

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**

Eugênio Simão

Redes de Regulação Gênica:

um modelo integrado da regulação do metabolismo do
triptofano em *Escherichia coli* sob o formalismo de
Redes de Petri.

Tese submetida à Universidade Federal de Santa Catarina
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Química

**Prof. Luismar Marques Porto, Ph.D.
Orientador**

Florianópolis, Dezembro de 2006

Redes de Regulação Gênica:

um modelo integrado da regulação do metabolismo do triptofano em *Escherichia coli* sob o formalismo de Redes de Petri.

Eugênio Simão

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, na Área de Concentração de **Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Coordenador – CPGENQ/UFSC

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Membro Interno, EQA/CTC/UFSC

Profa. Dra. Cíntia Soares
Membro Externo, UNERJ

Prof. Dr. Maurizio Tazza
Membro Externo, UTFPR

Profa. Dra. Regina Vasconcellos Antônio
Membro Externo, BQM/CCB/UFSC

Prof. Dr. Vitório Bruno Mazzola
Membro Externo, INE/CTC/UFSC

*Relógio! deus sinistro, hediondo, indiferente,
Que nos aponta o dedo em riste e diz: "Recorda"
A dor vibrante que a alma em pânico te acorda
Como num alvo há de encravar-se brevemente.
(As flores do mal, Charles Baudelaire.)*

Aos meus pais...
Emílio e Clara Simão

Agradecimentos

Expresso meus sinceros agradecimentos primeiramente aos gestores do programa de pós-graduação de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, CPGENQ, representados pelo Professor Agenor Furigo Junior, pela amplitude de visão ao incluir a formação multidisciplinar e multicurricular, o que permitiu minha inserção, neste programa. Neste contexto, estendo meus agradecimentos ao meu orientador Professor Luismar Marques Porto, por impelir seus orientados às fronteiras da ciência, com paciência e determinação, bem como aos professores do programa e em especial a Professora Regina Vasconcelos Antônio. Também, agradeço ao CNPq pela bolsa “sanduíche” concedida no período de setembro 2004/2005 para complemento e realização de pesquisa junto a Université de La Méditerranée, AIX-Marseille II, França. Agradeço a Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, pela aceitação e reconhecimento de equivalência curricular ao DEA, diploma de estudos aprofundados, o que permitiu minha inscrição no programa de Bioinformática para o período da bolsa sanduíche. Ao Institut de Biologie du Développement de Marseille, IBDM, e ao grupo de pesquisa do Laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement, LGPD, deste instituto que por um breve período tive a felicidade de fazer parte. Ao meu orientador na França, Denis Thieffry, chefe do LGPD, e sua equipe, em especial a Claudine Chaouiya e Elisabeth Remy. Finalmente, agradeço a Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, pelo suporte financeiro através do programa de formação de professores.



Universidade Federal de Santa Catarina, CPGENQ.



Resumo da tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Redes de Regulação Gênica:

um modelo integrado da regulação do metabolismo do triptofano em *Escherichia coli* sob o formalismo de Redes de Petri.

Eugênio Simão

Dezembro de 2006

Orientador: Prof. Luismar Marques Porto, Ph.D.

Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Palavras-chave: **Redes de Regulação Genômicas, Redes de Petri, Biologia Molecular Computacional, Biologia de Sistemas.**

Número de páginas: 135

Vias metabólicas são descritas por um conjunto de reações bioquímicas acopladas por um metabólito intermediário em comum. Cada uma das reações deste conjunto é facilitada pela presença de uma enzima. O estudo destes sistemas geralmente assume que a concentração de enzimas é constante e seu efeito é abstraído pela velocidade de reação identificada por seu parâmetro cinético correspondente. Enzimas por sua vez, são o resultado de uma complexa rede de interações biomoleculares governadas por um conjunto de sinais que podem levar a ativação ou a repressão da produção destas enzimas. Com o avanço da biologia molecular e conseqüentemente das inovações tecnológicas relacionadas, a quantidade de informações disponível possibilita considerar também as redes de regulação genômica que dão origem às enzimas e incluí-la na análise de vias metabólicas. Redes de regulação genômicas demonstram um forte caráter combinatório, enquanto que reações bioquímicas demonstram um caráter fluido e contínuo. Desta forma, a modelagem e análise de vias metabólicas reguladas naturalmente enquadram-se sob o domínio de sistemas híbridos. No entanto, como uma primeira abordagem de validação ou refutação de hipóteses sobre observações biológicas, vias metabólicas reguladas podem ser modeladas e analisadas por métodos formais da matemática discreta. Neste trabalho, redes de regulação genômicas serão modeladas e analisadas pelo formalismo de grafos regulatórios e reações bioquímicas por redes de Petri. Em seguida, o grafo de regulação será transcrito para um modelo equivalente em termos de redes de Petri. Finalmente, o modelo integrado da via metabólica com a rede de regulação, ambas sob o formalismo de rede de Petri, será analisado. Os mecanismos de regulação da produção do aminoácido aromático triptofano pela *Escherichia coli* serão utilizados para compor o modelo biológico.

Thesis abstract presented to Universidade Federal de Santa Catarina as a partial fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor in Chemical Engineering

Genetic Regulatory Networks:

an integrated model for the metabolic regulation
in *Escherichia coli* tryptophan biosynthesis
under the Petri Nets formalism.

Eugênio Simão

December 2006

Advisor: Prof. Luismar Marques Porto, Ph.D.

Concentration area: Chemical and Biotechnological Processes.

Keywords: **Genetic Regulatory Networks, Petri Nets, Computational Molecular Biology, Systems Biology.**

Number of pages: 135.

Metabolic pathways can be described by a set of biochemical reactions coupled by a common intermediate metabolite. Each one of these reactions is facilitated by the presence of an enzyme. Biochemical reactions modeling always assume a constant enzyme concentration, and its effect on the system is abstracted by its corresponding kinetic parameter. Enzymes are the result of a complex biomolecular interactive network, ruled by a set of signals, which can activate or deactivate the process of enzyme production. Molecular biology recent discoveries and its accompanying technological innovations produce an enormous set of molecular level information, which permits to consider the inclusion of genetic regulatory networks to the analyses of biochemical networks. Genetic regulatory networks have a strongly combinatorial behavior, while biochemical networks exhibits a fluid and continuous character. Therefore, regulated biochemical networks are naturally under hybrid system domain of modeling and analysis. However, discrete mathematical methods can be used to model regulated metabolic pathways as a first method to validate or refuse biological hypothesis. In this work, genetic regulatory networks will be modeled and analyzed under the regulatory graph formalism, and biochemical networks as Petri nets. In the sequel, the logic regulatory graph will be translated to an equivalent Petri net model. Finally, the model resulted from the integration of biochemical networks with the genetic regulatory network, both in terms of Petri nets, will be analyzed. The regulatory mechanisms of tryptophan production by *Escherichia coli* will be used as a biological model.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XVII
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
1.1. APRESENTAÇÃO	1
1.2. TRABALHOS CORRELATOS	2
1.3. MOTIVAÇÃO.....	3
1.4. OBJETIVOS DO TRABALHO	3
1.4.1. <i>Objetivo Geral</i>	3
1.4.2. <i>Objetivos Específicos</i>	4
1.5. ORGANIZAÇÃO DO TEXTO	4
CAPÍTULO 2	6
FUNDAMENTAÇÃO BIOLÓGICA.....	6
2.1. VIA DOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS.....	7
2.2. REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE TRIPTOFANO.....	9
2.2.1. <i>Via Metabólica Para o Triptofano</i>	9
2.2.2. <i>O Operon do Triptofano</i>	10
2.2.3. <i>Repressão da Transcrição</i>	12
2.2.4. <i>Atenuação da Transcrição</i>	12
2.2.5. <i>Inibição por Produto Final da Via</i>	14
2.3. RESUMO.....	15
CAPÍTULO 3	17
FUNDAMENTOS DE REDES DE PETRI.....	17
3.1. PRINCÍPIOS DE REDES DE PETRI	18
3.1.1. <i>Dualidade</i>	19
3.1.2. <i>Representação Gráfica</i>	19
3.1.3. <i>Representação Algébrica</i>	21
3.1.4. <i>Matrizes de Incidência</i>	22
3.2. REGRAS DE OCORRÊNCIA	23
3.2.1. <i>Marcação</i>	24
3.2.2. <i>Conjunto de Alcançabilidade</i>	25
3.2.3. <i>Equações de Estado</i>	26
3.2.4. <i>Localidade</i>	27

3.2.5. Concorrência.....	27
3.2.6. Conflito.....	27
3.2.7. Confusão.....	28
3.3. REFINAMENTO E COMPOSIÇÃO.....	28
3.3.1. Borda de Um Conjunto.....	28
3.3.2. Abstração Simples.....	28
3.3.3. Abstração.....	29
3.3.4. Abstração Estrita.....	30
3.4. PROPRIEDADES DAS REDES DE PETRI.....	31
3.4.1. Propriedades Comportamentais.....	31
3.4.1.1. Alcançabilidade (reachability).....	31
3.4.1.2. Grafos de Cobertura.....	33
3.4.1.3. Vivacidade (liveness).....	35
3.4.1.4. Limitabilidade (Boundedness).....	36
3.4.1.5. Reversibilidade (Reversibility).....	36
3.4.1.6. Conformidade (fairness).....	36
3.4.2. Propriedades Estruturais.....	37
3.4.2.1. Limitabilidade Estrutural.....	37
3.4.2.2. Invariância de Lugar.....	37
3.4.2.3. Invariância de Transições.....	38
3.5. ANÁLISE.....	39
3.5.1. Métodos de Enumeração.....	39
3.5.2. Análise por Transformação.....	39
3.5.3. Métodos de Análise Estrutural.....	40
3.6. RESUMO.....	40
CAPÍTULO 4.....	42
REDES DE PETRI E REAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	42
4.1. SISTEMAS BIOQUÍMICOS.....	43
4.2. MODELAGEM EM TERMOS DE REDES DE PETRI.....	44
4.2.1. Modelo da Oxidação do Carbono.....	44
4.2.2. Modelo Básico.....	45
4.3. CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO.....	46
4.3.1. Modelo Ilimitado.....	46
4.3.2. Modelo Limitado.....	47
4.3.3. Modelo Misto.....	48
4.4. ANÁLISE.....	49
4.4.1. Análise Comportamental.....	49
4.4.1.1. Grafo de Alcançabilidade.....	49
4.4.2. Análise Estrutural.....	50
4.4.2.1. Invariantes de Transição.....	51
4.4.2.2. Invariantes de Lugar.....	53
4.5. RESUMO.....	54
CAPÍTULO 5.....	55

REDES DE REGULAÇÃO GÊNICA.....	55
5.1. GRAFOS DE REGULAÇÃO.....	56
5.1.1. <i>Função Lógica</i>	57
5.1.2. <i>Estado Lógico Estável</i>	59
5.1.3. <i>Seqüências Temporais de Estados Lógicos</i>	59
5.1.4. <i>Definição Generalizada</i>	60
5.1.5. <i>Representação Gráfica</i>	61
5.1.6. <i>Dinâmica do Sistema</i>	62
5.1.6.1. <i>Dinâmica Síncrona</i>	63
5.1.6.2. <i>Dinâmica Assíncrona</i>	64
5.2. TRANSPOSIÇÃO PARA REDES DE REGULAÇÃO.....	65
5.2.1. <i>Regulação do Nodo a</i>	66
5.2.2. <i>Regulação do Nodo b</i>	67
5.2.3. <i>Regulação do Nodo c</i>	68
5.2.4. <i>Análise da Rede de Regulação</i>	69
5.3. RESUMO.....	70
CAPÍTULO 6	72
MATERIAIS E MÉTODOS	72
6.1. AMBIENTES COMPUTACIONAIS.....	72
6.1.1. <i>O Ambiente Computacional GINsim</i>	73
6.1.1.1. <i>Especificando um Grafo de Regulação</i>	73
6.1.1.2. <i>Simulação e Análise</i>	74
6.1.1.3. <i>A Análise de Grafos</i>	76
6.1.2. <i>O Editor de Redes de Petri Snoopy</i>	76
6.1.3. <i>O Ambiente Computacional INA</i>	77
CAPÍTULO 7	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
7.1. MODELO BIOLÓGICO DE REGULAÇÃO DO TRIPTOFANO.....	80
7.2. GRAFO DE REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE TRIPTOFANO.....	82
7.2.1. <i>O Modelo Lógico</i>	82
7.2.1.1. <i>O Nodo Trp</i>	83
7.2.1.2. <i>O Nodo TrpE</i>	83
7.2.1.3. <i>O Nodo TrpR</i>	84
7.2.2. <i>Interações e Espaço de Estados</i>	84
7.2.3. <i>Análise Global</i>	85
7.2.3.1. <i>Triptofano Externo no Nível Baixo</i>	86
7.2.3.2. <i>Triptofano Externo no Nível Médio</i>	86
7.2.3.3. <i>Triptofano Externo no Nível Alto</i>	87
7.2.4. <i>Análise dos Circuitos de Regulação</i>	88
7.2.4.1. <i>Atenuação</i>	88
7.2.4.2. <i>Inibição por Produto</i>	89
7.2.4.3. <i>Repressão da Transcrição</i>	90
7.2.4.4. <i>Repressão da Permease</i>	90

7.3. REDE DE REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO.....	91
7.3.1.1. Regulação do Trp	91
7.3.1.2. Regulação de TrpE.....	92
7.3.1.3. Regulação do TrpR.....	93
7.3.1.4. Rede de Regulação	94
7.4. ANÁLISE DA VIA METABÓLICA PARA O TRIPTOFANO.....	96
7.4.1. <i>Modelo Ilimitado</i>	97
7.4.1.1. Análise Dinâmica	97
7.4.1.2. Análise Estática	97
7.4.2. <i>Modelo Limitado</i>	99
7.4.2.1. Análise Dinâmica	101
7.4.2.2. Análise Estrutural.....	101
7.5. O MODELO INTEGRADO.....	104
7.5.1. <i>Modelo Ilimitado</i>	108
7.5.1.1. Análise Dinâmica	108
7.5.1.2. Análise Estrutural.....	108
7.5.2. <i>Modelo Limitado</i>	108
7.5.2.1. Análise Dinâmica	108
7.5.2.2. Análise Estrutural.....	109
7.6. RESUMO.....	109
CAPÍTULO 8	111
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
REFERÊNCIAS	114

Lista de Figuras

- FIGURA 1. VIA METABÓLICA DOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS. O CORISMATO CONSTITUI UM PONTO DE BIFURCAÇÃO A PARTIR DO QUAL DERIVAM A FENILALANINA, TIROSINA E TRIPTOFANO. ABREVIÇÕES UTILIZADAS: ANTA, ANTRANILATO; AKG, α -CETOGLUTARATO; CDRP, 1-(*o*-CARBOXIFENILAMINO)-1-DEOXIRIBULOSE 5-FOSFATO; CHA, CORISMATO; DAHP, 3-DEOXI-D-AROBINO-HEPTULOSONATO 7-FOSFATO; DHQ, 3-DEIDROQUINATO; DHS, 3-DEIDROSHIQUIMATO; EPSP, 5 ENOLPIRUVILSHIQUIMATO 3-FOSFATO; E4P, ERITROSE 4-FOSFATO; GA3P, GLICERALDEIDO 3-FOSFATO; HPP, 4-HIDROXIFENILPIRUVATO, I3GP, INDOL 3-GLICEROLFOSFATO; IND, INDOL; L-GLN, L-GLUTAMINA; L-GLU, L-GLUTAMATO; L-PHE, L-FENILALANINA; L-SER, L-SERINA; L-TRP, L-TRIPTOFANO; L-TYR, L-TIROSINA; PEP, FOSFOENOLPIRUVATO; PPA, PREFENATO; PPY, FENILPIRUVATO; PRAA, FOSFORIBOSIL ANTRANILATO; PRPP, 5-FOSFORIBOSIL-A-PIROFOSFATO; PYR, PIRUVATO; SHIK, SHIQUIMATO; S3P, SHIQUIMATO 3-FOSFATO. 8
- FIGURA 2. VIA METABÓLICA DE BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO. UM CONJUNTO DE SEIS REAÇÕES É NECESSÁRIO PARA SINTETIZAR O TRIPTOFANO A PARTIR DO CORISMATO. AS DUAS PRIMEIRAS E AS DUAS ÚLTIMAS REAÇÕES SÃO REVERSÍVEIS. TRPE E TRPD, FORMAM UM ÚNICO COMPLEXO ENZIMÁTICO, SENDO QUE O MESMO OCORRE COM TRPA, TRPB E TRPC É UMA ENZIMA BIFUNCIONAL..... 9
- FIGURA 3. OPERON DO TRIPTOFANO DA *ESCHERICHIA COLI*. REGIÃO PROMOTORA (P), REGIÃO DE OPERAÇÃO (O), PEPTÍDEO LÍDER (*trpL*), GENES *trpEDCBA* E PROMOTOR CONSTITUTIVO INTERNO *trpP2*. 11
- FIGURA 4. PROTEÍNA REPRESSORA DA TRANSCRIÇÃO DO TRIPTOFANO CODIFICADA PELO GENE *trpR*. O REPRESSOR INATIVO, APOREPRESSOR, E O ATIVO QUANDO COMPLEXADO COM TRIPTOFANO, HOLOREPRESSOR. ATUA SOBRE CINCO OPERONS: *trp*, *trpR*, *mtr*, *aroH* E *aroL*..... 12
- FIGURA 5. PEPTÍDEO LÍDER OBTIDO A PARTIR DA TRANSCRIÇÃO DO GENE *trpL*. CONFORMAÇÃO 1:2 PAUSA DA POLIMERASE, 2:3 ANTITERMINAÇÃO E 3:4 TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO. POSIÇÃO 139 ATENUAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO. SOBRE A REGIÃO I EXISTEM DUAS TRIPLAS QUE CODIFICAM PARA TRIPTOFANO..... 13
- FIGURA 6. DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE ATENUAÇÃO. INÍCIO DA TRANSCRIÇÃO (PASSO 1), PAUSA DA TRADUÇÃO (PASSO 2), DETECÇÃO DE RNA^{TRP} CARREGADO PELO RIBOSSOMO, TERMINAÇÃO COM LIBERAÇÃO DO RIBOSSOMO E POLIMERASE, ANTITERMINAÇÃO COM PRODUÇÃO DO TRANSCRITO *trpEDCBA*. 14

FIGURA 7. INIBIÇÃO RETROATIVA DA ENZIMA ANTRANILATO SINTASE, TRP _E , PELO PRODUTO FINAL DA VIA, O TRIPTOFANO.	15
FIGURA 8. ELEMENTOS EM UM GRAFO : NODOS OU VÉRTICES (A), NODOS E ARESTAS DE UM GRAFO NÃO ORIENTADO (B), NODOS ORDENADOS EM UM GRAFO ORIENTADO (C).....	18
FIGURA 9. MULTIPLICIDADE : MULTIPLICIDADE ENTRE OS NODOS N ₁ E N ₂ CARACTERIZANDO UM MULTIGRAFO NÃO ORIENTADO (A); MULTIPLICIDADE ENTRE OS NODOS N ₁ E N ₂ EM UM MULTIGRAFO ORIENTADO (B); NÃO CARACTERIZA UM MULTIGRAFO, POIS AS ARESTAS PARALELAS ENTRE OS NODOS N ₁ E N ₂ POSSUEM ORIENTAÇÃO DIFERENTES (C).	18
FIGURA 10. GRAFO BIPARTIDO : N ₁ CARACTERIZA UM TIPO DE VÉRTICE (A) E, N ₂ CARACTERIZA UM SEGUNDO TIPO (B); UM GRAFO BIPARTIDO ORIENTADO (C), ONDE ARESTAS INTERCONECTAM UM CONJUNTO DE VÉRTICES AO OUTRO E NUNCA A UM MESMO CONJUNTO.	19
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE REDES DE PETRI. CÍRCULOS REPRESENTAM LUGARES, RETÂNGULOS REPRESENTAM TRANSIÇÕES. ARESTAS ORIENTADAS DESIGNAM A ORDEM DE OCORRÊNCIA. NÚMEROS ASSOCIADOS ÀS ARESTAS INDICAM SUA MULTIPLICIDADE. MARCAS CIRCUNSCRITAS AOS LUGARES REPRESENTAM A PRESENÇA DE RECURSOS, DENOMINADAS DE TOKENS OU FICHAS.	20
FIGURA 12. REDE DE PETRI ONDE AS TRANSIÇÕES T ₂ E T ₃ SERIAM CONCORRENTES NÃO FOSSE A PRESENÇA DO LUGAR P ₆ , COMPARTILHADO ENTRE ESTAS DUAS TRANSIÇÕES, CARACTERIZANDO UMA SITUAÇÃO QUE COMBINA OS EFEITOS DE CONCORRÊNCIA E CONFLITO, DENOMINADA DE CONFUSÃO.	22
FIGURA 13. SEQÜÊNCIA DE OCORRÊNCIAS, OU DE DISPAROS. PRIMEIRAMENTE A TRANSIÇÃO t ₁ ESTA HABILITADA A DISPARAR. APÓS O DISPARO DE t ₁ , S ₁ = t ₁ t ₂ t ₃ t ₄ OU S ₂ = t ₁ t ₃ t ₂ t ₄ , É UMA DAS SEQÜÊNCIAS DE OCORRÊNCIAS PARA ESTA REDE.....	23
FIGURA 14. TÉCNICAS DE ABSTRAÇÃO. EM A) A REDE N = (P, T, F) COM DUAS REGIÕES A SEREM ABSTRÁIDAS E SUBSTITUÍDAS POR LUGARES, Y ₁ E Y ₂ POR P _{Y1} E P _{Y2} , RESPECTIVAMENTE. EM B) N[Y] = (P[Y], T[Y], F[Y]) É UMA ABSTRAÇÃO OU REFINAMENTO DA REDE N. A REGIÃO Y ₂ É UMA ABSTRAÇÃO (LUGAR)-ESTRITA.	29
FIGURA 15. GRAFO DE ALCANÇABILIDADE. O SISTEMA DE REDE S = (N, m ₀) É LIMITADO E ADMITE UM GRAFO DE ALCANÇABILIDADE RG(S) QUANDO VERIFICADO PELO ALGORITMO 4.1.	32
FIGURA 16. ARVORE DE COBERTURA. DADO O SISTEMA DE REDE S = (N, m ₀) EM A) OBTÉM-SE A ARVORE DE COBERTURA EM B) PELA APLICAÇÃO DO ALGORITMO 4.2, O QUAL TEM SAÍDA O GRAFO DE COBERTURA DADO EM C).	34
FIGURA 17. MAPEAMENTO DE REAÇÃO BIOQUÍMICA EM (A) PARA A REDE DE PETRI EQUIVALENTE EM (B) E A MATRIZ DE INCIDÊNCIA DO SISTEMA É DADO EM (C).	43
FIGURA 18. MAPEAMENTO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXO EM (A) PARA A REDE DE PETRI EQUIVALENTE EM (B) E A MATRIZ DE INCIDÊNCIA CORRESPONDENTE EM (C).....	43
FIGURA 19. MODELO EM REDES DE PETRI DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DO CARBONO. EM (A) E (B) ESTÃO REPRESENTADAS AS REAÇÕES R ₁ E R ₂ , ENQUANTO QUE EM (C) E (D) ESTÃO REPRESENTADAS AS REAÇÕES R _{3A} E R _{3B}	44
FIGURA 20. MODELO BÁSICO DA OXIDAÇÃO DO CARBONO EM TERMOS DE REDES DE PETRI.	45
FIGURA 21. MODELO DA OXIDAÇÃO DO CARBONO CONCEBIDO A PARTIR DO CRITÉRIO ILIMITADO.	46
FIGURA 22. CÁLCULO DA EQUAÇÃO GERAL DO SISTEMA DE OXIDAÇÃO DO CARBONO.....	47
FIGURA 23. INVERSA DA EQUAÇÃO GERAL DO SISTEMA DE OXIDAÇÃO DO CARBONO, R _T . A TRANSIÇÃO R _T É SUBSTITUÍDA PELAS TRANSIÇÕES R _p (REPETE), R _i (INICIA) E PELO LUGAR INÍCIO.	47
FIGURA 24. MODELO DA OXIDAÇÃO DO CARBONO LIMITADO. O FLUXO DE ENTRADA E SAÍDA DO SISTEMA ESTÁ SUBORDINADO A EQUAÇÃO GERAL DO SISTEMA, TORNANDO-O FINITO E REINICIALIZÁVEL.	48
FIGURA 25. GRAFO DE ALCANÇABILIDADE PARA O MODELO LIMITADO DA OXIDAÇÃO DO CARBONO. AS REAÇÕES R ₁ E R ₂ A PARTIR DO ESTADO M ₁ ESTÃO EM CONCORRÊNCIA DINÂMICA, ENQUANTO QUE ESTAS MESMAS REAÇÕES A PARTIR DO ESTADO M ₃ ESTÃO EM CONFLITO DINÂMICO E ESTRUTURAL.....	50
FIGURA 26. CIRCUITO CORRESPONDENTE A INVARIANTE DE TRANSIÇÃO x ₁ = {r _{3a} , r _{3b} }	51
FIGURA 27. CIRCUITO CORRESPONDENTE A INVARIANTE DE TRANSIÇÃO x ₂ = {inicia, 2r ₁ , r _{3b} , repete} 51	51

FIGURA 28. CIRCUITO CORRESPONDENTE A INVARIANTE DE TRANSIÇÃO $\mathbf{x}_3 = \{inicia, 2r_2, r_a, repete\}$	52
FIGURA 29. CIRCUITO CORRESPONDENTE A INVARIANTE DE TRANSIÇÃO $\mathbf{x}_4 = \{inicia, r_1, r_2, repete\}$	52
FIGURA 30. CIRCUITO CORRESPONDENTE A INVARIANTE DE LUGAR $\mathbf{y}_1 = \{4inicio, 2CO, CO, 2CO_2\}$	53
FIGURA 31. CIRCUITO CORRESPONDENTE A INVARIANTE DE LUGAR $\mathbf{y}_1 = \{3inicio, C, CO, CO_2\}$	53
FIGURA 32. IDEALIZAÇÃO LINEAR (A); COMPORTAMENTO SIGMOIDAL RELACIONANDO A CONCENTRAÇÃO DO REGULADOR E SEU EFEITO (B); IDEALIZAÇÃO LÓGICA, A QUAL É INFINITAMENTE NÃO LINEAR.	56
FIGURA 33. GRAFO DE REGULAÇÃO GÊNICA. ONDE, X, Y E Z SÃO PRODUTOS DOS GENES X, Y E Z, RESPECTIVAMENTE. SETAS INDICAM UMA ATIVAÇÃO E BARRAS UMA INIBIÇÃO.	57
FIGURA 34. GRAFO DE TRANSIÇÃO PARA O SISTEMA DA TABELA 4.....	60
FIGURA 35. GRAFO DE REGULAÇÃO. NODOS REPRESENTAM GENES, ARCOS INTERAÇÕES. SETAS REPRESENTAM UMA AÇÃO DE ATIVAÇÃO E BARRAS INIBIÇÃO.	61
FIGURA 36. GRAFO DE TRANSIÇÃO SÍNCRONA PARA O GRAFO DE REGULAÇÃO DA FIGURA 43.....	64
FIGURA 37. GRAFO DE TRANSIÇÃO ASSÍNCRONA PARA O GRAFO DE REGULAÇÃO DA FIGURA 35.....	65
FIGURA 38. REDE DE REGULAÇÃO DO GENE A.....	67
FIGURA 39. REDE DE REGULAÇÃO SOBRE O GENE B.....	68
FIGURA 40. REDE DE REGULAÇÃO DO GENE C.....	69
FIGURA 41. REDE DE REGULAÇÃO EM TERMOS DE REDES DE PETRI CORRESPONDENTE AO MODELO DA FIGURA 35.....	69
FIGURA 42. GRAFO DE ALCANÇABILIDADE DA REDE DE REGULAÇÃO.....	70
FIGURA 51. AMBIENTE DE MODELAGEM ANÁLISE DE GRAFOS REGULATÓRIOS.	74
FIGURA 52. INTERFACE DE DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES INICIAIS E DE MÉTODO DE EVOLUÇÃO DINÂMICA.	75
FIGURA 53. GERAÇÃO DO GRAFO DE TRANSIÇÕES DE ESTADOS.	75
FIGURA 54. IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPONENTE TERMINAL FORTEMENTE CONEXO. NESTE CASO, REFERE-SE A AÇÃO DO REPRESSOR TrpR, SOBRE O APORTE EXTERNO DE TRIPTOFANO PELA CÉLULA.	76
FIGURA 55. AMBIENTE DE EDIÇÃO E SIMULAÇÃO DE REDES DE PETRI ORDINÁRIAS, SNOOPY.	77
FIGURA 56. A PARTIR DA INTERFACE PRINCIPAL É POSSÍVEL EDITAR, EXECUTAR, REDUZIR E ANALISAR REDES DE PETRI, BEM COMO GERAR RELATÓRIOS E ARQUIVOS DE SAÍDA COM RESULTADOS DE CADA ANÁLISE.....	77
FIGURA 57. MÓDULO DE ANÁLISE DO AMBIENTE INA.....	78
FIGURA 50. ELEMENTOS MÍNIMOS CONSIDERADOS PARA O MODELO DE REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO. APORTE DE TRIPTOFANO EXTERNO PELA PERMEASE <i>mtr</i> , PRODUÇÃO DE TRIPTOFANO INTERNO PELA VIA DE BIOSÍNTESE (C), REGULAÇÃO POR: REPRESSÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA (B), ATENUAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA E INIBIÇÃO RE TROATIVA (A).....	80
FIGURA 51. MODELO LÓGICO DA REGULAÇÃO DO TRIPTOFANO. O NODO Trp REPRESENTA A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE TRIPTOFANO. O NODO TrpR REPRESENTA A PRESENÇA DO REPRESSOR. O NODO TrpE ABSTRAI O CONJUNTO DE ENZIMAS DO OPERON <i>trpEDCBA</i>	82
FIGURA 52. GRAFO DE REGULAÇÃO PARA A CONDIÇÃO INICIAL 100 SOB A ORDEM ENZIMA, TRIPTOFANO E REPRESSOR, RESPECTIVAMENTE. PARA ESTA CONDIÇÃO INICIAL É CONSIDERADO QUE: O CONJUNTO DE ENZIMAS ESTÁ PRESENTE, O TRIPTOFANO ESTÁ NO SEU NÍVEL BAIXO, CONSEQÜENTEMENTE O REPRESSOR ESTÁ INICIALMENTE INATIVO.....	86
FIGURA 53. GRAFO DE TRANSIÇÃO PARA A CONDIÇÃO INICIAL 110, SIGNIFICANDO : CONJUNTO DE ENZIMAS PRESENTES, APORTE DE TRIPTOFANO EXTERNO NO NÍVEL MÉDIO E REPRESSOR INICIALMENTE INATIVO. ESTA CONDIÇÃO INICIAL RESULTA NO ESTADO ESTÁVEL 010.....	87
FIGURA 54. GRAFO DE TRANSIÇÃO PARA A CONDIÇÃO INICIAL 120, SIGNIFICANDO: CONJUNTO DE ENZIMAS PRESENTES, TRIPTOFANO EXTERNO NO SEU NÍVEL MÁXIMO E O REPRESSOR INICIALMENTE INATIVO.....	88
FIGURA 55. GRAFO DE TRANSIÇÃO PARA A CONDIÇÃO INICIAL 100 E O TRIPTOFANO BLOQUEADO PARA O INTERVALO [0,1], DE MANEIRA A ISOLAR O CIRCUITO DE REGULAÇÃO CORRESPONDENTE AO MECANISMO DE REGULAÇÃO POR ATENUAÇÃO.....	89

FIGURA 56. GRAFO DE TRANSIÇÃO PARA A CONDIÇÃO INICIAL 100 E O REPRESSOR BLOQUEADO NO INTERVALO $[0,0]$, DE MANEIRA A ISOLAR O CIRCUITO DE REGULAÇÃO POR INIBIÇÃO RETROATIVA.	89
FIGURA 57. GRAFO DE REGULAÇÃO PARA A CONDIÇÃO INICIAL 121 E O REPRESSOR BLOQUEADO PARA O INTERVALO $[1,1]$, DE MANEIRA A ISOLAR O CIRCUITO QUE REPRESENTA A AÇÃO DO REPRESSOR SOBRE A PRODUÇÃO E APORTE DE TRIPTOFANO.	90
FIGURA 58. GRAFO DE TRANSIÇÃO PARA A CONDIÇÃO INICIAL 021 E O CONJUNTO DE ENZIMAS BLOQUEADO PARA O INTERVALO $[0,0]$, DE MANEIRA A ISOLAR O CIRCUITO CORRESPONDENTE A REPRESSÃO DO APORTE EXTERNO DE TRIPTOFANO.	91
FIGURA 59. REDE DE REGULAÇÃO DO TRIPTOFANO. AUSÊNCIA DE ENZIMAS E DE REPRESSÃO LEVAM TRP A ZERO (A); PRESENÇA DE ENZIMAS LEVAM TRP AO MÁXIMO E A PRESENÇA DO REPRESSOR LEVA TRP A ZERO (B).	92
FIGURA 60. REDE DE REGULAÇÃO DO CONJUNTO DE ENZIMAS. TRP NOS NÍVEIS 1 E 2 LEVAM A TRPE PARA ZERO (A); A PRESENÇA DO REPRESSOR LEVA A ENZIMA PARA ZERO E AUSÊNCIA DO REPRESSOR E DO TRIPTOFANO LEVAM TRPE PARA O NÍVEL MÁXIMO.	93
FIGURA 61. REDE DE REGULAÇÃO DO REPRESSOR TRpR. TRIPTOFANO NO NÍVEL 2 LEVA TRpR PARA SEU NÍVEL MÁXIMO E TRIPTOFANO NOS NÍVEIS 1 E 0 LEVAM TRpR PARA ZERO.	94
FIGURA 62. REDE DE REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO.	95
FIGURA 63. GRAFO DE ALCANÇABILIDADE DA REDE DE REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO.	95
FIGURA 64. REGULAÇÃO DO TRIPTOFANO NO NÍVEL BASAL MÉDIO.	96
FIGURA 65. GRAFO DE ALCANÇABILIDADE PARA O TRIPTOFANO BASAL NO NÍVEL MÉDIO.	96
FIGURA 66. MODELO ILIMITADO DA VIA DE BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO EM TERMOS DE REDES DE PETRI. A CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS É CONSIDERADA CONSTANTE. ENTRADAS E SAÍDAS OBEDECEM A UM FLUXO INFINITO. PRINCIPAIS ABREVIações: ANTA, ANTRANILATO; CDRP, 1-(<i>o</i> -CARBOXIFENILAMINO)-1-DEOXYRIBULOSE 5-FOSFATO; CHA, CORISMATO; GA3P, GLICERALDEIDO 3-FOSFATO; I3GP, INDOL 3-GLICEROLFOSFATO; IND, INDOL; GLN, GLUTAMINA; GLU, GLUTAMATO; TRP, TRIPTOFANO; PPA, PREFENATO; PPI, FENILPIRUVATO; PRAA, FOSFORIBOSIL ANTRANILATO; PRPP, 5-FOSFORIBOSIL-A-PIROFOSFATO; PYR, PIRUVATO; TRPA, TRpB, TRpC, TRpD e TRpE, CONJUNTO DE ENZIMAS EXPRESSAS PELO OPERON <i>trpEDCBA</i>	98
FIGURA 67. MODELO DA VIA DE BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO EM TERMOS DE REDES DE PETRI SOB O CRITÉRIO LIMITADO. LUGARES REFERENTES ÀS ENZIMAS FORAM RETIRADOS TORNANDO A REDE <i>pura</i> . PRINCIPAIS ABREVIações: ANTA, ANTRANILATO; CDRP, 1-(<i>o</i> -CARBOXIFENILAMINO)-1-DEOXYRIBULOSE 5-FOSFATO; CHA, CORISMATO; GA3P, GLICERALDEIDO 3-FOSFATO; I3GP, INDOL 3-GLICEROLFOSFATO; IND, INDOL; GLN, GLUTAMINA; GLU, GLUTAMATO; TRP, TRIPTOFANO; PPA, PREFENATO; PPI, FENILPIRUVATO; PRAA, FOSFORIBOSIL ANTRANILATO; PRPP, 5-FOSFORIBOSIL-A-PIROFOSFATO; PYR, PIRUVATO.	100
FIGURA 68. GRAFO DE ALCANÇABILIDADE PARA O MODELO LIMITADO DA VIA DE BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO.	101
FIGURA 69. CIRCUITOS OBTIDOS PELA ANÁLISE INVARIANTES DE TRANSIÇÃO DO MODELO LIMITADO. SENDO, A INVARIANTE x_1 REPRESENTADA PELA FIGURA 69A, x_2 PELA 69B, x_3 PELA 69C, x_4 PELA 69D.	102
FIGURA 70. CIRCUITO OBTIDO PELA INVARIANTE DE TRANSIÇÃO x_5 DO MODELO LIMITADO.	102
FIGURA 71. CIRCUITOS CORRESPONDENTES AS INVARIANTES DE LUGARES PARA O MODELO LIMITADO DA VIA BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO. EM 71A TEM-SE O CIRCUITO TOTAL PARA A PRODUÇÃO DO GLUTAMATO, OBTIDO DA COMPOSIÇÃO DOS CIRCUITOS CORRESPONDENTES AS INVARIANTES DE TRANSIÇÃO 2 E 3 DA TABELA 13. OS CIRCUITOS 71B, 71C E 71D FORAM OBTIDOS DA MESMA FORMA.	103
FIGURA 72. CIRCUITO CORRESPONDENTE A PRODUÇÃO DE TRIPTOFANO OBTIDO DA COMPOSIÇÃO DOS SUPORTES DE INVARIÂNCIA DE LUGAR 1, 12, 13 E 14 DA TABELA 13.	104
FIGURA 73. REDE DE REGULAÇÃO DO APORTE EXTERNO DE TRIPTOFANO.	105
FIGURA 74. REDE DE REGULAÇÃO DO APORTE EXTERNO DE TRIPTOFANO NO NÍVEL MÉDIO.	105
FIGURA 75. MODELO INTEGRADO DA VIA DE BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO ACOPLADA A REDE DE REGULAÇÃO. LUGARES DE MESMO NOME CONSTITUI UM ÚNICO LUGAR NA REDE. A TRANSIÇÃO t_3 (SOMBREADO FRACO) DO GRAFO DE REGULAÇÃO FOI SUBSTITUÍDA PELA VIA METABÓLICA. PRINCIPAIS ABREVIações: ANTA, ANTRANILATO; CDRP, 1-(<i>o</i> -CARBOXIFENILAMINO)-1-DEOXYRIBULOSE 5-FOSFATO; CHA, CORISMATO; GA3P, GLICERALDEIDO 3-FOSFATO; I3GP, INDOL 3-GLICEROLFOSFATO; IND, INDOL; GLN, GLUTAMINA; GLU, GLUTAMATO; TRP, TRIPTOFANO; PPA, PREFENATO; PPI, FENILPIRUVATO; PRAA, FOSFORIBOSIL ANTRANILATO; PRPP, 5-FOSFORIBOSIL-A-PIROFOSFATO; PYR, PIRUVATO; TRPA, TRpB, TRpC, TRpD e TRpE, CONJUNTO DE ENZIMAS EXPRESSAS PELO OPERON <i>trpEDCBA</i>	106

FIGURA 76. REDE DE REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO TRIPTOFANO SOB O CRITÉRIO LIMITADO. REGULAÇÃO DO TRP_{INT} (A); REGULAÇÃO TRP_{EXT} (B); REGULAÇÃO DO CONJUNTO DE ENZIMAS TRPE (C); REGULAÇÃO DO REPRESSOR TRPR (D). PRINCIPAIS ABREVIACÕES: ANTA, ANTRANILATO; CDRP, 1-(O-CARBOXYFENILAMINO)-1-DEOXYRIBULOSE 5-FOSFATO; CHA, CORISMATO; GA3P, GLICERALDEIDO 3-FOSFATO; I3GP, INDOL 3-GLICEROLFOSFATO; IND, INDOL; GLN, GLUTAMINA; GLU, GLUTAMATO; Trp, TRIPTOFANO; PPA, PREFENATO; PPI, FENILPIRUVATO; PRAA, FOSFORIBOSIL ANTRANILATO; PRPP, 5-FOSFORIBOSIL-A-PIROFOSFATO; PYR, PIRUVATO; TRPA, TRPB, TRPC, TRPD E TRPE, CONJUNTO DE ENZIMAS EXPRESSAS PELO OPERON TRP_{EDCBA}. 107

Lista de Tabelas

TABELA 1. MATRIZES DE PRÉ-CONDIÇÕES, PÓS-CONDIÇÕES E DE INCIDÊNCIA PARA A REDE DE PETRI DA FIGURA 12.....	22
TABELA 2. ESPAÇO DE ESTADO DOS PRODUTOS VERSUS ESPAÇO DES ESTADOS DOS GENES.	58
TABELA 3. CHAMADA PARA MUDANÇA DE ESTADO INDICADA PELOS SINAIS “+” OU “-“.....	58
TABELA 4. ESPAÇO DE ESTADOS PARA O GRAFO DE REGULAÇÃO DA FIGURA 35.	63
TABELA 5. TRANSIÇÕES CORRESPONDENTES ÀS INTERAÇÕES ATUANTES SOBRE O NODO A.	67
TABELA 6. TRANSIÇÕES CORRESPONDENTES ÀS INTERAÇÕES ATUANTES SOBRE O NODO B.	68
TABELA 7. TRANSIÇÕES CORRESPONDENTES ÀS INTERAÇÕES ATUANTES SOBRE O NODO C.	69
TABELA 8. CONJUNTO DE INTERAÇÕES DO GRAFO DE REGULAÇÃO DA BIODSSÍNTESE DO TRIPTOFANO.	85
TABELA 9. ESPAÇO DE ESTADOS PARA O GRAFO DE REGULAÇÃO DA BIODSSÍNTESE DO TRIPTOFANO.	85
TABELA 10. TRANSIÇÕES CORRESPONDENTES ÀS INTERAÇÕES ATUANTES SOBRE O NODO TRP.....	92
TABELA 11. TRANSIÇÕES CORRESPONDENTES ÀS INTERAÇÕES ATUANTES SOBRE O NODO TRPE.....	93
TABELA 13. TRANSIÇÕES CORRESPONDENTES ÀS INTERAÇÕES ATUANTES SOBRE O NODO TRPR.....	94
TABELA 13. INVARIANTES DE LUGARES CORRESPONDENTES AO MODELO LIMITADO DA VIA DE BIODSSÍNTESE DO TRIPTOFANO.	103

Capítulo 1

Introdução

1.1. Apresentação

Procurar compreender a dinâmica inerente aos mecanismos biológicos ao nível de interações moleculares leva conseqüentemente à busca por métodos formais que se mostrem adequados à validação e análise destes mecanismos. O campo da biologia molecular computacional aliado a procedimentos e técnicas, desenvolvidos pela bioinformática, procura dar suporte a análise da informação continuamente revelada pela Ciência Genômica do ponto de vista estrutural e funcional.

A maquinaria celular sob a orquestração de um conjunto de sinais responde com a produção de complexos moleculares funcionais necessários à *manutenção do estado energético, do crescimento e da reprodução celular*. A informação que permite a construção destes elementos funcionais encontra-se codificada sobre o DNA e à medida que se tornam necessários é desencadeada uma seqüência de processos de localização, acoplamento, cópia, transporte, tradução e modificações *moleculares posteriores* de

forma a originar complexos funcionalmente específicos. Estes processos estão sujeitos a mecanismos de regulação muitas vezes ditados pela variação da concentração de uma determinada molécula sinalisadora, pela presença ou ausência de um complexo inibidor ou ativador ou ainda pela transdução de sinais externos de diversas fontes.

Uma visão sistêmica do funcionamento celular que seja passível de ser analisada através da proposição de modelos encontra seu limite no grau de reducionismo aplicado, devido ao caráter da complexidade inerente, bem como devido à presença de informações esparsas. Desta forma, procura-se por um método formal que seja robusto o suficiente para permitir a construção de modelos a partir de poucas informações disponíveis e que seja flexível o suficiente para permitir que o modelo evolua à medida que novas informações sejam acrescentadas.

Redes de Petri constitui um modelo formal abstrato do fluxo da informação. As propriedades, conceitos e técnicas deste formalismo procuram descrever e analisar o fluxo da informação subordinada a sistemas de controle, particularmente naqueles que exibem atividades assíncronas e concorrentes. A maior aplicação de redes de Petri tem sido na modelagem de sistemas orientados a eventos, sendo possível que alguns destes eventos sejam concorrentes, sujeitos a restrições sobre a concorrência, precedência ou frequência destas ocorrências.

1.2. Trabalhos Correlatos

Vias metabólicas podem ser vistas como conjuntos coerentes de reações enzimáticas e podem ser interpretadas como grafos relacionais, onde cada nodo representa um metabólito e cada aresta uma reação bioquímica a qual é catalisada por uma enzima específica. Kohn e Letzkus (Kohn e Letzkus, 1983) estenderam a teoria dos grafos introduzindo uma função específica que permite a modelagem dinâmica de processos. Em seguida, a primeira aplicação de redes de Petri para a modelagem de vias metabólicas foi introduzida por (Reddy, Mavrovouniotis *et al.*, 1993). Em contraste a grafos puros, redes de Petri é uma linguagem gráfica que permite projetar, especificar, simular e verificar sistemas. Também, estabelece um método formal de representar a estrutura de sistemas de eventos discretos, simular seu comportamento e derivar determinadas conclusões baseando-se nas propriedades do sistema. Extensões deste formalismo, tais como redes de Petri temporizadas (Wang, 1998), redes de Petri coloridas (Xie, Keyhani *et al.*), redes Condição/Eventos (Genrich, 1987) e redes de Petri híbridas (David e Alla, 2001) permitem tanto a análise qualitativa como quantitativa sobre o fluxo de informação.

Nos últimos anos, artigos propondo a utilização de redes de Petri para a modelagem e análise de redes de regulação genômicas têm sido publicados (Genrich, Küffner *et al.*,

2001), (Goss e Peccoud, 1998), (Matsuno, Tanaka *et al.*, 2003) (Chaouiya, Remy *et al.*, 2005; Simão, 2005) o que constitui uma importante indicação de que o formalismo de redes de Petri é adequado à análise e simulação de redes de interações biomoleculares.

1.3. Motivação

Embora existam experimentações que apontam para análises quantitativas de vias metabólicas reguladas (Santillán e Mackey, 2001; Xiu, Chang *et al.*, 2002; Bhartiya, Rawool *et al.*, 2003; Mackey, 2004; Santillán, 2004; Venkatesh, Bhartiya *et al.*, 2004), estas iniciativas simplificam um aspecto crucial de que interações regulatórias são em sua maioria não lineares. Isto significa dizer que a taxa do processo controlado não é uma função linear da concentração do regulador. Sendo interações regulatórias não lineares então as equações diferenciais utilizadas para descrevê-las também são não lineares e geralmente somente podem ser integradas numericamente. Dado que o caráter não linear comumente encontrado em sistemas biológicos obedece a um comportamento sigmoidal, uma representação possível destes sistemas pode ser obtida simplificando a sigmóide para a forma de funções Booleanas. Esta alternativa origina uma descrição lógica das interações regulatórias afirmando que o produto da expressão de um gene pode estar “presente” ou “ausente”, ou ainda que o gene possa estar em um dos estados “ligado” ou “desligado”. Esta representação binária de sistemas de interação regulatórios preserva, no mínimo qualitativamente, a dinâmica original destes sistemas, revelando propriedades associadas à topologia de circuitos de regulação tais como circuitos de ativação, inibição e osciladores (Thomas, 1991; Thieffry e De Jong, 2002). De maneira a contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia que permita modelar e analisar redes de regulação gênicas, procura-se através deste trabalho, compor o formalismo de Grafos Regulatórios com o formalismo de Redes de Petri. O poder de modelagem e de análise dado pela conjugação destes formalismos será verificado através da modelagem e análise da via de biossíntese do triptofano da *Escherichia coli*.

1.4. Objetivos do trabalho

1.4.1. Objetivo Geral

Modelar e analisar os mecanismos de regulação da produção do aminoácido triptofano pela *E. coli* expondo um conjunto de técnicas e procedimentos para a modelagem e análise de redes de regulação gênica e, conseqüentemente, de vias metabólicas reguladas, baseando-se em métodos formais da matemática discreta, mais especificamente em Grafos de Regulação Gênica introduzido por (Thomas, 1991; Thieffry e Thomas, 1998) e redes de Petri (Genrich, Küffner *et al.*, 2001; Heiner e Koch, 2004).

1.4.2. Objetivos Específicos

- (i) Definir um *modelo biológico* da regulação da biossíntese do triptofano para a *E. coli* levando em consideração os mecanismos de regulação de *repressão gênica*, *atenuação da transcrição*, *inibição retroativa* e *aporte externo do triptofano* e o conjunto de genes relacionados a estes mecanismos de regulação.
- (ii) Propor um modelo da regulação da biossíntese do triptofano para a *E. coli*, sob os rigores do formalismo de Grafos de Regulação Gênica, denominado de *modelo lógico* e submetê-lo a análise estática e dinâmica utilizando-se do ambiente computacional GINsim.
- (iii) Transcrever o modelo lógico de regulação da biossíntese do triptofano para a *E. coli* para um modelo equivalente sob o formalismo de redes de Petri tendo como base os rigores do método de mapeamento descrito no trabalho (Chaouiya, 2004) e submeter este modelo a análise estática e dinâmica utilizando-se do ambiente computacional INA.
- (iv) Modelar a via metabólica de produção do triptofano para a *E. coli* sob o formalismo de redes de Petri e proceder a uma análise estática e dinâmica utilizando-se do ambiente computacional INA.
- (v) Promover a integração do modelo da via metabólica de produção do triptofano com o modelo de regulação desta via, ambos descritos pelo formalismo de redes de Petri, e submeter este modelo integrado para análise utilizando-se do ambiente computacional INA.

1.5. Organização do Texto

Os fundamentos biológicos concernentes à regulação da biossíntese do triptofano pela

E. coli é apresentado no capítulo 2, conjuntamente com uma breve descrição dos mecanismos de regulação que serão considerados neste trabalho. Os elementos principais deste capítulo são a via metabólica para o triptofano e o conjunto de genes envolvidos na regulação.

O modelo biológico é compreendido por dois tipos de redes, o primeiro que descreve a via metabólica e o segundo que descreve a regulação gênica da via metabólica. Devido ao fato de que vias metabólicas encontram transposição direta da notação utilizada em reações bioquímicas para redes de Petri, então faz-se necessário primeiramente apresentar o fundamento sobre redes de Petri e suas propriedades, o que é feito no capítulo 3.

No capítulo 4, é descrita a base formal de mapeamento da notação de reações bioquímicas para redes de Petri, seguida por um exemplo de aplicação e conseqüente análise das propriedades estáticas e dinâmicas deste exemplo.

Outra parte do problema se resume em propor um modelo para a rede de regulação gênica, a qual descreve a rede de interação dos mecanismos de regulação da biossíntese do triptofano. Este problema não é diretamente capturado pelo formalismo de redes de Petri e sim pelo formalismo de Grafos de Regulação Gênica. Desta forma, faz-se necessário primeiramente apresentar o fundamento deste formalismo, o que é feito no decorrer do capítulo 5.

No capítulo 6, é feita uma breve descrição dos ambientes computacionais que se apóiam nos fundamentos matemáticos dispostos pelos métodos apresentados neste trabalho e que serão utilizados para a modelagem e análise de exemplos e estudos de casos.

Finalmente, a rede que modela a via metabólica e a rede que modela a regulação gênica são integradas sob um único formalismo, o de redes de Petri, no decorrer do capítulo 7. Para tal, primeiramente é obtido o modelo de regulação do triptofano em termos de Grafos de Regulação Gênica, seguido de uma análise sob este mesmo formalismo utilizando-se do ambiente computacional GIMsim. Na seqüência, este mesmo modelo é transposto para um modelo equivalente em termos de redes de Petri. Uma vez transposto, a via metabólica e a rede de regulação são integradas e esta integração é submetida à análise sob o ambiente computacional INA.

Nos capítulos seguintes é feita a apresentação da conclusão e referências.

Capítulo 2

Fundamentação Biológica

Neste capítulo procura-se apresentar os mecanismos de regulação da biossíntese do aminoácido aromático triptofano pelo microorganismo *Escherichia coli*. Para tal, é descrita a via dos aminoácidos aromáticos, seguida pela apresentação da via metabólica para o triptofano e seus conjuntos de reações. Na seqüência, é apresentado o operon *trp*, o conjunto de enzimas necessário ao metabolismo do triptofano, os mecanismos de regulação adotados pela *E. coli* para controlar a biossíntese destas enzimas e, conseqüentemente, a concentração de triptofano no meio celular. A fundamentação biológica caracterizada por este capítulo é suporte para a definição do modelo biológico. A escolha pela regulação da produção do triptofano pela *E. coli* se deu por este apresentar um forte caráter combinatório de regulação e, conseqüentemente, de difícil interpretação intuitiva. Informações biológicas sobre os mecanismos de regulação do triptofano datam de décadas e são frutos de investigações científicas que compreendem as eras pré e pós-genômicas e em grande parte nos trabalhos de Yanofsky e seus colaboradores (Yanofsky, Platt *et al.*, 1981; Yanofsky e Horn, 1994; Yanofsky, Konan *et al.*, 1996; Yanofsky, 2000; , 2004).

2.1. Via dos Aminoácidos Aromáticos

A maquinaria celular desenvolveu mecanismos de controle sobre a produção dos vinte aminoácidos essenciais não somente para controlar a taxa de biossíntese de determinados aminoácidos, mas também para coordenar esta produção em proporções corretas de maneira a garantir uma equimolaridade na biossíntese de proteínas.

O triptofano constitui uma das vinte bases entre os aminoácidos necessários a produção de proteínas. A produção de triptofano ocorre de forma concorrente com os aminoácidos tirosina e fenilalanina a partir do substrato intermediário em comum, o corismato. A depleção de um destes aminoácidos leva a uma concorrência de sinais de controle de maneira a seqüestrar o substrato em comum para a via cujo produto final é requisitado pelo sistema celular (Bongaerts J., 2001).

Estes sinais de controle basicamente se dão pelos mecanismos de regulação de inibição alostérica por um ou mais produtos finais de uma via, ou por mecanismos de repressão da transcrição gênica. A inibição alostérica ocorre quando uma enzima forma um complexo com uma molécula reguladora de maneira a modificar sua conformação espacial tornando-a insensível ao reconhecimento de seu substrato específico. A repressão gênica se dá pela presença de proteínas reguladoras capazes de ligar-se a posições específicas do DNA impedindo que a polimerase acople-se a esta posição e inicie o processo de transcrição do gene que dá origem à enzima necessária à catálise de um determinado passo de uma via metabólica.

Na via dos aminoácidos aromáticos, representada pela Figura 1, tanto a tirosina, como a fenilalanina e o triptofano são capazes de produzir uma inibição alostérica sobre a DHP sintase, bem como uma repressão gênica sobre os genes que dão origem a esta enzima, controlando desta forma a presença do produto intermediário DAHP. Mais especificamente, a fenilalanina é capaz de produzir uma inibição alostérica sobre o produto do gene *aroG* e repressiva sobre a transcrição deste mesmo gene. Da mesma forma, a tirosina é capaz de inibir alostéricamente o produto do gene *aroF* e reprimir a transcrição deste mesmo gene (Yanofsky, 2003). O triptofano, por sua vez, inibe alostéricamente o produto do gene *aroH* e participa da repressão da transcrição deste mesmo gene. Esta ação combinatória de inibição por diversos produtos sobre um mesmo complexo enzimático é denominada de *inibição orquestrada*. O triptofano além de atuar alostéricamente sobre a DHP sintase e o gene *aroH*, também provoca inibição alostérica na enzima antranilato sintase, *trpE*, e participa da repressão da expressão gênica do gene relacionado a esta enzima (Sarsero, Wookey *et al.*, 1991).

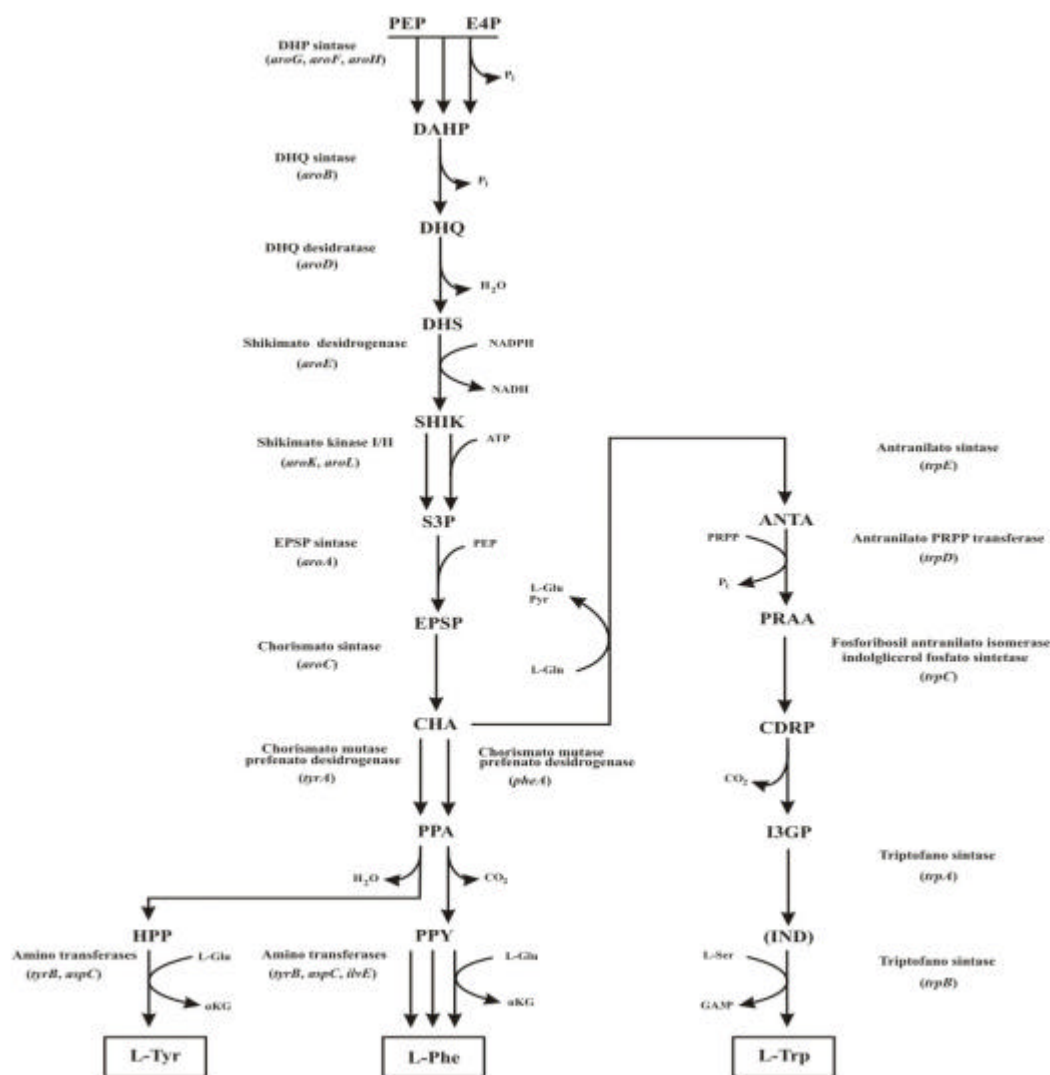


Figura 1. Via metabólica dos aminoácidos aromáticos. O corismato constitui um ponto de bifurcação a partir do qual derivam a fenilalanina, tirosina e triptofano. Abreviações utilizadas: ANTA, antranilato; *a*KG, *a*-cetoglutarato; CDRP, 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-deoxiribulose 5-fosfato; CHA, corismato; DAHP, 3-deoxi-d-arobino-heptulose 7-fosfato; DHQ, 3-deidroquinato; DHS, 3-deidroshiquimato; EPSP, 5 *enol*piruvilshiquimato 3-fosfato; E4P, eritrose 4-fosfato; GA3P, gliceraldeído 3-fosfato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; I3GP, indol 3-glicerolfosfato; IND, indol; L-Gln, L-glutamina; L-Glu, L-glutamato; L-Phe, L-fenilalanina; L-Ser, L-serina; L-Trp, L-triptofano; L-Tyr, L-tirosina; PEP, fosfoenolpiruvato; PPA, prefenato; PPY, fenilpiruvato; PRAA, fosforibosil antranilato; PRPP, 5-fosforibosil-*a*-pirofosfato; Pyr, piruvato; SHIK, shiquimato; S3P, shiquimato 3-fosfato.

O aporte externo destes aminoácidos pela célula evita o dispêndio energético envolvido no metabolismo e se dá através de permeases. Permeases são estruturas moleculares que se localizam na membrana celular e que reconhecem uma molécula específica permitindo ou não sua passagem para fora ou para o interior da célula. Desta forma, os

genes que dão origem a permeases também estão sujeitos a mecanismos de controle de repressão da transcrição gênica.

2.2. Regulação da Biossíntese de Triptofano

A *Escherichia coli* possui a habilidade de ajustar a taxa de biossíntese de triptofano sobre uma faixa de milhares de vezes o valor basal. Esta capacidade de regulação origina-se de uma combinação de mecanismos de regulação que afetam diretamente as etapas de transcrição, tradução, transporte, bem como sobre a atividade enzimática de maneira a influenciar o fluxo de carbono na via dos aminoácidos aromáticos que culmina na produção do produto intermediário corismato (Jeeves, Evans *et al.*, 1999).

2.2.1. Via Metabólica Para o Triptofano

A partir do ponto de bifurcação determinado pela presença do corismato são necessárias seis reações catalíticas para que este intermediário seja convertido em triptofano, como ilustrado pela Figura 2.

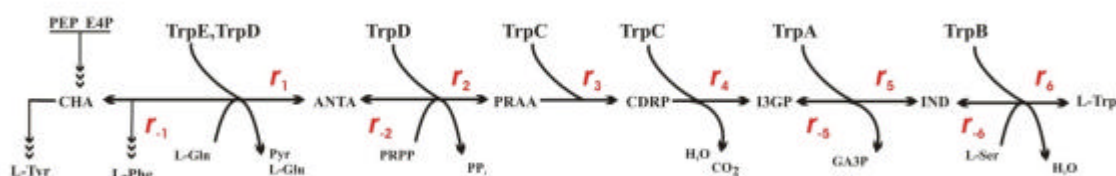
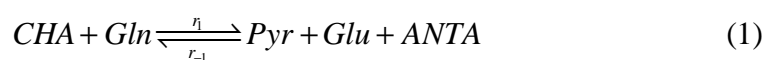


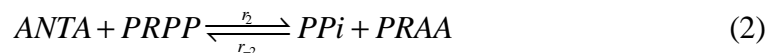
Figura 2. Via metabólica de biossíntese do triptofano. Um conjunto de seis reações é necessário para sintetizar o triptofano a partir do corismato. As duas primeiras e as duas últimas reações são reversíveis. TrpE e TrpD, formam um único complexo enzimático, sendo que o mesmo ocorre com TrpA, TrpB e TrpC é uma enzima bifuncional.

A primeira reação é reversível e catalisada pela enzima *antranilato sintase* (TrpE)



onde os substratos *corismato* (CHA) e *glutamina* (Gln) são convertidos em *piruvato* (Pyr), *glutamato* (Glu) e *antranilato* (ANTA).

A segunda reação, também reversível, é catalisada pela enzima *antranilato PRPP transferase* (TrpD)

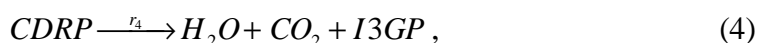


onde os intermediários *antralilato* e *fosforibosil-pirofostato* (PRPP) são convertidos em *pirofosfato* (PPI) e *fosforibosil-antranilato* (PRAA).

A terceira e a quarta reação, não reversíveis, são catalisadas pela enzima bifuncional *fosforibosil-antranilato-isomerase* (TrpC) e *indolglycerol-fosfato-sintetase* (TrpC), onde a terceira reação dada por,

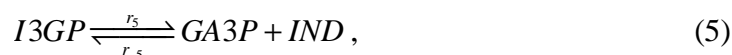


converte o intermediário *fosforibosil-antranilato* em *carboxifenilamino-deoxiribulose-fosfato* (CDRP). Sendo que a quarta reação

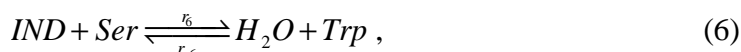


converte CDRP em água, dióxido de carbono e *indol-glicerol-fosfato* (I3GP).

A quinta e a sexta reação, são reversíveis e catalisadas pela enzima bifuncional *triptofano sintase* (TrpA) e *triptofano sintase* (TrpB), respectivamente:



Onde o intermediário I3GP é convertido em *gliceraldeido-fosfato* e *indol*. Finalmente, a sexta reação



converte o intermediário IND mais *serina* em água e *triptofano* (Trp).

2.2.2. O Operon do Triptofano

A síntese de proteínas requer uma grande quantidade de aminoácidos e a *E. coli* consegue sintetizar todos os vinte aminoácidos essenciais. Os genes que codificam as enzimas necessárias a biossíntese de um determinado aminoácido geralmente estão agrupados na forma de um operon, os quais são expressos sempre que a concentração deste aminoácido se mostrar inadequada ao funcionamento celular (Yanofsky e Horn,

1994).

Na *E. coli*, a biossíntese do aminoácido aromático triptofano a partir do corismato requer cinco enzimas, as quais se encontram codificadas em cinco genes distintos agrupados pelo operon *trp*.

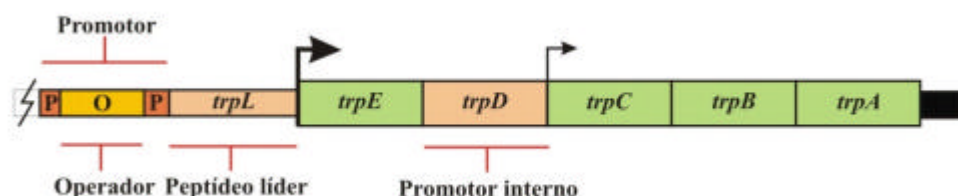


Figura 3. Operon do triptofano da *Escherichia coli*. Região promotora (P), região de operação (O), peptídeo líder (*trpL*), genes *trpEDCBA* e promotor constitutivo interno *trpP2*.

Este operon é constituído por uma região promotora (P) superposta pela região de operação (O). A região de promoção contém seqüências específicas de nucleotídeos que são reconhecidos pela RNA polimerase e que indicam ser um sítio de início de transcrição gênica. A região de operação contém seqüências específicas de nucleotídeos que são reconhecidas pela proteína de regulação da transcrição, ou seja, pela proteína repressora da transcrição gênica. Subseqüente a região promotora encontra-se o gene *trpL*, o qual ao ser transcrito dá origem a um peptídeo de regulação da transcrição, denominado de peptídeo líder e que será melhor detalhado na seqüência. Sucedendo o gene *trpL*, encontram-se os cinco genes que codificam para as enzimas necessárias a biossíntese do triptofano (Xie, Keyhani *et al.*, ; Yanofsky, 2004).

Outra propriedade estrutural do operon *trp* que tem um efeito significativo sobre a taxa de síntese do triptofano é a presença do promotor constitutivo *trpP2*, o qual se localiza sobre a parte final do segundo gene do operon *trp*, ou seja, sobre a parte final do gene *trpD*. Mesmo quando a concentração de triptofano intracelular mostra-se excessiva os genes *trpC*, *trpB* e *trpA* continuam a serem expressos a partir do promotor *trpP2*.

Estima-se que a presença continuada das enzimas TrpC, TrpB e TrpA facilitam a retomada da biossíntese de triptofano após um momento de forte estado repressor seguido de uma ausência abrupta de triptofano, pois neste instante também é desfeito o complexo inibidor das primeiras enzimas da via liberando TrpE e TrpD, o que completa o conjunto de enzimas necessária a retomada da biossíntese.

Também, a tradução casada de polipeptídeos que codificam pares de genes do operon *trp* constitui uma propriedade regulatória adicional deste operon. Os pares de genes *trpE*, *trpD* e *trpB*, *trpA* do operon *trp* proporcionam uma tradução casada de seus polipeptídeos equivalentes, pois cada par forma um complexo enzimático bifuncional. Desta forma, a tradução casada garante a equimolaridade de cada componente em cada complexo enzimático.

2.2.3. Repressão da Transcrição

O controle da expressão gênica geralmente se dá pelo acoplamento de proteínas específicas sobre uma determinada seqüência do DNA. Desta forma, o mecanismo pelo qual uma proteína regulatória reconhece suas seqüências cognatas é de fundamental importância. O repressor da expressão gênica do operon *trp* da *Escherichia coli* (TrpR) é uma das menores proteínas que apresenta uma seqüência de acoplamento específico ao DNA e é controlada de forma alostérica pelo próprio triptofano .

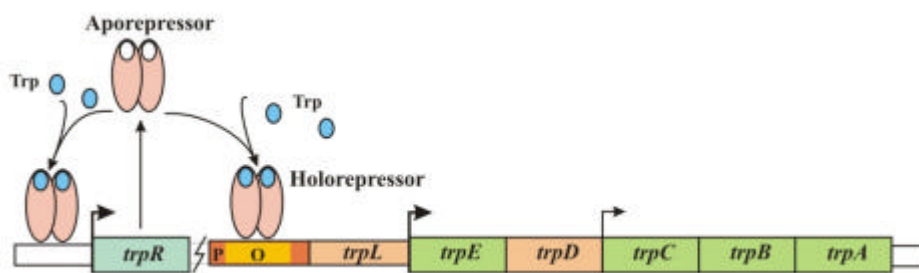


Figura 4. Proteína repressora da transcrição do triptofano codificada pelo gene *trpR*. O repressor inativo, aporepressor, e o ativo quando complexado com triptofano, holorepressor atua sobre cinco operons: *trp*, *trpR*, *mtr*, *aroH* e *aroL*.

Esta proteína acopla-se a cinco seqüências diversas do genoma da *E. coli*. Quatro destas seqüências localiza-se em regiões promotoras, no operon *trpEDCBA*, no gene *trpR*, no gene *aroH*, no gene *mtr* e sobre a região do peptídeo líder do gene *aroL*. Estes cinco operons controlam a biossíntese e o aporte do aminoácido triptofano. O repressor TrpR acopla-se a estes operadores somente na presença do triptofano, reprimindo desta forma a expressão gênica e controlando a concentração intracelular de seu co-repressor. A especificidade do repressor por cada operon difere e a extensão do estado repressor também varia de operon para operon.

2.2.4. Atenuação da Transcrição

O sítio de início de transcrição do operon *trp* é antecedido por um gene que codifica um peptídeo líder responsável pelo mecanismo de atenuação da transcrição. O transcrito deste peptídeo define quatro segmentos que podem formar estruturas secundárias de controle do processo de transcrição gênica por atenuação. Atenuação da transcrição é modulada pela mudança na concentração intracelular de tRNA^{Trp} carregado. Células que possuem tRNA^{Trp} carregado em níveis adequados ao suporte da síntese de proteínas geralmente terminam a transcrição próximo ao bp 140 do peptídeo líder *trpL*.

Células que possuem um nível insuficiente de tRNA^{Trp} carregado não terminam o processo de transcrição na região de atenuação e prosseguem transcrevendo o grupo de genes agrupados pelo operon *trp*. A concentração intracelular de tRNA^{Trp} carregado é percebida pela tentativa em traduzir a região do peptídeo líder que codifica uma sequência do aminoácido triptofano. A presença de apenas duas triplas de nucleotídeos torna a atenuação relativamente insensível à falta de triptofano, ou seja, somente uma deficiência extrema em tRNA^{Trp} evita que a terminação do processo de transcrição ocorra.

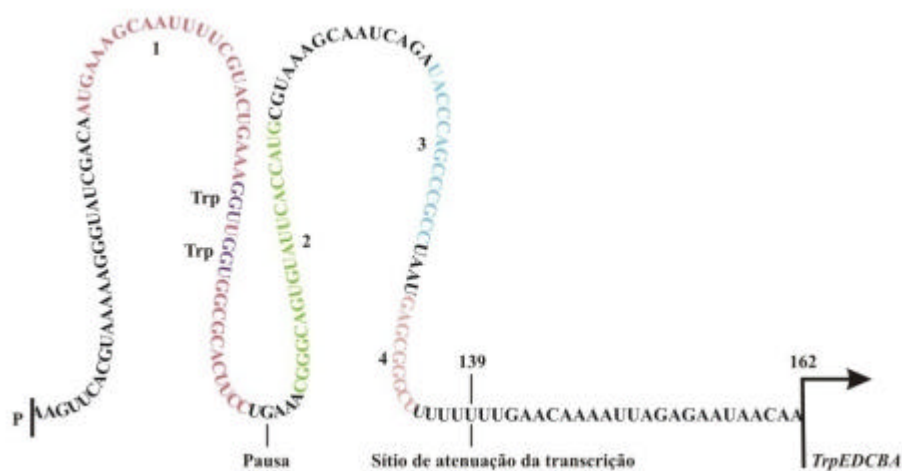


Figura 5. Peptídeo líder obtido a partir da transcrição do gene *trpL*. Conformação 1:2 pausa da polimerase, 2:3 antiterminação e 3:4 terminação da transcrição. Posição 139 atenuação da transcrição. Sobre a região 1 existem duas triplas que codificam para triptofano.

A conformação secundária obtida pelo pareamento da região 1:2 causa uma pausa no processo de transcrição executado pela polimerase e introduz um atraso. Este atraso é suficiente para permitir que o ribossomo acople-se ao transcrito e comece o processo de tradução. O ribossomo, por sua vez, desfaz o complexo de pausa e restaura o processo de transcrição pela polimerase.

Se houver uma concentração abundante de triptofano, ou seja, de tRNA^{Trp} carregado, o ribossomo rapidamente termina a tradução do segmento 1 e passa a traduzir o segmento 2 do peptídeo líder em formação. Este avanço do ribossomo sobre o segmento 2 impede o pareamento dos segmentos 2:3 e facilita o pareamento dos segmentos 3:4. A conformação estrutural assumida pelo pareamento dos segmentos 3:4 sinaliza para a polimerase que a transcrição deve ser terminada.

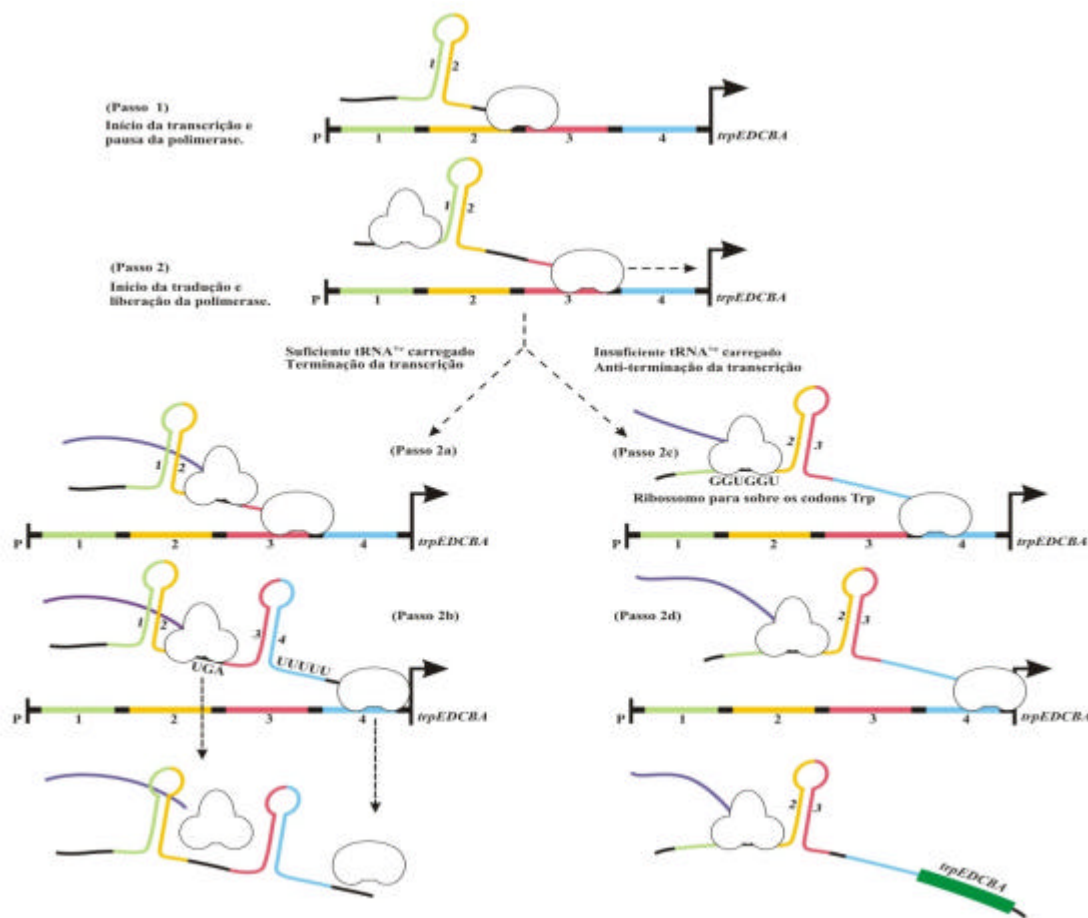


Figura 6. Descrição do processo de atenuação. Início da transcrição (Passo 1), pausa da tradução (Passo 2), Detecção de $tRNA^{Trp}$ carregado pelo ribossomo, terminação com liberação do ribossomo e polimerase, antiterminação com produção do transcrito *trpEDCBA*.

Se não houver um nível adequado de $tRNA^{Trp}$, então o ribossomo ao tentar traduzir o segmento 1 fica parado devido à ausência de triptofano necessária a tradução dos dois codons que codificam para triptofano existente sobre este segmento. Este fato facilita o pareamento dos segmentos 2:3 e impede o pareamento dos segmentos 3:4 evitando, desta forma, a sinalização de terminação da transcrição. Esta conformação estrutural do peptídeo líder é então denominada de *anti-terminador*.

2.2.5. Inibição por Produto Final da Via

A inibição retroativa da enzima antranilato sintase, a qual catalisa a primeira reação da biossíntese de triptofano, desempenha um papel importante na produção de triptofano porque regula o fluxo de carbono que entra na via de biossíntese.

-
- Alta concentração de triptofano provoca a ativação da proteína de *repressão*, TrpR, *da transcrição* dos vários operons envolvidos na produção do triptofano.
 - Alta concentração de triptofano provoca a *inibição retroativa*, ou alostérica, da primeira enzima, TrpE, da via de biossíntese do triptofano.

Estes mecanismos e seus inter-relacionamentos serão abordados nos capítulos seguintes sob os formalismos de Redes Regulatórias e Redes de Petri. Ambos os formalismos tem base na matemática discreta e combinatória e serão aplicados de maneira a auxiliar na compreensão e validação de modelos biológicos pela verificação de propriedades, tais como: a existência de circuitos de ativação e inibição retroativa e estados estáveis, as quais possam auxiliar na corroboração ou refutação de observações biológicas.

Capítulo 3

Fundamentos de Redes de Petri

Neste capítulo apresenta-se uma breve introdução aos fundamentos do formalismo de redes de Petri de maneira a caracterizar o embasamento matemático, a notação gráfica e as técnicas de análise que permitem verificar propriedades de modelos construídos a partir deste formalismo. Para tal, primeiramente é reforçado o conceito de redes de Petri como uma categoria de grafos, por segundo a notação gráfica e sua representação algébrica, regras de ocorrência e equações de estado. Finalmente, dentre as técnicas de análise será abordada a construção dos grafos de alcançabilidade e de cobertura para verificação de propriedades que dependem da marcação inicial, ou dinâmicas, bem como aquelas que dependem somente da topologia da rede, ou estáticas. Outras introduções a redes de Petri podem ser verificadas em (Peterson, ; Reisig, 1985; Murata, 1989).

3.1. Princípios de Redes de Petri

A base do formalismo de redes de Petri está fortemente apoiada na teoria dos grafos. Desta forma, ao introduzir este formalismo pela ótica desta teoria procura-se salientar que muitos dos algoritmos desenvolvidos para analisar modelos representados na forma de grafos também são aplicáveis a redes de Petri. Por sua vez, a teoria dos grafos também constitui a base de outros métodos, tais como em autômatos finitos, linguagens formais, cadeias markovianas, entre outros. Portanto, modelos representados por certas classes de redes de Petri não somente encontram representações equivalentes em outros formalismos, bem como herdam todo um arcabouço de técnicas de análise para eles desenvolvido e o conjunto de soluções de um sistema ora pode ser mais facilmente encontrado sob um formalismo e ora por outro.

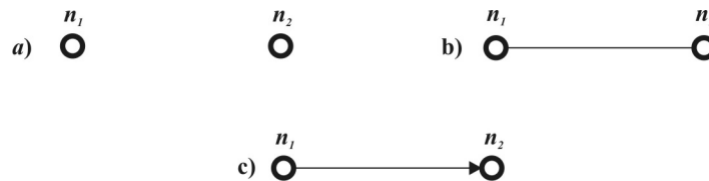


Figura 8. Elementos em um grafo : nodos ou vértices (a), nodos e arestas de um grafo não orientado (b), nodos ordenados em um grafo orientado (c).

Um grafo essencialmente consiste de dois tipos de elementos, vértices e arestas, mas também pela maneira que estes elementos se interconectam. Desta forma, um grafo pode ser definido pela 3-tupla $G = (V, E, F)$, onde V é o conjunto de vértices, E o conjunto de arestas e F uma função de mapeamento entre estes conjuntos, como ilustra a Figura 8.

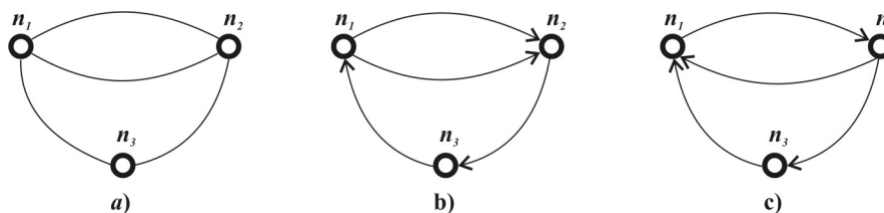


Figura 9. Multiplicidade : Multiplicidade entre os nodos n_1 e n_2 caracterizando um multígrafo não orientado (a); Multiplicidade entre os nodos n_1 e n_2 em um multígrafo orientado (b); Não caracteriza um multígrafo, pois as arestas paralelas entre os nodos n_1 e n_2 possuem orientação diferentes (c).

Se um par de vértices conectados por uma aresta for ordenado, então a aresta é orientada e uma seta é colocada na extremidade da aresta indicando sua orientação. Se todas as arestas de um grafo forem orientadas, então o grafo é denominado de grafo orientado ou de dígrafo, como ilustra a Figura 9.

Em um grafo, dois vértices conectados por uma aresta são denominados de vértices adjacentes. Desta forma, se em um grafo houver múltiplas arestas de mesma orientação conectando vértices adjacentes, então o grafo é denominado de *multígrafo*. Ainda, se em um grafo houver dois tipos distintos de vértices, então o grafo é denominado de *grafo bipartido*, como ilustrado pela Figura 10.

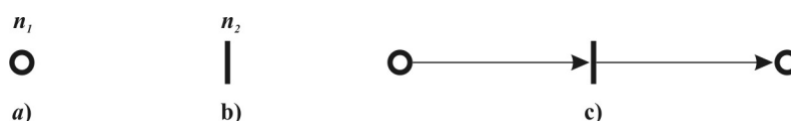


Figura 10. Grafo bipartido : n_1 caracteriza um tipo de vértice (a) e, n_2 caracteriza um segundo tipo (b); um grafo bipartido orientado (c), onde arestas interconectam um conjunto de vértices ao outro e nunca a um mesmo conjunto.

Redes de Petri é essencialmente um *multígrafo orientado bipartido*, onde um conjunto de vértice caracteriza os *elementos passivos* de um sistema, enquanto que o outro caracteriza os *elementos ativos*. Este particionamento no conjunto de vértices dá origem ao princípio de dualidade para redes de Petri.

3.1.1. Dualidade

Para redes de Petri, um conjunto de vértices denominado de lugar (P), representa os elementos passivos de um sistema, enquanto que outro conjunto de vértices denominados de transição (T), representa os elementos ativos. Esta propriedade que permite separar elementos passivos de elementos ativos constitui o *princípio de dualidade* em redes de Petri.

3.1.2. Representação Gráfica

Em redes de Petri, lugares são representados por formas circulares as quais fazem referência ao topo da letra P, enquanto que transições são representadas por formas retangulares fazendo referência a letra T. Relacionando lugares a transições e transições a lugares existem arestas orientadas, isto é, com uma seta em uma das extremidades indicando sua orientação.

A multiplicidade de arestas entre vértices adjacentes é representada por uma única aresta associada a um rótulo, o qual indica o valor desta multiplicidade para valores maiores do que uma unidade, pois o valor unitário é implícito. Outros rótulos podem estar associados aos lugares e transições com o carácter de identificação. Ainda, circunscrito aos lugares representa-se a presença de recursos em um sistema sob a forma numérica ou de pontos (•), sendo os mesmos denominados de *tokens*, *fichas* ou *marcas*, como ilustrado pela Figura 11.

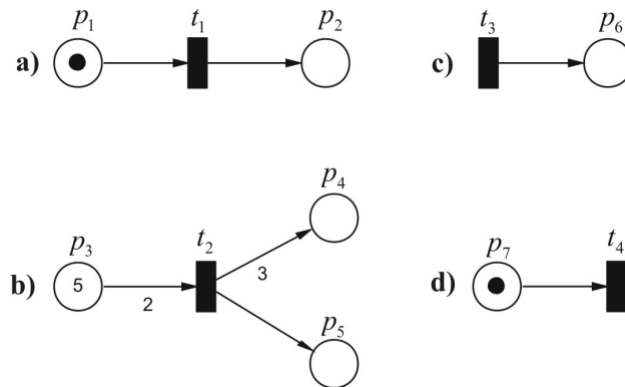


Figura 11. Representação gráfica de redes de Petri. Círculos representam lugares, retângulos representam transições. Arestas orientadas designam a ordem de ocorrência. Números associados às arestas indicam sua multiplicidade. Marcas circunscritas aos lugares representam a presença de recursos, denominadas de tokens ou fichas.

Dados estes elementos, pode-se chegar a uma primeira definição de redes de Petri como a que segue:

Definição 3.1. Uma rede de Petri é uma 3-tupla $N = (P, T, F)$ onde:

- P é um conjunto de lugares,
- T é um conjunto de transições, disjunto de P , e
- F é uma relação de fluxo $F \subseteq (P \times T) \cup (T \times P)$ para o conjunto de arcos.

Se P e T forem finitos, então a rede N também é dita finita.

De maneira a indicar os lugares conectados a transições e vice versa, a seguinte notação é utilizada:

Dado um elemento $x \in P \cup T$, então $\bullet x := \{y \in P \cup T \mid (y, x) \in F\}$ descreve o conjunto de todos os elementos de entrada de x , de forma análoga $x^\bullet := \{y \in P \cup T \mid (x, y) \in F\}$ descreve o conjunto de todos os elementos de saída de x .

Se x for uma transição então $\bullet x$ descreve o conjunto de lugares que constitui a entrada, ou pré-condições de x e x^\bullet é o conjunto de lugares que constitui a saída, ou pós-condições de x . Aplica-se o mesmo raciocínio se x for um lugar. Por exemplo, na Figura

11b, para $x = \{t_2\}$ as pré e pós-condições de x são respectivamente, $\bullet x = \{p_3, t_2\}$ e $x^\bullet = \{\{t_2, p_4\}, \{t_2, p_5\}\}$.

3.1.3. Representação Algébrica

Os conjuntos *pré* e *pós-condições* de uma transição, naturalmente dão origem a uma representação algébrica destas condições sob a forma de matrizes de incidência como caracteriza a definição a seguir:

Definição 3.2. Uma rede lugar transição é definida pela 4-tupla $N = \langle P, T, \mathbf{Pre}, \mathbf{Post} \rangle$, onde:

- P é um conjunto finito, ou o conjunto de lugares de N ,
- T é um conjunto finito, ou o conjunto de transições de N , disjunto de P , e
- $\mathbf{Pre}, \mathbf{Post} \in \mathbb{N}^{|P| \times |T|}$ são matrizes, ou matrizes de incidência anterior e posterior de N .

Existe um arco com peso $n > 0$ do lugar $p \in P$ para alguma transição $t \in T$ se $\mathbf{Pre}[p, t] = n$ com $n > 0$ e existe um arco com peso $n > 0$ da transição $t \in T$ para algum lugar $p \in P$ se $\mathbf{Post}[p, t] = n > 0$. Sendo assim, $F := \{(p, t) \in P \times T \mid \mathbf{Pre}[p, t] > 0\} \cup \{(t, p) \in T \times P \mid \mathbf{Post}[p, t] > 0\}$ é o conjunto de arcos de N .

De posse da definição formal do conjunto de arcos de N , então podemos estender a definição 3.2 para redes de Petri, a qual melhor se aproxima da representação gráfica, como segue:

Definição 3.3. Uma rede lugar/Transição (P/T) é definida pela 4-tupla $N = \langle P, T, F, W \rangle$, onde

- P é um conjunto finito, ou o conjunto de lugares de N ,
- T é um conjunto finito, ou o conjunto de transições de N , disjunto de P , e
- F é um conjunto de arcos, ou $F := \{(p, t) \in P \times T \mid \mathbf{Pre}[p, t] > 0\} \cup \{(t, p) \in T \times P \mid \mathbf{Post}[p, t] > 0\}$
- W é uma função de atribuição de peso, ou $W : F \rightarrow \mathbb{N} \setminus \{0\}$.

3.1.4. Matrizes de Incidência

Desta forma para o exemplo da Figura 12, o conjunto de lugares é formado por $P = \{p_1, p_2, p_3, p_4, p_5, p_6\}$, o conjunto de transições por $T = \{t_1, t_2, t_3, t_4\}$. A função de atribuição de peso quando aplicada para $W(p_i, t_j)$ retorna o valor 1, sendo que para $W(t_1, p_2) = 1, \dots, W(p_6, t_3) = 1$. Ainda, $\mathbf{Pre}[t_1, p_1] = 1, \mathbf{Post}[t_1, p_2] = 1$ e assim consecutivamente.

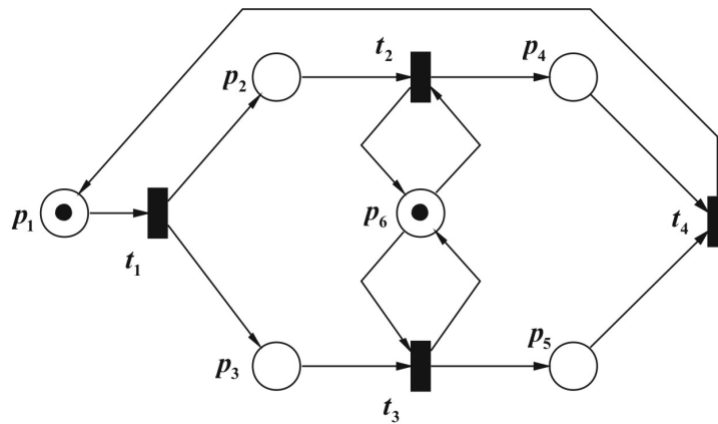


Figura 12. Rede de Petri onde as transições t_2 e t_3 seriam concorrentes não fosse à presença do lugar p_6 , compartilhado entre estas duas transições, caracterizando uma situação que combina os efeitos de concorrência e conflito, denominada de confusão.

Tabela 1. Matrizes de pré-condições, pós-condições e de incidência para a rede de Petri da Figura 12.

Pré	p_1	p_2	p_3	p_4	p_5	p_6	Post	p_1	p_2	p_3	p_4	p_5	p_6	C	p_1	p_2	p_3	p_4	p_5	p_6
t_1	1	0	0	0	0	0	T_1	0	1	1	0	0	0	t_1	-1	1	1	0	0	0
t_2	0	1	0	0	0	1	T_2	0	0	0	1	0	1	t_2	0	-1	0	1	0	0
t_3	0	0	1	0	0	1	T_3	0	0	0	0	1	1	t_3	0	0	-1	0	1	0
t_4	0	0	0	1	1	0	T_4	1	0	0	0	0	0	t_4	1	0	0	-1	-1	0

As matrizes de incidência **Pre**, **Post** e **C**, para este modelo podem ser verificadas por completo na Tabela 1.

3.2. Regras de Ocorrência

O disparo, ou ocorrência, de uma transição consome recursos, “tokens” ou *marcas*, de seu conjunto de entradas e produz novos recursos para seu conjunto de saídas de acordo com regras de ocorrência. Uma transição somente estará habilitada a disparar, se as *pré* e *pós-condições* desta transição forem satisfeitas. De forma genérica, inscrições associadas aos arcos em redes P/T pertencem ao conjunto dos números naturais e indicam o numero de *marcas* a serem retirados, ou depositados em um lugar, dado que uma transição esteja habilitada a *disparar*.

A Figura 13 ilustra uma seqüência de *disparos* das transições existentes no modelo da Figura 12. Partindo-se do canto superior esquerdo para a direita, somente a transição t_1 está habilitada a disparar. Conseqüentemente, t_1 disparando tornam-se habilitadas às transições t_2 e t_3 . A decisão de disparo entre t_2 e t_3 é dada por uma escolha aleatória. Assumindo-se que t_2 dispara, então neste contexto somente permanece habilitada a transição t_3 . Disparando a transição t_3 , então a transição t_4 torna-se habilitada. Finalmente, ao disparar t_4 o sistema retorna a condição inicial.

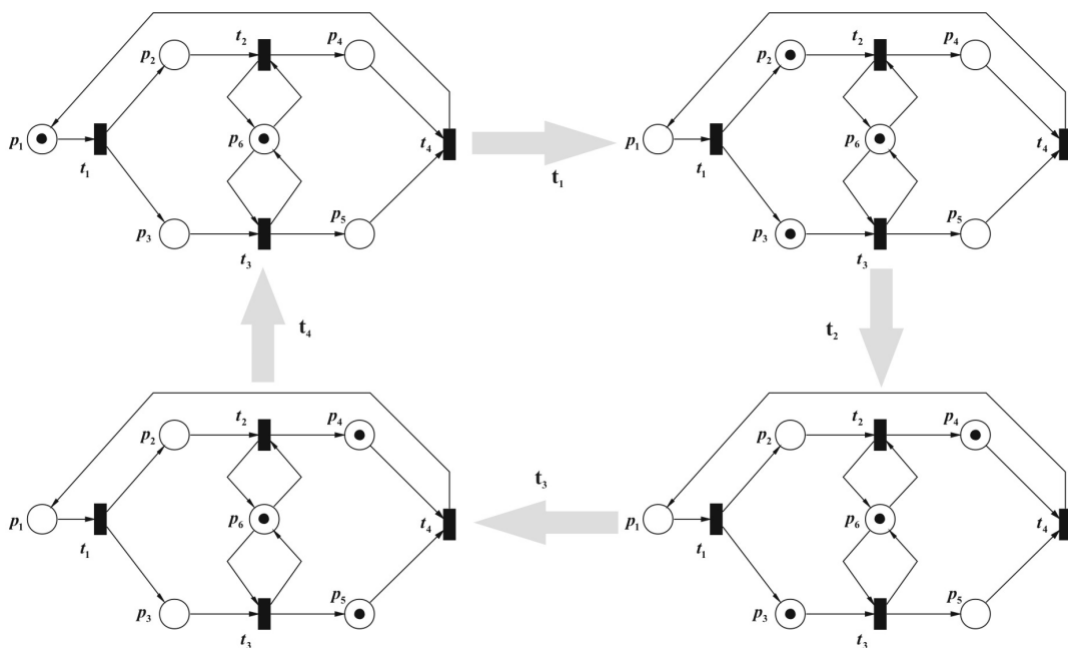


Figura 13. Seqüência de ocorrências, ou de disparos. Primeiramente a transição t_1 está habilitada a disparar. Após o disparo de t_1 , $S_1 = t_1 t_2 t_3 t_4$ ou $S_2 = t_1 t_3 t_2 t_4$, é uma das seqüência de ocorrências para esta rede.

Esta forma de perseguir a marcação de uma rede é denominada de jogo de marcas ou “*token game*” e caracteriza uma das formas de verificação de sistemas em redes de

Petri, e seu limite de aplicação depende somente da complexidade da rede. Outra forma é dada pela definição algébrica e conseqüentemente pela equação de estado de uma rede, as quais serão formalizadas a seguir.

3.2.1. Marcação

Uma *marcação*, ou *estado*, é mais bem representada por um vetor de inteiros, assumindo-se uma ordenação total dos lugares. Desta forma, a marcação inicial da rede da Figura 13, é dada pelo vetor $\mathbf{m}_0 = (1,0,0,0,0,1)$. De forma alternativa, uma marcação também pode ser expressa pelo mapeamento $\mathbf{m}_0 : P \rightarrow \mathbb{N}$, que para o exemplo anterior, $\mathbf{m}_0(p_1) = 1$, $\mathbf{m}_0(p_6) = 1$ e $\mathbf{m}_0(p_i) = 0$ para todos os outros casos.

Outras vezes, torna-se conveniente representar uma marcação como uma seqüência de lugares, onde o nome do lugar é elevado a um expoente que indica o número de *marcas* daquele lugar. Se o número de *marcas* for igual a zero, então o lugar é omitido nesta seqüência. Também, se o expoente for igual à unidade então se omite sua representação por este ser implícito. Para o exemplo, $\mathbf{m}_0 = p_1^1 p_6^1$ ou $\mathbf{m}_0 = \langle p_1^1 p_6^1 \rangle$. Outra variante desta notação, $\mathbf{m}_0 = p_1^1 + p_6^1$, também é utilizada.

Para o exemplo, a transição t_1 está habilitada, pois o número de tokens no lugar p_1 é maior ou igual ao número de arcos conectando p_1 a t_1 , ou seja, este arco apresenta multiplicidade 1, o que equivale a dizer que $W(p_1, t_1) = 1$. Quando a transição t_1 dispara, o número de tokens no lugar p_1 é decrescido deste valor. Conseqüentemente, os lugares de saída da transição t_1 , ou seja, p_2 e p_3 , irão receber tokens em quantidade correspondente ao peso dos arcos que conectam t_1 a p_2 e t_1 a p_3 , respectivamente. Desta forma, $\mathbf{m}_1(p_2) = \mathbf{m}_0(p_2) + 1 = 0 + 1 = 1$, de forma equivalente $\mathbf{m}_1(p_3) = \mathbf{m}_0(p_3) + 1 = 0 + 1 = 1$, caracterizando a marcação sucessora $\mathbf{m}_1 = (0,1,1,0,0,1)$.

Para casos onde um mesmo lugar é simultaneamente entrada e saída de uma transição o número de tokens da marcação sucessora é calculado por ambas as operações de incremento e decremento, por exemplo, o lugar $\mathbf{m}_1(p_6) = \mathbf{m}_0(p_6) + 1 - 1 = 1 + 1 - 1 = 1$. Utilizando se da notação vetorial, a seqüência de ocorrências das marcações sucessoras a partir da marcação inicial \mathbf{m}_0 é dada a seguir,

$$\begin{array}{ccccccccc}
 \mathbf{m}_0 & & \mathbf{m}_1 & & \mathbf{m}_2 & & \mathbf{m}_3 & & \mathbf{m}_4 \\
 \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} & \xrightarrow{t_1} & \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} & \xrightarrow{t_2} & \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} & \xrightarrow{t_3} & \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix} & \xrightarrow{t_4} & \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \\
 & & & & & & & &
 \end{array} \tag{7}$$

Generalizando os procedimentos anteriores pode se então chegar à seguinte definição formal para *marcação*, ou *estado* em redes de Petri:

Definição 3.4. Uma marcação de uma rede lugar transição $N = \langle P, T, \mathbf{Pre}, \mathbf{Post} \rangle$ é um vetor $\mathbf{m} \in \mathbb{N}^{|P|}$. Onde, N conjuntamente com uma marcação inicial \mathbf{m}_0 é denominada de *sistema de rede lugar transição* com $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$, ou $S = \langle P, T, \mathbf{Pre}, \mathbf{Post}, \mathbf{m}_0 \rangle$. Desta forma, uma transição $t \in T$ está habilitada em uma marcação \mathbf{m} se $\mathbf{m} \geq \mathbf{Pre}[\bullet, t]$. Neste caso, a marca sucessora é definida por $\mathbf{m}' = \mathbf{m} + \mathbf{Post}[\bullet, t] - \mathbf{Pre}[\bullet, t] = \mathbf{m} + C[\bullet, t]$. Onde, $\mathbf{Pre}[\bullet, t]$ refere-se ao vetor coluna $\mathbf{Pre}[\bullet, t] = (\mathbf{Pre}[p_1, t], \dots, \mathbf{Pre}[p_{|P|}, t])$ da matriz $\mathbf{Pre}_{|P| \times |T|}$. O mesmo raciocínio aplica-se a $\mathbf{Post}[\bullet, t]$ tomando-se em conta a matriz \mathbf{Post} .

3.2.2. Conjunto de Alcançabilidade

Definição 3.5. A definição da marcação sucessora dada pela Definição 3.4 pode ser estendida de maneira à melhor representar seqüências de transições, ou seja, palavras da linguagem T^* formadas a partir do alfabeto T , sob a forma:

- $\mathbf{m} \xrightarrow{w} \mathbf{m}'$, se w for a palavra vazia I e $\mathbf{m} = \mathbf{m}'$, e
- $\mathbf{m} \xrightarrow{wt} \mathbf{m}'$, se $\exists \mathbf{m}'' . \mathbf{m} \xrightarrow{w} \mathbf{m}'' \wedge \mathbf{m}'' \xrightarrow{t} \mathbf{m}'$ para $w \in T^*$ e $t \in T$.

Para um sistema $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ o conjunto $RS(S) = RS(N, \mathbf{m}_0)$, onde $RS(N, \mathbf{m}_0) := \{\mathbf{m} \mid \exists w \in T^* . \mathbf{m} \xrightarrow{w} \mathbf{m}'\}$ define o *conjunto de alcançabilidade* de S . Também, $FS(S) := \{w \in T^* \mid \mathbf{m} . \mathbf{m}_0 \xrightarrow{w} \mathbf{m}\}$ é o conjunto de seqüências das ocorrências de transições, ou seqüência de disparos, de S . Muitas vezes é conveniente definir o conjunto de seqüências de ocorrências de S , $Oc(S)$, como sendo o conjunto de seqüências sob a forma, $\mathbf{m}_0 t_0, \mathbf{m}_1 t_1, \dots, t_{n-1}, \mathbf{m}_n$, para $n \geq 1$, tal que $\mathbf{m}_i \xrightarrow{t_i} \mathbf{m}_{i+1}$ para $i \in \{0, \dots, n-1\}$, como verificado no exemplo anterior.

3.2.3. Equações de Estado

Para redes de Petri com m transições e n lugares, pode-se formular a equação de estado sob a forma,

$$\mathbf{m}_k = \mathbf{m}_{k-1} + \mathbf{C}^T \mathbf{u}_k, \quad k = 1, 2, 3, \dots, K \quad (8)$$

o índice k representa a k -ésima marcação sucessora em uma seqüência de ocorrências. Para cada k , \mathbf{m}_k representa um vetor $m \times 1$. O vetor de controle \mathbf{u}_k , de dimensão $n \times 1$, representa as transições disparadas para o k -ésimo disparo. A matriz de incidência \mathbf{C} , de dimensão $m \times n$, cujos elementos c_{ij} representam o decréscimo do número de tokens no lugar j devido ao disparo da transição i .

Dada uma seqüência de disparos $\mathbf{S} = \{\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \mathbf{u}_3, \dots, \mathbf{u}_n\}$ e a marcação inicial \mathbf{m}_0 , uma marcação particular \mathbf{m}_n pode ser encontrada se considerarmos todos os disparos desta seqüência,

$$\mathbf{m}_n = \mathbf{m}_0 + \mathbf{C}^T \sum_{k=1}^n \mathbf{u}_k \quad (9)$$

desta forma, podemos definir um vetor $\mathbf{x} = \sum_{k=1}^n \mathbf{u}_k$, como sendo um *vetor contador de disparos*. Os elementos i em \mathbf{x} indicam o número de vezes que a transição i deve disparar de maneira a transformar \mathbf{m}_0 em \mathbf{m}_n . Substituindo-se \mathbf{x} na equação (9), obtém-se,

$$\mathbf{m}_n - \mathbf{m}_0 = \mathbf{C}^T \mathbf{x} \quad (10)$$

ou que,

$$\mathbf{C}^T \mathbf{x} = \Delta \mathbf{m} \quad (11)$$

Por exemplo, somando-se as seqüências de disparos $\mathbf{u}_0 = [1, 0, 0, 0]^T$, $\mathbf{u}_1 = [0, 1, 0, 0]^T$, considerando-se a marcação inicial $\mathbf{m}_0 = [1, 0, 0, 0, 1]^T$, a matriz de incidência \mathbf{C} da Tabela 1 e aplicando-se na equação (9), obtém-se que a marcação \mathbf{m}_2 resulta em

$$\mathbf{m}_2 = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \quad (12)$$

3.2.4. Localidade

O comportamento de uma transição exclusivamente depende de sua localidade, ou seja, depende somente do conjunto de entradas e saídas imediatamente relacionadas à transição. De outra maneira, a localidade de uma transição pode ser formalmente definida como $loc(t) := \{t\} \cup {}^*t \cup t^*$. Por exemplo, na Figura 1, a localidade $loc(t_2) = \{t_2\} \cup \{\{p_2, t_2\}, \{p_6, t_2\}\} \cup \{t_2, p_4\} = \{t_2, p_2, p_4, p_6\}$, enquanto que a localidade $loc(t_3) = \{t_3\} \cup \{\{p_3, t_3\}, \{p_6, t_3\}\} \cup \{p_5\} = \{t_3, p_3, p_5, p_6\}$.

3.2.5. Concorrência

Transições que possuem localidades disjuntas, ou seja $loc(t_i) \cap loc(t_j) = \emptyset$, ocorrem de forma independente ou concorrente. Para o exemplo da Figura 12, $loc(t_2) \cap loc(t_3) = \{p_6\}$, caracterizando o lugar p_6 como um marca compartilhada entre as transições t_2 e t_3 .

3.2.6. Conflito

Contrário a noção de concorrência esta a noção de conflito, onde transições disputam pelos mesmos recursos de um lugar compartilhado. O lugar p_6 tem como saída as transições t_2 e t_3 , sendo neste caso denominado de *lugar conflito estrutural*. As transições t_2 e t_3 por estarem simultaneamente habilitadas, mas somente uma delas podendo ocorrer caracteriza o que é denominado de *conflito comportamental*. Uma escolha aleatória decide pelo disparo de uma das transições. Uma vez que uma delas ocorre, a outra é deliberadamente excluída, caracterizando o efeito de *exclusão mutua*.

3.2.7. Confusão

Transições que possuem localidades disjuntas, ou seja, concorrentes, podem levar o sistema a uma interação sofisticada entre concorrência e situações de conflito. Esta interação entre concorrência e conflito é então denominada de *confusão*.

3.3. Refinamento e Composição

A construção hierárquica de modelos pela utilização de níveis de abstração ou refinamentos é uma técnica importante no projeto de sistemas. Redes de Petri suportam estes conceitos através de técnicas de abstração que asseguram a compatibilidade e consistência de cada nível de abstração.

3.3.1. Borda de Um Conjunto

Seja $N = (P, T, F)$ uma rede, $X := P \cup T$ e $Y \subseteq X$ um conjunto de elementos desta rede, então $\partial(Y) := \{y \in Y \mid \exists x \notin Y. x \in \text{loc}(y)\}$ define a borda ou fronteira do conjunto Y . O conjunto Y é denominado de *lugar-circunscrito* ou aberto se $\partial(Y) \subseteq P$, e *transição-circunscrito* ou fechado se $\partial(Y) \subseteq T$. Conjuntos de elementos lugar-circunscrito ou transição-circunscrito podem ser substituídos por um único lugar ou uma única transição, respectivamente. Se um conjunto Y for aberto e fechado ao mesmo tempo, por exemplo $Y := P \cup T$, então o contexto do problema irá determinar se Y deve ser substituído por um lugar ou por uma transição.

3.3.2. Abstração Simples

Seja $N = (P, T, F)$ uma rede e Y um conjunto de elementos transição-circunscrito não vazio. Então $N[Y] = (P[Y], T[Y], F[Y])$ é denominada de *abstração simples* de N em relação a Y se:

- $P[Y] = P \setminus Y$,
- $T[Y] = (T \setminus Y) \cup \{t_Y\}$ onde t_Y é o novo elemento e
- $F[Y] = \{(x, y) \mid x \notin Y \wedge y \notin Y \wedge (x, y) \in F\} \cup \{(x, t_Y) \mid x \notin Y \wedge \exists y \in Y. (x, y) \in F\} \cup \{(t_Y, x) \mid x \notin Y \wedge \exists y \in Y. (y, x) \in F\}$

Onde, $P[Y]$ contém todos os lugares com exceção daqueles em Y . $T[Y]$ contém todas as transições com exceção daquelas em Y . $F[Y]$ é a união de três conjuntos de arestas: 1) O conjunto de arestas que estão totalmente fora da região de abstração; 2) O conjunto de arestas que saem da região de abstração; 3) O conjunto de arestas que entram para a região de abstração. De forma análoga se Y for do tipo lugar-circunscrito, então:

- $P[Y] = (P \setminus Y) \cup \{p_Y\}$,
- $T[Y] = T \setminus Y$,
- $F[Y] = \{(x, y) \mid x \notin Y \wedge y \notin Y \wedge (x, y) \in F\} \cup \{(x, p_Y) \mid x \notin Y \wedge \exists y \in Y. (x, y) \in F\} \cup \{(p_Y, x) \mid x \notin Y \wedge \exists y \in Y. (y, x) \in F\}$.

Por exemplo, dada a rede $N = (P, T, F)$ da Figura 14, a região de abstração é dada por $Y = \{Y_1\} \cup \{Y_2\}$ sendo ambas as regiões do tipo lugar-circunscrito, as quais serão substituídas pelos lugares p_{Y1} e p_{Y2} , respectivamente. Desta forma, $Y = \{p_1, p_2, p_3, p_4, p_5, t_1\}$, $P[Y] = \{p_6\}$, $T[Y] = \{t_2, t_3, t_4\}$ e $F = \{(p_{Y1}, t_2), (p_{Y1}, t_3), \dots, (t_2, p_{Y2}), (t_3, p_{Y2}), (p_{Y2}, t_4), (t_4, p_{Y1})\}$.

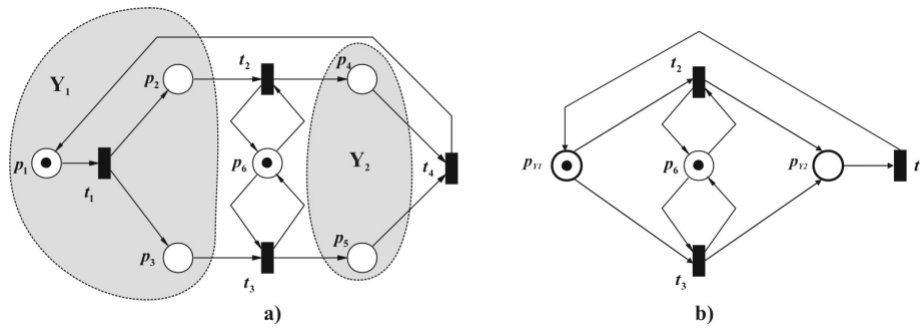


Figura 14. Técnicas de abstração. (Em a) a rede $N = (P, T, F)$ com duas regiões a serem abstraídas e substituídas por lugares, Y_1 e Y_2 por p_{Y1} e p_{Y2} , respectivamente. (Em b) $N[Y] = (P[Y], T[Y], F[Y])$ é uma abstração ou refinamento da rede N . A região Y_2 é uma abstração (lugar)-estrita.

3.3.3. Abstração

Se $N_2 = N_1[Y]$ for uma abstração simples de N_1 para algum conjunto Y lugar ou

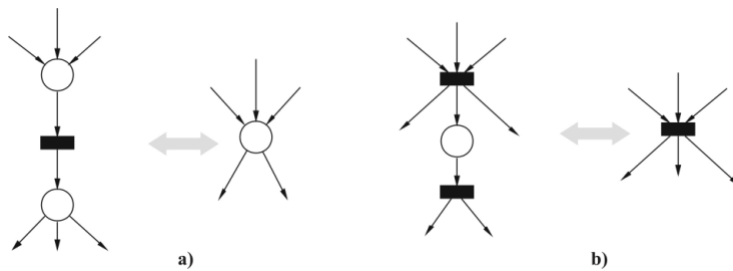
transição-circunscrita, então N_1 é denominado de *refinamento simples* de N_2 . Se existir um conjunto $\{Y_1, Y_2, \dots, Y_n\}$ para cada subconjunto disjunto de lugares e transições-circunscritas em $P_1 \cup T_1$, então $N_2 = (\dots((N_1[Y_1])[Y_2])\dots[Y_n])$ é uma *abstração*, ou um *refinamento*, de N_1 indicada por $N_2 = N_1[Y_1, Y_2, \dots, Y_n]$.

3.3.4. Abstração Estrita

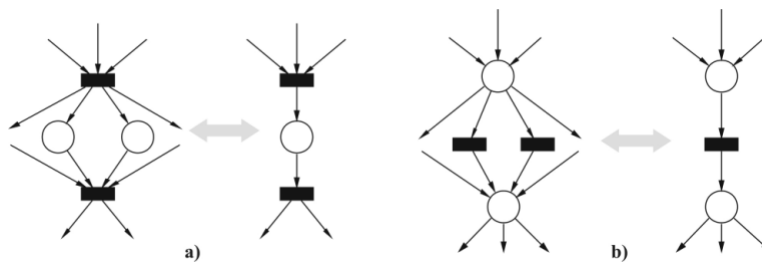
Uma abstração $N_2 = N_2[Y_1, Y_2, \dots, Y_n]$ de N_1 é dita *estrita* se todo Y_i for um conjunto de lugares, ou $Y_i \subseteq P_1$, ou de transições, ou $Y_i \subseteq T_1$. Pela definição de uma abstração estrita, no primeiro caso Y_i será substituída por um lugar p_{Y_i} e no segundo caso por uma transição t_{Y_i} . Desta forma, N_1 é denominada de *refinamento estrito* de N_2 , sendo também conhecida como “*folding*” (dobradura ou encapsulamento).

De maneira a facilitar a análise de sistemas extensos, pode-se reduzir este sistema para uma representação mais simplificada e que preserve as propriedades do sistema a ser analisado. Existem muitas técnicas de transformação para redes de Petri. Algumas das quais transformam redes de Petri em *grafos de marcação* e a análise procede sobre este grafo equivalente.

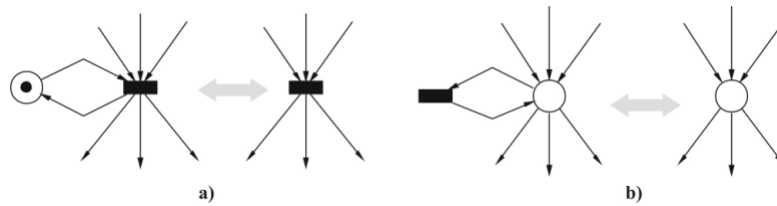
De outra forma, seja um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ então existe um sistema $S' = \langle N', \mathbf{m}'_0 \rangle$ equivalente quando for seguido a aplicação das operações seguintes:



Fusão de lugares em série (a) e Fusão de transições em série (b).



Fusão de lugares em paralelo (a) e Fusão de transições em paralelo (b).



Eliminação de lugares auto-iterativos (a) e Eliminação de transições auto-iterativas (b).

3.4. Propriedades das Redes de Petri

Após um sistema ter sido modelado por redes de Petri uma questão óbvia se apresenta : “*quais as informações que podemos extrair destes modelos?*”. Dois tipos de propriedades podem ser verificadas em modelos de redes de Petri: *propriedades comportamentais*, ou *dinâmicas*, as quais dependem da marcação inicial e *propriedades estruturais*, ou *estáticas*, as quais não dependem da marcação inicial e sim da topologia da rede.

3.4.1. Propriedades Comportamentais

3.4.1.1. Alcançabilidade (reachability)

Dado um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$, seu grafo de alcançabilidade é um grafo orientado $RG(S) = (V, E)$, onde $V = RS(S)$ e $E = \{ \langle \mathbf{m}, t, \mathbf{m}' \rangle \mid \mathbf{m}, \mathbf{m}' \in RS(S) \text{ e } \mathbf{m} \xrightarrow{t} \mathbf{m}' \}$ formam o conjunto de nodos e arcos, respectivamente. Se o sistema em rede for limitado então o grafo de alcançabilidade é finito e pode ser construído, utilizando-se, por exemplo, o Algoritmo 4.1. Este algoritmo termina quando todas as marcações, partindo-se da marcação inicial \mathbf{m}_0 , foram exploradas. No passo 2.1 assegura-se que uma marcação não tenha sido visitada mais de uma vez. No passo 2.2.4 assegura-se que somente as marcações adicionadas a V serão aquelas que ainda não foram adicionadas. Quando uma marcação é visitada, somente os arcos que representam o disparo de uma transição habilitada, a partir desta marcação, serão adicionados a E , no passo 2.2.6.

Algoritmo 4.1: (Cálculo do Grafo de Alcançabilidade)

Entrada: Um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$

Saída: O grafo orientado $RG(S) = (V, E)$ para sistemas que se mostrarem limitados.

1. **Inicializar** $RG(S) = (\{\mathbf{m}_0\}, \emptyset)$; sendo o nodo \mathbf{m}_0 marcado como “não visitado”
2. **enquanto** existir um nodo “não visitado” em V **faça**
 - 2.1. Selecione um nodo “não visitado” $\mathbf{m} \in V$ e marque-o como “visitado”
 - 2.2. **para** cada transição habilitada, t , em \mathbf{m} **faça**
 - 2.2.1. Calcule \mathbf{m}' tal que $\mathbf{m} \xrightarrow{t} \mathbf{m}'$;
 - 2.2.2. **se** existir um $\mathbf{m}'' \in V$ tal que $\mathbf{m}'' \xrightarrow{s} \mathbf{m}'$ e $\mathbf{m}'' < \mathbf{m}'$
 - 2.2.3. **então** o algoritmo falha e termina; (a não limitabilidade de S foi detectada)
 - 2.2.4. **se** não existir um $\mathbf{m}'' \in V$ tal que $\mathbf{m}'' = \mathbf{m}'$
 - 2.2.5. **então** $V := V \cup \{\mathbf{m}'\}$; (\mathbf{m}' é um nodo não visitado)
 - 2.2.6. $E := E \cup \{\langle \mathbf{m}, t, \mathbf{m}' \rangle\}$
3. O algoritmo termina e $RG(S)$ é o grafo de alcançabilidade

Para sistemas de rede que mostrarem-se ilimitados, o grafo de alcançabilidade $RS(S)$ não é finito e a construção de $RG(S)$ nunca terminaria se não fosse detectada esta condição no passo 2.2.2. Este passo assegura que um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ é ilimitado se e somente se existir uma marcação \mathbf{m}' alcançável a partir de $\mathbf{m} \in RS(S)$ através de uma seqüência de disparos $\mathbf{m} \xrightarrow{s} \mathbf{m}'$, tal que $\mathbf{m} < \mathbf{m}'$. A repetição da seqüência de ocorrências s permite concluir a ilimitabilidade do sistema devido a que aumenta de forma estrita as coordenadas de uma marcação \mathbf{m} .

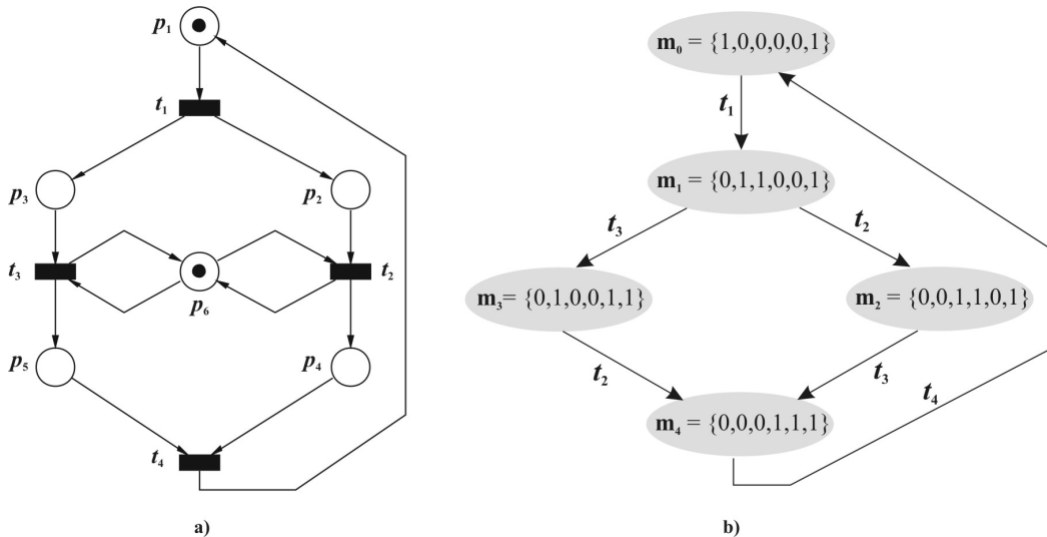


Figura 15. Grafo de alcançabilidade. O sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ é limitado e admite um grafo de alcançabilidade $RG(S)$ quando verificado pelo algoritmo 4.1.

Por exemplo, dado o sistema de rede da Figura 15, a repetição da seqüência de

ocorrências $\mathbf{s} = \{t_1 t_2 t_3 t_4\}$ a partir de $\mathbf{m} = \mathbf{m}_0 = \{1, 0, 0, 0, 0, 1\}$ leva para a marcação $\mathbf{m}' = \{1, 0, 0, 0, 0, 1\}$ não importando o número de repetições, mantendo sempre a igualdade $\mathbf{m} = \mathbf{m}'$, o que permite dizer que a rede é limitada.

No entanto, tomando-se o sistema de rede da Figura 16, a repetição da seqüência de ocorrência $\mathbf{s} = \{t_2 t_4\}$ a partir da marcação inicial $\mathbf{m}_0 = \{1, 0, 0, 0\}$ produz a marcação $\mathbf{m}_3 = \{1, 0, 1, 0\}$ em uma primeira iteração e a marcação $\mathbf{m}_7 = \{1, 0, 2, 0\}$ para uma segunda iteração. Desta forma, constata-se que $\mathbf{m}_0[p_3] < \mathbf{m}_3[p_3] < \mathbf{m}_7[p_3]$ com $\mathbf{m}_0 \neq \mathbf{m}_3 \neq \mathbf{m}_7$, caracterizando o lugar p_3 como ilimitado fazendo com que o Algoritmo 4.1 termine e o grafo de alcançabilidade não seja construído. Outra forma de se obter um grafo de alcançabilidade, mesmo que para sistemas de redes ilimitados é através da construção de grafos de cobertura, como é dado a seguir.

3.4.1.2. Grafos de Cobertura

De forma a manter a árvore de cobertura finita, introduz-se um número especial w , o qual se assemelha a definição de “infinidade”. Para cada inteiro n , $w > n$, $w \pm n = w$ e $w \geq w$. Desta forma a árvore de cobertura é construída pelo algoritmo a seguir:

Algoritmo 4.2: (Cálculo do Grafo de Cobertura)

Entrada: Um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$

Saída: O grafo de cobertura $RG(S) = (V, E)$.

1. **Inicializar** $RG(S) = (\{\mathbf{m}_0\}, \emptyset)$; sendo a marcação \mathbf{m}_0 rotulada como “nova”
2. **enquanto** existirem marcações “novas” em V **faça**
 - 2.1. Selecione um nodo “não visitado” $\mathbf{m} \in V$ e marque-o como “visitado”
 - 2.2. **se** não houver pelos menos uma transição habilitada, t , em \mathbf{m}
 - 2.3. **então** rotule t como transição “morta”
 - 2.4. **para** cada transição habilitada, t , em \mathbf{m} **faça**
 - 2.4.1. Calcule \mathbf{m}' tal que $\mathbf{m} \xrightarrow{t} \mathbf{m}'$;
 - 2.4.2. **se** existir um $\mathbf{m}'' \in V$ tal que $\mathbf{m}'' \xrightarrow{s} \mathbf{m}'$, com $\mathbf{m}'[p] \geq \mathbf{m}''[p]$ para cada lugar p e $\mathbf{m}' \neq \mathbf{m}''$, ou seja, a marcação \mathbf{m}' “cobre” a marcação \mathbf{m}''
 - 2.4.3. **então** $\mathbf{m}'[p] = w$ para cada p onde $\mathbf{m}'[p] > \mathbf{m}''[p]$.
 - 2.4.4. **se** não existir um $\mathbf{m}'' \in V$ tal que $\mathbf{m}'' = \mathbf{m}'$
 - 2.4.5. **então** $V := V \cup \{\mathbf{m}'\}$, onde \mathbf{m}' é uma “nova” marcação
 - 2.4.6. **senão** rotule a marcação \mathbf{m}' como marcação “velha”
 - 2.4.7. $E := E \cup \{\langle \mathbf{m}, t, \mathbf{m}' \rangle\}$ é uma aresta de \mathbf{m} para \mathbf{m}' rotulada por t
3. O algoritmo termina e $RG(S)$ é o grafo de cobertura

Por exemplo, dado o sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ da Figura 16, as transições t_1 e t_2 estão habilitadas a disparar. Fazendo com que t_1 dispare então a marcação

$\mathbf{m}_0 = \{1,0,0,0\}$ produz a marcação sucessora $\mathbf{m}_1 = \{0,1,0,0\}$, sendo que para esta marcação a transição t_3 mostra-se em *situação de impasse* ou *morta*. Disparando a transição t_2 a partir da marcação \mathbf{m}_0 produz a marcação $\mathbf{m}_2 = \{0,0,1,1\}$, para a qual a transição t_4 está habilitada. Prosseguindo com o disparo da transição t_4 é produzida a marcação $\mathbf{m}_3 = \{1,0,1,0\}$, a qual cobre a marcação \mathbf{m}_0 passando a ser $\mathbf{m}_3 = \{1,0, w, 0\}$. A partir de \mathbf{m}_3 as transições t_1 e t_2 estão habilitadas. Disparando t_1 leva para a marcação $\mathbf{m}_4 = \{0,1, w, 0\}$, para a qual t_3 agora se mostra habilitada. Disparando t_3 em \mathbf{m}_4 produz a marcação “velha” $\mathbf{m}_5 = \mathbf{m}_3$. Por sua vez, o disparo de t_2 a partir de \mathbf{m}_3 produz a marcação $\mathbf{m}_6 = \{0,0, w, 1\}$, para a qual a transição t_4 está habilitada. Finalmente, disparando t_4 é produzida a marcação “velha” $\mathbf{m}_7 = \mathbf{m}_3$. O algoritmo termina por não existir mais marcações novas e apresenta como saída o grafo de cobertura da Figura 16c.

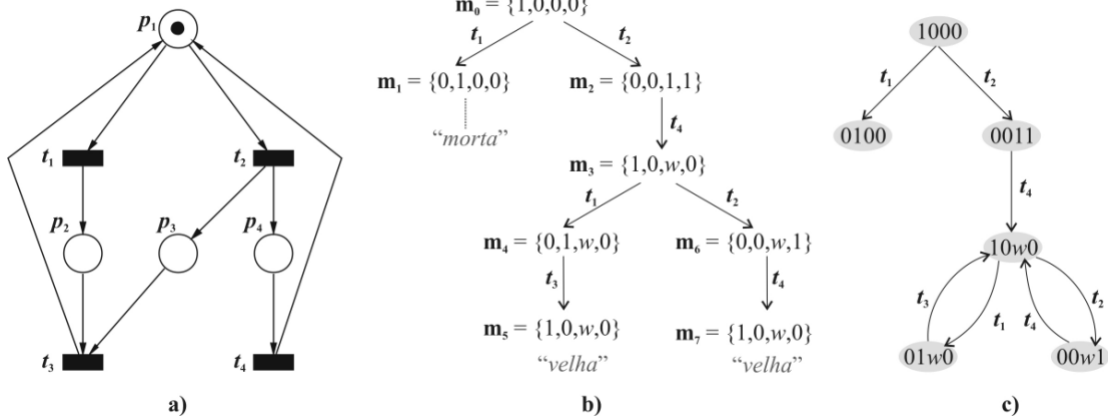


Figura 16. Arvore de cobertura. Dado o sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ em a) obtém-se a arvore de cobertura em b) pela aplicação do Algoritmo 4.2, o qual tem saída o grafo de cobertura dado em c).

Algumas das propriedades que podem ser verificadas diretamente sobre a árvore de cobertura $CT(S)$ dado um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$, são as seguintes:

- O sistema será limitado e conseqüentemente o grafo de alcançabilidade será finito se e somente se o número w não aparecer em nenhum dos nodos da arvore de cobertura.
- O sistema é dito *preservado* (*safe*) se e somente se as marcações mantiverem os valores de suas coordenadas sobre o conjunto $\{0,1\}$.
- Uma transição é dita “morta” se e somente se não aparecer como um rótulo de um arco em $CT(S)$.
- Se a marcação \mathbf{m} for alcançável a partir da marcação inicial \mathbf{m}_0 então existe um

nodo \mathbf{m}' tal que $\mathbf{m} \leq \mathbf{m}'$.

- Se o sistema de rede se mostrar limitado então a árvore de cobertura assemelha-se a árvore de alcançabilidade dada pelo algoritmo 4.1.

3.4.1.3. Vivacidade (liveness)

O conceito de vivacidade está intimamente relacionado à completa ausência de situações de impasse. Um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ é dito ser vivo se durante a evolução dinâmica deste sistema, dada pela progressão da marcação \mathbf{m} alcançada a partir da marcação inicial \mathbf{m}_0 , as seqüências de transições obtidas nesta evolução mostrem-se disparáveis. Esta propriedade garante operações livres de situações de impasse não importando a seqüência de ocorrências escolhidas para o sistema de rede.

Vivacidade é uma propriedade ideal requerida em muitos sistemas, mas é impraticável e custoso verificar esta forte propriedade para sistemas extensos. Desta forma, procura-se relaxar a condição de vivacidade em diversos níveis, para os quais uma transição t em um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ é dita:

- *L0-viva*, ou morta, se t nunca poderá ser disparada para qualquer seqüência de disparo dada pelo sistema.
- *L1-viva*, ou potencialmente disparável, se t puder disparar pelo menos uma vez em uma dada seqüência de disparos.
- *L2-viva*, dado qualquer inteiro positivo k , t poderá disparar pelo menos k vezes em uma dada seqüência de disparos.
- *L3-viva*, se t aparecer infinitamente em uma dada seqüência de disparos.
- *L4-viva*, se t for *L1-viva* para cada marcação \mathbf{m} alcançável do sistema.

Um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ é dita *Lk-viva* se para todas as transições do sistema a rede seja *Lk-viva*, para $k = 1, 2, 3, 4$. Sendo o nível *L4-viva* o mais forte e conseqüentemente determinando uma hierarquia de implicações, ou seja, o nível 4 implica o nível 3, que por sua vez implica o nível 2 e finalmente, este ultimo implica o nível 1. Também, diz-se que uma transição é estritamente *Lk-viva* se for *Lk-viva*, mas não *L(k+1)-viva*, para $k = 1, 2, 3$.

Por exemplo, para rede da Figura 16, a seqüência de ocorrência $\mathbf{s}_1 = \{t_1\}$ leva a marcação inicial $\mathbf{m}_0 = \{1,0,0,0\}$ para a marcação sucessora $\mathbf{m}_1 = \{0,1,0,0\}$, na qual a transição t_3 está impossibilitada de disparar devido a uma ausência de marcas no lugar p_3 , caracterizando desta forma uma situação de impasse. Para esta seqüência de ocorrência a transição t_3 é *L0-viva*. Sendo que para a seqüência de ocorrência $\mathbf{s}_2 = \{t_2, t_4, t_1, t_3\}$ a rede é parcialmente *L4-viva*, pois esta seqüência parte e retorna a marcação inicial \mathbf{m}_0 , não importando o número de repetições desta seqüência.

3.4.1.4. Limitabilidade (Boundedness)

Um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ é dito k -limitado, ou simplesmente limitado, se o número de marcas de cada lugar não exceder um número finito k para qualquer marcação alcançável a partir da marcação inicial \mathbf{m}_0 , ou seja, $\mathbf{m}[p] \leq k$ para cada lugar p e qualquer marcação $\mathbf{m} \in RG(S)$. Também, um sistema de rede é dito ser *preservado* (*safe*) se for 1-limitado. Por exemplo, para a rede da Figura 15, todos os lugares possuem marcações que não ultrapassam o valor 1.

De outra forma, dada a seqüência de ocorrências $\mathcal{S}_2 = \{t_2, t_4\}$ para o sistema de rede da Figura 16, a repetição desta seqüência permite concluir que o lugar p_3 é ilimitado, pois em uma primeira iteração a marcação inicial \mathbf{m}_0 passa para uma marcação sucessora $\mathbf{m}_2 = \{1, 0, 1, 0\}$ e em uma segunda iteração para a marcação sucessora $\mathbf{m}_3 = \{1, 0, 2, 0\}$, fazendo com que pelo menos uma das coordenadas homônimas das marcações predecessoras sejam menores do que as das marcações sucessoras diferentes, que para o caso do lugar p_3 tem-se que $\mathbf{m}_0[p_3] < \mathbf{m}_2[p_3] < \mathbf{m}_3[p_3]$ com $\mathbf{m}_0 \neq \mathbf{m}_2 \neq \mathbf{m}_3$.

3.4.1.5. Reversibilidade (Reversibility)

Um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ é dito *reversível* se a marcação inicial \mathbf{m}_0 for alcançável a partir de qualquer outra marcação alcançável $\mathbf{m} \in RG(S)$, esta última por sua vez também obtida a partir de \mathbf{m}_0 . Desta forma, em uma rede reversível pode-se sempre voltar a marcação inicial ou estado inicial.

A condição de reversibilidade, quando aplicada a qualquer outro estado que não seja o estado inicial, acaba por denominar de ‘*home state*’ o estado para o qual se admite a reversibilidade. De outra forma, uma marcação é denominada de ‘*home state*’ se para cada marcação $\mathbf{m} \in RG(S)$, houver uma marcação \mathbf{m}' alcançável a partir de \mathbf{m} .

Por exemplo, dada a rede da Figura 15, a marcação inicial $\mathbf{m}_0 = \{1, 0, 0, 0, 0, 1\}$ é alcançável a partir de qualquer marcação sucessora de \mathbf{m}_0 . Também, como outro exemplo, dada a seqüência de ocorrências $\mathcal{S}_3 = \{t_2, t_4, t_1, t_3\}$ para a rede da Figura 16, a marcação sucessora $\mathbf{m}_4 = \{1, 0, 0, 0\}$ é igual a marcação inicial \mathbf{m}_0 , fazendo com que a rede seja parcialmente reversível nesta seqüência.

3.4.1.6. Conformidade (fairness)

O conceito de conformidade deriva da expressão ‘*a fair mark*’, ou *caminho livre*, por estar conforme as regras ou padrões. Neste sentido, uma rede de Petri é dita conforme se houver uma seqüência de disparos \mathcal{S} que possa ocorrer infinitamente.

3.4.2. Propriedades Estruturais

Propriedades estruturais são aquelas que dependem da estrutura topológica de uma rede de Petri. Estas propriedades são independentes da marcação inicial \mathbf{m}_0 no sentido de que elas existem para qualquer marcação inicial, ou que estão relacionadas a uma seqüência de ocorrências dada uma marcação inicial. Desta forma, estas propriedades podem ser caracterizadas em termos da matriz de incidência C e suas equações homogêneas associadas ou desigualdades.

Assume-se que todas as redes são puras. O i -ésimo elemento de um vetor \mathbf{x} é indicado por $\mathbf{x}(i)$. Dados dois vetores \mathbf{x} e \mathbf{y} , então $\mathbf{x} > \mathbf{y}$ significa $\mathbf{x}(i) > \mathbf{y}(i)$ para cada i , $\mathbf{x} \geq \mathbf{y}$ significa que $\mathbf{x}(i) \geq \mathbf{y}(i)$, finalmente $\mathbf{x} > \neq \mathbf{y}$ significa que $\mathbf{x} \geq \mathbf{y}$ e que $\mathbf{x}(i) \neq \mathbf{y}(i)$ para algum i .

3.4.2.1. Limitabilidade Estrutural

Uma rede de Petri N é dita ser estruturalmente limitada se for limitada para qualquer marcação inicial \mathbf{m}_0 finita. De outra forma, N será estruturalmente limitada se e somente se existir um vetor \mathbf{y} de inteiros positivos tal que $C\mathbf{y} \leq 0$. O número de tokens em um lugar p $\mathbf{m}[p]$ é dado por:

$$\mathbf{m}[p] = (\mathbf{m}_0^T \mathbf{y}) / \mathbf{y}[p] \quad (13)$$

onde $\mathbf{y}[p]$ é o p -ésimo elemento de vetor solução \mathbf{y} correspondente ao lugar p .

3.4.2.2. Invariância de Lugar

Um vetor \mathbf{y} de inteiros é denominado de S-invariante se,

$$C\mathbf{y} = 0 \quad (14)$$

De outra forma, um vetor \mathbf{y} é um S-invariante se e somente se $\mathbf{m}^T \mathbf{y} = \mathbf{m}_0^T \mathbf{y}$ para qualquer marcação alcançável \mathbf{m} a partir da marcação inicial \mathbf{m}_0 .

Por exemplo, dada a matriz de incidência da Figura 14, e desconsiderando o lugar p_6 de forma a que a rede seja pura, tem-se o sistema de equações homogêneas reduzido,

$$\mathbf{C}\mathbf{y} = \begin{cases} y_1 & -y_4 & -y_5 & = & 0 \\ & y_2 & & -y_4 & = & 0 \\ & & y_3 & & -y_5 & = & 0 \end{cases}$$

Sendo que y_4 e y_5 são variáveis livres. Fazendo $y_4 = 1$ e $y_5 = 1$ obtém-se o vetor $\mathbf{y}_1 = \{2, 1, 1, 1, 1\}$, para $y_4 = 0$ e $y_5 = 1$ o vetor $\mathbf{y}_2 = \{1, 0, 1, 0, 1\}$, finalmente para $y_4 = 1$ e $y_5 = 0$ o vetor $\mathbf{y}_3 = \{1, 1, 0, 1, 0\}$.

Somente as soluções \mathbf{y}_2 e \mathbf{y}_3 constituem um suporte mínimo, indicado por $\|\mathbf{y}_2\| = \{p_1, p_3, p_5\}$ e $\|\mathbf{y}_3\| = \{p_1, p_2, p_4\}$, por serem subconjuntos mínimos linearmente independentes do conjunto de soluções que satisfazem a equação (14) e tomando-lhes somente as coordenadas não nulas. Pode-se também verificar que a inserção do lugar p_6 no conjunto de soluções também representa soluções do sistema, pois para este lugar sabe-se a priori que é invariável. Desta forma, os suportes mínimos tornam-se $\|\mathbf{y}_2\| = \{p_1, p_3, p_5, p_6\}$ e $\|\mathbf{y}_3\| = \{p_1, p_2, p_4, p_6\}$.

3.4.2.3. Invariância de Transições

Invariâncias de transições são as soluções para o sistema de equações,

$$\mathbf{C}^T \mathbf{x} = 0, \quad \mathbf{x} \geq 0 \quad (15)$$

sendo que o suporte para invariantes de transição, definida por \mathbf{x} , é o conjunto de transições que devam disparar a partir da marcação inicial \mathbf{m}_0 de forma que a rede de Petri volte a este mesmo estado inicial.

Por exemplo, considerando-se a transposta da matriz de incidência da Figura 14, tem-se o sistema de equações reduzidas,

$$\mathbf{C}^T \mathbf{x} = \begin{cases} x_1 & & -x_4 & = & 0 \\ & x_2 & & -x_4 & = & 0 \\ & & x_3 & & -x_4 & = & 0 \end{cases}$$

onde x_4 é a única variável livre. Desta forma, fazendo $x_4 = 1$, tem-se pelo menos uma solução não trivial $\mathbf{x} = \{1, 1, 1, 1\}$ a qual nos fornece a única invariante de transições deste sistema $\|\mathbf{x}\| = \{t_1, t_2, t_3, t_4\}$.

3.5. Análise

Tradicionalmente, técnicas de análise para redes de Petri podem ser classificadas como: (1) Enumeração, (2) Transformações e (3) Análise estruturais.

3.5.1. Métodos de Enumeração

Métodos de enumeração estão baseados na construção de grafos de alcançabilidade (RG) os quais representam marcações e disparos de transições entre cada marcação. Se o sistema em rede for limitado, o grafo de alcançabilidade será finito e, conseqüentemente, diferentes propriedades qualitativas podem ser verificadas. Se o sistema em rede for ilimitado, então o RG é infinito e sua construção não é possível. Neste caso, grafos finitos denominados de grafos de cobertura podem ser construídos. Mesmo sendo um método poderoso, enumeração é sempre difícil de ser aplicado, mesmo sobre redes pequenas, devido a sua complexidade computacional (é fortemente combinatorial).

3.5.2. Análise por Transformação

Este tipo de análise é obtida pela transformação de um sistema de rede $S = \langle N, \mathbf{m}_0 \rangle$ em um sistema de rede $S' = \langle N', \mathbf{m}'_0 \rangle$ que preserve um conjunto de propriedades Π a ser verificado. O objetivo é verificar as propriedades Π em S' mais facilmente do que diretamente em S . O espaço de estados de S' pode ser maior do que de S , mas S' pode pertencer a uma subclasse para a qual o método de enumeração de estados pode ser evitado.

Métodos de redução são uma classe especial de transformações para as quais uma seqüência de sistemas em rede que preservem as propriedades a serem estudadas é construída. Esta construção é feita de tal forma que o sistema de rede $\langle N_{i+1}, \mathbf{m}_{0i+1} \rangle$ seja “menor” do que a seqüência anterior $\langle N_i, \mathbf{m}_{0i} \rangle$.

A aplicabilidade de métodos de redução é limitada pela existência de sistemas em rede irredutíveis. Em prática, as reduções obtidas são normalmente consideráveis e permitem que as propriedades desejadas sejam verificadas diretamente. Devido à existência de sistemas irredutíveis este método deve ser complementado por outros.

3.5.3. Métodos de Análise Estrutural

Investiga o relacionamento entre comportamento de um sistema de rede e sua estrutura, enquanto que a marca inicial atua como um parâmetro. Para esta última classe de técnica de análises, distinguem-se dois subgrupos:

- Técnicas baseadas em álgebra linear e/ou programação linear, as quais se baseiam na equação de estado da rede. Em certos casos permitem um diagnóstico rápido sem a necessidade de recorrer a enumeração.
- Técnicas baseadas na teoria dos grafos, para as quais a rede é vista como um grafo bipartite e que sobre o qual é passível de ser aplicado todo um conjunto de algoritmos de análise. Estes métodos são especificamente efetivos na análise de subclasses restritas de redes ordinárias.

3.6. Resumo

Neste capítulo foi introduzido o formalismo de redes de Petri ordinárias. A aplicação direta de redes de Petri ordinárias na modelagem de sistemas procura extrair da topologia destas redes informações sobre a existência de circuitos e sobre a inter-relação destes circuitos determinados pelo comportamento do fluxo da informação.

Dar ênfase à análise de circuitos em detrimento de uma análise quantitativa e temporizada de sistemas tem como vantagem manter o método simples o suficiente para encontrar equivalência entre outros métodos formais de modelagem e análise, ampliando desta forma, o leque de propriedades passíveis de serem extraídas de um modelo. Por exemplo, encontra-se relação direta entre redes de Petri e Teoria dos Grafos, Conjuntos Parcialmente Ordenados, Conjuntos Convexos, Matróides, Álgebra Linear, entre outros.

As principais propriedades até o momento verificadas, do formalismo de redes de Petri quando aplicadas à modelagem de sistemas biomoleculares podem ser assim relacionadas:

- Constitui primeiramente uma *notação formal* muito próxima da notação por hipergrafos utilizada na descrição de reações químicas e bioquímicas.
- A flexibilidade inserida pela propriedade de *abstração* de uma sub-rede por um lugar, ou por uma transição, permite a modelagem e análise de sistemas para os

quais poucas informações encontram-se disponíveis, o que é o caso das interações biomoleculares associadas a informações genômicas.

- A propriedade de *localidade* para a qual uma transição ocorre dada a satisfação das condições de entrada e saída desta transição assemelha-se as condições impostas em balanços estequiométricos de reações bioquímicas.
- A propriedade de *concorrência*, normalmente dada pela disjunção das localidades de transições distintas permite modelar sistemas concorrentes bem como verificar situações de *conflito*.
- A verificação da *limitabilidade* do sistema permite a construção de *grafos de alcançabilidade*, a partir do qual muitas outras propriedades podem ser derivadas.
- A verificação da não existência da *limitabilidade* do sistema, ainda assim permite a construção de *grafos de cobertura*, a partir dos quais algumas propriedades podem ser verificadas. Neste caso também, pode-se lançar mão de métodos heurísticos auxiliares a busca de soluções ótimas.
- As propriedades estruturais de *invariância de lugar* e *invariância de transições* permitem verificar a existência de sub-circuitos, ou a decomposição de uma rede em sub-redes componentes, e seus inter-relacionamentos.

A aplicabilidade de redes de Petri na modelagem e análise de redes de regulação genômicas, bem como em redes descritas por reações metabólicas serão investigadas nos capítulos seguintes.

Capítulo 4

Redes de Petri e Reações Bioquímicas

Redes de reações bioquímicas são definidas por uma cadeia de reações acopladas por espécies químicas reativas em comum. Em geral, o número de espécies reativas pode ser muito grande, na ordem de dezenas a centenas de milhares de reações. Ainda que estes sistemas possam ser resolvidos pelo uso tradicional de equações diferenciais parciais, como é comumente feito, não fica evidente como que biomoléculas acoplando-se umas as outras originam circuitos retro-alimentados positivos, negativos e osciladores, por exemplo. Ainda que possa existir um grande número de processos interconectados, o número de moléculas chaves presentes na célula não é muito grande. Geralmente encontra-se na ordem de milhares a milhões. Esta ordem de grandeza, entre 10^3 ou 10^6 , está muito abaixo da ordem de grandeza quando comparada a cálculos que tomam por base quantidades molares ou mesmo pico-molares, as quais estão em torno de $\sim 6 \times 10^{32}$, $\sim 10^{12}$ moléculas/mol, respectivamente.

Portanto, devido a esta baixa ordem de grandeza e pelo fato de que reações moleculares acontecem sempre em quantidades inteiras, métodos matemáticos discretos muitas vezes mostram-se mais apropriados ao estudo destes sistemas (Reddy, Mavrovouniotis *et al.*, 1993; Heiner, Ventre *et al.*, 1994; Heiner e Deussen, 1996; Reddy, Liebman *et al.*, 1996; Schuster, Pfeiffer *et al.*, 2002; Will e Heiner, 2002; Voss, Heiner *et al.*, 2003;

Heiner e Koch, 2004; Koch, Junker *et al.*, 2005).

4.1. Sistemas Bioquímicos

Pode-se considerar que processos bioquímicos são compostos por dois elementos fundamentais: *reações moleculares* e *formação de complexo*. Estes elementos fundamentais, dados pela notação de hipergrafos comumente utilizada na representação de reações bioquímicas, encontram representação direta em redes de Petri, como ilustra a Figura 17 e Figura 18, respectivamente.

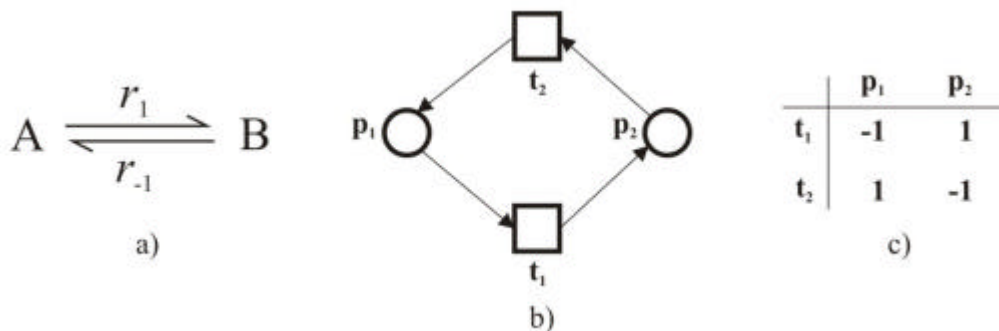


Figura 17. Mapeamento de reação bioquímica em (a) para a rede de Petri equivalente em (b) e a matriz de incidência do sistema é dado em (c).

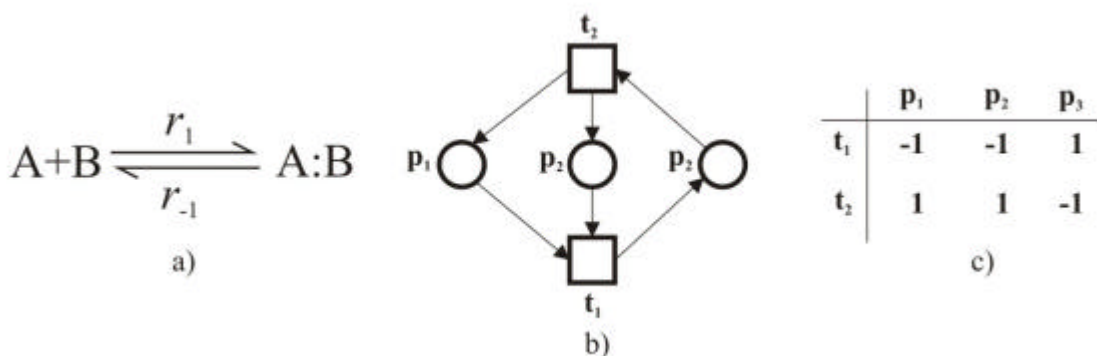


Figura 18. Mapeamento da formação de complexo em (a) para a rede de Petri equivalente em (b) e a matriz de incidência correspondente em (c).

De um ponto de vista operacional, a representação de reações bioquímicas na forma de redes de Petri assume a conotação de que transições atuam como controladores, enquanto que lugares atuam como variáveis de estado. Esta representação é uma

abstração combinatorial das interações moleculares, definidas no espaço das reações químicas, onde as transições definem as condições operacionais que devem ser satisfeitas para que uma reação ocorra. Nesta representação gráfica, uma espécie química move-se de um estado para outro, sujeita as regras de transições que asseguram um equilíbrio químico.

4.2. Modelagem em Termos de Redes de Petri

Nesta seção será feita a modelagem da reação de oxidação do carbono, a qual será utilizada nas seções subseqüentes de maneira a introduzir, exemplificar e explorar as etapas de modelagem e análise de reações químicas em termos de redes de Petri, exemplo este primeiramente explorado por (Heiner, Koch *et al.*, 2004).

4.2.1. Modelo da Oxidação do Carbono

A reação de oxidação do carbono em monóxido e dióxido de carbono ocorre através das seguintes reações:

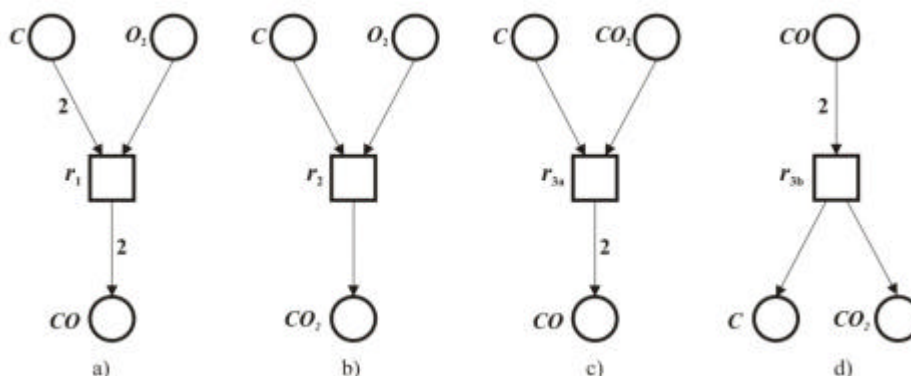
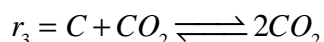
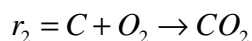
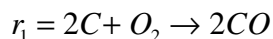


Figura 19. Modelo em redes de Petri das reações de oxidação do carbono. Em (a) e (b) estão representadas as reações r_1 e r_2 , enquanto que em (c) e (d) estão representadas as reações r_{3a} e r_{3b} .

Desta forma, a reação r_1 possui três lugares denominados de C , O_2 e CO . Para esta reação, os lugares C e O_2 constituem lugares de entrada e o lugar CO constitui um lugar de saída. A reação propriamente dita é representada por uma transição. Conectando lugares de entrada e saída à transição existe um conjunto de arcos cujos pesos correspondem aos coeficientes estequiométricos de cada espécie química envolvida na reação. A rede de Petri da reação r_2 é obtida da mesma forma. A reação r_3 , por ser reversível, é determinada por duas transições r_{3a} e r_{3b} e suas pré e pós-condições correspondentes à direção de cada fluxo reativo.

4.2.2. Modelo Básico

Utilizando-se das técnicas de refinamento e composição para redes de Petri introduzidas no capítulo anterior obtém-se o modelo básico em termos redes de Petri para a oxidação do carbono ilustrado pela Figura 20.

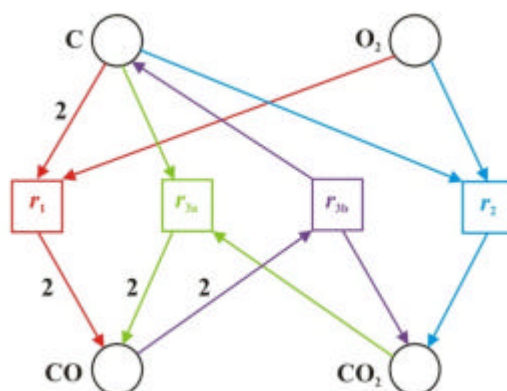


Figura 20. Modelo básico da oxidação do carbono em termos de redes de Petri.

A partir da fusão dos lugares homônimos dos modelos em termo de redes de Petri de cada reação chega-se a configuração geral do modelo para a oxidação do carbono. Resta ainda definir, para este modelo, as condições de entrada e saída do modelo geral. Esta definição dá origem aos critérios de avaliação do modelo que serão explorados na seção seguinte. Ao definirmos um fluxo infinito para a entrada e a saída do modelo optamos pela avaliação de determinadas propriedades do sistema, enquanto que a definição de um fluxo finito permite uma avaliação mais detalhada em termos das propriedades dinâmicas e estruturais do modelo.

4.3. Critérios de Validação

A interpretação direta das cadeias de reações químicas para redes de Petri leva a estruturas de rede que podem apresentar comportamentos distintos no que se refere a *limitabilidade* ou *ilimitabilidade* do sistema e todos os efeitos delas decorrentes sobre as propriedades passíveis de serem observadas a partir do modelo. Desta forma, na seqüência, serão definidos três critérios de avaliação de modelos com base na definição das entradas e saídas do sistema denominados de *ilimitado*, *limitado* e *misto*.

4.3.1. Modelo Ilimitado

Este critério é baseado sobre *hipóteses fracas* quanto ao fluxo de entrada e saída do sistema. Assume-se que o fluxo dos *componentes primários* e *auxiliares* seja *infinito não-enumerável*.

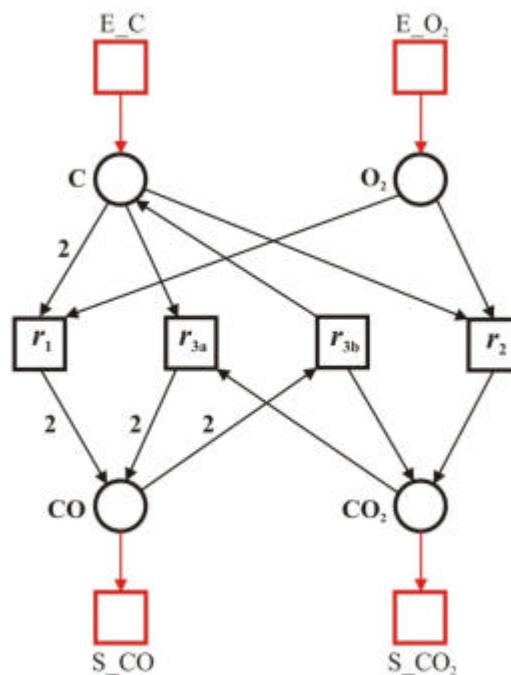


Figura 21. Modelo da oxidação do carbono concebido a partir do critério ilimitado.

A entrada do sistema é feita por transições que não possuem pré-condições, constituindo uma *fonte* infinita de marcas. Da mesma forma, a saída é feita por transições que não possuem pós-condições um *sumidouro* infinito de marcas.

4.3.2. Modelo Limitado

Este critério é baseado sobre *hipóteses fortes* quanto ao fluxo de entrada e saída do sistema. Assume-se que o fluxo dos *componentes primários* seja *finito* e que o fluxo dos *componentes auxiliares* seja *finitamente suficiente*. Para tal, é considerado as relações quantitativas ou de balanço entre os fluxos de entrada e saída do sistema, como no cálculo de balanço ilustrado pela Figura 22.

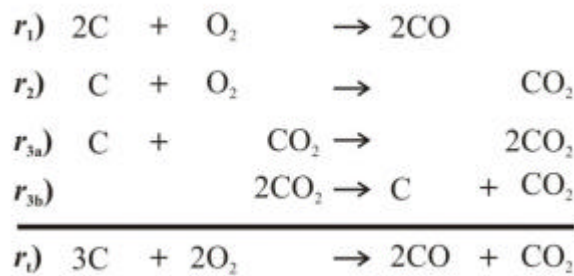


Figura 22. Cálculo da equação geral do sistema de oxidação do carbono.

Desta forma, a partir da equação geral do sistema é também construída a rede de Petri equivalente a esta equação. Obtendo-se a inversa da equação geral e conseqüentemente a rede de Petri correspondente a equação inversa, pode-se gerar uma estrutura de repetição das condições de entrada e saída, mantendo-se o fluxo finito.

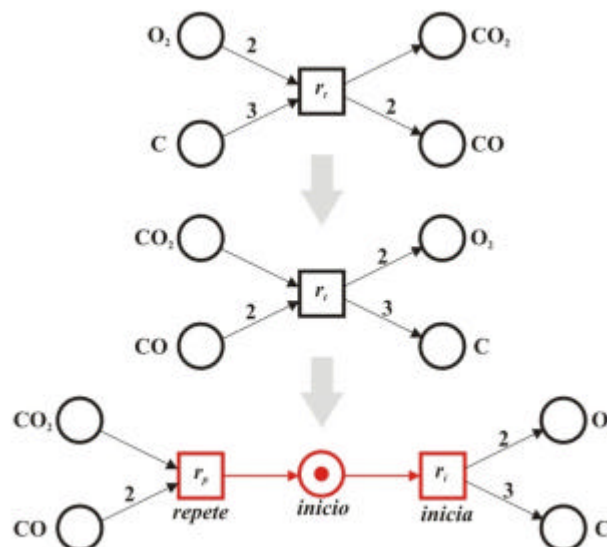


Figura 23. Inversa da equação geral do sistema de oxidação do carbono, r_1 . A transição r_1 é substituída pelas transições r_p (*repete*), r_i (*inicia*) e pelo lugar *inicio*.

Aplicando a técnica de composição para redes de Petri a transição r_i foi substituída por um conjunto *transição-circunscrita*, no qual estão inseridas as transições r_p e r_i e o lugar *início*, sem alterar a semântica da rede.

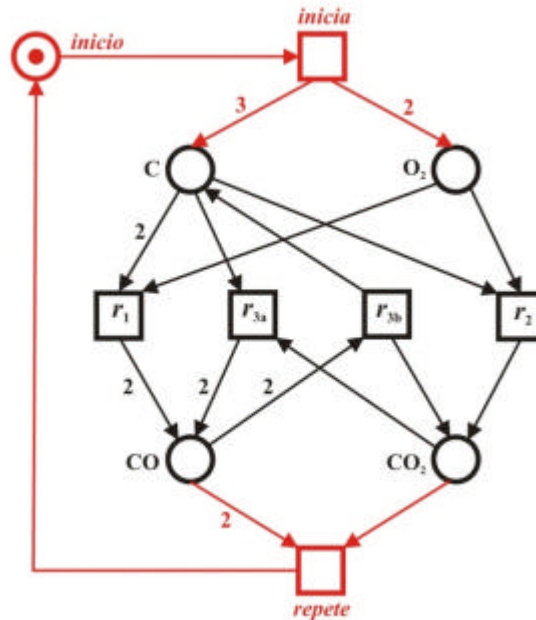


Figura 24. Modelo da oxidação do carbono limitado. O fluxo de entrada e saída do sistema está subordinado a equação geral do sistema, tornando-o finito e reinicializável.

O modelo limitado é então obtido impondo-se as entradas e saídas às condições descritas pela equação inversa e pelo ciclo de repetição introduzido pela sub-rede de substituição da transição r_i , conforme ilustrado pela Figura 24.

4.3.3. Modelo Misto

Este critério é baseado sobre *hipóteses firmes* quanto ao fluxo de entrada e saída do sistema. Assume-se que o fluxo dos *componentes primários* seja *infinito-enumerável* e que o fluxo dos *componentes auxiliares* seja *finitamente suficiente*. De outra forma, este critério é uma combinação dos critérios ilimitado e limitado quanto à imposição de condições aos fluxos de entrada e saída do sistema.

4.4. Análise

O modelo *limitado* da oxidação do carbono construído na seção anterior será utilizado nesta seção como objeto de estudo da análise por redes de Petri considerando-se as técnicas de análise das propriedades comportamentais e estruturais introduzidas no capítulo anterior.

4.4.1. Análise Comportamental

A análise comportamental baseia-se primeiramente na obtenção do grafo de alcançabilidade para sistemas limitados e no grafo de cobertura para sistemas ilimitados. A partir da existência destes grafos é então possível derivar propriedades relacionadas tais como:

- **Vivacidade**, sendo a propriedade que assegura a completa ausência de situações de impasse em um sistema. Então, se torna uma propriedade requerida na análise de sistemas biológicos, pois garante que todas as reações (transições) irão reagir (disparar), não importando o estado sucessor obtido a partir do estado inicial do sistema.
- **Limitabilidade**, sendo a propriedade que determina se o número de marcas em um determinado lugar é limitado, tem como conotação análoga a limitabilidade da concentração de um determinado metabólito durante a evolução dinâmica do sistema.
- **Reversibilidade**, sendo a propriedade que determina se o sistema estando em um estado sucessor qualquer possa retornar ao estado inicial, ou a um estado intermediário determinado, torna-se uma propriedade importante na análise de reações bioquímicas ou cadeias de reações bioquímicas reversíveis.

4.4.1.1. Grafo de Alcançabilidade

Para o exemplo do modelo limitado da oxidação do carbono e aplicando-se o algoritmo 4.1, obtém-se o grafo de alcançabilidade dado pela Figura 13. Por estes dois grafos é possível perceber que as reações r_1 e r_2 estão em conflito estrutural pelos lugares C e O₂ do modelo. Mas, devido à concentração (marcação) destes elementos no estado m_1 passam a ser a ter uma concorrência comportamental, ou dinâmica. No entanto, estas mesmas reações a partir das concentrações do estado m_3 encontram-se em conflito dinâmico e estrutural. Também, a partir do estado m_3 as transições r_1 e r_{3a} encontram-se

em conflito dinâmico.

Quanto às propriedades de interesse sob análise, este modelo demonstra ser *vivo*, *limitado* e *reversível*.

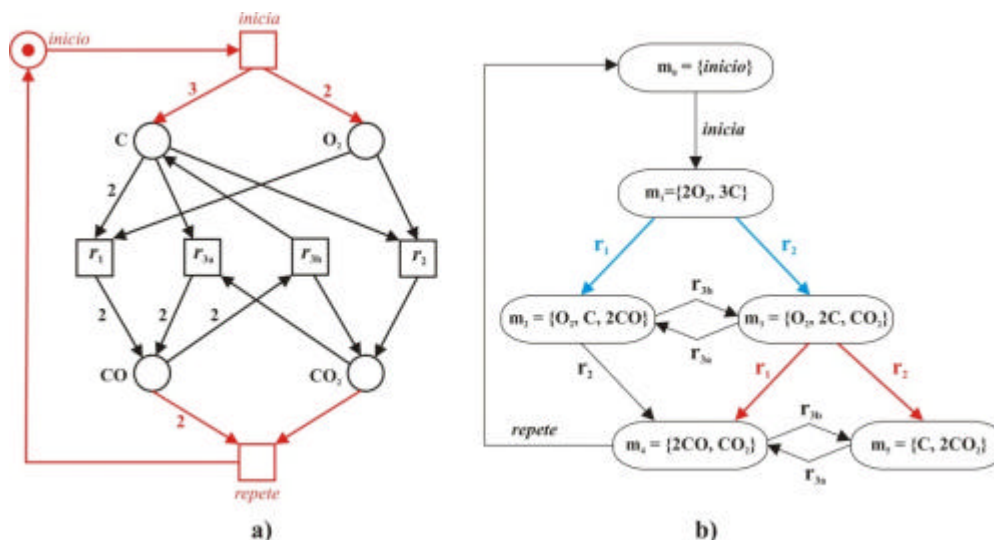


Figura 25. Grafo de alcançabilidade para o modelo limitado da oxidação do carbono. As reações r_1 e r_2 a partir do estado m_1 estão em concorrência dinâmica, enquanto que estas mesmas reações a partir do estado m_3 estão em conflito dinâmico e estrutural.

4.4.2. Análise Estrutural

A análise estrutural baseia-se na topologia da rede permitindo verificar a existência de circuitos, os quais podem determinar o equilíbrio na distribuição de metabólitos, *invariantes de lugar*, bem como o equilíbrio na seqüência de reações, *invariantes de transição*. Também, a partir da identificação destes circuitos pode-se fazer uma decomposição da rede em sub-redes menores o que permite uma análise independente de cada circuito e sua relação de interconexão a outros circuitos da rede.

- **Invariância de Lugar**, sendo a propriedade que identifica o conjunto de lugares para os quais permanece preservada a relação estequiométrica do conjunto de marcas destes lugares. Também, um lugar que pertença a um vetor de invariância é garantido que seja limitado.
- **Invariância de transições**, sendo a propriedade que identifica uma seqüência de transições que não altera o equilíbrio das marcações contidas nesta seqüência pode ser associada ao equilíbrio estável no fluxo de substâncias em uma dada seqüência de reações.

4.4.2.1. Invariantes de Transição

Para o exemplo do modelo limitado da oxidação do carbono e aplicando o algoritmo para identificação de invariantes de transição, obtém-se o seguinte conjunto de invariantes:

1. Invariante de transição $\mathbf{x}_1 = \{r_{3a}, r_{3b}\}$, correspondente ao circuito interno da reação reversível r_3 .

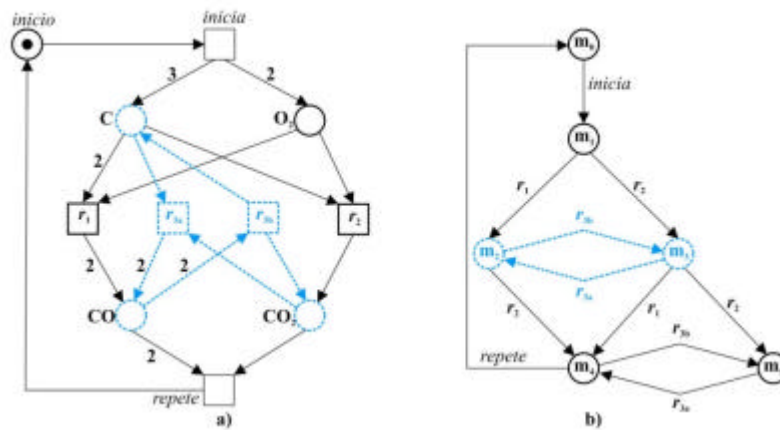


Figura 26. Circuito correspondente a invariante de transição $\mathbf{x}_1 = \{r_{3a}, r_{3b}\}$.

2. Invariante de transição $\mathbf{x}_2 = \{inicia, 2r_1, r_{3b}, repete\}$, correspondente ao circuito de produção de monóxido e dióxido através das reações r_1 e r_{3b} , sendo que para cada ocorrência de r_{3b} , r_1 ocorre duas vezes.

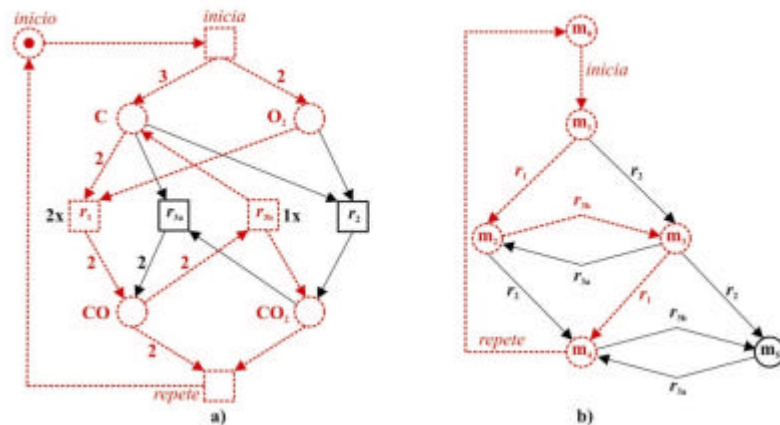


Figura 27. Circuito correspondente a Invariante de transição $\mathbf{x}_2 = \{inicia, 2r_1, r_{3b}, repete\}$.

3. Invariante de transição $\mathbf{x}_3 = \{inicia, 2r_2, r_{3a}, repete\}$, correspondente ao circuito de produção de monóxido e dióxido de carbono através das seqüências de ocorrências $\mathbf{s}_1 = \{r_2 r_{3a} r_2\}$ ou $\mathbf{s}_2 = \{r_2 r_2 r_{3a}\}$, quando se ignora as transições de início e repetição, sendo que para cada ocorrência da reação r_{3a} a reação r_2 ocorre duas vezes.

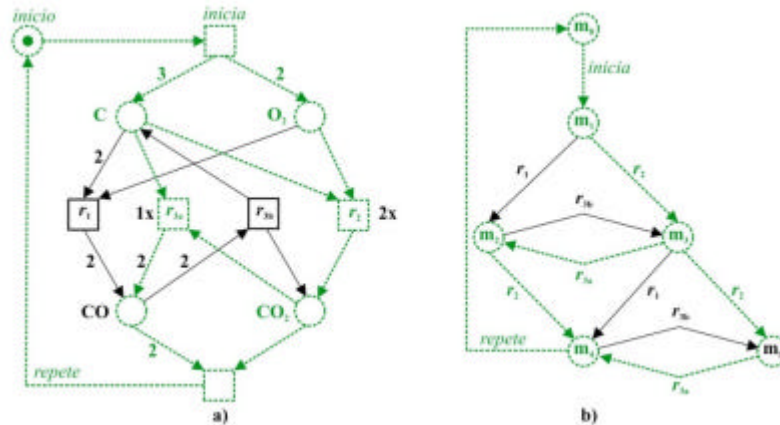


Figura 28. Circuito correspondente a invariante de transição $\mathbf{x}_3 = \{inicia, 2r_2, r_{3a}, repete\}$.

4. Invariante de transição $\mathbf{x}_4 = \{inicia, r_1, r_2, repete\}$, correspondente ao circuito de produção de monóxido e dióxido de carbono através das seqüências de ocorrências $\mathbf{s}_1 = \{r_1 r_2\}$ ou $\mathbf{s}_2 = \{r_2 r_1\}$ relativas as reações r_1 e r_2 .

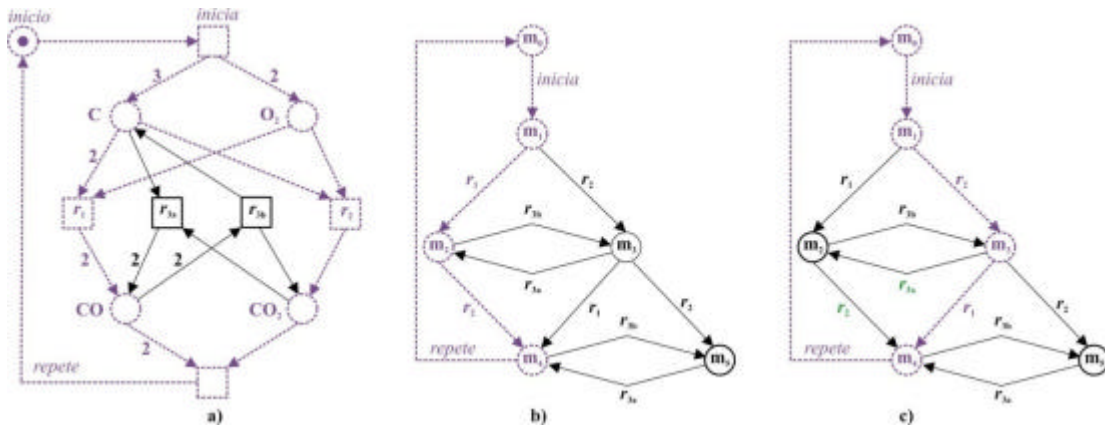


Figura 29. Circuito correspondente a invariante de transição $\mathbf{x}_4 = \{inicia, r_1, r_2, repete\}$.

4.4.2.2. Invariantes de Lugar

Invariantes de lugar indicam o equilíbrio do fluxo de substâncias $\mathbf{ym} = \mathbf{ym}_0$ para qualquer estado alcançável \mathbf{m} obtido a partir do estado inicial \mathbf{m}_0 , não importando a frequência de ocorrências das transições neste circuito. Por exemplo, para o modelo limitado da oxidação de carbono obtém-se duas invariantes de lugar:

1. Invariante de lugar $\mathbf{y}_1 = \{4início, 2O_2, CO, 2CO_2\}$, correspondente ao circuito de preservação do oxigênio.

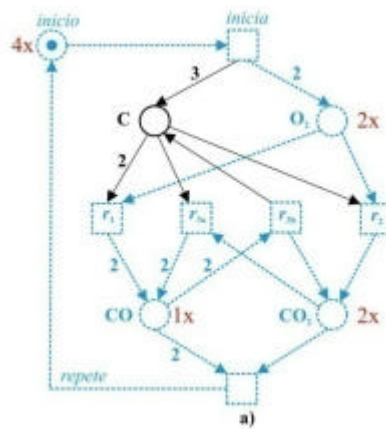


Figura 30. Circuito correspondente a invariante de lugar $\mathbf{y}_1 = \{4início, 2CO, CO, 2CO_2\}$.

2. Invariante de lugar $\mathbf{y}_2 = \{3início, C, CO, CO_2\}$, correspondente ao circuito de preservação de carbono.

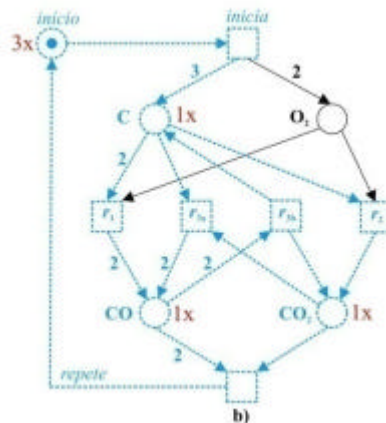


Figura 31. Circuito correspondente a invariante de lugar $\mathbf{y}_1 = \{3início, C, CO, CO_2\}$.

4.5. Resumo

Neste capítulo foi introduzida a modelagem de sistemas bioquímicos em termos de redes de Petri. Foi possível verificar que a notação em termos de hipergrafos comumente utilizada na descrição de reações bioquímicas encontra equivalência direta no formalismo de redes de Petri.

Este mapeamento da notação de reações químicas para redes de Petri não constitui todo o processo de modelagem. Após a obtenção do modelo primário torna-se necessário a aplicação de critérios as entradas e saídas do modelo. A definição destes critérios leva a três tipos de modelos: o *ilimitado*, o *limitado* e o *misto*. A diferenciação destes critérios é dada pelo caráter das hipóteses formuladas sobre os elementos *primários* e *auxiliares* de uma reação, o qual pode ser: *fraco*, *firme* ou *forte*. Um caráter fraco assume que os elementos primários e auxiliares são *infinitos não-enumeráveis*. Um caráter firme assume que os elementos primários sejam *finitos*, enquanto que os elementos auxiliares sejam *infinitos não-enumeráveis*. Finalmente, um caráter forte assume que os elementos primários e secundários sejam *finitos enumeráveis*, sendo que neste caso a quantificação da relação entre entradas e saídas é dada pelo cálculo do balanço estequiométrico das reações.

Como um primeiro exemplo foi utilizado as reações químicas de oxidação do carbono em dióxido e monóxido de carbono. Para este caso, o modelo básico obtido foi modificado de maneira a ser enquadrado no critério de análise *limitado*. Este modelo limitado foi então submetido aos procedimentos de análise *dinâmica* e *estrutural* de redes de Petri. Na análise dinâmica foi possível construir o *grafo de alcançabilidade* a partir do qual foram verificadas as propriedades que dependem da marcação inicial do sistema, tais como: *vivacidade*, *reversibilidade* e *limitabilidade*. Na análise *estrutural* foram verificadas as *invariantes* de transição e de lugar, as quais permitem identificar os sub-circuitos mínimos que compõem a rede e suas inter-relações.

O próximo capítulo introduz um método formal de modelagem e análise de redes de regulação da expressão gênica que captura o caráter lógico presente em redes de regulação e sua correspondente transcrição para redes de Petri.

Capítulo 5

Redes de Regulação Gênica

Neste capítulo é apresentado o formalismo de Grafos Regulatórios introduzido por René Thomas e seus colaboradores (Thomas, 1991; Thieffry e Thomas, 1995; , 1998) para modelagem e análise de redes de regulação genômicas. Em seguida, a partir de um exemplo de redes de interação gênica este formalismo é explorado de maneira a verificar a caracterização das equações de estado e dinâmicas do sistema. Uma vez obtido o modelo em termos de grafos regulatórios, este é transcrito para o formalismo de redes de Petri segundo os critérios definidos em (Chaouiya, 2004; Remy, Ruet *et al.*, 2005; Simao, Remy *et al.*, 2005). Estes mesmos procedimentos serão aplicados no capítulo seguinte de maneira a se obter o modelo de regulação da biossíntese do triptofano em termos de redes de Petri.

5.1. Grafos de Regulação

Como em muitos outros campos, também na biologia circuitos retroativos desempenham um papel crucial. Retroação é a base geradora da complexidade dinâmica, na qual se incluem a multiestacionariedade, a periodicidade simples e complexa, e, por conseguinte o caos. Sendo assim, a questão colocada por Thomas é “*Como tratar apropriadamente sistemas que apresentam uma multiplicidade de circuitos retroativos interligados?*”. Uma resposta simples a esta questão é a de utilizar sistemas de equações diferenciais. Mesmo assim, em função do caráter não linear, estes sistemas não podem ser tratados de forma analítica e sim são calculados para uma determinada precisão numérica. Mas, esta precisão pode ser enganosa, pois a escolha de parâmetros e a função de aproximação sempre terão que ser “inventados” e, por conseguinte diferentes dinâmicas podem ser originadas para pequenas variações nos parâmetros.

Diferente da idealização linear, a qual apropriadamente pode ser aplicada somente para a vizinhança dos estados estáveis do sistema, uma idealização com base em uma descrição lógica aproxima-se infinitamente ao caráter não linear do sistema. Pois, descrições lógicas utilizam variáveis que assumem um número limitado de valores, que para o caso Booleano encontra-se entre 0 e 1. Inicialmente esta descrição aparenta ser uma caricatura grosseira do sistema, mas logo se mostra não ser o caso quando se percebe que em fenômenos biológicos, a maioria das interações biomoleculares exibem um comportamento duplamente não linear, ou seja, um regulador é geralmente ineficiente abaixo de um fator de limiar e o efeito do regulador rapidamente é percebido acima deste fator. Este comportamento resulta em uma função sigmoideal, a qual é caracterizada pelo fator de limiar ditado pela concentração do regulador e pelo patamar ditado pelo efeito do regulador.

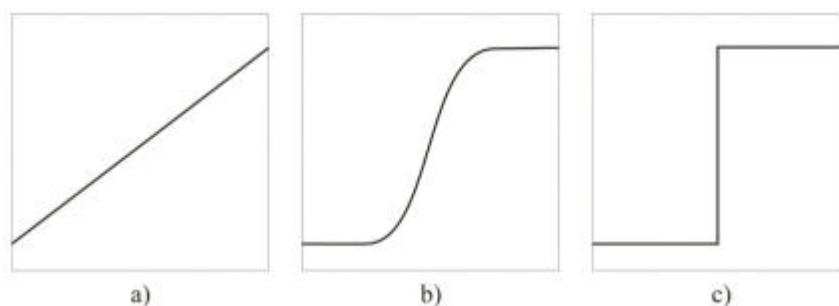


Figura 32. Idealização linear (a); Comportamento sigmoideal relacionando a concentração do regulador e seu efeito (b); Idealização lógica, a qual é infinitamente não linear.

Tais não linearidades são responsáveis pelas dificuldades introduzidas no tratamento de sistemas de equações diferenciais e ao mesmo tempo constituem elementos essenciais de muitas propriedades destes sistemas. Desta forma, a descrição lógica de sistemas não

lineares aproxima-se muito fortemente do comportamento exibido por estes sistemas e preserva suas propriedades, ainda que qualitativamente.

Na sua forma mais simples, a descrição lógica associa uma variável lógica x a cada elemento do sistema. Esta variável lógica assume o valor 1, indicando que o produto de um gene está “*presente*”, quando a variável real x correlata exceder o fator de limiar q . Da mesma forma a variável x assumira o valor 0, indicando que o produto do gene está “*ausente*” quando a variável real x estiver abaixo do fator de limiar q .

O estado do sistema pode então ser descrito por um vetor de variáveis lógicas $[x, y, z, \dots]$, ou *vetor de estados*, o qual fornece valores lógicos em uma ordem definida. Por exemplo, o vetor 010 descreve o estado para o qual o elemento x está “*ausente*”, o elemento y está “*presente*” e o elemento z está “*ausente*”.

O conceito de tempo é introduzido pelo vetor de estado sucessor $[x, y, z]_{t+1}$, para cada valor do vetor de estado $[x, y, z]_t$. Esta descrição *síncrona* não se mostra realista para sistemas biológicos, pois assume que cada estado lógico possui um único estado sucessor e não admite nenhuma escolha (bifurcação) entre estados, também assume que todas as reações ocorrem simultaneamente.

5.1.1. Função Lógica

Outra forma de descrever a *evolução* do sistema a partir de um vetor de estado inicial se dá pela adoção de uma *função lógica*, sob a forma,

$$X = f_x(x,y,z), \quad Y = f_y(x,y,z), \quad Z = f_z(x,y,z) \quad (16)$$

as quais são construídas a partir do grafo de interação, onde uma interação de *ativação* remete a variável sob esta ação para o valor 1 e uma interação de *inibição* remete para o valor 0. Por exemplo, para o grafo de interações da Figura 33,

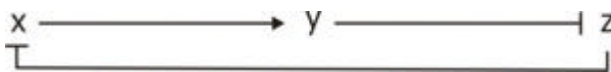


Figura 33. Grafo de regulação gênica. Onde, x , y e z são produtos dos genes X , Y e Z , respectivamente. Setas indicam uma ativação e barras uma inibição.

significa que para o sistema considerado, o produto do gene X , ou seja x , é sintetizado se e somente se o produto z estiver *ausente*, o produto y é sintetizado se e somente se o produto x estiver *presente* e o produto z é sintetizado se e somente se o produto y estiver *ausente*. Para o exemplo, as funções lógicas são dadas por,

$$X = \bar{z}, Y = x, Z = \bar{y} \tag{17}$$

Desta forma, o *estado* do sistema é dado pelas possíveis combinações das *interações de entrada* exercidas pelos *produtos* dos genes e a *evolução* do sistema pela aplicação da função lógica de saída que determina os estados dos genes.

Tabela 2. Espaço de estado dos produtos versus espaço de estados dos genes.

Produtos			Genes		
x	y	z	$X = f_x(\bar{z})$	$Y = f_y(x)$	$Z = f_z(\bar{y})$
0	0	0	1	0	1
0	0	1	0	0	1
0	1	0	1	0	0
0	1	1	0	0	0
1	0	0	1	1	1
1	0	1	0	1	1
1	1	0	1	1	0
1	1	1	0	1	0

A presença do produto da expressão de um gene não se faz presente de forma imediata, bem como após a inibição deste mesmo gene seu produto ainda persiste por um tempo. Desta forma, não existe razão para que dois genes possuam o mesmo atraso associado a seus estados lógicos de *ligado* e *desligado*. Esta observação permite uma *descrição assíncrona* da evolução do sistema, para a qual se assume que todos os atrasos são diferentes, salvo mera coincidência. Por exemplo, a condição inicial 000 indica que quando todos os produtos estiverem ausentes os genes X e Z estão *ligados* e o gene Y *desligado*, o que corresponde à saída 101 da Tabela 2.

Tabela 3. Chamada para mudança de estado indicada pelos sinais “+” ou “-”.

Produtos			Genes		
x	y	z	$X = f_x(\bar{z})$	$Y = f_y(x)$	$Z = f_z(\bar{y})$
⁺ 0	0	⁺ 0	1	0	1
0	0	1	0	0	1
⁺ 0	⁻ 1	0	1	0	0
0	⁻ 1	⁻ 1	0	0	0
1	⁺ 0	⁺ 0	1	1	1
⁻ 1	⁺ 0	1	0	1	1
1	1	0	1	1	0
⁻ 1	1	⁻ 1	0	1	0

Para este mesmo exemplo, existe uma chamada para que os produtos dos genes X e Z

sejam sintetizados. Sendo que, a existência desta chamada pode ser verificada toda vez que houver mudança nas coordenadas homônimas entre o espaço de estados dos produtos e o espaço de estados dos genes. A variação de cada coordenada irá indicar se a chamada será de *ativação* ou de *inibição* e pode ser representada pela inserção dos sinais “+” ou “-“ sobre a coordenada correspondente. Esta representação, embora redundante para o caso binário, torna-se essencial para sistemas de mais de dois estados lógicos.

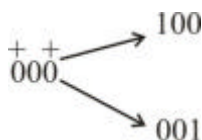
5.1.2. Estado Lógico Estável

Pode-se observar na Tabela 3, nas linhas sombreadas, que dois estados não indicam chamadas para mudança de estado, devido às coordenadas dos produtos serem idênticas às coordenadas dos genes, e isto caracteriza dois *estados lógicos estáveis*.

Segue imediatamente deste exemplo que a multiestacionariedade é resultante de circuitos retroativos positivos, como pode ser verificado pelos sinais das interações da Figura 33. Neste caso, o sistema pode escolher entre dois atratores, o estado estável 001 no qual somente o gene Z permanece *ligado* e o estado estável 110 onde os genes X e Y permanecem *ligados* e o gene Z *desligado*. Esta propriedade não depende do número de elementos no sistema e sim da paridade das interações de inibição, ou melhor, das interações negativas (Thomas, 1991).

5.1.3. Sequências Temporais de Estados Lógicos

A partir da tabela de estados é possível derivar seqüências de estados lógicos originando um grafo de transições de estados, a partir de um dado estado inicial. Por exemplo, partindo-se do estado 000 existe uma chamada para sintetizar x e outra para sintetizar z. Dependendo de qual chamada é realizada primeiro, é gerado inicialmente o grafo,



onde se percebe que mesmo o estado 000 tendo como imagem 101, o próximo estado pode ser 100 ou 001. Isto caracteriza que a imagem de um estado sendo de alguma forma uma projeção de um estado futuro, necessariamente não é coincidente com o próximo estado sucessor.

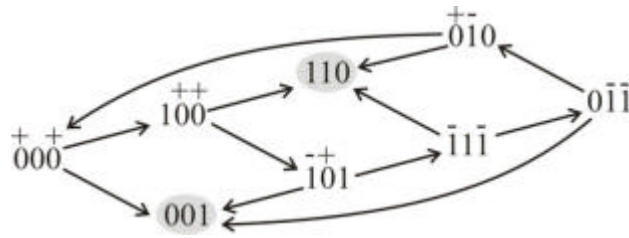


Figura 34. Grafo de transição para o sistema da Tabela 4.

A Figura 34 apresenta o grafo de transição completo para o grafo de regulação dado pela Figura 33.

5.1.4. Definição Generalizada

Um grafo de regulação é um grafo rotulado onde vértices representam genes, ou entidades moleculares que participam na regulação gênica, e arcos representam interações entre genes. Em cada arco, rótulos indicam as condições para as quais uma interação torna-se funcional, conjuntamente com o sinal desta interação.

Definição 5.1. Um grafo de regulação é um grafo orientado dado pela 4-tupla $RG = (\mathbf{G}, \mathbf{I}, l, s)$, onde:

- \mathbf{G} é um conjunto finito de vértices, os quais representam genes ou entidades moleculares que participam ativamente no processo de regulação.
- \mathbf{I} é um conjunto finito de arcos definidos para $I \subseteq G \times G$, os quais determinam as interações entre genes.
- l é um conjunto de números inteiros positivos definido para o intervalo $l = \{1, 2, 3, \dots, max_i\}$, onde max_i representa o nível máximo de expressão de um determinado gene g_i em \mathbf{G} .
- s é um número inteiro definido para o conjunto $s = \{-1, 0, +1\}$, onde $s = \{-1\}$ representa uma repressão, $s = c$ uma ativação e $s = \{0\}$ uma indeterminação.

Desta forma uma interação $I = (g_i, g_j, l, s)$ é descrita pela interação de um gene fonte g_i sobre um gene alvo g_j , pelo intervalo discreto l para o qual esta interação irá atuar, ou seja tornar-se funcional, e pelo sinal s designando se irá ocorrer uma ativação ou repressão gênica. Ainda, uma interação pode estar sujeita as seguintes condições:

Para todo gene de origem g_i em G e para todo valor discreto l_k do intervalo de expressão $0 \leq l_i \leq \max_i$ de g_i existe uma interação I_k partindo de g_i tal que $0 < l_k \leq l_i$.

De outra forma, existe uma correspondência biunívoca entre os níveis de expressão de um gene e seu número de interações sobre outros genes e que todo nível de expressão não trivial de um gene corresponde a um fator de limiar a partir do qual o gene torna-se atuante e a interação é dita funcional.

Seja \mathfrak{S} o conjunto de interações exercidas sobre um gene alvo e X um subconjunto de \mathfrak{S} , então X é admissível se não apresentar interações que tenham o mesmo gene de origem atuando sob um mesmo intervalo.

O mapeamento lógico $K : X \rightarrow l$ entre uma entrada admissível X e o nível de expressão l indica o nível de expressão com o qual o gene alvo irá responder a esta entrada.

Nota 1: Para um dado gene alvo g_j a ausência de uma interação de inibição sobre este gene leva seu nível de expressão a progredir para o seu limite máximo de expressão o que corresponde a $K(\emptyset) = l_k$ para $1 \leq l_k \leq \max_j$.

Nota 2: Quando X for um subconjunto não admissível de \mathfrak{S} , então $K_j(X) = 0$.

5.1.5. Representação Gráfica

Para o exemplo da Figura 35, o conjunto de genes é dado por $G = \{a, b, c\}$, com $\max_a = 2$, $\max_b = 1$ e $\max_c = 1$. O gene a é um regulador dual, ou seja, ele ativa ou inibe o gene b dependendo do contexto. O gene b ativa o gene c , bem como a si próprio, enquanto que o gene c inibe o gene a .

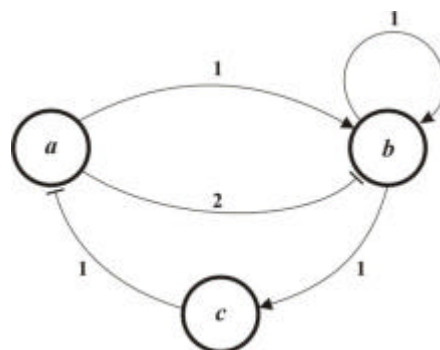


Figura 35. Grafo de regulação. Nodos representam genes, arcos interações. Setas representam uma ação de ativação e barras inibição.

Para este exemplo, existem cinco interações: $I_1 = (a,b,1,+1)$, $I_2 = (a,b,2,-1)$, $I_3 = (b,b,1,+1)$, $I_4 = (b,c,1,+1)$ e $I_5 = (c,a,1,-1)$. Para o gene a , o conjunto de interações de entrada é dado por $\mathfrak{S}_a = \{I_5\}$, cujo subconjunto é dado por $X_a = \{\emptyset, \{I_5\}\}$, sendo que o gene c tem como conjunto de entrada $\mathfrak{S}_c = \{I_4\}$ e subconjunto $X_c = \{\emptyset, \{I_4\}\}$, finalmente o gene b tem como conjunto de entrada $\mathfrak{S}_b = \{I_1, I_2, I_3\}$ e $X_b = \{\emptyset, \{I_1\}, \{I_2\}, \{I_3\}, \{I_1, I_2\}, \{I_1, I_3\}, \{I_2, I_3\}, \{I_1, I_2, I_3\}\}$.

A aplicação da função lógica para o gene a quando as interações de entrada forem vazias é dada por $K_a(\emptyset) = 2$, pois não existe nenhuma interação que impeça seu nível de expressão de progredir para seu valor máximo, enquanto que $K_a(\{I_5\}) = 0$, pois o gene c está atuando sobre o gene a levando-o a um decremento de seu nível de expressão para um valor mínimo.

5.1.6. Dinâmica do Sistema

Sejam $|g_i| = l_k$ um valor discreto do intervalo de expressão $l_i = \{0, 1, 2, \dots, \max_i\}$ do gene g_i de forma que $0 \leq l_k \leq l_i$ e o vetor de estado inicial $x_0 = (l_{k_1}, l_{k_2}, l_{k_3}, \dots, l_{k_i})$ onde l_{k_i} representa o nível de expressão inicial do gene g_i , então resta-nos a seguinte questão: Quais serão os estados sucessores alcançados pelo sistema? Para responder a esta questão primeiro representamos por \mathbf{e} o espaço de estados tal que,

$$\mathbf{e} = \{ \{x_0, x_1, x_2, \dots, x_n\} \mid 0 \leq x_i \leq n \} \quad (18)$$

Para um dado estado x_i em \mathbf{e} e para um determinado gene alvo g_j , existe um conjunto de interações de entrada admissíveis $X_{g_j}(x_i)$ atuando sobre g_j tal que,

$$X_{g_j}(x_i) = \{ \{X_{g_j,1}, X_{g_j,2}, \dots, X_{g_j,i}\} \mid \forall (g_i, g_j, l_k, s) \in X . 1 \leq l_k \leq \max_i \} \quad (19)$$

O conjunto de interações de entradas atuantes $X_{g_j}(x_i)$ é denominado de conjunto de instruções para o estado x_i e sobre este conjunto é então aplicado a função lógica $K(X_{g_j}(x_i)) = l_k$, a qual faz o mapeamento lógico de cada instrução para um nível discreto de expressão do gene alvo g_j .

Tabela 4. Espaço de estados para o grafo de regulação da **Figura 35**.

Estados x_i			Instruções			Parâmetros		
a	b	c	$X_a(x_i)$	$X_b(x_i)$	$X_c(x_i)$	$K(X_a(x_i))$	$K(X_b(x_i))$	$K(X_c(x_i))$
0	0	0	\emptyset	\emptyset	\emptyset	2	0	0
0	0	1	$\{I_5\}$	\emptyset	\emptyset	0	0	0
0	1	0	\emptyset	$\{I_3\}$	$\{I_4\}$	2	1	1
0	1	1	$\{I_5\}$	$\{I_3\}$	$\{I_4\}$	0	1	1
1	0	0	\emptyset	$\{I_1\}$	\emptyset	2	1	0
1	0	1	$\{I_5\}$	$\{I_1\}$	\emptyset	0	1	0
1	1	0	\emptyset	$\{\{I_1\}, \{I_3\}\}$	$\{I_4\}$	2	1	1
1	1	1	$\{I_5\}$	$\{\{I_1\}, \{I_3\}\}$	$\{I_4\}$	0	1	1
2	0	0	\emptyset	$\{I_2\}$	\emptyset	2	0	0
2	0	1	$\{I_5\}$	$\{I_2\}$	\emptyset	0	0	0
2	1	0	\emptyset	$\{\{I_2\}, \{I_3\}\}$	$\{I_4\}$	2	0	1
2	1	1	$\{I_5\}$	$\{\{I_2\}, \{I_3\}\}$	$\{I_4\}$	0	0	1

5.1.6.1. Dinâmica Síncrona

Sob a *dinâmica síncrona*, a cada intervalo de tempo, todas as chamadas de mudança de estado são executadas simultaneamente. Como resultado, cada estado possui exatamente um estado sucessor. Do ponto de vista biológico, isto implicaria que todos os processos biomoleculares deveriam ocorrer em quantidades de tempos iguais, o que se mostra irreal e constitui somente um artifício de simulação.

Seja $\mathbf{x}_s = (\mathbf{e}, F)$ o grafo de alcançabilidade síncrona, onde $\mathbf{e} = (x_0, x_1, x_2, \dots, x_i)$ é o espaço de estados, $x_i = (l_{k_1}, l_{k_2}, \dots, l_{k_i})$ o estado corrente onde l_{k_i} é o nível de expressão atual do gene g_i definido para o intervalo $0 \leq l_{k_i} \leq \max_i$, $X_{g_i}(x_i)$ o conjunto de entradas atuantes sobre um gene alvo g_j , $K(X_{g_i}(x_i))$ o valor de resposta de g_j a suas entradas definido no intervalo $0 \leq l_{k_j} \leq \max_j$, então existe um arco $f \in F$ do estado x_i para um único estado sucessor x_{i+1} obtido da atualização simultânea de suas coordenadas tal que,

$$x_{i+1} = (l_{k_1}, l_{k_2}, \dots, l_{k_i}) = \begin{cases} l_{k_i} & \text{se } K(X_{g_i}(x_i)) = l_{k_i} \\ l_{k_i} - 1 & \text{se } K(X_{g_i}(x_i)) < l_{k_i} \\ l_{k_i} + 1 & \text{se } K(X_{g_i}(x_i)) > l_{k_i} \end{cases} \quad (20)$$

Para o exemplo, no estado inicial $x_0 = (0,0,0)$ o nível de expressão corrente do gene a é $l_{k_a} = 0$ e para este estado $K(X_a(\emptyset)) = 2$, $K(X_b(\emptyset)) = 0$, $K(X_c(\emptyset)) = 0$, então existe

uma chamada para incrementar de uma unidade o nível de expressão correspondente a coordenada do gene a , levando ao estado sucessor $x_1 = (1,0,0)$. Procedendo-se da mesma forma obtém-se o grafo de transição síncrono ilustrado pela Figura 36.

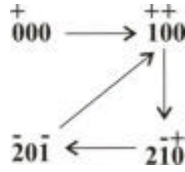


Figura 36. Grafo de transição síncrona para o grafo de regulação da Figura 43.

Nota 3. Pela definição deste método, entende-se que o incremento ou decremento do nível de expressão de estado para estado ocorre de uma unidade. Pela definição, a função de mapeamento K é um indicador do acréscimo ou decréscimo do nível de expressão, bem como do patamar para o qual tende o nível de expressão, mas a evolução do sistema sempre irá ocorrer em passos de uma unidade.

5.1.6.2. Dinâmica Assíncrona

Seja $\mathbf{x}_a = (\mathbf{e}, F)$ o grafo de transição assíncrona, onde $\mathbf{e} = (x_0, x_1, x_2, \dots, x_i)$ é o espaço de estados, $x_i = (l_{k_1}, l_{k_2}, \dots, l_{k_i})$ o estado corrente onde l_{k_i} é o nível de expressão atual do gene g_i definido para o intervalo $0 \leq l_{k_i} \leq \max x_i$, $X_{g_i}(x_i)$ o conjunto de entradas atuantes sobre um gene alvo g_j , $K(X_{g_i}(x_i))$ o valor de resposta de g_j a suas entradas definido no intervalo $0 \leq l_{k_j} \leq \max x_j$, então existe um arco $f \in F$ do estado x_i para cada estado sucessor x_{i+1} sempre que $K(X_{g_i}(x_i)) \neq l_{k_i}$ e l_{k_i} de cada novo estado atualizado como segue,

$$x_{i+1} = (l_{k_1}, l_{k_2}, \dots, l_{k_i}) = \begin{cases} l_{k_i} - 1 & \text{se } K(X_{g_i}(x_i)) < l_{k_i} \\ \text{ou} \\ l_{k_i} + 1 & \text{se } K(X_{g_i}(x_i)) > l_{k_i} \end{cases} \quad (21)$$

Para o exemplo, no estado inicial $x_0 = (0,0,0)$ o nível de expressão corrente do gene a é $l_{k_a} = 0$ e para este estado $K(X_a(\emptyset)) = 2$, $K(X_b(\emptyset)) = 0$, $K(X_c(\emptyset)) = 0$, então existe uma chamada para incrementar de uma unidade o nível de expressão correspondente a coordenada do gene a , levando ao estado sucessor $x_1 = (1,0,0)$. Tomando-se x_1 como o estado atual, e sendo que para este estado $K(X_a(\emptyset)) = 2$, $K(X_b(\{I_1\})) = 1$, $K(X_c(\emptyset)) = 0$, então existe uma chamada para incrementar o nível de expressão do

conectados por arcos de teste a $t_{i,X}^+$ e a $t_{i,X}^-$, de maneira que:

- Para todo $(g_j, s_j) \in X$, a condição $x_j \geq s_j$ dever ser satisfeita de maneira a assegurar que a interação esteja atuante, sendo o lugar g_j um lugar de entrada conectado a um arco de teste com peso s_j .
- Para todo $(\widetilde{g}_j, s_j) \in \mathfrak{S}(i) \setminus X$, a condição $x_j \leq s_j - 1$ dever ser satisfeita de maneira a assegurar que a interação não esteja atuante, sendo o lugar \widetilde{g}_j um lugar de entrada conectado por arcos de teste de peso $\mathbf{M}_j - s_j + 1$.
- Se $x_i \geq K_i(X) + 1$, então a transição $t_{i,X}^-$ está habilitada e decreta o nível de expressão do gene g_i , levando uma marca de g_i para \widetilde{g}_i .
- Se $x_i \leq K_i(X) - 1$, então a transição $t_{i,X}^+$ está habilitada e incrementa o nível de expressão do gene g_i , levando uma marca de \widetilde{g}_i para g_i .
- Se $x_i = K_i(X)$, então nada acontece.

5.2.1. Regulação do Nodo a

Sobre o nodo a exerce uma interação: o gene c no nível 1 leva a um decremento da expressão do gene a . O conjunto de partes das interações atuantes sobre o gene a é dado por $X_a = \{\emptyset, \{I_5\}\}$. Neste caso, a função lógica descrita pelas combinações do conjunto de partes é dada por uma única variável,

$$f_a(X_a) = I_5$$

A função lógica para o caso que nenhuma destas interações estejam atuando sobre o gene a é dada por,

$$f_a(\emptyset) = \overline{I_5}$$

Desta forma, existirão duas transições t_1 e t_2 , cada qual representando a presença ou ausência das interações de entrada sobre o gene a , como dado a seguir pela Tabela 6.

Tabela 5. Transições correspondentes às interações atuantes sobre o nodo *a*.

<i>Transição</i>	<i>Instrução</i>	<i>Parâmetro</i>
t_1	$\{I_5\}$	0
t_2	$\{\bar{I}_5\}$	2

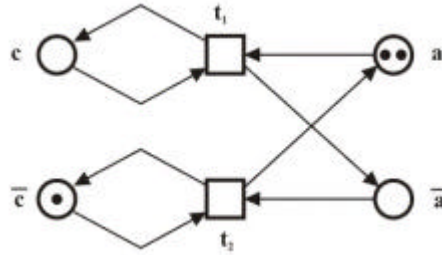


Figura 38. Rede de regulação do gene *a*.

A rede de Petri da Figura 38 representa o conjunto de pré e pós-condições das transições t_1 e t_2 que regulam o gene *a*.

5.2.2. Regulação do Nodo *b*

Sobre o nodo *b* exercem três interações: o gene *a* no nível 1 leva a um incremento da expressão do gene *b* e no nível 2 leva a um decremento. Ainda, o gene *b* no nível 1 leva a um auto-incremento. O conjunto de partes das interações atuantes sobre o gene *b* é dado por $X_b = \{\emptyset, \{I_1\}, \{I_2\}, \{I_3\}, \{I_1, I_2\}, \{I_1, I_3\}, \{I_2, I_3\}, \{I_1, I_2, I_3\}\}$. Neste caso, a função lógica descrita pelas combinações do conjunto de partes pode ser minimizada pelo teorema $A + AB = A + B$,

$$\begin{aligned} f_b(X_b) &= I_1 + I_2 + I_3 + I_1 \cdot I_2 + I_1 \cdot I_3 + I_2 \cdot I_3 + I_1 \cdot I_2 \cdot I_3 \\ &= I_1 + I_2 + I_3 \end{aligned}$$

A função lógica para o caso que nenhuma destas interações estejam atuando sobre o gene *b* é dada por,

$$\begin{aligned} f_b(\emptyset) &= \overline{I_1 + I_2 + I_3} \\ &= \overline{I_1} \cdot \overline{I_2} \cdot \overline{I_3} \end{aligned}$$

Onde, \bar{I}_3 corresponde ao gene *a* estar no nível 2 ou no nível 0, pois em ambos os casos $\bar{I}_3 = I_2 + 0 = I_2$. Substituindo em $f_b(\emptyset)$, tem-se que

$$\begin{aligned}
 f_b(\emptyset) &= \overline{I_1 + I_2 + I_3} \\
 &= \overline{I_1} \cdot \overline{I_2} + I_2 \\
 &= I_2
 \end{aligned}$$

Tabela 6. Transições correspondentes às interações atuantes sobre o nodo *b*.

<i>Transição</i>	<i>Instrução</i>	<i>Parâmetro</i>
t_3	$\{I_2\}$	0
t_4	$\{I_1\}$	1

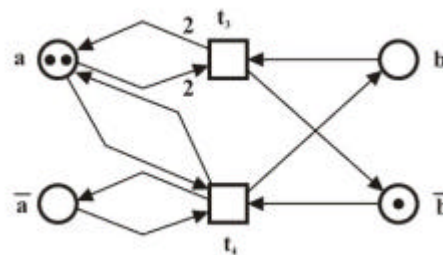


Figura 39. Rede de regulação sobre o gene *b*.

A rede de Petri da Figura 39 representa o conjunto de pré e pós-condições das transições t_3 e t_4 que regulam o gene *b*.

5.2.3. Regulação do Nodo *c*

Sobre o nodo *c* exerce uma interação: o gene *b* no nível 1 leva a um decremento da expressão do gene *c*. O conjunto de partes das interações atuantes sobre o gene *c* é dado por $X_c = \{\emptyset, \{I_4\}\}$. Neste caso, a função lógica descrita pelas combinações do conjunto de partes é dada por uma única variável,

$$f_c(X_c) = I_4$$

A função lógica para o caso que nenhuma destas interações estejam atuando sobre o gene *c* é dada por,

$$f_c(\emptyset) = \overline{I_4}$$

Tabela 7. Transições correspondentes às interações atuantes sobre o nodo c .

<i>Transição</i>	<i>Instrução</i>	<i>Parâmetro</i>
t_5	$\{I_4\}$	1
t_6	$\{\bar{I}_4\}$	0

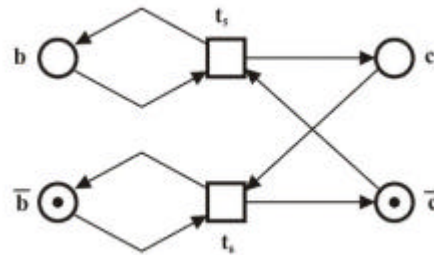


Figura 40. Rede de regulação do gene c .

A rede de Petri da Figura 40 representa o conjunto de pré e pós-condições das transições t_5 e t_6 que regulam o gene c .

5.2.4. Análise da Rede de Regulação

Fazendo-se a composição das redes de regulação de cada gene obtém-se o modelo integrado ilustrado pela Figura 41, lembrando que lugares de mesmo nome neste modelo correspondem a um único lugar. Submetendo-se este modelo a análise no ambiente INA pode-se verificar as seguintes propriedades relevantes:

- A rede é limitada, portanto é possível obter um grafo de alcançabilidade.
- A rede é conexa, bem como fortemente conexa, portanto é possível obter circuitos derivados de componentes fortemente conexos e a existência de componentes terminais.

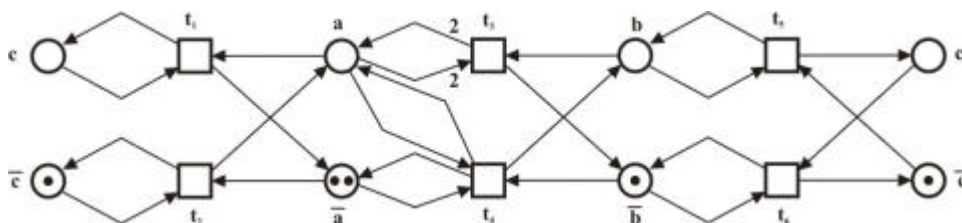


Figura 41. Rede de regulação em termos de redes de Petri correspondente ao modelo da Figura 35.

A construção do grafo de alcançabilidade, ilustrado pela Figura 42, revela que este sistema possui 11 estados, tal como obtido pela dinâmica assíncrona e ilustrado pela Figura 45, constituindo um bom indicio da equivalência entre modelos e métodos.

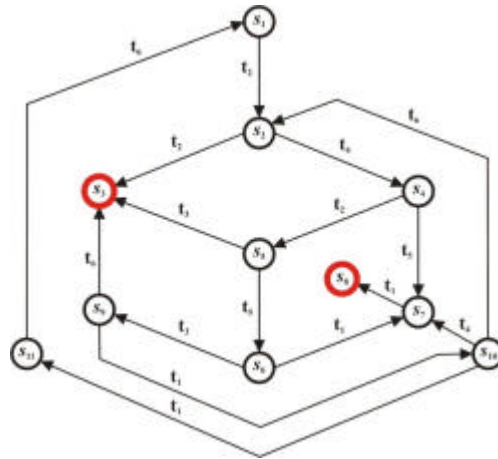


Figura 42. Grafo de alcançabilidade da rede de regulação.

Prosseguindo, o grafo de alcançabilidade revela que esta rede não é viva, não é reversível e possui dois estados “mortos”, o que equivale aos estados estáveis 200 (estado s_3) e 011 (estado s_8) encontrados pelo grafo de transição assíncrona da Figura 37, ou seja, no primeiro caso o gene a ao atingir o nível de expressão 2 mantém reprimidos os genes b e c , no segundo caso o gene b ao atingir o nível de expressão 1 ativa o gene c , o qual mantém reprimido o gene a , respectivamente.

5.3. Resumo

Neste capítulo foi introduzido o formalismo de modelagem e análise de redes regulatórias gênicas. Grafos regulatórios são compostos por nodos e arcos. Nodos representam genes ou biomoléculas que interagem no processo de regulação. Arcos representam interações entre os nodos, as quais podem ser de ativação ou de repressão. Pesos atribuídos aos arcos indicam o intervalo para o qual uma interação está atuante.

Para cada nodo, os níveis lógicos são determinados em função do número de interações que um nodo exerce sobre outros nodos. De outra forma, para cada nível de expressão de um gene existe um efeito sobre os outros genes da rede.

Um nodo pode ser alvo de diversas interações exercidas por diversos nodos fontes e estar sujeito a combinações de interações de ativação e de repressão. A resposta de um nodo a estas combinações de interações é determinada pela função lógica K . Esta função faz o mapeamento dos níveis lógicos das interações de entrada para um nível lógico de resposta as diferentes combinações destas interações.

De outra forma, existe um espaço de estados descrito pela combinação dos diferentes níveis de expressão de cada gene e existe um espaço de parâmetros indicando a resposta de um gene as diferentes combinações destes níveis de expressão. Fazendo o mapeamento entre estes dois espaços, encontram-se as instruções, as quais são formadas pelo conjunto de interações de entrada resultante da minimização lógica da combinação destas interações, de estado para estado.

Dada uma condição inicial, então é possível verificar a evolução dinâmica do sistema sob dois critérios possíveis: *síncrono* e *assíncrono*. A dinâmica síncrona atualiza o valor de todas as coordenada do vetor de estados de forma simultânea, sempre que houver uma chamada para mudança de estado. A dinâmica assíncrona gera um novo estado para cada atualização de uma única coordenada do vetor de estados, sempre que houver uma chamada para mudança de estado. Uma chamada de mudança de estado pode ser observada pela declividade entre as coordenadas homônimas do espaço de estados dos níveis de expressão e o espaço de estado dos parâmetros lógicos.

As propriedades passíveis de serem observadas por este formalismo são primeiramente a existência de estados estáveis multi-estacionários e por segundo a existência de circuitos funcionais. Ambas as propriedades compõem indicadores de aceitação ou de refutação das hipóteses formuladas sobre o modelo biológico.

De maneira a expandir os métodos de análise de um modelo lógico foi então desenvolvido um método de correspondência entre grafos regulatórios e redes de Petri. Desta forma, um grafo regulatório pode ser descrito por uma rede de Petri equivalente que preserve todas as propriedades e atribuições semânticas associadas ao modelo lógico.

Como forma de comprovar estes procedimentos foi utilizado um modelo fictício de regulação gênica, o qual foi então analisado sob o formalismo de grafos regulatórios e posteriormente transcrito para o formalismo de redes de Petri. Ambos os modelos apresentaram o mesmo conjunto de estados e revelaram as mesmas propriedades. Desta forma, agora é possível descrever vias metabólicas e suas redes de regulação correspondentes sob um mesmo formalismo, ou seja, ambos em termos de redes de Petri.

Capítulo 6

Materiais e Métodos

Neste capítulo é feita uma breve descrição dos ambientes computacionais utilizados como suporte a modelagem e análise de Grafos de Regulação Gênica e Redes de Petri.

6.1. Ambientes Computacionais

O ambiente computacional GINsim será utilizado para transpor o modelo biológico para a interpretação do formalismo de Grafos de Regulação Gênica, obtendo-se um modelo equivalente denominado de *modelo lógico*. Este ambiente permite construir um modelo, editá-lo, parametrizá-lo, bem como proceder a uma análise da evolução dinâmica das variáveis sob análise de maneira a identificar estados estáveis, bem como circuitos de regulação exibidos pelo comportamento dinâmico do modelo considerado. Este ambiente está disponível em <http://gin.univ-mrs.fr/GINsim> e em constante

desenvolvimento pelo Laboratório de Genética e Fisiologia do Desenvolvimento, LGPD, do Instituto de Biologia do Desenvolvimento de Marselha, IBDM.

O modelo lógico será transposto para o formalismo de redes de Petri de maneira a usufruir da potencialidade das metodologias de análise até então desenvolvidas para este formalismo. O modelo obtido após a transposição do modelo lógico para redes de Petri é denominado de *rede de regulação*. O ambiente computacional INA, desenvolvido pelo Prof. Dr. Peter H. Starke da Universidade “Humboldt Universität zu Berlin Institut für Informatik Lehrstuhl für Automaten und Systemtheorie”, permite editar, parametrizar e analisar redes de Petri e está disponível no endereço <http://www2.informatik.hu-berlin.de/~starke/ina.html>. A rede de regulação obtida será então submetida aos procedimentos de análise, estática e dinâmica, disponível no ambiente INA, de maneira a verificar propriedades tais como a existência de invariantes de lugar e de invariantes de transição amplamente discutidas no capítulo 4. Também, a edição de redes de Petri será realizada utilizando-se do editor Snoopy, desenvolvido pela Dra. Mônica Heiner da Universidade Tecnológica de Brandemburgo em Cottbus, o qual permite exportar a rede em questão para diversos ambientes de análise, bem como para o ambiente INA. Informações sobre o editor Snoopy, bem como sobre outros softwares correlatos podem ser obtidos no endereço <http://www-dssz.informatik.tu-cottbus.de/index.html?/software/ped.html>.

6.1.1. O Ambiente Computacional GINsim

O Ambiente computacional GINsim, desenvolvido por Claudine Chaouiya, Denis Thieffry e seus colaboradores no LGPD, “Laboratoire de Genomique e Physiologie du Développement”, do Instituto de Biologia do Desenvolvimento em Marselha, França, IBDM, suporta a definição, simulação e análise de grafos regulatórios baseados na descrição lógica de redes de regulação genômicas. Para tal foi desenvolvido um conjunto de classes na linguagem Java categorizadas em quatro módulos principais: uma interface com o usuário, um parser, um núcleo de simulação e um conjunto de classes para análise de grafos. Também, uma arquitetura baseada no conceito de “plug-in” permite a inserção de novos módulos, particularmente na ampliação dos algoritmos de análise de grafos. O ambiente GINsim é disponível no endereço <http://gin.univ-mrs.fr/GINsim>. Também, neste endereço, existe material de apoio, bem como uma coleção de grafos regulatórios, muitos deles referentes ao ciclo de desenvolvimento da “mosca da fruta”.

6.1.1.1. Especificando um Grafo de Regulação

A interface principal do editor de grafos permite a especificação e visualização de grafos regulação gênica. Similar a softwares de edição gráfica, estes recursos foram desenvolvidos utilizando a API *JGraph*, a qual é um componente da biblioteca *Swing* e, portanto, sob licença de código aberto.

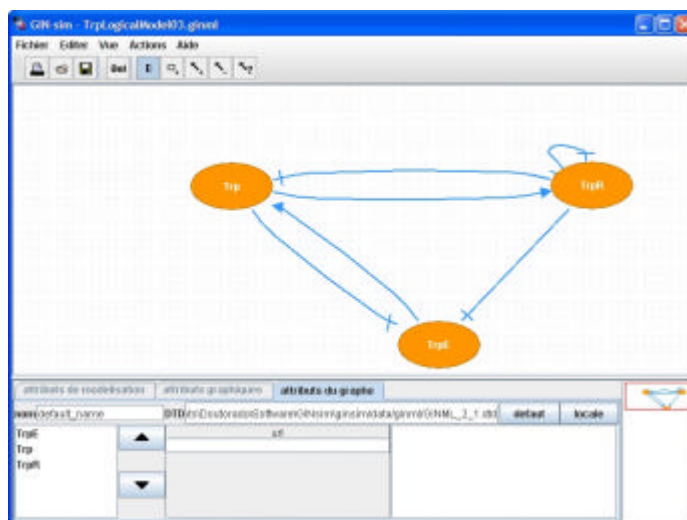


Figura 43. Ambiente de modelagem e análise de grafos regulatórios.

A estrutura interna referente a grafos foi implementada utilizando a API *JGraphT*, a qual inclui um conjunto de classes que encapsulam algoritmos matemáticos para a teoria dos grafos. Conjuntamente a especificação do grafo de regulação, nodos e interações, um painel dedicado permite a parametrização de cada nodo. O usuário simplesmente seleciona um determinado grupo de interações e especifica seus parâmetros correspondentes.

Uma vez que o modelo lógico esteja definido, este poderá ser armazenado sob a linguagem GINML (Gene Interaction Markup Language). Esta linguagem foi definida para armazenar grafos regulatórios e grafos de transição sob um critério formal de interoperabilidade. GINML segue os critérios definidos para GXL, uma linguagem baseada em XML e dedicada a formalização representativa de grafos, a qual pode ser verificada em <http://www.gupro.de/GXL>. Grafos regulatórios e grafos de transição também podem ser exportados para o formato SVG (Scalable Vector Graphics), o qual é baseado na API de código aberto Grapviz, padrão para visualização de grafos, ver (<http://www.graphviz.org/>).

6.1.1.2. Simulação e Análise

Uma vez construído um grafo regulatório, então pode ser efetuada uma análise através do grafo de transições gerado a partir do modelo lógico parametrizado e para uma dada condição inicial. Uma interface permite a definição da condição inicial das variáveis envolvidas no modelo, bem como a definição do método de atualização da evolução dinâmica destas variáveis, ou seja, pelo método síncrono ou assíncrono.

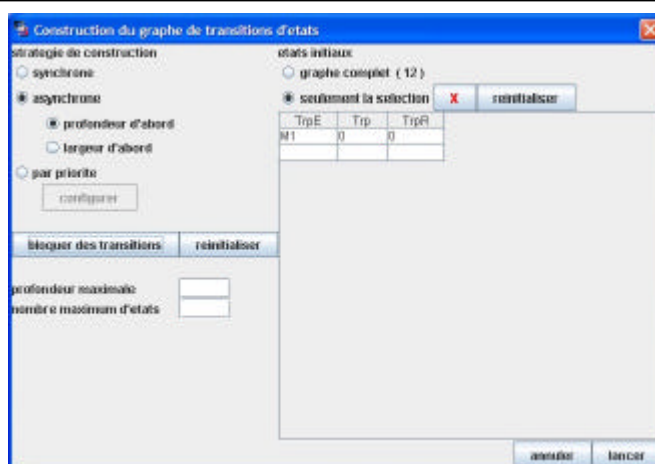


Figura 44. Interface de definição das condições iniciais e de método de evolução dinâmica.

Um grafo regulatório com n genes pode gerar um grafo de transições com 2^n estados. Isto leva ao caso clássico de explosão combinatória do espaço de estados. A escolha por algoritmos apropriados de busca em grafos pode contribuir para diminuição da ordem de complexidade e, conseqüentemente, evitar a explosão de estados.

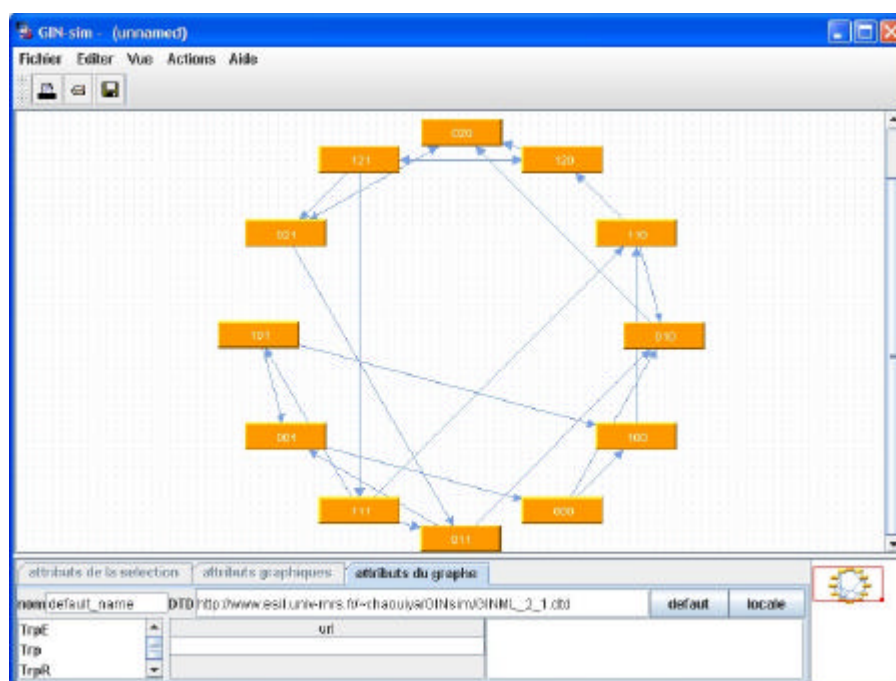


Figura 45. Geração do grafo de transições de estados.

Também, a possibilidade de bloquear a evolução de determinadas variáveis para um intervalo de interesse, contribui para uma análise localizada de circuitos de interação dados pelo grafo de transição. Para grafos de transição de estados com até 500 nodos, estes são gerados diretamente na mesma interface que para os grafos de regulação.

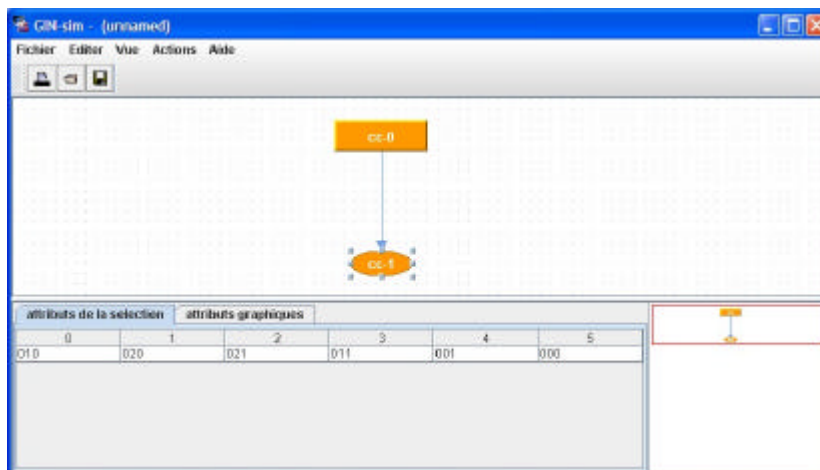


Figura 46. Identificação de um componente terminal fortemente conexo. Neste caso, refere-se a ação do repressor TrpR, sobre o aporte externo de triptofano pela célula.

6.1.1.3. A Análise de Grafos

Composta por dois módulos: (1) Para o caso de grafos regulatórios, o núcleo de análise consiste em determinar os circuitos regulatórios e suas funcionalidades, isto é, a aplicação de restrições sobre os parâmetros de maneira a verificar a funcionalidade de um determinado circuito. (2) Para o caso de grafos de transição de estados, a questão mais relevante é a de identificar estados estacionários, ciclos atratores através da existência de circuitos conexos e fortemente conexos com a possibilidade de existência de componentes terminais fortemente conexos.

6.1.2. O Editor de Redes de Petri Snoopy

O ambiente de edição de redes de Petri Snoopy, desenvolvido por Mônica Heiner e seus colaboradores, permite a edição, bem como a simulação por “*token-game*”. Uma característica importante deste ambiente é a possibilidade de construir redes menores através da associação de lugares e transições de mesmo nome como sendo um único lugar ou transição, respectivamente. Isto leva a uma clareza dos circuitos, melhorando a sua leitura e interpretação.

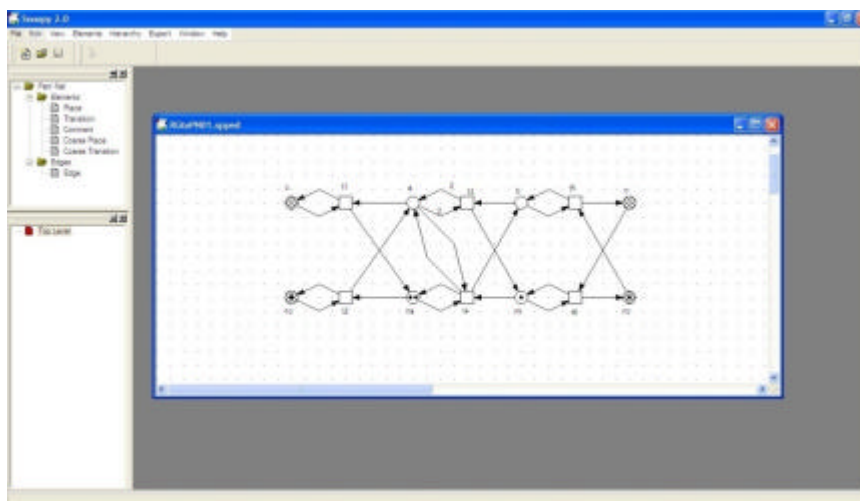


Figura 47. Ambiente de edição e simulação de redes de Petri Ordinárias, Snoopy.

Outra característica importante deste ambiente consiste na possibilidade de exportar modelos de redes de Petri para outros ambientes de análise, tais como: INA, Lola, Maria, Prod.

6.1.3. O Ambiente Computacional INA

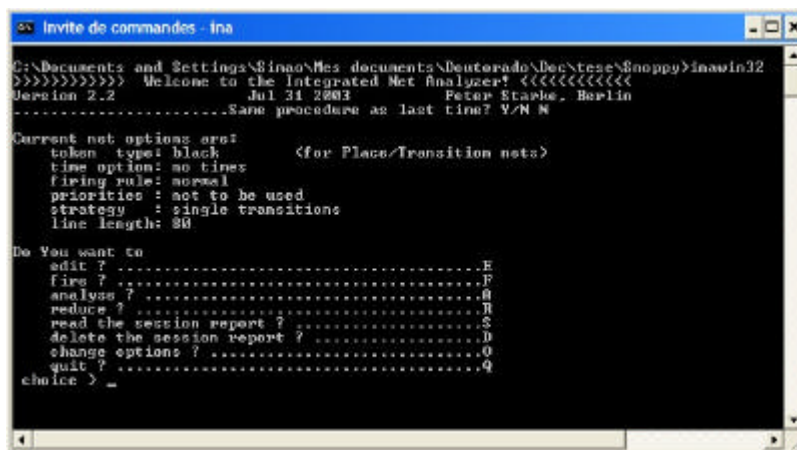


Figura 48. A partir da interface principal é possível editar, executar, reduzir e analisar redes de Petri, bem como gerar relatórios e arquivos de saída com resultados de cada análise.

O ambiente de construção e análise de redes de Petri INA, desenvolvido pelo Prof. Dr. Peter H. Starke da Universidade Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Informatik Lehrstuhl für Automaten und Systemtheorie, permite a edição, execução, redução e

análise de redes de Petri.

```

CA Invite de commandes - ina
The net is bounded.
There are no proper semipositive T-surinvariants.
The net is subconservative.
The net is not a state machine.
The net is not free choice.
The net is not extended free choice.
The net is not extended simple.
The net is not marked.
The net is not marked with exactly one token.
The net is not a marked graph.
The net is not homogenous.
The net has not a non-blocking multiplicity.
The net has a nonempty clean trap.
The net has no transitions without pre-place.
The net has no transitions without post-place.
The net has no places without pre-transition.
The net has no places without post-transition.
The net is connected.
The net is strongly connected.
ORD HOM NBM PUR CSU SCF CON SC Ft0 tF0 Fp0 pF0 MG SM FC EFC ES
N N N Y M Y Y N N N N N N N N N
DTP CPI CII B SB REU DSt BSt DTr DCF L LU L&S
? ? ? Y Y ? ? ? ? ? ? ? ?
Analysis menu:
Decide structural boundedness.....B
Non-reachability test of a partial marking using the state equation.....N
Compute the symmetries of the net.....Y

Compute a shortest path from the initial state to a target marking.....P
Compute a minimal path from the initial state to satisfy a predicate.....O
Compute a reachability graph.....R
Compute a coverability graph to decide boundedness and coverability.....G

Compute a basis for all P/T-invariants [non-reachability test].....I
Compute a basis for all semipositive P/T-[sub/sur]-invariants.....S
Format lines written to INUARI.HLP earlier.....F
Test place- or transition-vectors for invariant properties.....T

choice >

```

Figura 49. Módulo de análise do ambiente INA.

Sob o módulo de análise é possível verificar propriedades de limitabilidade estrutural, alcançabilidade, cobertura e cálculo de invariantes de lugar e de transição.

Capítulo 7

Resultados e Discussão

Finalmente, neste capítulo é apresentado o *modelo biológico* de regulação da biossíntese do triptofano, o *modelo lógico* equivalente em termos de Grafos de Regulação Gênica, a *rede de regulação* equivalente em termos de Redes de Petri, a *via de biossíntese* em termos de redes de Petri e um modelo integrado destes dois últimos modelos. Para tal, primeiramente é definido o modelo lógico em termos do formalismo de Grafos Regulatórios utilizando-se do ambiente GINsim (Chaouiya, 2003; Larrinaga, Naldi *et al.*, 2006). Em seguida, o modelo em termos de Grafos Regulatórios é transcrito para o modelo de redes de Petri, sobre o qual é verificada a conservação de propriedades entre modelos, utilizando-se do ambiente de análise INA (Roch e Starke, 1999). Na seqüência, ocorre a integração da via metabólica com a rede de regulação. O modelo integrado é então submetido aos critérios de análise ilimitada e limitada, de maneira a verificar propriedades da integração da via metabólica subordinada a rede de regulação.

7.1. Modelo Biológico de Regulação do Triptofano

Os elementos constitutivos do modelo biológico, suficiente para caracterizar o sistema de biossíntese e de regulação do triptofano na *E. coli*, estão representados pela Figura 50. Neste modelo serão considerados os mecanismos de regulação por repressão da transcrição gênica, atenuação e inibição por produto final.

Também, será considerada a repressão gênica sobre a permease *mtr*, principal responsável pelo aporte de triptofano externo. Neste modelo pode-se perceber que todos os mecanismos de regulação são mediados pela presença de triptofano intracelular. Pois a proteína repressora, TrpR, somente torna-se ativa quando complexada com Trp. Ainda, o processo de atenuação ocorre somente se houver suficiente tRNA^{Trp} carregado a ponto de acionar o mecanismo de terminação da transcrição. Por último, a inibição por produto somente irá ocorrer quando houver uma concentração excedente de Trp interno.

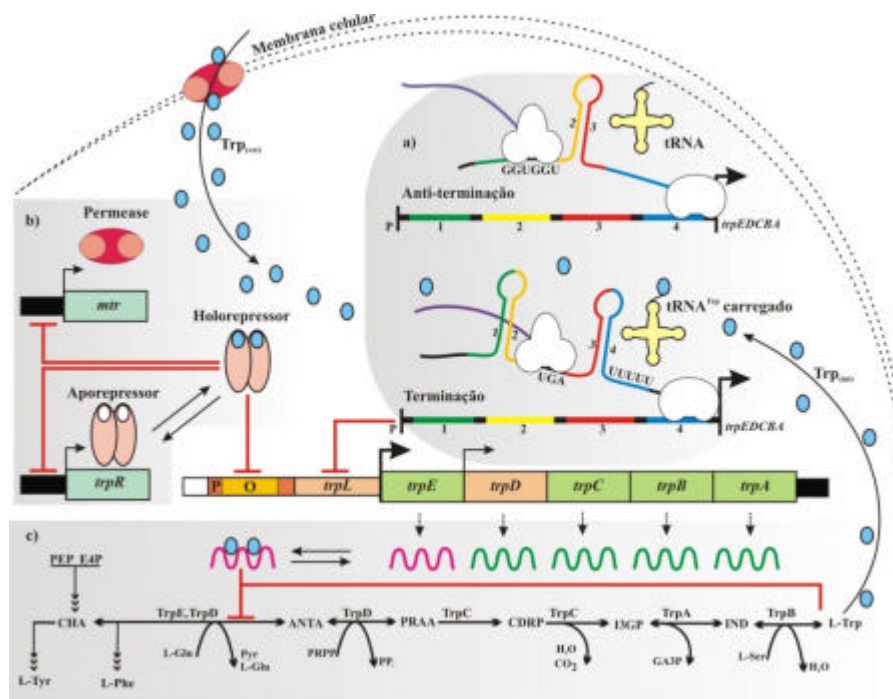


Figura 50. Elementos mínimos considerados para o modelo de regulação da biossíntese do triptofano. Aporte de triptofano externo pela permease *mtr*, produção de triptofano interno pela via de biossíntese (c), regulação por: repressão da transcrição gênica (b), atenuação da transcrição gênica e inibição retroativa (a).

Com base nas informações coletadas, pode-se enumerar as seguintes observações qualitativas relevantes sobre este sistema:

-
- (i) É dada à preferência pelo aporte de triptofano externo, sendo que a maquinaria interna permanece em forte estado de regulação repressivo e próximo à exaustão total por este aminoácido.
 - (ii) Se houver uma ausência extrema de Trp no sistema, então nada impede que sejam produzidos transcritos do operon *trpEDCBA*. Porém, estes não serão traduzidos devido à falta de Trp e, provavelmente, serão degradados se esta circunstância persistir.
 - (iii) O mecanismo de atenuação é sensível o suficiente para perceber níveis baixos de Trp no meio celular e deflagrar o mecanismo de terminação da transcrição deste patamar até altas concentrações de Trp, mas este mecanismo sozinho não impede o aporte externo excessivo de Trp.
 - (iv) Para altas concentrações de Trp o sistema encontra-se fortemente repressivo tanto para a produção interna, quanto para o aporte externo de Trp. Neste caso, a diferença de afinidade da proteína repressora pela região de operação dos diversos operons, que são regulados por ela, podem definir esta situação de impasse.
 - (v) Mesmo que ocorra um relaxamento da proteína repressora levando a concentração de Trp para níveis intermediários, o mecanismo de atenuação ainda continua a impedir a transcrição gênica sob esta circunstância.
 - (vi) A inibição da primeira enzima pelo produto final é um mecanismo redundante de regulação, quando em conjunto com os mecanismos de repressão e atenuação, mas ao mesmo tempo constitui um buffer contendo Trp e primeiras enzimas (TrpE e TrpD) da via durante um estado fortemente repressivo.
 - (vii) Em um estado fortemente repressivo, o promotor constitutivo *trpP2* continua a expressar os genes *trpCBA* e dado uma queda abrupta de Trp a partir deste estado, enzimas previamente inibidas liberam Trp e enzimas ativas no meio celular completando o conjunto de enzimas necessárias a retomada da biossíntese de triptofano. Este caso assemelha-se a um sistema de “gotejamento” a partir de um estado fortemente repressor.
 - (viii) As reações reversíveis no início e final da via metabólica proporcionam um “buffer” de produtos intermediários que pode dispor prontamente destes produtos para dar início a uma retomada da biossíntese do triptofano em etapas distintas da cadeia de reações enzimáticas.
 - (ix) O nível basal de produção de triptofano, mesmo sob condições de atenuação e repressão, é atribuído aos transcritos que escapam do processo de terminação, pela dissociação do complexo inibitório da enzima TrpE e pela promoção constitutiva dada por *trpP2*.

Estas observações evidenciam o forte caráter combinatório existente nos mecanismos de regulação biológicos, o que constitui um forte apelo para a aplicação de métodos formais baseados na matemática discreta e combinatória como primeiro método de análise e validação de modelos de regulação gênica.

7.2. Grafo de Regulação da Biossíntese de Triptofano

7.2.1. O Modelo Lógico

O modelo biológico dos mecanismos de regulação da biossíntese do triptofano está representado pelo modelo lógico ilustrado pela Figura 51. Neste modelo estão caracterizados três nodos: o nodo Trp representando o triptofano, o nodo TrpR o repressor e o nodo TrpE o conjunto de enzimas do operon *trpEDCBA*.

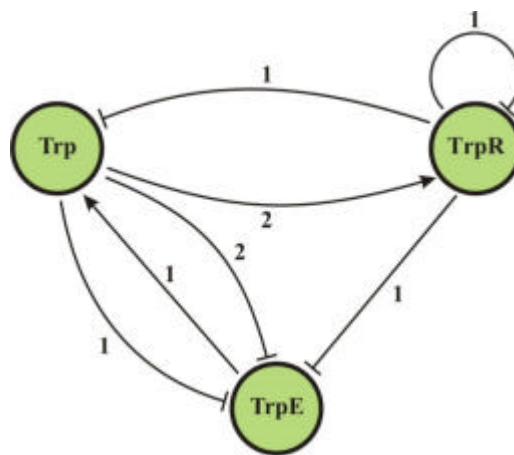


Figura 51. Modelo lógico da regulação do triptofano. O nodo Trp representa a concentração total de triptofano. O nodo TrpR representa a presença do repressor. O nodo TrpE abstrai o conjunto de enzimas do operon *trpEDCBA*.

Todos os mecanismos de regulação da biossíntese do triptofano são mediados pela presença do triptofano no meio celular. A concentração do triptofano determina a ativação ou inibição destes mecanismos. Desta forma, os níveis qualitativos definidos para o triptofano são os seguintes:

0	<i>baixo</i>	Não impede a transcrição do operon <i>trpEDCBA</i> e existe Trp suficiente para a biossíntese de enzimas.
1	<i>médio</i>	Provoca a atenuação da transcrição do operon <i>trpEDCBA</i> .
2	<i>alto</i>	Provoca a ativação do repressor TrpR e a inibição retroativa da enzima TrpE.

O repressor TrpR por atuar sobre a região de promoção de pelo menos cinco genes deveria ter associado a ele pelo menos seis níveis qualitativos, pois o grau de afinidade

de cada região de operação varia de operon para operon. Neste modelo, foi considerado que o grau de afinidade é o mesmo para todos os operons, tornando desta forma TrpR em uma variável Booleana com as seguintes interpretações biológicas:

0	<i>inativo</i>	TrpR está na forma de um aporepressor.
1	<i>ativo</i>	TrpR complexado com Trp formando um holorepressor.

O conjunto de enzimas do operon *trpEDCBA*, representadas no modelo pela primeira enzima da via, TrpE, também assume o caráter de uma variável Booleana com a seguinte interpretação biológica:

0	<i>ausente</i>	O conjunto de enzimas está ausente.
1	<i>presente</i>	O conjunto de enzimas está presente.

A seguir é apresentada uma descrição da semântica adotada para cada nodo do grafo de regulação, sua interpretação biológica e relações com os outros nodos do grafo.

7.2.1.1. O Nodo Trp

Este nodo representa o triptofano total presente no sistema, ou seja, $Trp_{tot} = Trp_{int} + Trp_{ext}$, o qual é a soma do triptofano produzido pela maquinaria interna mais o triptofano que resulta do aporte externo mediado por permeases. Sobre este nodo existem duas interações diretas, sendo uma de ativação e outra de repressão:

- A interação de ativação se dá pela presença do conjunto de enzimas, indicadas aqui por TrpE, as quais elevam a concentração de Trp_{int} para o seu nível máximo.
- A interação de repressão, exercida por TrpR sobre este nodo, indica a repressão do aporte externo de Trp. Ao invés de existir no modelo um nodo que represente o aporte de Trp externo pela permease *mtr*, optou-se pela manipulação do nível basal do nodo Trp para indicar este aporte externo, sendo por isto a repressão direta de TrpR sobre Trp.

O nível basal da concentração de Trp, ou quando nenhuma entrada estiver operante sobre Trp, é *baixo*.

7.2.1.2. O Nodo TrpE

Este nodo representa a presença das cinco enzimas necessárias a biossíntese de triptofano e abstrai os processos de transcrição, tradução, transporte e modificações

moleculares posteriores. Sobre este nodo existem três interações de repressão mediadas pela concentração de Trp, cada qual representando um mecanismo distinto de regulação:

- Quando a concentração de Trp estiver no seu nível *baixo*, nada impede a produção das enzimas necessárias a biossíntese do próprio Trp. Neste caso, a concentração destas enzimas encontra-se no seu nível alto, ou *presente*.
- Quando a concentração de Trp estiver no seu nível *médio*, o mecanismo de atenuação é sensível o suficiente para impedir os processos de transcrição e de tradução das enzimas necessárias a produção de Trp, levando a concentração de enzimas para o estado *ausente*.
- Quando a concentração de Trp estiver no seu nível *alto*, ocorre uma inibição por produto da primeira enzima da via de biossíntese levando a uma desativação das reações subseqüentes por falta de metabólitos intermediários e conseqüentemente baixando a concentração de Trp.
- Também, para a concentração de Trp no seu nível *alto*, ocorre uma repressão sobre o operon *trp* efetuada pelo repressor TrpR na sua forma *ativa*, o qual impede a transcrição das enzimas necessárias a biossíntese do Trp.

O nível basal de TrpE, ou quando nenhuma entrada estiver operante sobre TrpE, é caracterizado pelo estado *presente*.

7.2.1.3. O Nodo TrpR

Quando a concentração de Trp estiver no seu nível *alto*, então existe suficiente Trp para formar o complexo repressor, ou seja, *ativar* TrpR. O repressor, quando *ativo*, atua sobre a região de operação de pelo menos cinco genes. Neste modelo, está representado a atuação sobre a região de operação do operon *trpEDCBA*, sobre o gene da permease *mtr* e sobre o próprio gene do repressor *trpR*.

O nível basal de TrpR, ou quando nenhuma entrada estiver operante sobre TrpR, é caracterizado pelo estado *inativo*.

7.2.2. Interações e Espaço de Estados

O conjunto de interações que ligam estes nodos representa o conjunto de mecanismos de regulação da biossíntese do triptofano, relacionados pela Tabela 8 dada a seguir:

Tabela 8. Conjunto de interações do grafo de regulação da biossíntese do triptofano.

<i>Interação</i>	<i>Interpretação biológica.</i>
$I_1 = \{TrpTrpE,1,-1\}$	<i>Atenuação da transcrição do operon trp provocada pela presença de Trp no nível médio.</i>
$I_2 = \{TrpTrpE,2,-1\}$	<i>Inibição retroativa da primeira enzima da via de biossíntese do triptofano quando Trp estiver no nível alto.</i>
$I_3 = \{TrpTrpR,2,+1\}$	<i>Ativação da proteína repressora TrpR quando o triptofano estiver no nível alto.</i>
$I_4 = \{TrpRTrp,1,-1\}$	<i>Repressão do aporte externo de triptofano quando TrpR estiver ativo.</i>
$I_5 = \{TrpRTrpR,1,-1\}$	<i>Auto-repressão do TrpR, quando TrpR estiver ativo.</i>
$I_6 = \{TrpRTrpE,1,-1\}$	<i>Repressão da transcrição do operon trp quando TrpR estiver ativo.</i>
$I_7 = \{TrpETrp,1,+1\}$	<i>Ativação do Trp devido à presença do conjunto de enzimas necessárias a biossíntese do triptofano.</i>

O espaço de estados e as instruções descritas pelas interações atuantes, bem como os parâmetros correspondentes a estas instruções são dados na Tabela 9.

Tabela 9. Espaço de estados para o grafo de regulação da biossíntese do triptofano.

<i>Espaço de estados</i>			<i>Instruções</i>			<i>Parâmetros</i>		
TrpE	Trp	TrpR	$X_{TrpE}(x_i)$	$X_{Trp}(x_i)$	$X_{TrpR}(x_i)$	$K(X_{TrpE}(x_i))$	$K(X_{Trp}(x_i))$	$K(X_{TrpR}(x_i))$
0	0	0	\emptyset	\emptyset	\emptyset	1	0	0
0	0	1	$\{I_6\}$	$\{I_4\}$	$\{I_5\}$	0	0	0
0	1	0	$\{I_1\}$	\emptyset	\emptyset	0	0	0
0	1	1	$\{\{I_1\},\{I_6\}\}$	$\{I_4\}$	$\{I_5\}$	0	0	0
1	0	0	\emptyset	$\{I_7\}$	\emptyset	1	2	0
1	0	1	$\{I_6\}$	$\{\{I_7\},\{I_4\}\}$	$\{I_5\}$	0	0	0
1	1	0	$\{I_1\}$	$\{I_7\}$	\emptyset	0	2	0
1	1	1	$\{\{I_1\},\{I_6\}\}$	$\{\{I_7\},\{I_4\}\}$	$\{I_5\}$	0	0	0
0	2	0	$\{I_2\}$	\emptyset	$\{I_3\}$	0	0	1
0	2	1	$\{\{I_2\},\{I_6\}\}$	$\{I_4\}$	$\{\{I_3\},\{I_5\}\}$	0	0	0
1	2	0	$\{I_2\}$	$\{I_7\}$	$\{I_3\}$	0	2	1
1	2	1	$\{\{I_2\},\{I_6\}\}$	$\{\{I_7\},\{I_4\}\}$	$\{\{I_3\},\{I_5\}\}$	0	0	0

7.2.3. Análise Global

Nesta seção será feita uma análise do grafo de regulação da biossíntese do triptofano utilizando-se do ambiente computacional GIN-sim. Os circuitos obtidos nesta análise também podem ser verificados na Tabela 9 a partir de uma dada condição inicial, como feito para o exemplo do capítulo 5.

TrpE	Trp	TrpR	Interpretação biológica do tipo de análise.
1	0	0	Triptofano externo no nível <i>baixo</i>. Verificar a evolução do sistema devido somente à produção interna de Trp.
1	1	0	Aporte externo de Trp no nível <i>médio</i>. Verificar a evolução do sistema quando houver um aporte externo mediano e concorrente com a produção interna de Trp.
1	2	0	Aporte externo de Trp no nível <i>alto</i>. Verificar a evolução do sistema quando houver um excesso sobre o aporte de triptofano externo.

7.2.3.1. Triptofano Externo no Nível Baixo

Neste caso, o estado inicial é caracterizado pelas coordenadas 100, indicando que o conjunto de enzimas está *presente*, o triptofano encontra-se no seu nível *baixo* e o repressor encontra-se inicialmente *inativo*. O grafo de transições apresenta 12 estados, os quais podem ser verificados na Figura 52.

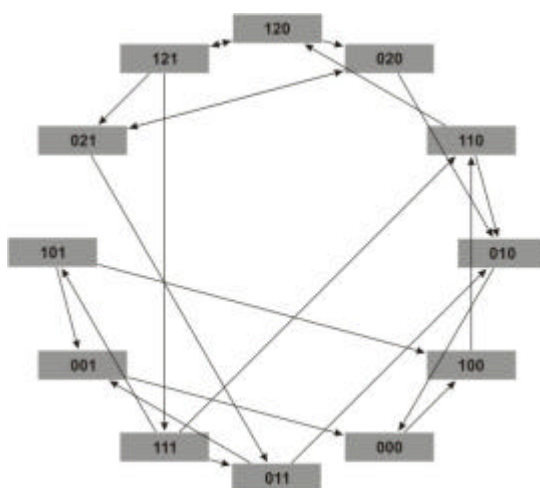


Figura 52. Grafo de regulação para a condição inicial 100 sob a ordem Enzima, Triptofano e Repressor, respectivamente. Para esta condição inicial é considerado que: o conjunto de enzimas está *presente*, o triptofano está no seu nível *baixo* e, conseqüentemente, o repressor está inicialmente *inativo*.

Para este estado inicial o sistema não apresenta nenhum estado estável e pode-se observar claramente que no canto inferior esquerdo da Figura 52 existe um circuito de regulação para níveis médios de Trp, enquanto que na parte superior ocorre a regulação para níveis altos de Trp. Quando o sistema atinge o estado trivial 000 todo o ciclo de produção e regulação é repetido.

7.2.3.2. Triptofano Externo no Nível Médio

Neste caso o nível basal do Trp é modificado de *baixo* para *médio* indicando que existe um aporte externo médio e constante de Trp. A condição inicial 110 caracteriza que o conjunto de enzimas está *presente*, o nível de triptofano encontra-se no seu nível *médio* e o repressor encontra-se inicialmente *inativo*. Para este caso, o grafo de transições apresenta 12 estados, conforme pode ser verificado pela Figura 53.

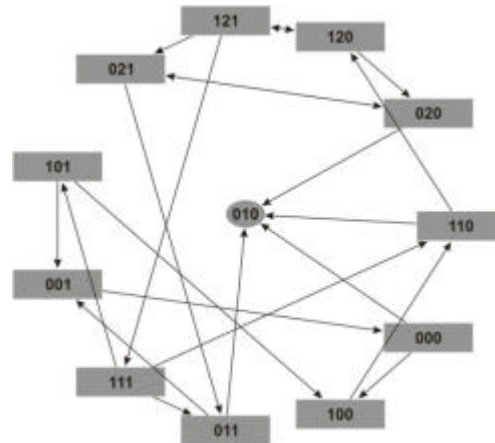


Figura 53. Grafo de transição para a condição inicial 110, significando : conjunto de enzimas presentes, aporte de triptofano externo no nível médio e repressor inicialmente inativo. Esta condição inicial resulta no estado estável 010.

Para estas condições iniciais o sistema apresenta o estado estável 010. Deste estado pode-se verificar, após a estabilização do sistema, que a primeira coordenada indica que o conjunto de enzimas permanece reprimido, o Trp está vindo do meio externo e que neste patamar a concentração de Trp não é suficiente para ativar TrpR.

7.2.3.3. Triptofano Externo no Nível Alto

Neste caso o nível basal do Trp é modificado para o nível *alto* indicando um aporte massivo de Trp externo. A condição inicial 120 indica que o conjunto de enzimas está *presente*, Trp está no nível *alto* e o repressor TrpR está inicialmente *inativo*. O grafo de transições apresenta novamente os 12 estados com todas as variáveis oscilando entre seus níveis baixos, médios e altos.



Figura 54. Grafo de transição para a condição inicial 120, significando: conjunto de enzimas presentes, triptofano externo no seu nível máximo e o repressor inicialmente inativo.

Porém, como ilustra a Figura 54, este grafo apresenta um circuito fortemente conexo contendo seis estados, indicando que para um aporte externo massivo de Trp as enzimas permanecem reprimidas, enquanto que o repressor se ocupa em modular a entrada de Trp para níveis internos admissíveis.

7.2.4. Análise dos Circuitos de Regulação

Nesta seção será utilizada uma propriedade do software GIN-sim que permite bloquear a evolução de uma variável para um determinado intervalo. Esta propriedade permite isolar o efeito de uma ou mais variáveis para o intervalo de bloqueio determinado. Desta forma, é possível isolar circuitos que correspondem a mecanismos de regulação específicos.

TrpE	Trp	TrpR	Interpretação biológica do tipo de análise.
1	[0,1]	0	Circuito de atenuação. Verificar a evolução do sistema para a concentração de Trp bloqueada no intervalo [0,1].
1	0	[0,0]	Circuito de inibição retroativa. Verificar a evolução do sistema quando o repressor TrpR estiver bloqueado no estado <i>inativo</i> .
1	2	[1,1]	Circuito de repressão da transcrição. Verificar a evolução do sistema quando o repressor TrpR estiver bloqueado no estado <i>ativo</i> .
[0,0]	2	1	Circuito de repressão da permease. Verificar a evolução do sistema quando o conjunto de enzimas for bloqueado no estado <i>ausente</i> .

7.2.4.1. Atenuação

Sabendo-se que o mecanismo de atenuação é sensível o suficiente para impedir o processo de transcrição e de tradução foi bloqueada a concentração de Trp para o intervalo $[0,1]$ e aplicada à condição inicial 100. O grafo de transição gerado apresenta quatro estados como ilustra a Figura 55.

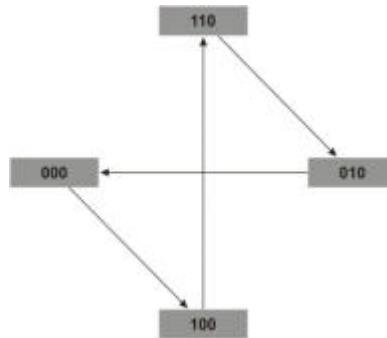


Figura 55. Grafo de transição para a condição inicial 100 e o triptofano bloqueado para o intervalo $[0,1]$, de maneira a isolar o circuito de regulação correspondente ao mecanismo de regulação por atenuação.

A partir do grafo de transição pode-se facilmente verificar que o conjunto de enzimas é atenuado e que o Trp, pela ausência deste mesmo conjunto de enzimas, vai para o nível *baixo* permitindo novamente a *presença* das enzimas e o ciclo de regulação se repete. Caso houvesse uma combinação do aporte externo de Trp no nível *médio* então este grafo ficaria reduzido em $110 \rightarrow 010$, sendo 010 um estado estável.

7.2.4.2. Inibição por Produto

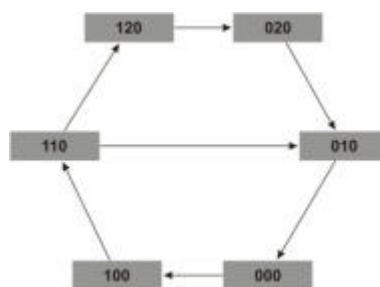


Figura 56. Grafo de transição para a condição inicial 100 e o repressor bloqueado no intervalo $[0,0]$, de maneira a isolar o circuito de regulação por inibição retroativa.

Bloqueando-se o repressor TrpR para o estado *inativo* e permitindo que a evolução interna da concentração de Trp atinja seu nível *alto*, então poderemos verificar a ação do mecanismo de inibição retroativa da primeira enzima da via de biossíntese do

triptofano.

Os seis estados do grafo de transição da Figura 56 sugerem que a produção interna de Trp ao atingir uma *alta* concentração inibe a enzima TrpE levando a concentração de Trp do nível *alto* para o nível *baixo*, repetindo-se desta forma o ciclo de regulação. Neste caso, este circuito de regulação inclui também o efeito de regulação por atenuação, o qual pode ser verificado na parte inferior do grafo.

7.2.4.3. Repressão da Transcrição

Ao ser permitido que a evolução interna da concentração de Trp atinja seu nível máximo e somando a isto o aporte massivo de Trp externo, então podemos investigar a ação do repressor TrpR. Para isto, foi selecionada a condição inicial 121 indicando que o conjunto de enzimas ainda está *presente*, o Trp está no seu nível *alto* e o repressor está bloqueado no estado *ativo*.

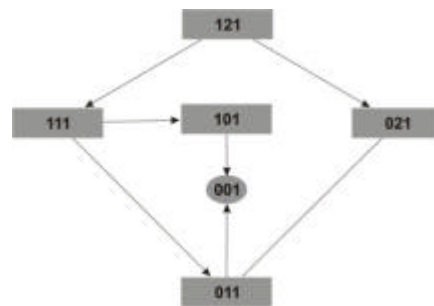


Figura 57. Grafo de regulação para a condição inicial 121 e o repressor bloqueado para o intervalo [1,1], de maneira a isolar o circuito que represente a ação do repressor sobre a produção e aporte de triptofano.

Pode-se observar no lado esquerdo do grafo de transição da Figura 57 uma repressão da transcrição, enquanto que pelo lado direito do grafo observa-se uma repressão do aporte externo de Trp, ou seja, uma repressão da permease. Devido ao fato de que TrpR está bloqueado no estado *ativo*, o sistema para estas condições chega ao estado estável 001.

7.2.4.4. Repressão da Permease

Considerando-se que a concentração interna de Trp tenha origem somente do meio externo, então podemos verificar a ação do repressor sobre a permease bloqueando a contribuição da enzima na produção de Trp. Ainda, partindo-se da condição inicial 021 e também bloqueando o repressor no estado *ativo*, obtém-se o circuito da Figura 58.

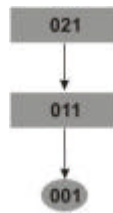


Figura 58. Grafo de transição para a condição inicial 021 e o conjunto de enzimas bloqueado para o intervalo $[0,0]$, de maneira a isolar o circuito correspondente a repressão do aporte externo de triptofano.

Neste grafo de transição, bem como no grafo precedente, pode-se facilmente verificar a existência de um circuito que representa a modulação do aporte de Trp externo.

7.3. Rede de Regulação da Biossíntese do Triptofano

Nesta seção, a exemplo do capítulo anterior, serão aplicados os procedimentos de mapeamento do formalismo de grafos regulatórios para redes de Petri. Serão analisados todos os nodos de maneira a obter uma função lógica minimizada sobre o conjunto de interações atuantes. A partir desta função lógica será então construído o modelo de regulação em termos de redes de Petri de cada nodo. Ao final, estas sub-redes de regulação serão compostas de maneira a formar a rede de regulação geral da biossíntese do triptofano correspondente ao grafo regulatório dado no início deste capítulo.

7.3.1.1. Regulação do Trp

Sobre o nodo Trp exercem duas interações: TrpE no nível 1, levando a um aumento de Trp no sistema e TrpR no nível 1 levando a uma diminuição de Trp. O conjunto de partes das interações atuantes sobre o nodo Trp é dado por $I_{Trp} = \{\emptyset, \{TrpE, 1\}, \{TrpR, 1\}, \{TrpE, 1\}, \{TrpR, 1\}\}$. A função lógica descrita pelas combinações do conjunto de partes pode ser minimizada aplicando-se o teorema $A + A.B = A + B$, resultando em,

$$\begin{aligned} f(TrpE, TrpR) &= TrpE + TrpR + TrpETrpR \\ &= TrpE + TrpR \end{aligned}$$

A função lógica para o caso que nenhuma destas interações estejam atuando sobre o nodo Trp, ou seja, $f(\emptyset)$, é dada por,

$$\begin{aligned}
 f(\emptyset) &= \overline{TrpE + TrpR} \\
 &= \overline{TrpE} \overline{TrpR}
 \end{aligned}$$

Desta forma, obtêm-se três transições dadas pela Tabela 10: a transição t_1 para o caso de nenhuma entrada estiver atuante o que leva o nível de Trp para zero, a transição t_2 para o caso do repressor estar atuante levando o nível de Trp para zero e a transição t_3 para o caso do conjunto de enzimas estar atuante e levar o nível de Trp para seu valor máximo.

Tabela 10. Transições correspondentes às interações atuantes sobre o nodo Trp

Transição	Instrução	Parâmetro
t_1	$\{\{TrpE,0\},\{TrpR,0\}\}$	0
t_2	$\{TrpR,1\}$	0
t_3	$\{TrpE,1\}$	2

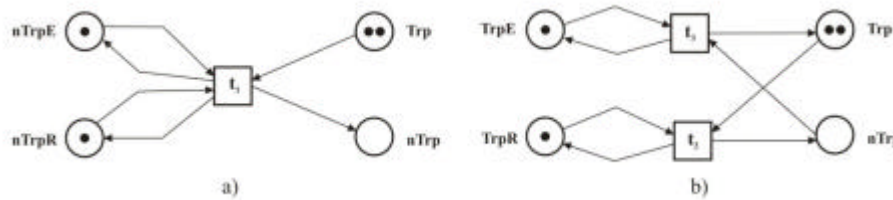


Figura 59. Rede de regulação do triptofano. Ausência de enzimas e de repressão levam Trp a zero (a); Presença de enzimas levam Trp ao máximo e a presença do repressor leva Trp a zero (b).

A rede de Petri da Figura 59a representa o conjunto de pré e pós-condições da transição t_1 e a Figura 59b o conjunto de pré e pós-condições das transições t_2 e t_3 .

7.3.1.2. Regulação de TrpE

Sobre o nodo TrpE exercem três interações: Trp no nível 1, Trp no nível 2, ambas levando TrpE a zero e TrpR no nível 1 levando TrpE a zero. O conjunto de partes das interações atuantes sobre o nodo TrpE é dado por $I_{TrpE} = \{\emptyset, \{Trp,1\}, \{Trp,2\}, \{TrpR,1\}, \{\{Trp,1\}, \{TrpR,1\}\}, \{\{TrpR,1\}, \{Trp,2\}\}\}$, onde se pode observar que algumas combinações não foram feitas devido a que o Trp não pode estar no nível 1 e 2 simultaneamente. A função lógica descrita pelas combinações do conjunto de partes pode ser minimizada aplicando-se o teorema $A + A.B = A + B$, resultando em,

$$\begin{aligned}
 f(Trp_1, Trp_2, TrpR) &= Trp_1 + Trp_2 + TrpR + TrpRTrp_1 + TrpRTrp_2 \\
 &= Trp_1 + Trp_2 + TrpR
 \end{aligned}$$

A função lógica para o caso que nenhuma destas interações estejam atuando sobre o nodo TrpE, ou seja, $f(\emptyset)$, é dada por,

$$\begin{aligned} f(\emptyset) &= \overline{Trp_1 + Trp_2 + TrpR} \\ &= \overline{Trp_1} \cdot \overline{Trp_2} \cdot \overline{TrpR} \end{aligned}$$

Onde, $\overline{\overline{Trp_1} \cdot \overline{Trp_2}} = \overline{Trp} = Trp_0$, ou seja, somente quando Trp estiver no nível zero.

Desta forma, tem-se quatro transições dadas pela Tabela 11: a transição t_4 a qual indica uma inibição retroativa da enzima TrpE, a transição t_5 a qual indica a ocorrência da atenuação da transcrição, a transição t_6 a qual indica a ocorrência da repressão da transcrição e a transição t_7 indicando a ausência do estado repressor sobre TrpE, o que permite que o conjunto de enzimas seja expresso.

Tabela 11. Transições correspondentes às interações atuantes sobre o nodo TrpE.

Transição	Instrução	Parâmetro
t_4	$\{Trp,2\}$	0
t_5	$\{Trp,1\}$	0
t_6	$\{TrpR,1\}$	0
t_7	$\{\{Trp,0\},\{TrpR,0\}\}$	1

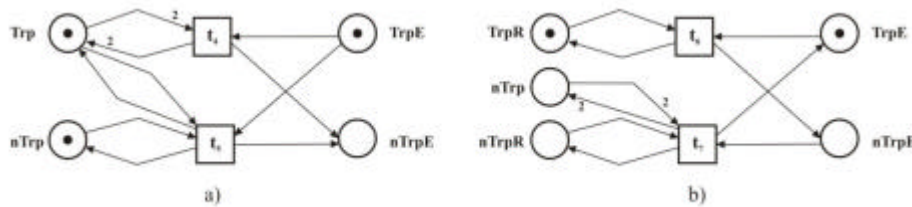


Figura 60. Rede de regulação do conjunto de enzimas. Trp nos níveis 1 e 2 levam a TrpE para zero (a); a presença do repressor leva a enzima para zero e ausência do repressor e do triptofano levam TrpE para o nível máximo.

A rede de Petri da Figura 60a representa o conjunto de pré e pós-condições das transições t_4 e t_5 e a Figura 60b o conjunto de pré e pós-condições das transições t_6 e t_7 .

7.3.1.3. Regulação do TrpR

Sobre o nodo TrpR exercem duas interações: Trp no nível 2 indicando a ativação do repressor TrpR e a auto repressão de TrpR. O conjunto de partes das interações atuantes sobre o nodo TrpR é dado por $I_{TrpR} = \{\emptyset, \{Trp,2\}, \{TrpR,1\}, \{\{TrpR,1\}, \{Trp,2\}\}\}$. A função lógica descrita pelas combinações do conjunto de partes pode ser minimizada

aplicando-se o teorema $A + A.B = A + B$, resultando em,

$$\begin{aligned} f(Trp_2, TrpR) &= Trp_2 + TrpR + TrpRTrp_2 \\ &= Trp_2 + TrpR \end{aligned}$$

A função lógica para o caso que nenhuma destas interações estejam atuando sobre o nodo TrpR, ou seja, $f(\emptyset)$, é dada por,

$$\begin{aligned} f(\emptyset) &= \overline{Trp_2 + TrpR} \\ &= \overline{Trp_2} \overline{TrpR} \end{aligned}$$

Onde $\overline{Trp_2} = Trp_0 + Trp_1$, ou seja, se Trp estiver em um dos níveis 0 ou 1 implica que TrpR irá para zero.

Tabela 12. Transições correspondentes às interações atuantes sobre o nodo TrpR.

Transição	Instrução	Parâmetro
t_8	$\{Trp, 2\}$	1
t_9	$\{Trp, 1\}$	0
t_{10}	$\{Trp, 0\}$	0

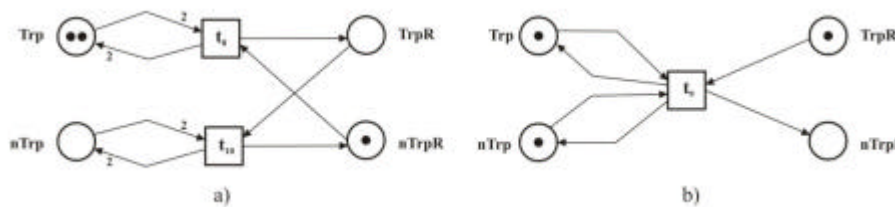


Figura 61. Rede de regulação do repressor TrpR. Triptofano no nível 2 leva TrpR para seu nível máximo e triptofano nos níveis 1 e 0 levam TrpR para zero.

A rede de Petri da Figura 61a representa o conjunto de pré e pós-condições das transições t_8 e t_{10} e a Figura 61b o conjunto de pré e pós-condições da transição t_9 .

7.3.1.4. Rede de Regulação

Fazendo-se a composição das sub-redes de regulação obtém-se a rede geral de regulação para a biossíntese do triptofano dada pela Figura 62. O estado inicial é dado pelo vetor 110, indicando que o conjunto de enzimas está presente, a produção de triptofano encontra-se no nível 1 e o repressor está inicialmente inativo.

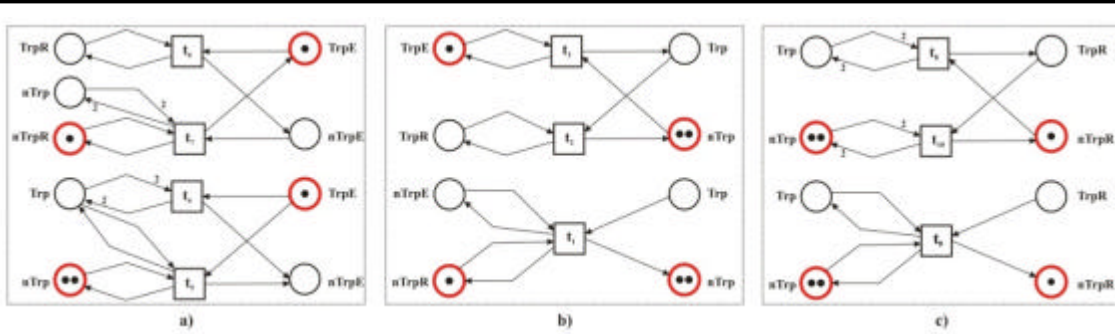


Figura 62. Rede de regulação da biossíntese do triptofano.

Submetendo-se esta rede de regulação a análise, observa-se as seguintes propriedades: a rede é viva, limitada, conservativa, conexa, fortemente conexa e apresenta o grafo de alcançabilidade dado pela Figura 63.

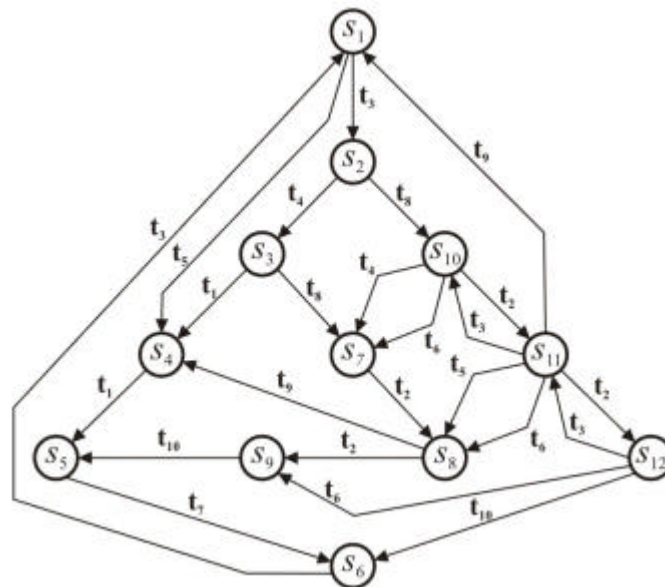


Figura 63. Grafo de alcançabilidade da rede de regulação da biossíntese do triptofano.

O grafo de alcançabilidade apresenta 12 estados, tal como para o grafo de regulação discutido na seção 7.2.

Para analisar o caso do nível basal de triptofano manter-se no nível médio devido a um aporte externo de triptofano neste nível é então modificada as pós-condições da transição t_1 de maneira que, para o repressor inativo e enzimas ausentes, o triptofano mantém-se no nível médio, como ilustra a Figura 64.

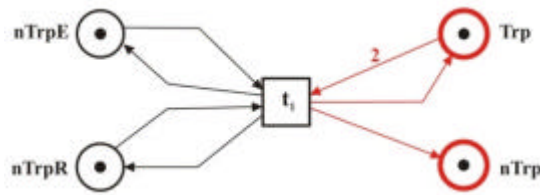


Figura 64. Regulação do triptofano no nível basal médio.

O grafo de alcançabilidade correspondente à rede de regulação para o triptofano no nível basal médio é ilustrando na Figura 65.

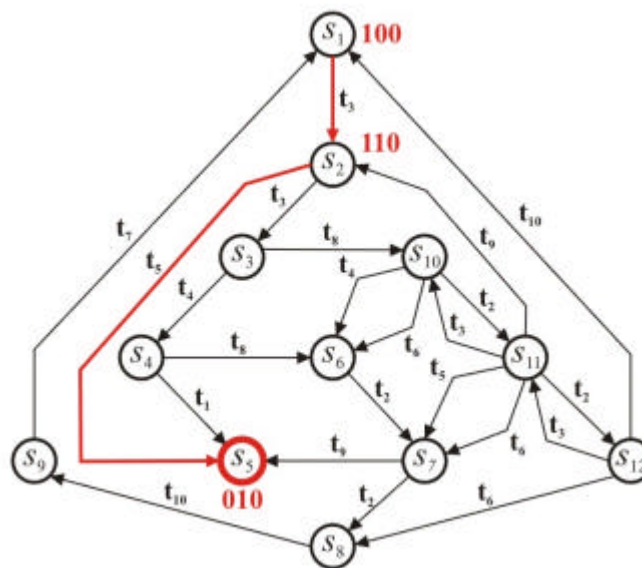


Figura 65. Grafo de alcançabilidade para o triptofano basal no nível médio.

Os grafos de alcançabilidade obtidos sob o formalismo de redes de Petri corroboram com os resultados obtidos sob o formalismo de Grafos de Regulação Gênica, evidenciando a equivalência entre os métodos e que a aplicação dos procedimentos de transposição de um método para o outro está correta, pois apresentam o mesmo número de estados e comportamentos dinâmicos.

7.4. Análise da Via Metabólica Para o Triptofano

Uma vez apresentados os procedimentos de modelagem e análise de reações bioquímicas em termos de redes de Petri, resta agora aplicá-los para o caso da via

metabólica de interesse deste trabalho, ou seja, para a via de biossíntese do triptofano. Desta forma, a seguir serão feitas a modelagem e as análises dinâmicas e estruturais do modelo da via de biossíntese sob os critérios ilimitado e limitado.

Com base no conjunto das seis reações existentes na via metabólica de produção do triptofano e nas informações deste capítulo, o modelo desta via em termos de rede de Petri, pode ser verificado na Figura 66. Neste caso, não somente estão sendo consideradas as reações, mas também a presença da enzima catalisadora de cada reação, como condição necessária ao disparo da reação. Ainda, por este modelo seguir o critério ilimitado, foram inseridas as transições *fontes* para as entradas e *sumidouros* para as saídas do modelo.

7.4.1. Modelo Ilimitado

No modelo ilimitado da biossíntese do triptofano, como mostra a Figura 66, o fluxo de entrada e saída dos elementos é considerado infinito. A marcação inicial indica que a presença das enzimas é constante.

7.4.1.1. Análise Dinâmica

Sendo este modelo ilimitado, uma análise dinâmica somente poderá ser feita por grafo de cobertura. Neste caso, o grafo de cobertura apresenta 29 estados, para o qual não é identificado nenhum estado “morto” (estável) a partir da marcação inicial.

7.4.1.2. Análise Estática

Uma análise estática ou estrutural revela a existência de nove invariantes de lugar correspondendo exatamente aos lugares associados às enzimas, comprovando que estes são os únicos lugares limitados neste sistema.

Quanto à invariância de transições, a análise estrutural revela a existência de cinco invariantes de transição, ou seja, cinco circuitos que se encontram em equilíbrio estável, sendo eles:

- $\mathbf{x}_1 = \{r_1, r_{-1}\}$, o qual corresponde a reação reversível r_1 ,
- $\mathbf{x}_2 = \{r_2, r_{-2}\}$ que corresponde a reação reversível r_2 ,
- $\mathbf{x}_3 = \{r_3, r_{-3}\}$ que corresponde a reação reversível r_3
- $\mathbf{x}_4 = \{r_6, r_{-6}\}$ correspondente a reação reversível r_6
- $\mathbf{x}_5 = \{E4PPEP, Gln, PRPP, Ser, \tau, \xi, \zeta, \eta, \theta, \rho, \sigma, Pyr, Glu, PPI, H_2O, CO_2, GA3P, Trp\}$ o qual assegura a existência de um circuito de produção do triptofano.

7.4.2. Modelo Limitado

Aplicando-se regras de redução previstas para redes de Petri sobre o modelo ilimitado, as quais não alteram o comportamento geral do modelo e fazendo com que as entradas e saídas sejam reinicializadas a cada ciclo, obtém-se então o modelo limitado ilustrado pela Figura 67.

A marcação inicial, com uma marca no lugar *início*, faz com que a transição *inicia* alimente os lugares de entrada do sistema exatamente com uma marca. Após a evolução total do sistema a transição *repete* atua como saída para os lugares que representam elementos *secundários* das reações.

Neste caso, lugares e transições de mesmo nome corresponde a um único lugar e uma única transição. Para o caso do lugar H_2O , este ocorre nas reações r_4 e r_6 e constitui um único lugar. Sendo assim, a transição *repete* retira a cada ciclo duas moléculas de H_2O do sistema.

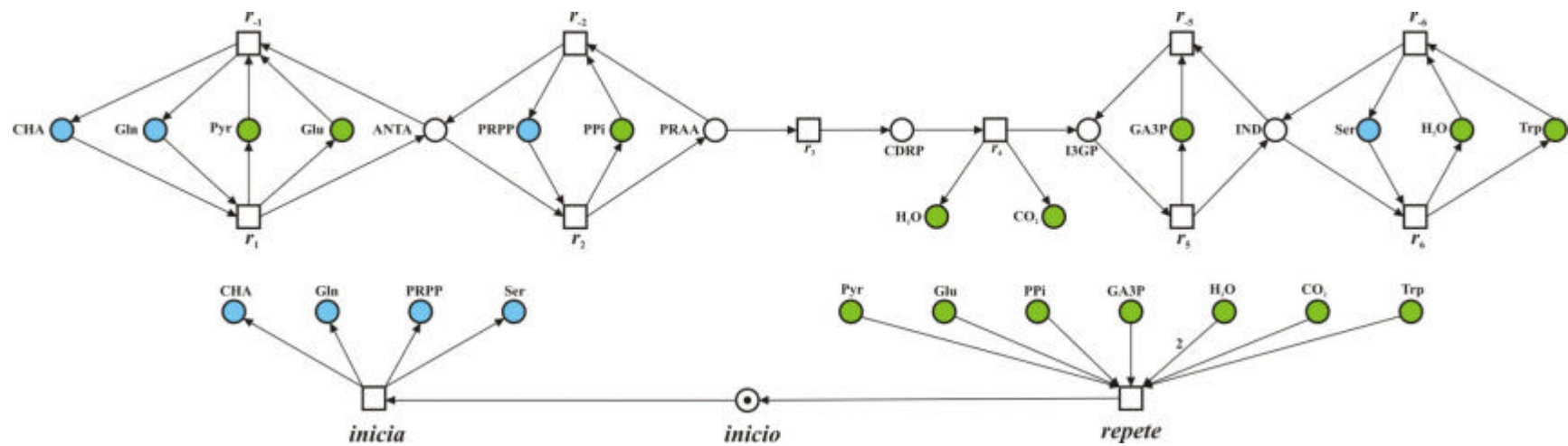


Figura 67. Modelo da via de biossíntese do triptofano em termos de redes de Petri sob o critério limitado. Lugares referentes às enzimas foram retirados tornando a rede *pura*. Principais abreviações: ANTA, antranilato; CDRP, 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-deoxyribulose 5-fosfato; CHA, corismato; GA3P, gliceraldeído 3-fosfato; I3GP, indol 3-glicerolfosfato; IND, indol; Gln, glutamina; Glu, glutamato; Trp, triptofano; PPA, prefenato; PPI, fenilpiruvato; PRPP, 5-fosforibosil-*a*-pirofosfato; Pyr, piruvato.

7.4.2.1. Análise Dinâmica

Por ser limitado, a análise dinâmica revela o grafo de alcançabilidade ilustrado pela Figura 68 para este modelo. Neste grafo pode-se perceber que as duas primeiras reações deste sistema, por serem reversíveis, estão em conflito dinâmico a partir do estado \mathbf{m}_2 através das reações r_{-1} e r_2 . Da mesma forma, as duas últimas reações estão em conflito dinâmico a partir do estado \mathbf{m}_6 através das reações r_{-5} e r_6 . Também, as reações r_{-2} e r_3 estão em conflito dinâmico a partir do estado \mathbf{m}_3 .

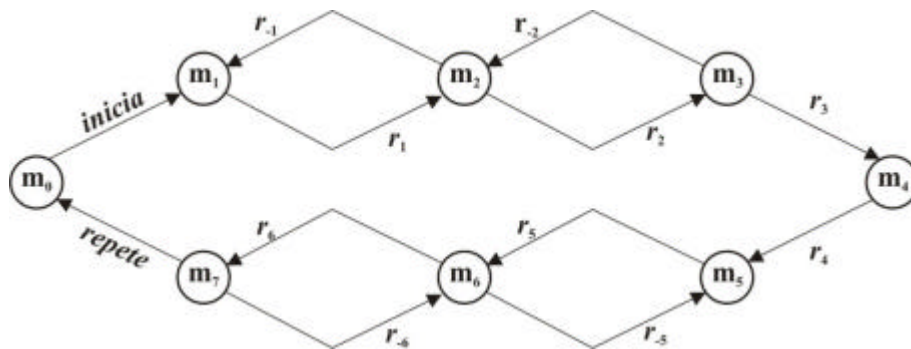


Figura 68. Grafo de alcançabilidade para o modelo limitado da via de biossíntese do triptofano.

A configuração deste grafo de alcançabilidade sugere que a existência de regiões de reversibilidade no início e no final do sistema possam atuar como repositórios dinâmicos de produtos intermediários. Em uma eventualidade que acuse a ausência de um determinado produto final de uma via, o sistema pode decidir por outra rota metabólica a partir destes intermediários. Ainda, o estrangulamento ou gargalo dado pelo circuito das reações r_3 e r_4 , atua como um seqüenciador do fluxo metabólico entre as regiões de reversibilidade, garantindo que uma quantidade suficiente de produtos intermediários entre para o ciclo final do sistema.

7.4.2.2. Análise Estrutural

Uma análise estrutural ou estática para o modelo limitado reforça a existência de cinco circuitos estáveis, como também obtidos para o modelo ilimitado, através das seguintes invariantes de transição:

- $\mathbf{x}_1 = \{r_1, r_{-1}\}$ que corresponde ao circuito de reversibilidade da reação r_1 ,
- $\mathbf{x}_2 = \{r_2, r_{-2}\}$ ao circuito da reação r_2 ,
- $\mathbf{x}_3 = \{r_3, r_{-3}\}$ ao circuito da reação r_3 ,

- $\mathbf{x}_4 = \{r_6, r_{-6}\}$ ao circuito da reação r_6 e finalmente
- $\mathbf{x}_5 = \{r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6\}$ correspondente ao ciclo de produção do triptofano.

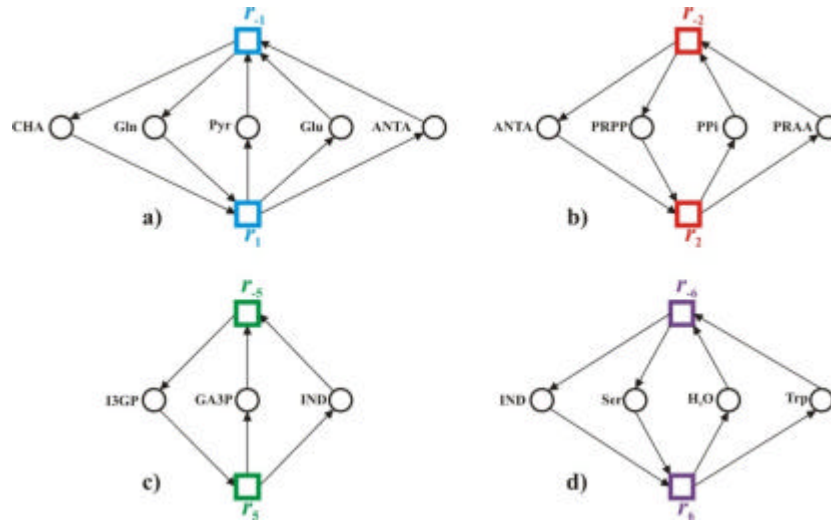


Figura 69. Circuitos obtidos pela análise invariantes de transição do modelo limitado. Sendo, a invariante x_1 representada pela figura 69a, x_2 pela 69b, x_3 pela 69c, x_4 pela 69d.

A Figura 70 ilustra o circuito da invariante de transição x_5 , o qual evidencia a existência de uma seqüência de ocorrências de reações (transições) que garante a produção do triptofano.

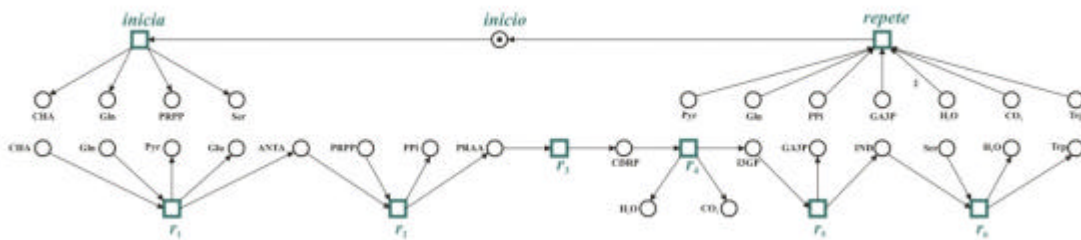


Figura 70. Circuito obtido pela invariante de transição x_5 do modelo limitado.

A análise de invariância de lugar feita para o modelo limitado revela a existência de vinte e três invariantes como mostra a Tabela 13. As invariantes de lugares apontam para todos os circuitos de preservação dos elementos produzidos pelo sistema. Por exemplo, os suportes de invariância de lugar 1, 12, 13 e 14 correspondem aos circuitos que levam a produção do triptofano.

Tabela 13. Invariantes de lugares correspondentes ao modelo limitado da via de biossíntese do triptofano.

<i>Invariantes</i>	<i>Lugares</i>						
1	<i>início</i>	<i>Ser</i>	<i>Trp</i>				
2	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>Glu</i>				
3	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>Glu</i>				
4	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>Pyr</i>				
5	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>Pyr</i>				
6	<i>início</i>	<i>PRPP</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>Ser</i>	<i>H₂O</i>	
7	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>Ser</i>	<i>H₂O</i>
8	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>Ser</i>	<i>H₂O</i>
9	<i>início</i>	<i>PRPP</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>IND</i>	<i>H₂O</i>
10	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>IND</i> <i>H₂O</i>
11	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>IND</i> <i>H₂O</i>
12	<i>início</i>	<i>PRPP</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>IND</i>	<i>Trp</i>
13	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>IND</i> <i>Trp</i>
14	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>IND</i> <i>Trp</i>
15	<i>início</i>	<i>PRPP</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>GA3P</i>	
16	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>GA3P</i>
17	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>I3GP</i>	<i>GA3P</i>
18	<i>início</i>	<i>PRPP</i>	<i>PPi</i>				
19	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>ANTA</i>	<i>PPi</i>			
20	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>ANTA</i>	<i>PPi</i>			
21	<i>início</i>	<i>PRPP</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>CO₂</i>		
22	<i>início</i>	<i>CHA</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>CO₂</i>	
23	<i>início</i>	<i>Gln</i>	<i>ANTA</i>	<i>PRAA</i>	<i>CDRP</i>	<i>CO₂</i>	

Aplicando técnicas de composição, pode-se montar uma sub-rede de produção de um determinado elemento a partir da composição destes sub-circuitos. A Figura 71 ilustra as sub-redes de produção do glutamato, piruvato, CO₂ e pirofostato.

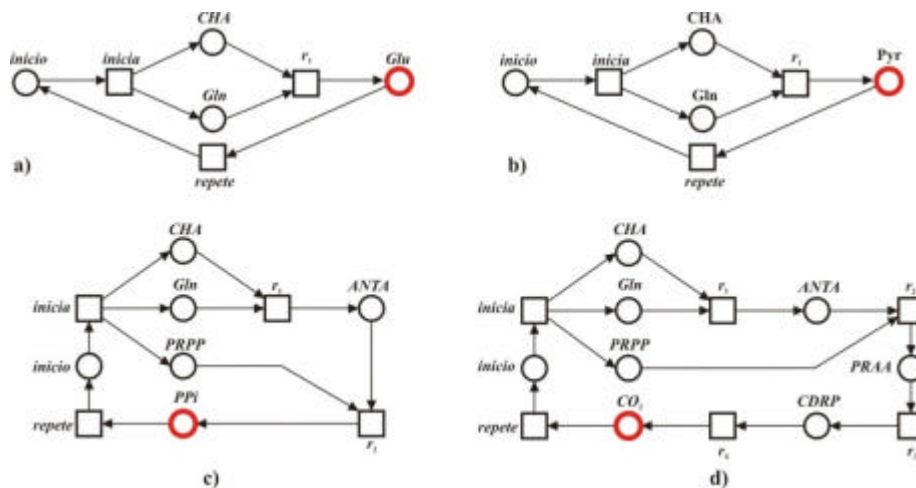


Figura 71. Circuitos correspondentes as invariantes de lugares para o modelo limitado da via biossíntese do triptofano. Em 71a tem-se o circuito total para a produção do glutamato, obtido da composição dos circuitos correspondentes as invariantes de transição 2 e 3 da Tabela 13. Os circuitos 71b, 71c e 71d foram obtidos da mesma forma.

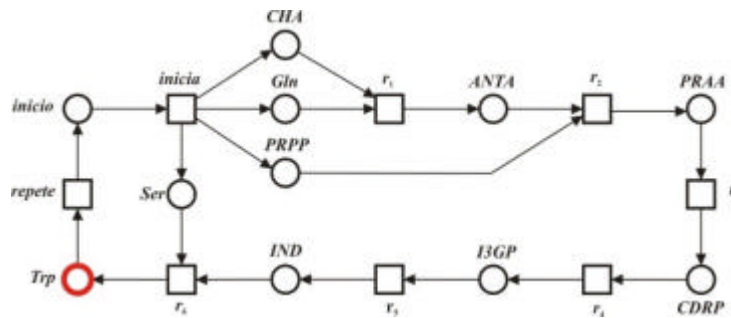


Figura 72. Circuito correspondente a produção de triptofano obtido da composição dos suportes de invariância de lugar 1, 12, 13 e 14 da Tabela 13.

Para o caso da produção do triptofano, a Figura 72, ilustra os lugares e transições necessárias a estabelecer um circuito de produção do triptofano obtido pelas invariantes de lugares 1, 12, 13 e 14 indicadas pela Tabela 13.

7.5. O Modelo Integrado

A integração da via metabólica a rede de regulação, ambas em termos de redes de Petri, está ilustrada pelas Figura 75, onde se tem um modelo sob o critério de análise *ilimitado* desta integração e pela Figura 76 representando o modelo integrado sob o critério de análise *limitado*.

Primeiramente, a integração se dá pela substituição da transição t_3 da rede de regulação, a qual impõe que a presença das enzimas aumenta o nível de triptofano, por toda a rede do modelo da via metabólica. Segundo, o conjunto de enzimas TrpD, TrpC, TrpB e TrpA é considerado constante, neste modelo, com base nas evidências biológicas:

- Somente as subunidades da enzima TrpE são desativadas pelo mecanismo de inibição retroativa, restando as subunidades TrpD ativas do tetrâmero que compõe o primeiro complexo enzimático da via metabólica.
- Devido a existência do promotor constitutivo interno *trpP2*, sempre se fará presente o conjunto de enzimas TrpC, TrpB e TrpA.

Terceiro, na transição correspondente a reação r_6 é adicionado a pré-condição equivalente ao lugar $n\text{Trp}$ mantendo a produção do triptofano no intervalo descrito pelos níveis qualitativos *baixo*, *médio* e *alto*.

Mais importante, toda a lógica de regulação sobre a produção da via metabólica recai sobre a presença, ausência ou inibição da enzima TrpE, representada na via metabólica pelo lugar de mesmo nome.

Por último, na rede de regulação foram introduzidas duas sub-redes de regulação que indicam o aporte de triptofano externo, Trp_{ext} , e sua regulação pela proteína repressora TrpR, como ilustrado pela Figura 73. Esta alteração não modifica a semântica da rede e substitui o procedimento de manipulação do valor basal de triptofano no modelo. Isto foi feito para deixar mais evidente a relação entre os mecanismos de controle, somente com o prejuízo do aumento do número de estados sob análise.

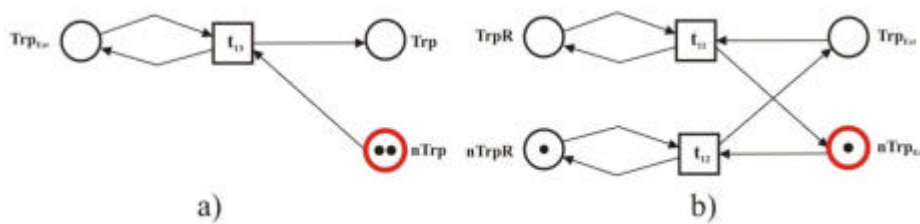


Figura 73. Rede de regulação do aporte externo de triptofano.

Neste caso, a presença do aporte externo leva a concentração de triptofano para seu nível máximo, como indicado pela Figura 73a. Sendo que para simular um aporte externo de triptofano no nível médio é necessário modificar esta mesma rede de maneira a elevar a concentração de triptofano somente para o nível médio, como pode ser verificado na Figura 74.

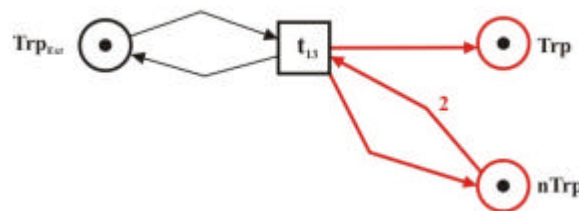


Figura 74. Rede de regulação do aporte externo de triptofano no nível médio

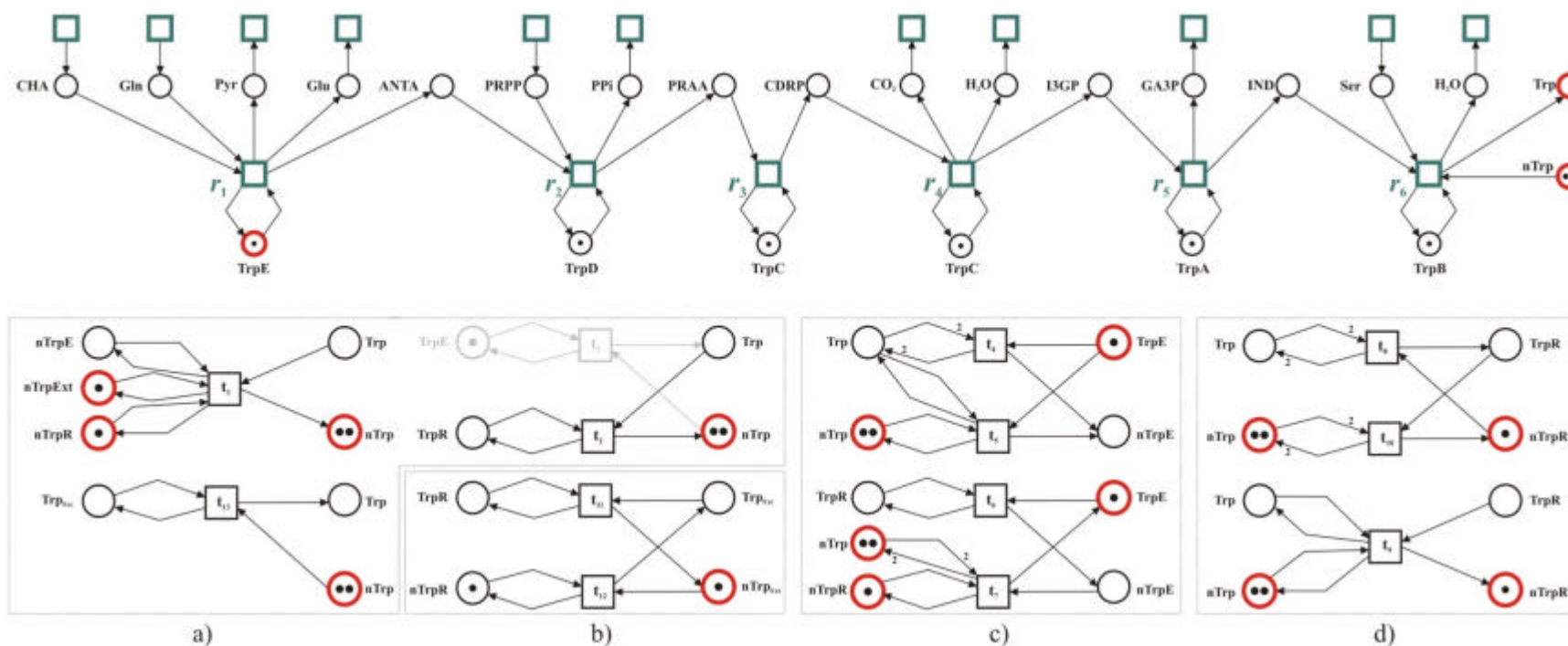


Figura 75. Modelo integrado da via de biossíntese do triptofano acoplada a rede de regulação. Lugares de mesmo nome constitui um único lugar na rede. A transição t_3 (sombreado fraco) do grafo de regulação foi substituída pela via metabólica. Principais abreviações: ANTA, antranilato; CDRP, 1-(*o*-carboxyfenilamino)-1-deoxyribulose 5-fosfato; CHA, corismato; GA3P, gliceraldeído 3-fosfato; I3GP, indol 3-glicerolfosfato; IND, indol; Gln, glutamina; Glu, glutamato; Trp, triptofano; PPA, prefenato; PPi, fenilpiruvato; PRAA, fosforibosil antranilato; PRPP, 5-fosforibosil- α -pirofosfato; Pyr, piruvato; TrpA, TrpB, TrpC, TrpD e TrpE, conjunto de enzimas expressas pelo operon *trpEDCBA*.

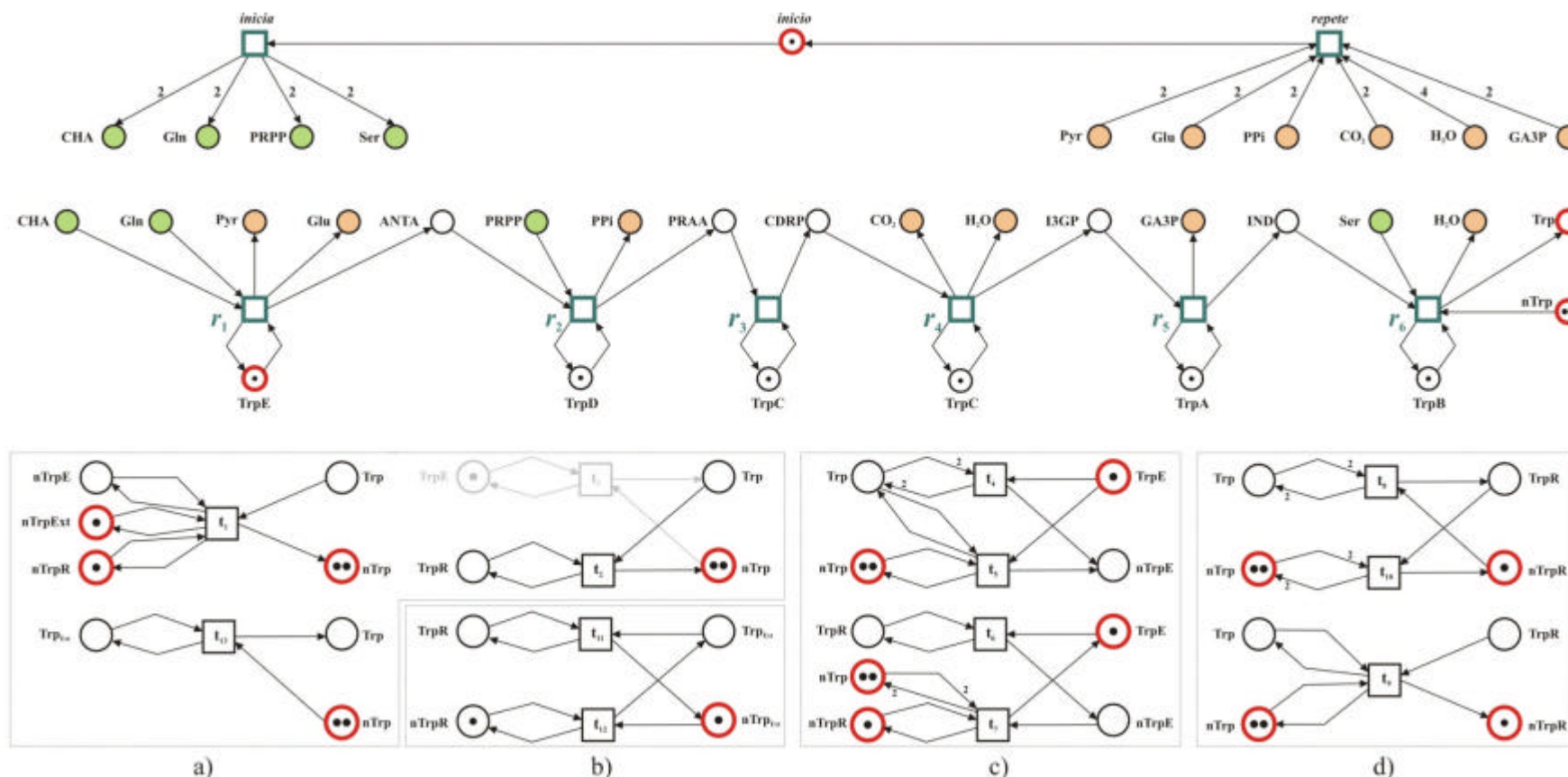


Figura 76. Rede de regulação da biossíntese do triptofano sob o critério limitado. Regulação do Trp_{int} (a); Regulação Trp_{ext} (b); Regulação do conjunto de enzimas TrpE (c); Regulação do repressor TrpR (d). Principais abreviações: ANTA, antranilato; CDRP, 1-(o-carboxyfenilamino)-1-deoxyribulose 5-fosfato; CHA, corismato; GA3P, gliceraldeído 3-fosfato; I3GP, indol 3-glicerolfosfato; IND, indol; Gln, glutamina; Glu, glutamato; Trp, triptofano; PPA, pafenato; PPI, fenilpiruvato; PRAA, fosforibosil antranilato; PRPP, 5fosforibosil-a-pirofosfato; Pyr, piruvato; TrpA, TrpB, TrpC, TrpD e TrpE, conjunto de enzimas expressas pelo operon trpEDCBA.

7.5.1. Modelo Ilimitado

O modelo sob o critério de análise ilimitado da integração da via metabólica com a rede de regulação pode ser verificado na Figura 75. Neste modelo, as entradas e saídas do sistema são infinitas não-enumeráveis. Somente a saída do triptofano do sistema é mantida para o intervalo definido pela análise qualitativa, de maneira a corresponder com a lógica prevista para a rede de regulação.

7.5.1.1. Análise Dinâmica

O grafo de cobertura para este modelo apresenta 703 estados. Sendo que nenhum destes estados e nenhuma transição são “mortos”, dada à marcação inicial da rede.

7.5.1.2. Análise Estrutural

Esta análise revela um conjunto de 10 invariantes de transição. Sendo oito destas invariantes referentes aos circuitos de controle e duas invariantes referentes à produção de triptofano. Para as invariantes de lugar, a análise revela um conjunto de nove invariantes de lugar que correspondem às enzimas, ao repressor, a presença de triptofano externo e ao triptofano interno.

7.5.2. Modelo Limitado

O modelo sob o critério de análise limitado da integração da via metabólica com a rede de regulação pode ser verificado na Figura 76. Neste modelo as entradas e saídas do sistema são limitadas. A cada repetição das entradas é adicionado no sistema um conjunto de marcas suficientes para triptofano no nível alto, sendo as saídas retiradas nesta mesma proporção.

7.5.2.1. Análise Dinâmica

O grafo de alcançabilidade apresentou 696 estados, onde nenhum destes estados ou transições entre estados encontra-se “morto” em função da marcação inicial da rede.

Também, pela análise de vivacidade a rede mostrou-se viva, conexa, fortemente conexa e reversível.

7.5.2.2. Análise Estrutural

Novamente, foram encontradas dez invariantes de transição tal como para o modelo ilimitado. Sendo que oito destas invariantes correspondem aos circuitos de controle e duas revelam dois circuitos que levam a produção de triptofano.

7.6. Resumo

Neste capítulo, primeiramente foi obtido o modelo lógico de regulação da biossíntese do triptofano a partir do modelo biológico introduzido pelo capítulo 2. Neste modelo, foram considerados os mecanismos de regulação por atenuação da transcrição gênica, repressão da transcrição gênica, repressão do aporte externo de triptofano e inibição alostérica retroativa por produto final da via metabólica.

O modelo lógico ficou então composto por três nodos: o nodo Trp representando a concentração total de triptofano no meio celular, o nodo TrpR representando o a proteína repressora da transcrição gênica de mais de um operon envolvidos na regulação da biossíntese do triptofano e o nodo TrpE representando o conjunto de enzimas necessárias ao metabolismo do triptofano a partir do corismato.

Todos os mecanismos de regulação são mediados pela concentração de triptofano no meio celular. Desta forma, foram escolhidos três níveis lógicos de concentração do triptofano: *baixo*, *médio* e *alto*. O nível baixo favorece a expressão gênica do operon *trpEDCBA* o que contribui para a presença do conjunto de enzimas necessárias a produção de triptofano. O nível médio provoca atenuação da transcrição contribuindo para a ausência do conjunto de enzimas. O nível alto, tem dois efeitos, sendo um deles a ativação da proteína repressora TrpR, a qual reprime a transcrição do operon *trpEDCBA*, da permease *mtr* e de seu próprio operon *trpR*, contribuindo para a ausência do conjunto de enzimas e repressão do aporte externo de triptofano. O segundo efeito da concentração alta de triptofano é o da inibição retroativa da primeira enzima da via metabólica, TrpE, contribuindo para a diminuição da produção de triptofano.

A análise dinâmica assíncrona deste modelo revelou um grafo de transições contendo 12 estados, para a condição inicial que assume Trp baixo, TrpR inativo, o conjunto de enzimas, TrpE, presente e nenhum aporte externo de Trp. A análise deste grafo, para estas condições, revelou a existência de dois circuitos de regulação, um dado pelo mecanismo de atenuação para concentração intermediária de Trp e outro de repressão

para concentração alta de Trp. Estas mesmas condições iniciais quando combinadas ao aporte externo médio de Trp apresenta um estado estável com Trp no nível médio, o conjunto de enzimas ausente e o repressor inativo. Fora desta condição o sistema oscila entre os níveis de baixa e alta concentração de Trp governados pelos mecanismos de regulação destes extremos.

Em seguida foram simuladas situações para as quais houve bloqueio na evolução das variáveis de maneira a verificar a existência de circuitos que correspondem aos mecanismos de regulação mencionados. Neste caso, todos os circuitos mostraram-se evidentes e correspondentes ao comportamento biológico esperado.

O modelo lógico dado pelo grafo de regulação foi então transcrito para o formalismo de redes de Petri. A rede de regulação obtida apresentou 12 estados da mesma forma que para o grafo de regulação e exibiu as propriedades de *vivacidade*, *reversibilidade* e *limitabilidade*.

A rede de regulação foi então integrada a rede da via metabólica sob os critérios de análise *ilimitado* e *limitado*. A análise destes modelos sob estes critérios revelou que o sistema preservou as propriedades inerentes a lógica de regulação derivada das observações biológicas.

Capítulo 8

Conclusões e Considerações Finais

Vias metabólicas são formadas por um conjunto de reações bioquímicas subordinadas à presença de enzimas que facilitam estas reações. O estudo destas cadeias de reações, levando-se em conta somente os parâmetros cinéticos de cada enzima por seu substrato, assume a presença constante do conjunto de enzimas no meio celular. Considerar a lógica de regulação que determina a presença destas enzimas no meio celular com base em informações genômicas requer o desenvolvimento de novos métodos formais de abordagem deste problema.

Recentemente o formalismo de redes de Petri tem sido considerado para modelar redes bioquímicas. Porém, poucas destas experimentações levam em consideração redes de regulação gênicas, e atém-se a uma transcrição direta de vias metabólicas para o formalismo de redes de Petri. Na medida em que mais e mais informações sobre mecanismos regulatórios tornam-se disponíveis, dado o avanço da biologia molecular, torna-se imprescindível considerar estas informações.

Os mecanismos de regulação da produção de triptofano pela *Escherichia coli* é um exemplo da disponibilidade desse tipo de informação. Usualmente elas cobrem desde o espectro genômico de interações entre biomoléculas até o de informações relacionadas à elucidação do comportamento de cada enzima envolvida nas reações bioquímicas. Também, por ser de produção dispendiosa para a *E. coli*, em termos energéticos, esta via metabólica encontra-se sob um rigoroso sistema de controle. Este rigor se dá principalmente pela combinação da atuação dos mecanismos de *atenuação da transcrição*, *repressão da transcrição* e *inibição retroativa* da primeira enzima da via de biossíntese, bem como sobre o aporte de triptofano extracelular.

De maneira a capturar este aspecto combinatório ditado pela ativação ou inibição destes mecanismos de controle foi utilizado o formalismo de grafos de regulação gênica para

descrever a rede de regulação da produção do triptofano. Este formalismo tem como propriedades a identificação de circuitos funcionais de ativação ou de inibição que corroborem para a aceitação ou refutação de hipóteses levantadas por observações biológicas, bem como na identificação de estados multi-estacionários.

O modelo lógico de regulação da produção do triptofano obtido sob o formalismo de grafos regulatórios encontra tradução para o formalismo de redes de Petri e preserva as propriedades sistêmicas capturadas pelo modelo lógico. Este mapeamento de um método formal para outro permite, além de ampliar as técnicas de análise, usufruir dos ambientes computacionais de modelagem e análise de redes de Petri, amplamente desenvolvidos ao longo de décadas. Também, devido a que o método de grafos regulatórios ser relativamente recente quando comparado a redes de Petri, ambientes computacionais para este método encontram-se em pleno desenvolvimento.

Uma vez obtido ambos os modelos, da rede de regulação e da via bioquímica descrita pelo formalismo de redes de Petri, procedeu-se a integração destas redes de maneira a caracterizar um modelo integrado da produção regulada do triptofano. Este modelo integrado foi então submetido à análise dinâmica e estrutural previstas para redes de Petri.

Lembrando que a análise dinâmica depende da marcação inicial do sistema e revela a *limitabilidade* do modelo quanto aos estados alcançáveis a partir da marcação inicial. Ainda, se um sistema for *limitado* então um grafo de alcançabilidade pode ser construído e a partir deste grafo muitas outras propriedades podem ser derivadas tais como: *vivacidade*, *reversibilidade*, *conservação*, *conectividade*, entre outras.

Por sua vez, a análise estrutural refere-se à topologia do modelo e permite verificar a existência de circuitos. Estes circuitos podem ser construídos pela análise de invariância de lugar e pela invariância de transição.

Invariantes de lugar revelam os lugares cuja marcação permanece inalterada, não importando o número de disparos das transições do sistema, e o circuito descrito pela interconexão destes lugares e suas devidas transições corresponde à conservação de um determinado produto durante a evolução do sistema.

Invariantes de transição revelam subcircuitos da rede e permitem verificar as sub-redes componentes da rede global. Estes subcircuitos são formados pela repetição de uma mesma seqüência de ocorrências a partir de um conjunto de transições e que, por conseguinte, pode levar a verificação da produção de um determinado metabólito, por exemplo.

A análise do modelo integrado da produção do triptofano pela *E. coli* revelou que este sistema da prioridade ao aporte externo de triptofano no nível *médio* em detrimento da produção interna e demonstrou um estado estável para esta condição, mantendo-se a produção de enzimas atenuada e o repressor inativo. Também, a ausência súbita de triptofano externo, ativa a biossíntese do conjunto de enzimas e a retomada do metabolismo do triptofano. Para valores excedentes de triptofano, os mecanismos de repressão e de inibição retroativa modulam a concentração de triptofano para valores

internos admissíveis.

Basicamente existem dois grandes circuitos de regulação, um que modula a concentração interna nos valores intermediários para baixo e outro que modula a concentração de valores excedentes para intermediários.

A produção interna ocorre somente para valores de baixa concentração de triptofano e ainda devido aos casos para os quais a biossíntese do conjunto de enzimas escapa do processo combinatório de atenuação da transcrição.

Mesmo assim, a produção interna por si só pode levar o sistema a altas concentrações de triptofano, quando por sua vez os mecanismos de regulação de repressão e de inibição retroativa voltam a modular esta concentração para níveis baixos.

Desta forma o sistema oscila entre níveis alternados de baixa e alta concentração de triptofano assumindo um estado estável somente para um aporte de triptofano externo no nível intermediário, pois neste caso o conjunto de enzimas mantém-se atenuado e este nível não é suficiente para ativar o mecanismo de repressão.

Uma análise futura mais refinada poderia considerar a afinidade da proteína repressora TrpR pela região de operação dos diversos operons sob sua regulação o que permitiria melhorar a definição dos limiares de atuação dos mecanismos de regulação.

Ainda, considerar a regulação cooperativa exercida conjuntamente entre as proteínas repressoras TyrR e TrpR, as quais conjuntamente decidem pelo aporte externo e produção de um dos três aminoácidos aromáticos a partir de pontos de entrada e de bifurcação de metabólitos intermediários para a via metabólica dos aminoácidos aromáticos.

Também, à medida que informações detalhadas sobre os parâmetros cinéticos destas reações incluindo as “reações” de transcrição, tradução e transporte tornem-se plausíveis, este modelo pode ser facilmente convertido para um modelo de redes de Petri Híbridas e desta forma permitir uma análise quantitativa e mais significativa em termos numéricos sobre este sistema.

Referências

Bhartiya, S., S. Rawool, *et al.* Dynamic model of Escherichia coli tryptophan operon shows an optimal structural design. Eur J Biochem, v.270, n.12, Jun, p.2644-51. 2003.

Bongaerts, J., M. Krämer, *et al.* Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds.

Bongaerts J., K. M., Müller U., Raeven L., Wubbolts M. Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds. Metabolic Engineering, v.3, July 2001, p.289-300. 2001.

Chaouiya, C., E. Remy, B. Mossé, and D. Thieffry. Qualitative analysis of regulatory graphs: a computational tool based on a discrete formal framework. LNCIS, v.294, p.119-126. 2003.

Chaouiya, C., E. Remy, *et al.* Petri net modelling of biological regulatory networks: CMSB 2005.

Chaouiya, C., Remy E., Ruet P., and Thieffry D. Qualitative Modelling of genetic networks: from logical regulatory graphs to standard Petri nets. LNCIS, v.3099, p.137-156. 2004.

David, R. e H. Alla. On Hybrid Petri Nets. Discrete Event Dynamic Systems, v.11, n.1, p.9-40. 2001.

Genrich, H., R. Küffner, *et al.* Executable Petri net models for the analysis of metabolic pathways. International Journal on Software Tools for Technology Transfer (STTT), v.3, n.4, p.394-404. 2001.

Genrich, H. J. Predicate/Transition Nets in: Advances in Petri Nets Part I, ed. W. Bauer, W. Reisig, G. Rozenberg, Vol. 254: Springer Verlag 1987.

Goss, P. J. E. e J. Peccoud. Quantitative modeling of stochastic systems in molecular biology by using stochastic Petri nets. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.95, n.12, p.6750-6755. 1998.

Heiner, M. e P. Deussen. Petri Net Based Design and Analysis of Reactive Systems. Proc. Workshop on Discrete Event Systems (WODES'96), Edinburgh, August, p.308-313. 1996.

Heiner, M. e I. Koch. Petri Net Based Model Validation in Systems Biology. 25th International Conference on Application and Theory of Petri Nets, Bologna, Italy. 2004.

Heiner, M., I. Koch, *et al.* Model Validation of Biological Pathways Using Petri Nets-Demonstrated for Apoptosis. Biosystems, v.75, n.1-3, p.15-28. 2004.

Heiner, M., G. Ventre, *et al.* A Petri Net Based Methodology to Integrate Qualitative and Quantitative Analysis. Information and Software Technology, v.36, n.7, p.435-441. 1994.

Jeeves, M., P. D. Evans, *et al.* Studies of the Escherichia coli Trp repressor binding to its five operators and to variant operator sequences. FEBS Journal, v.265, p.919-928. 1999.

Koch, I., B. H. Junker, *et al.* Application of Petri net theory for modelling and validation of the sucrose breakdown pathway in the potato tuber. Bioinformatics, v.21, n.7, p.1219-1226. 2005.

Kohn, M. C. e W. J. Letzkus. A graph-theoretical analysis of metabolic regulation. J Theor Biol, v.100, n.2, p.293-304. 1983.

Larrinaga, A., A. Naldi, *et al.* GINsim: A software suite for the qualitative modelling, simulation and analysis of regulatory networks. Biosystems. 2006.

Mackey, M. C. Mathematical Models of Gene Regulation. American Physical Society, March Meeting 2004, March 22-26, 2004, Palais des Congres de Montreal, Montreal, Quebec, Canada, MEETING ID: MAR04, abstract# N8. 001. 2004.

Matsuno, H., Y. Tanaka, *et al.* Biopathways representation and simulation on hybrid functional Petri net. In Silico Biology, v.3, p.32. 2003.

Murata, T. Petri nets: Properties, analysis and applications. Proceedings of the IEEE, v.77, n.4, p.541-580. 1989.

Peterson, J. L. Petri Nets.

Reddy, V. N., M. N. Liebman, *et al.* Qualitative analysis of biochemical reaction systems. Comput Biol Med, v.26, n.1, p.9-24. 1996.

Reddy, V. N., M. L. Mavrovouniotis, *et al.* Petri net representations in metabolic pathways. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, v.1, p.328-36. 1993.

Reisig, W. Petri nets: an introduction: Springer-Verlag New York, Inc. New York, NY, USA. 1985

Remy, E., P. Ruet, *et al.* From Logical Regulatory Graphs to Standard Petri Nets: Dynamical Roles and Functionality of Feedback Circuits. Preprint IML, p.10-2005. 2005.

Roch, S. e P. H. Starke. INA Integrated Net Analyzer Version 2.2. Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Informatik, Lehrstuhl für Automaten-und Systemtheorie, Berlin, Germany. 1999.

Santillán, M. e M. C. Mackey. Dynamic behavior in mathematical models of the tryptophan operon. Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science, v.11, p.261. 2001.

Santillán, M., Zeron, S. E. Dynamic influence of feedback enzyme inhibition and transcription attenuation on the tryptophan operon response to nutritional shifts. Theoretical Biology, v.231, p.287-298. 2004.

Sarsero, J. P., P. J. Wookey, *et al.* Regulation of expression of the Escherichia coli K-12 mtr gene by TyrR protein and Trp repressor. Journal of Bacteriology, v.173, n.13, p.4133-4143. 1991.

Schuster, S., T. Pfeiffer, *et al.* Exploring the pathway structure of metabolism: decomposition into subnetworks and application to Mycoplasma pneumoniae. Bioinformatics, v.18, n.2, p.351-361. 2002.

Simao, E., E. Remy, *et al.* Qualitative modelling of regulated metabolic pathways: application to the tryptophan biosynthesis in E.Coli. Bioinformatics, v.21 Suppl 2, Sep 1, p.ii190-ii196. 2005.

Simão, E., Remy E., Thieffry D., Chaouiya C. Qualitative modelling of regulated metabolic pathways: application to the tryptophan biosynthesis in *E. coli*. Bioinformatics, v.21, p.ii190-ii196. 2005.

Thieffry, D. e H. De Jong. Bio-informatique(3). Modélisation, analyse et simulation des réseaux génétiques. MS. Médecine sciences, v.18, n.4, p.492-502. 2002.

Thieffry, D. e R. Thomas. Dynamical behaviour of biological regulatory networks--II. Immunity control in bacteriophage lambda. Bull Math Biol, v.57, n.2, p.277-97. 1995.

Thieffry, D. e R. Thomas. Qualitative analysis of gene networks. Pac Symp Biocomput, v.77, p.88. 1998.

Thomas, R. Regulatory networks seen as asynchronous automata: a logical description. J. Theor. Biol., v.153, n.1-23. 1991.

Venkatesh, K. V., S. Bhartiya, *et al.* Multiple feedback loops are key to a robust dynamic performance of tryptophan regulation in Escherichia coli. FEBS Lett, v.563, p.234-240. 2004.

Voss, K., M. Heiner, *et al.* Steady state analysis of metabolic pathways using Petri nets. In Silico Biology, v.3, p.31. 2003.

Wang, J. Timed Petri Nets: Theory and Application: Kluwer Academic Publishers. 1998

Will, J. e M. Heiner. Petri Nets in Biology, Chemistry, and Medicine-Bibliography. Computer Science Reports, v.4, n.02. 2002.

Xie, G., N. O. Keyhani, *et al.* Ancient Origin of the Tryptophan Operon and the Dynamics of Evolutionary Change {dagger}. Microbiology and Molecular Biology Reviews.

Xiu, Z. L., Z. Y. Chang, *et al.* Nonlinear dynamics of regulation of bacterial trp operon: model analysis of integrated effects of repression, feedback inhibition, and attenuation. Biotechnol Prog v.18, n.4, Jul-Aug, p.686-93. 2002.

Yanofsky, C. Transcription attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. J Bacteriol, v.182, n.1, Jan, p.1-8. 2000.

Yanofsky, C. Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions. J Biol Chem, v.278, n.13, Mar 28, p.10859-78. 2003.

Yanofsky, C. The different roles of tryptophan transfer RNA in regulating *trp* operon expression in *E. coli* versus *B. subtilis*. TRENDS in Genetics, v.20, n.8, August 2004. 2004.

Yanofsky, C. e V. Horn. Role of regulatory features of the trp operon of Escherichia coli in mediating a response to a nutritional shift. J Bacteriol, v.176, n.20, Oct, p.6245-54. 1994.

Yanofsky, C., K. V. Konan, *et al.* Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria. Biochimie, v.78, n.11-12, p.1017-24. 1996.

Yanofsky, C., T. Platt, *et al.* The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of Escherichia coli. Nucleic Acids Res, v.9, n.24, Dec 21, p.6647-68. 1981.

Página deixada intencionalmente em branco.