH, G., SHAMIR, R., Modellingand analysis of gene regulatory network. **Nature** v. 9, p. 770-780.(2008).

KHLEIF,S. N., et al, Inhibition of cyclin D-CDK4/6 activity is associated with as E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. **Cell Biology** v. 93, p. 4350-4354. 1996.

KONG, Y. et al. Regulation of Senescence in Cancer and Aging. **Journal of Aging Research**, v. 963172, p. 01-15. 2011.

KUILMAN, T. et al.The essence of senescence.**Genes Dev**. v. 24, p. 2463-2479.2010.

KYLE, L-W.**Senescence Signaling, regulation and bypasss by telomere maintenance**.2010. 301f. Tese Doutorado (Doutorado em Filosofia) - University of Glasgow, Reino Unido. 2010.

LANGE, T. How telomeres solve the end-protection problem. **Science**, v. 326, p. 948-952. 2009.

MALLETTE, F. A., et al, Human fibroblast require the Rb family of tumor suppressors, but p53 for PML-induce senescence. **Nature Pub G. Oncogene**.v. 23, p. 91-99. 2004.

MEUTH, M. Chk1 suppressed cell death.**Cell Division**, v. 5, p. 1-6. 2010.

NEWMAN, M. E. J The Structure and Function of Complex Network.**SIAM review** v 45, 167-256 2003.

PALSSON,B. Systems Biology. San Diego US **Cambridge University Press** 1ed. p. 322. 2007.

PORATH, I. B WEINBERG, R.A.,.The signals and pathways activating cellular senescence.**The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**.v. 37, p. 961-976. 2005.

RODIER, F. CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. J. Cell Biol., **The Journal of Cell Bio.** v. 14, 2011.

SANCAR, A. et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage.**Annu.Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85. 2004.

SARETZKI, G. Cellular Senescence in the development and treatment of cancer.**Current Pharmaceutical Desing.** v. 16, p. 79-100. 2010.

SHMULEVICH, I., DOUGHERTY, E.R.,KIM, S., ZANG, W. Probabilistic Boolean Networks: A Rule-Based Uncertainty Model for Gene regulatory Networks. **Bioinformatics**, v. 18(2), p. 261-274. 2002.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 903 p.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.**Cell Prolif.**, v. 36, p. 131-149. 2003.

WU, Y.; ZAKIAN, A. Identity crisis when telomeres left unprotected.**Journal of Mol. Cell. Bio.**, p. 1-3. 2009.

YOO, H. Y. et al. The Mre11-Rad50-Nbs1 complex mediates activation of TopBP1 by ATM. **Mol. Biol. Cell.**, v. 20, p. 2351-2360. 2009.

ZHANG, H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. **J. Cell Physiol.**, v. 210, p. 567-74. 2007.

ZUCKERMAN, V., et al. Tumor suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. **Journal of Pathology**, v. 219. p. 3-15. 2009.

ANEXO

ANEXO 1 – Algoritmo da Rede Regulatória de Senescência Celular no Mathematica 7.0

(*Entre com o número de condições iniciais*)
k1=200;

(*Entre com o número de interações*)
k2=5;

(*Entre com o número de elementos presentes nas condições iniciais*)
k3=3;

(*Estes comandos são usados para gerar estados aleatórios para elementos que precisam de condições iniciais*)

```
VAL1=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI1[0]=Table[If[VAL1[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL2=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI2[0]=Table[If[VAL2[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL3=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI3[0]=Table[If[VAL3[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL4=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI4[0]=Table[If[VAL4[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL5=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI5[0]=Table[If[VAL5[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL6=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI6[0]=Table[If[VAL6[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL7=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI7[0]=Table[If[VAL4[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL8=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI8[0]=Table[If[VAL8[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL9=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI9[0]=Table[If[VAL9[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL10=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI10[0]=Table[If[VAL10[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
VAL11=Table[Random[Integer],{i,k1}];
VI11[0]=Table[If[VAL11[[i]]==1,True,False],{i,k1}];
```

(*Esta lista AVL é usada para gerar estados aleatórios para elementos aleatórios durante a dinâmica da rede*)

```
AVL={True, False};
```

(*Definição de comandos para a obtenção de uma Lista Aleatória de n inteiros*)

```
Q=RandomRelist[x_List]:=Block[{n=x,p},Do[p=Random[Integer,{1,i}];n[[{p,i}]]]=n[[{i,p}]],{i,Length[x]};n];
```

(*Regras de Atualização*)

```

VD=Table[
  {{VIA1[1]=VI1[0][[i]];
VIA2[1]=VI2[0][[i]];
  VIA3[1]=VI3[0][[i]];
  VIA4[1]=VI4[0][[i]];
  VIA5[1]=VI5[0][[i]];
  VIA6[1]=VI6[0][[i]];
  VIA7[1]=VI7[0][[i]];
  VIA8[1]=VI8[0][[i]];
  VIA9[1]=VI9[0][[i]];
  VIA10[1]=VI10[0][[i]];
  VIA11[1]=VI10[0][[i]];
  VIA12[1]=VI11[0][[i]];
  ATM[1]=VIA1[1];
  ATR[1]=VIA2[1];
  CHK1[1]=VIA3[1];
  CHK2[1]=VIA4[1];
  BMIT[1]=VIA5[1];
  EST2[1]=VIA6[1];
  CDK4[1]=VIA7[1];
  TWISTE2F3[1]=VIA8[1];
  Mdm2[1]=VIA9[1];
  P19[1]=VIA10[1];
  P16[1]=VIA11[1];

```

```

{TAG[j]={AVL[[Table[RandomRelist[Range[j]],{j,2}][[2]][[1]]],AVL[[Table[RandomRelist[Range
[j],{j,2}][[2]][[1]]]]];

```

```

{
  ATM[j+1]=ATM[j];
  ATR[j+1]=ATR[j];
  C12[j+1]= ATM[j] && ATR[j];
  CHK1[j+1]=CHK1[j];
  CHK2[j+1]=CHK2[j];
  C34[j+1]=CHK1[j] &&CHK2[j];
  C34[j+1]=C12[j+1];
  P53 [j+1]= TAG[j][[Table[RandomRelist[Range[j]],{j,2}][[2]][[1]]]]*(C34[j+1] || C12[j+1]) ||
!TAG[j][[Table[RandomRelist[Range[j]],{j,2}][[2]][[1]]]]);
  Mdm2[j+1] = P53[j+1] || !((TAG[j][[Table[RandomRelist[Range[j]],{j,2}][[2]][[1]]]] &&
(TAG[j][[Table[RandomRelist[Range[j]],{j,2}][[2]][[1]]]]));
  TWISTE2F3[j+1]=TWISTE2F3[j];
  BMIT [j+1] = BMIT [j] ;
  EST2[j+1]= EST2[j];
  P19[j+1]=! TWISTE2F3[j] || ! BMIT [j] || EST2[j];
  P16[j+1] = ! TWISTE2F3[j] || ! BMIT [j] || EST2[j];
  CYCD[j+1]=!P19[j] &&P16[j];
  CDK6[j+1]=!(P19[j+1] &&P16[j+1]);
  P21[j+1]=P53[j+1];
  CYCE[j+1]=!P21[j+1];
  CDK2[j+1]=!P21[j+1];CDK4[j+1]=CDK4[j];
  RB[j+1] =!CYCE[j]&&CDK2[j] || !( CYCD[j+1]&&CDK4[j]&&CDK6[j]);
  E2F [j+1]= !RB[j+1];
  SENESENCIA [j+1]= P53[j+1] || (RB[j+1] && !E2F[j+1])

```

```

},
{i,k1},{j,k2}
];

```

```
ITERA=Table[Flatten[VD[[i]],{i,1,k1}]
```

```
CONVERESTADOS=Table[If[ITERA[[i,j]]==True,1,0],{i,1,k1},{j,1,k2}]
```

```
SEPARAESTADOS=Table[CONVERESTADOS[[i,j]],{j,k2},{i,k1}]
```

```
Quantidade=Table[Sum[SEPARAESTADOS[[m]][[i]],{i,k1}],{m,k2}]
```

```
Porcentagem=Table[(Quantidade[[i]])/k1,{i,k2}]
```

```
Li=Flatten[List[0,Random[]/2,Porcentagem]]
```

```
Grafico= ListPlot[Li,Filling@Axis,PlotRange@{{0,(k2+3)},{0,1.1}},PlotStyle ->PointSize[.02]]
```