

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa Interunidades em Bioinformática

Herbert Rausch Fernandes

STATISTICAL MODEL CHECKING NO REPOSICIONAMENTO DE
FÁRMACOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Belo Horizonte
2022

Herbert Rausch Fernandes

***STATISTICAL MODEL CHECKING* NO REPOSICIONAMENTO DE
FÁRMACOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioinformática.

Orientador: Sérgio Vale Aguiar Campos
Coorientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Belo Horizonte
2022

043

Fernandes, Herbert Rausch.

Statistical Model Checking no reposicionamento de fármacos na Doença de Alzheimer [manuscrito] / Herbert Rausch Fernandes. – 2022.

103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Sérgio Vale Aguiar Campos. Coorientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Doença de Alzheimer. 3. Reposicionamento de Medicamentos. 4. Modelagem Computacional. I. Campos, Sérgio Vale Aguiar. II. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"STATISTICAL MODEL CHECKING NO REPOSICIONAMENTO DE DROGAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER"

Herbert Rausch Fernandes

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Sergio Vale Aguiar Campos - Orientador

UFMG

Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira - Coorientador

UFMG

Prof. Thiago Verano Braga

UFMG

Prof. Rafael Pinto Vieira

UFMG

Prof. Rodrigo Richard Gomes

PUC-MG

Profa Natália Pessoa Rocha

UTHealth

Belo Horizonte, 22 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Verano Braga, Professor do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Pinto Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 12:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Natalia Pessoa Rocha, Usuária Externa**, em 22/12/2022, às 18:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Richard Gomes, Usuário Externo**, em 23/12/2022, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Vale Aguiar Campos, Professor do Magistério Superior**, em 13/01/2023, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 14/01/2023, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1944222** e o código CRC **40B40B1D**.

Á Deus que me deu todas as forças necessárias.

Agradecimentos

À minha filha, Alice, tão esperada e amada.

Agradeço especialmente à minha “mamãe querida”, Maria José, e ao meu pai, Sérgio, que são responsáveis diretos por todas as minhas conquistas. Às minhas irmãs, Bruna e Fernanda, por todo o apoio e o incentivo. Aos meus sobrinhos, Amanda, Arthur, Lorenzo e Sophia, por sempre me fazerem sorrir. Agradeço a presença amorosa, a ajuda incondicional e o incentivo da minha esposa, Lidia. Para ela, minha mais profunda gratidão por tudo que passamos e temos construído. Gratidão, ainda, aos nossos gatos, Anelize e Macário, Cersei e Arya, que nos divertem todos os dias. Também ao meu sogro, Daniel, sempre presente nos incentivando.

A todos os meus tios e tias, que contribuíram para a minha formação.

Meu obrigado aos meus pais científicos, Alessandra e Sérgio Campos, pelos conselhos, pelas orientações e pela contribuição na construção da minha carreira. Obrigado pela confiança e pela cumplicidade.

Minha eterna gratidão ao meu coorientador, Antônio Carlos, que me acolheu em seu laboratório e me guiou pela neurociência. Agradeço também por todo o apoio do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial ao Giovanni.

A Ana, Bernardo, Bruno, Divino, Fabiane, Fábio, Felipe, Gisele, Náisa, Rafaela, Renato e Virgil, pelos longos anos de amizade e cumplicidade. Um agradecimento especial à direção do CEFET-MG, pelo apoio incondicional, e a todos os meus colegas.

À banca examinadora, por se disponibilizar para a defesa da minha tese.

Ciente de que é impossível listar todos, meu muito obrigado àqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para esta tese.

“Happiness [is] only real when shared.”
(Christopher McCandless)

Resumo

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, caracterizada pela perda gradual de memória e cognição dos pacientes. Mesmo com os avanços nas pesquisas sobre essa enfermidade, ainda não existe medicamento capaz de curá-la ou preveni-la. Assim, a descoberta de um tratamento eficaz é de vital importância, e uma abordagem que pode contribuir para esse fim, reduzindo o tempo e os custos de novas descobertas, é o reposicionamento de fármacos e técnicas *in silico*. Nesse sentido, *Statistical Model Checking*, uma técnica de verificação formal, pode ajudar a analisar as interações entre proteínas e drogas e testar estratégias farmacológicas a um custo menor do que os experimentos de laboratório. Nesta pesquisa, então, desenvolvemos um modelo formal estocástico que permite testar diferentes drogas, ou combinações de drogas, que têm como alvo a via PI3K/mTOR e avaliar o efeito sobre Tau e amiloide beta, que são duas proteínas que influenciam na evolução da doença de Alzheimer. Neste trabalho analisamos o efeito da rapamicina, LY294002, e da BEZ235 nessas proteínas. Os resultados mostram que a rapamicina tem o potencial de retardar um dos processos biológicos que causam a morte neuronal; identificamos também a melhor dose de rapamicina para obter tais resultados. No entanto, as análises indicam que a LY294002 e a NVP-BEZ235 podem aumentar a fosforilação de Tau em todos os cenários testados. Tais resultados são indícios de um possível efeito colateral de candidatos a fármacos que inibem PI3K e precisam ser investigados em modelos *in vivo*. Além disso, mostramos que a rapamicina não reduziu esse efeito colateral quando administrada em conjunto com a LY294002. A metodologia proposta mostrou que a verificação formal de modelos pode ser aplicada ao estudo de biologia de sistemas, uma vez que é capaz de verificar propriedades de forma eficiente. Nosso modelo está pronto para ser usado para testar outras drogas que visam às variáveis da via e os efeitos causados por elas. Pode ser considerado uma ferramenta poderosa para traçar estratégias farmacológicas reduzindo tempo e custo no desenvolvimento de experimento gerando novos *insights*.

Palavras-chave: Statistical Model Checking. Doença de Alzheimer. PI3K/mTOR

Abstract

Alzheimer's disease is the most common form of dementia characterized by the gradual loss of memory and cognition of patients. There is no drug capable of curing or preventing the disease, being the discovery of an efficient treatment for the disease is of vital importance. An approach that can contribute to this purpose of reducing time and costs of new discoveries is drug repositioning and *in silico* techniques. Statistical Model Checking, a formal verification technique can aid in analyzing protein and drugs interactions and test pharmacological strategies, contributing for drug discovery and repurposing. In this work, we present a stochastic formal model that allows us to test different drugs, or combination of drugs, that target the PI3K/AKT/mTOR pathway and to evaluate the effect on tau protein and amyloid-beta peptide, which are two important components that contribute to the progression of Alzheimer's disease. We have analyzed the effect of rapamycin, LY294002, and NVP-BEZ235 on those proteins. Our results have shown that rapamycin has the potential to slow down one of the biological processes that causes neuronal death. Moreover, we have identified the ideal dose of rapamycin to obtain such results. However, our findings have unveiled that LY294002 and NVP-BEZ235 can increase tau phosphorylation in all scenarios tested. This is an indication of a possible side effect of drug candidates that inhibit PI3K and need to be investigated in *in vivo* models. Besides that, we have shown rapamycin has not reduced this side-effect when administered together with LY294002. The methodology proposed has been able to model both the disease and drug interactions. We have analyzed three drugs and our model is flexible to test other drugs and pharmacological strategies and efficient to analyze the properties of the model generating new insights.

Keywords: Statistical Model Checking. Alzheimer's Disease. PI3k/mTOR

Lista de Figuras

2.1	Representação simplificada do mecanismo de sinalização da via PI3K/AKT/mTOR e dos efeitos moleculares e celulares relacionados e como podem afetar a produção do peptídeo $A\beta$ e a fosforilação de Tau. Em verde temos o relacionamento quando uma proteína é ativada por outra molécula. Em vermelho temos a reação de inibição de proteína.	25
3.1	Diferenças entre modelo determinístico e estocástico.	29
3.2	Dois exemplos de simulação de um sistema Michaelis-Menten.	30
3.3	Exemplos de um autômato DTMC e de um processo CTMC.	31
4.1	Fluxograma das entradas e saídas de um verificador.	34
4.2	Árvore binária de decisão para a função booleana $(a \wedge b) \vee (c \wedge d)$	35
4.3	Exemplo de um BDD reduzido para a Árvore binária de decisão para a função booleana $(a \wedge b) \vee (c \wedge d)$	36
4.4	Representação de uma estrutura de Kripke e de seu desdobramento na árvore de computação.	38
4.5	O operador “Eventualmente”: F.	39
4.6	O operador “Globalmente”: G.	39
4.7	O operador “Próximo”: X.	39
4.8	O operador “Até”: U.	40
4.9	Representação de 4 propriedades CTL na árvore computacional.	40
4.10	Representação da engrenagem de verificação de um SMC. A partir de um modelo, um conjunto de propriedades e parâmetros de precisão, simulações são executadas para verificar se $M \models \Phi$	42
5.1	Representação da sincronização de dois autômatos, e a descrição de suas arestas.	45
5.2	Módulo de verificação do Uppaal onde as propriedades são definidas. A ferramenta ainda permite que gráficos sejam gerados a partir dos resultados da verificação das propriedades.	47
6.1	Descrição das etapas do desenvolvimento do modelo formal. Com base na definição das variáveis-chave, identificamos os valores dos parâmetros de cinética na literatura a partir de modelos já publicados.	51

6.2	Via de sinalização com as referências agrupadas. Em azul são as transições da via PI3K/mTOR modeladas por [81, 58, 97]; em vermelho os modelos que abordam os inibidores [44, 35]; e em verde os modelos que abstraem a formação de A β e fosforilação de Tau [82, 47]	53
6.3	Ilustração do modelo da via de sinalização PI3K/mTOR e da fosforilação de Tau por meio da GSK3 β	54
6.4	Modelo PTA de reação de ativação de AKT por PI3K.	57
6.5	Alguns autômatos do modelo formal.	57
6.6	Autômato que representa a administração da substância em diferentes momentos.	58
6.7	Comportamento de aPI3K, aAKT, aGSK3, amTORC1 e aS6K. O eixo x é o tempo decorrido, em horas, da simulação, e o eixo y apresenta o número de ativas de cada uma das proteínas. Os gráficos representam o comportamento médio de 100 simulações.	59
7.1	Comportamento das espécies com a administração da rapamicina no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.	66
7.2	Comportamento de aPI3K, aAKT, amTORC1, e aS6K nas diferentes dosagens da rapamicina	67
8.1	Comportamento das espécies com a administração da LY294002 no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.	72
8.2	Comportamento de aPI3K, amTORC1, e aS6K nas diferentes dosagens da LY294002. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.	73
9.1	Comportamento das espécies com a administração da BEZ235 no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.	78
9.2	Comportamento das espécies com a administração da BEZ235 no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.	79

Lista de Tabelas

5.1	Subconjunto de operações CTL implementadas no Uppaal.	48
6.1	Resumo dos modelos matemáticos utilizados como referência. Nenhum dos modelos integra a via PI3K/AKT/mTOR com a Doença de Alzheimer.	52
6.2	Lista de reações do modelo com a descrição e constante estocástica que define a <i>propensity function</i>	56
7.1	Valor médio da quantidade do peptídeo $A\beta$ após a simulação de 300h de evolução do sistema.	63
7.2	Diferentes cenários foram testados com rapamicina (RAP) o intervalo representa a probabilidade de redução $A\beta$ em 5%. Nesse caso, o valor mais alto é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	63
7.3	Diferentes cenários foram testados com rapamicina (RAP) o intervalo representa a probabilidade de aumento da fosforilação de Tau. Nesse caso, o valor mais baixo é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	64
7.4	Diferentes cenários foram testados com rapamicina (RAP) o intervalo representa a probabilidade de recuperação do comportamento S6K sem perturbação O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	64
8.1	Valor médio da quantidade do peptídeo $A\beta$ após a simulação de 300h de evolução do sistema.	69
8.2	Diferentes cenários foram testados com LY294002; o intervalo representa a probabilidade de redução $A\beta$ em 5%. Nesse caso, o valor mais alto é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	69
8.3	Diferentes cenários foram testados com LY294002; o intervalo representa a probabilidade de aumento da fosforilação de Tau. Nesse caso, o valor mais baixo é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	70
8.4	Diferentes cenários foram testados com LY294002; o intervalo representa a probabilidade de recuperação do comportamento S6K sem perturbação O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	70

9.1	Valor médio da quantidade do peptídeo $A\beta$ após a simulação de 300h de evolução do sistema.	75
9.2	Diferentes cenários foram testados com NVP-BEZ235; o intervalo representa a probabilidade de redução $A\beta$ em 5%. Nesse caso, o valor mais alto é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	75
9.3	Diferentes cenários foram testados com NVP-BEZ235; o intervalo representa a probabilidade de aumento da fosforilação de Tau. Nesse caso, o valor mais baixo é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	76
9.4	Diferentes cenários foram testados com NVP-BEZ235; o intervalo representa a probabilidade de recuperação do comportamento S6K sem perturbação O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.	76
10.1	Sumário do resultado de cada molécula nas variáveis verificadas. O cenário ideal é uma estratégia capaz de reduzir a produção de $A\beta$ e a fosforilação da Tau. Nenhum dos cenários testados em nosso modelo alcançou tal resultado. .	82

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Motivação	17
1.2	Objetivos	20
1.2.1	Objetivo geral	20
1.2.2	Objetivos específicos	20
1.3	Justificativa	20
1.4	Organização	21
2	Doença de Alzheimer	22
2.1	Fisiopatologia	22
2.2	Via PI3K/AKT/mTOR	23
2.3	Inibidores da via	26
2.3.1	Rapamicina	26
2.3.2	LY294002	26
2.3.3	NVP-BEZ235	27
3	Modelagem Computacional	28
3.1	Reações bioquímicas	28
3.2	Modelos determinísticos e estocásticos	29
3.3	Processos de Markov	30
4	Statistical Model Checking	33
4.1	Verificação de modelos	33
4.1.1	Binary Decision Diagrams	34
4.1.2	Estrutura de Kripke	37
4.1.3	Lógica Temporal	38
4.1.3.1	Fórmulas CTL	39
4.1.4	Aplicações	41
4.2	Statistical Model Checking	41
4.2.1	Verificadores SMC	42
5	Uppaal	44
5.1	Modelagem	44
5.1.1	PTA e SHA	46

5.2	Simulação	46
5.3	Verificação	47
5.3.1	Lógica Temporal	47
6	O Modelo	50
6.1	Processo de modelagem	50
6.2	Modelos de referência	51
6.3	Reações do modelo	53
6.4	Convertendo reações em autômatos	56
6.5	Modelo formal	57
6.6	Simulações	58
6.7	Propriedades WMTL verificadas	58
6.8	Cenários avaliados	60
6.9	Discussão	61
7	Rapamicina	62
7.1	Resultados	62
7.1.1	Simulando a administração da rapamicina no sistema	62
7.1.2	O efeito da rapamicina na formação de $A\beta$	63
7.1.3	O efeito da rapamicina na fosforilação de Tau	63
7.1.4	O efeito da rapamicina em S6K	64
7.2	Discussão	65
8	LY294002	68
8.1	Resultados	68
8.1.1	Simulação da administração da LY294002 no sistema	68
8.1.2	O efeito de LY294002 na formação de $A\beta$	69
8.1.3	O efeito de LY294002 na fosforilação de Tau	69
8.1.4	O efeito de LY294002 em S6K e no feedback negativo da via	70
8.2	Discussão	71
9	NVP-BEZ235	74
9.1	Resultados	74
9.1.1	Simulando a administração da BEZ no sistema	74
9.1.2	O efeito de BEZ235 na formação de $A\beta$	75
9.1.3	O efeito BEZ235 na fosforilação de Tau	75
9.1.4	O efeito de BEZ235 em S6K e no feedback negativo da via	76
9.2	Discussão	76
10	Conclusão	80
10.1	Discussão	80

10.2	Considerações finais	82
10.3	Trabalhos futuros	83
	Referências	84
Apêndice A	Conjunto de autômatos que representam a via PI3K/mTOR	95
Apêndice B	Conjunto de autômatos que representam a formação do peptídeo amiloide beta e fosforilação de Tau	96
Apêndice C	Conjunto de autômatos que representam o processo de associação, desassociação, e degradação da rapamicina	97
Apêndice D	Autômatos de inserção da rapamicina no tempo 100 horas e de uso contínuo durante uma semana	98
Apêndice E	Conjunto de autômatos que representam o processo de associação, desassociação, e degradação da LY294002	99
Apêndice F	Autômatos de inserção da LY294002 no tempo 100 horas e de uso contínuo durante uma semana	100
Apêndice G	Conjunto de autômatos que representam o processo de associação, desassociação, e degradação da BEZ235	101
Apêndice H	Autômatos de inserção da BEZ235 no tempo 100 horas e de uso contínuo durante uma semana	102

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação

Demência é o nome atribuído às síndromes que afetam a memória, o pensamento e as emoções. Ela é uma das maiores causas de dependência entre a população mais idosa, e o número de pessoas acometidas vem crescendo ao longo dos anos, haja vista o aumento da expectativa de vida da população. Em 2017, eram 50 milhões de pessoas com demência no mundo, número que quase dobra a cada 20 anos, havendo estimativa de 75 milhões de pessoas em 2030 e de 131 milhões em 2050. Além disso, a demência tem impacto econômico para as pessoas que necessitam de cuidados. Em 2018, o gasto com tais cuidados extrapolou o valor de U\$ 1 trilhão, e, em 2050, espera-se que seja de U\$ 3 trilhões em todo o mundo [102].

Das doenças que provocam a demência, a doença de Alzheimer (DA) é a mais comum, sendo responsável por 50% a 75% de todos os casos [51]. Trata-se de uma doença neurodegenerativa progressiva associada à perda de memória, à alteração de comportamento e cognição [29]. Os pacientes com Alzheimer também costumam desenvolver quadro de apatia, depressão, distúrbio alimentar e do sono, agressividade e outras alterações comportamentais [87].

Isso posto, a morte de neurônios na DA é uma consequência de uma série de processos, incluindo o acúmulo de placas do peptídeo amiloide beta ($A\beta$) no cérebro, a desestabilização do citoesqueleto neuronal com a formação de emaranhados neurofibrilares, alterações metabólicas e inflamação no sistema nervoso central [72].

O déficit na formação de memória é o quadro clínico tradicional para a identificação da DA. Entretanto, quando o paciente apresenta esse quadro clínico, a DA já se encontra em estágio avançado. Sabe-se que a DA inicia décadas antes de o quadro de demência ser diagnosticado. Em um grupo de pessoas de 85 anos, os danos cerebrais iniciaram aos 55 e 65 anos. Nos grupos de pessoas com 65 anos, a patologia iniciou entre 35 e 45 anos do paciente [52].

Atualmente, os biomarcadores para a detecção da doença de Alzheimer são obtidos

através do líquido cérebro espinhal e constatam o aumento das concentrações das proteínas Tau e Tau fosforilada, além de uma redução na concentração do peptídeo $A\beta$ de cadeia de 42 aminoácidos. Há outros biomarcadores sendo avaliados que são extraídos de maneira menos invasiva, como do plasma sanguíneo, mas ainda não são confiáveis [77].

Os primeiros medicamentos aprovados para o tratamento da doença foram 3 inibidores colinesterase (donepezila, rivastigmina e galantamina) e a memantina, que foi o último fármaco aprovado para a DA em 2003. Os tratamentos com estes fármacos atuam para suavizar os sintomas da doença melhorando aspectos cognitivos e não são capazes de regredir o processo de neurodegeneração. Além disso, eles se tornam pouco eficientes nas fases mais tardias da doença – apenas a donepezila e a memantina são aprovadas para usos nos quadros severos da doença [33].

Considerando este cenário e o crescente número de pacientes acometidos com DA, em junho de 2021, a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos do governo norte-americano, a FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) aprovou o aducanumabe para a DA utilizando o mecanismo de Aprovação Acelerada. Esse mecanismo possibilita que um medicamento para uma doença grave seja aprovado desde que ele possa propiciar benefícios significativos para os pacientes. A aprovação ocorre mesmo que ainda exista um grau de incerteza sobre os resultados dos testes clínicos [36].

Diferentemente dos medicamentos já aprovados, o aducanumabe atua diretamente na fisiopatologia da DA e não apenas na redução do efeito colateral. Ele é um anticorpo que se liga nas placas e nos oligômeros solúveis de $A\beta$ [86], e a FDA determinou que há evidências que a substância reduz as placas amiloides no cérebro capaz de trazer benefícios para os pacientes. Por ser uma aprovação acelerada, a Biogen, que é responsável pela produção da aducanumabe, deverá continuar os ensaios clínicos para averiguar os reais benefícios podendo ter aprovação cassada se o resultado não for satisfatório [36].

Apesar das controvérsias a respeito da aprovação acelerada da aducanumabe, este recurso trará novas possibilidades de tratamento para DA, uma doença cujo número de pessoas acometidas, a cada ano que passa, só cresce devido ao envelhecimento da população. Estima-se que as doenças neurodegenerativas se tornarão a segunda maior causa de mortalidade no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares [37].

Uma estratégia para buscar novos tratamentos contra a doença de Alzheimer é o reposicionamento de fármacos, ou seja, uma tentativa de uma substância já conhecida e testada para certa doença ser utilizada em nova aplicação terapêutica. Algumas vantagens dessa abordagem são a redução do investimento e do tempo necessários para testes e o fato de a farmacocinética já ser conhecida [37, 74]. Nesse sentido, os candidatos a fármaco anticâncer têm se mostrado uma alternativa para aplicação terapêutica na doença de Alzheimer. Estudos indicam que existem vias compartilhadas por essas doenças, por exemplo a PI3K/AKT/mTOR que é responsável pela disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e metabolismo celular [37].

Uma ferramenta que pode auxiliar nessa busca de tratamento para a doença e sua compreensão é a modelagem computacional das interações envolvidas. Os modelos têm como objetivo descrever e entender como os componentes biológicos interagem ao longo do tempo [1, 16, 49]. Eles são abstrações virtuais e imperfeitas que reproduzem as principais características necessárias para a compreensão dos sistemas. Assim, um modelo precisa ser simples e, ao mesmo tempo, detalhado o suficiente para que seu comportamento possa ser explorado [103].

Associados a métodos estatísticos e ferramentas computacionais, os modelos possibilitam que os pesquisadores explorem o sistema, assim como físicos e químicos fazem com as estruturas moleculares. Com esse ferramental, pode-se, por exemplo, aumentar a concentração de um ligante ou até mesmo removê-lo e avaliar os efeitos no sistema. O aumento da concentração de uma espécie molecular pode ser útil para verificar a toxicidade de uma substância, por exemplo. Para a indústria farmacêutica, a utilização dessas técnicas auxilia na descoberta de novos compostos, permitindo identificar mecanismos de feedback e prevenir efeitos colaterais [16, 103, 55, 95].

A técnica de *Statistical Model Checking* (SMC) é uma abordagem que pode ser utilizada para a análise de modelos biológicos computacionais. Ela é uma técnica formal de verificação e análise de sistemas complexos que mescla simulações controladas com verificação de modelos [105]. A verificação de modelos analisa todas as combinações possíveis de entradas do modelo e executa uma busca exaustiva e automática no espaço de estados [27]. Um dos grandes desafios dessa abordagem é lidar com o crescimento exponencial do número de estados quando o número de variáveis aumenta. Nesse sentido, o SMC é uma maneira de contornar essa limitação, associando simulações, estatística e *Model Checking* [56].

A adoção do SMC em modelos estocásticos, como os sistemas biológicos, oferece vantagens em comparação com outras abordagens computacionais, tais como a simulação. Isso porque o SMC permite explorar comportamentos raros do sistema por meio da lógica temporal e observar comportamentos raros de forma mais aprofundada.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Testar a hipótese de que a técnica SMC pode ser utilizada para analisar o potencial efeito farmacológico na inibição da via PI3K/AKT/mTOR para o tratamento da doença de Alzheimer.

1.2.2 Objetivos específicos

- Construir um modelo formal da via PI3K/AKT/mTOR/Tau/A β .
- Utilizar o Uppaal para a verificação das propriedades do modelo.
- Avaliar o efeito de diferentes doses da rapamicina sobre a fosforilação de Tau e a formação do peptídeo A β .
- Avaliar o efeito de diferentes doses da LY294002 sobre a fosforilação de Tau e a formação do peptídeo A β .
- Avaliar o efeito de diferentes doses da NVP-BEZ235 sobre a fosforilação de Tau e a formação do peptídeo A β .

1.3 Justificativa

Com a adoção da abordagem computacional proposta, esperamos obter hipóteses que possam ser úteis no desenvolvimento de estratégias farmacológicas para a doença de Alzheimer. Ao disponibilizarmos para a comunidade um modelo novo que relaciona a via com as variáveis-chave da doença, esperamos contribuir para o avanço na pesquisa farmacológica, a qual demanda grande atenção.

1.4 Organização

Esta tese está organizada da seguinte forma: o Capítulo 2 apresenta a doença de Alzheimer e os processos bioquímicos envolvidos nessa enfermidade. É mostrado um modelo que descreve algumas reações que desencadeiam a doença, além de como um candidato a fármaco age no sistema a fim de reduzir os efeitos da doença. No Capítulo 3 são abordados os conceitos de modelagem computacional de sistemas determinísticos e estocásticos.

O Capítulo 4 introduz os conceitos de *Model Checking* e da lógica temporal. Apresentam-se a explosão de estados como um gargalo da técnica e as abordagens que surgiram para minimizar esse problema. O SMC é uma dessas abordagens, o qual mescla simulação com MC.

O Capítulo 5 descreve o Uppaal, software que utiliza o SMC no processo de verificação de propriedades. A ferramenta possui três módulos principais: a modelagem do sistema, a simulação e a verificação. Descrevem-se os formalismos dos modelos e a lógica temporal implementada na ferramenta. Nesse capítulo também se explica uma maneira de mapear um sistema biológico para um modelo no Uppaal.

O Capítulo 6 descreve o processo de desenvolvimento do modelo formal da via PI3K/AKT/mTOR. Apresentam-se também as análises prévias para a calibração do modelo, assim como são descritas as propriedades do modelo que serão verificadas. Nos capítulos 7, 8, e 9 apresentam-se as nossas análises e a discussão da aplicabilidade de rapamicina, LY294002 e BEZ235, respectivamente, na doença de Alzheimer. Por fim, o último capítulo contém as considerações finais desta pesquisa.

Capítulo 2

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa e é responsável pela maioria dos casos de demência no mundo. Infelizmente, ainda não há um tratamento que interrompa a progressão ou previna seu desenvolvimento, nem mesmo de diagnóstico precoce. Neste capítulo são descritos alguns dos mecanismos que a caracterizam, tratamentos e vias de sinalização relacionadas à doença.

2.1 Fisiopatologia

Existem diferentes fatores de risco que podem desencadear a doença de Alzheimer, como baixo nível de escolaridade, estilo de vida e histórico familiar. Apesar de se conhecerem alguns fatores genéticos, tais como mutação na proteína amiloide precursora (APP), na presenilina 1, na presenilina 2 e na alipoproteína E4, eles correspondem a apenas 5% dos casos da doença [17].

A principal hipótese para a doença de Alzheimer são a formação e o acúmulo de placas amiloides. Essas placas resultam de um desequilíbrio entre a produção do peptídeo $A\beta$ e sua degradação. Uma das razões conhecidas para esse desequilíbrio é a ativação da via amiloidogênica, na qual a APP é clivada por duas enzimas, beta e gama secretases, gerando $A\beta$ [22, 92]. Esse peptídeo possui diferentes protoformas, sendo as cadeias com 40 resíduos de aminoácidos, $A\beta_{1-40}$, e a de 42 resíduos de aminoácidos, $A\beta_{1-42}$, mais predominantes na doença de Alzheimer. Apesar de a protoforma $A\beta_{1-40}$ ser mais abundante, o peptídeo $A\beta_{1-42}$ possui maior neurotoxicidade e capacidade de se agregar [85, 53].

De acordo com a hipótese amiloide, formas menores de $A\beta$ (monômeros e dímeros) também podem transpor a membrana neuronal e induzir a hiperfosforilação anormal da proteína Tau – uma proteína envolvida na estabilização do citoesqueleto do neurônio. A Tau hiperfosforilada resulta no acúmulo de emaranhados neurofibrilares Tau (do inglês, *neurofibrillary tangles* – NFT) no neurônio, além de levar à desestabilização do citoesque-

leto do neurônio, seguida por degeneração do axônio e do dendrito, morte celular e perda de função [89]. O disfuncionamento das placas amiloides em degradação e o processo NFT também contribuem para manter ou aumentar a morte e a perda neuronal, resultando em declínio cognitivo [72].

A inflamação, que é responsável pela reação de defesa do organismo contra diferentes agentes nocivos, é outro fator presente na DA. Apesar de esse processo poder originar-se a partir de processos inerentes ao organismo como o próprio envelhecimento, na DA ele é acentuado [4].

A inflamação no sistema nervoso central é mediada pelas células das micróglia e dos astrócitos que podem ser ativadas pelos agregados ou por proteínas modificadas. As micróglia são recrutadas para a região lesada onde podem proliferar e liberar citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, tais como as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-12, fator de necrose tumoral alfa e interferon gamma. Esses mediadores pró-inflamatórios aumentam a produção da APP e o processamento amiloidogênico para formar mais peptídeos A β . Estes, por sua vez, fazem com que mais citocinas pró-inflamatórias sejam liberadas. Essa perturbação provoca uma neuroinflamação crônica, o que resulta na morte de neurônios, ativando, conseqüentemente, novas células microgliais. Assim, surge um círculo vicioso que aumenta a neurodegeneração e implica a progressão da doença de Alzheimer [32, 34].

Sendo assim, uma função que pode auxiliar na redução das placas amiloides e dos NFT é a autofagia, que é um processo de degradação intracelular em que a célula auto digere seus próprios componentes. A autofagia tem um papel importante na manutenção da homeostase, no equilíbrio energético e na integridade funcional, eliminando espécies disfuncionais como agregados de proteínas tóxicas e organelas celulares danificadas, protegendo os neurônios da morte [63].

A autofagia é estimulada por diferentes fatores, sendo o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) um dos principais componentes reguladores que inibem a biogênese autofágica [64]. Trabalhos em modelos animais transgênicos da doença de Alzheimer têm apresentado bons resultados na melhora cognitiva quando se utilizam inibidores de mTOR [8, 84].

2.2 Via PI3K/AKT/mTOR

As fosfatidilinositol-3 quinases (PI3K) são uma família de enzimas que fosforilam os lipídios fosfatidilinositol. Essas enzimas são agrupadas em três classes, que são determinadas pela estrutura e pela função desempenhada por cada uma delas [96].

A classe I é subdividida em grupo IA (p110 α , p110 β , p110 γ), que são enzimas

ativadas por receptores de tirosina quinase e que possuem a subunidade regulatória p85 e a subunidade catalítica p110. Essas estruturas são responsáveis por fosforilar o fosfatidilinositol-bi-fosfato e produzir o fosfatidilinositol-tri-fosfato. Essa ação leva ao recrutamento e à ativação de outras proteínas que atuam na cascata de sinalização, em particular a proteína quinase B (AKT), que é fosforilada no aminoácido treonina no sítio 308 (T308) [96, 50, 70].

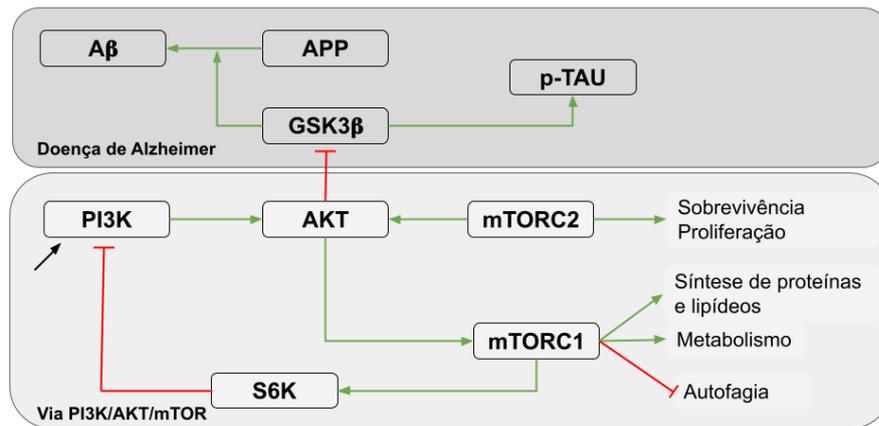
A total ativação de AKT depende também da fosforilação na serina 473 (S473) por mTORC2. Essa ativação de AKT desencadeia uma série de sinalizações, como a inibição glicogênio-sintase-quinase 3 (GSK3 β) e a ativação da mTORC1 [101].

O mTORC1 e o mTORC2 são dois complexos de proteínas que possuem como componente central a serina/treonina quinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Tais complexos variam em composição e função fisiológica. mTORC1 é formado por mTOR, Raptor (*Regulatory-associated protein of mtor*), Deptor (*Domain-containing mTOR-interacting protein*), Pras40 (*Proline-rich Akt substrate of 40 kDa*), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*) e possui como funções principais a regulação da síntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos e a inibição da autofagia. Um dos substratos de mTORC1 é a proteína ribossômica S6 quinase beta-1 (S6K), que, além de atuar na síntese proteica, inibe a fosforilação do substrato de receptor de insulina [84, 99]. Já mTORC2 compreende mTOR, Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mLST8, mSIN1 (*Mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein*), Deptor, Protor 1/2 e é responsável pela fosforilação de quinases como a AKT [84].

A Figura 2.1 apresenta essa cascata de sinalização da via e algumas das funções biológicas que ela desencadeia, tais como autofagia, síntese de proteínas, sobrevivência e proliferação celular. Essas respostas fisiológicas da via podem impactar a doença de Alzheimer de variadas formas. A inibição de GSK3 β pela AKT pode provocar uma redução na fosforilação Tau e, conseqüentemente, a formação dos emaranhados. Além disso, a redução das atividades de GSK3 β possibilita uma desaceleração na formação das placas amiloides, pois essa quinase interfere na clivagem da APP, que forma o peptídeo A β [68, 62]. Porém, uma superativação de mTORC1 inibe o processo de autofagia, possibilitando a progressão da doença e a neuroinflamação provocada pelos emaranhados e as placas amiloides [41, 48].

Há indícios de que a doença de Alzheimer pode contribuir para um desequilíbrio dessa via de sinalização. Animais transgênicos, 3xTg-AD, apresentaram um aumento na atividade e na sinalização de mTOR. Supõe-se que a hiperativação de mTOR pode ser causada pelo peptídeo A β , já que, com a redução da produção do peptídeo, é observada uma redução em mTOR. Esses estudos propõem que A β estimule a hiperativação de mTOR que pode contribuir com as deficiências cognitivas iniciais da doença de Alzheimer. Considerando que a atividade basal de mTOR é necessária para o aprendizado e para a memória, e considerando que a hiperativação da sinalização da via mTOR induz para um

Figura 2.1: Representação simplificada do mecanismo de sinalização da via PI3K/AKT/mTOR e dos efeitos moleculares e celulares relacionados e como podem afetar a produção do peptídeo A β e a fosforilação de Tau. Em verde temos o relacionamento quando uma proteína é ativada por outra molécula. Em vermelho temos a reação de inibição de proteína.



Fonte: Elaborado pelo autor.

déficit cognitivo, sugerem-se que há uma “janela” ótima da ativação de mTOR para atuar no aprendizado e na memória [10].

Além disso, existem modelos animais que mostram que a inibição de mTOR tem efeito neuroprotetor na doença de Alzheimer, como a degradação das placas amiloides pela indução da autofagia [93]. No entanto, essa ativação da autofagia deve ocorrer nos estágios iniciais da doença onde o processo de degradação ainda é efetivo e as placas agregadas ainda não estão tão grandes e estáveis [10].

Dessa forma, considerando a contribuição da via PI3K/AKT/mTOR na neurodegeneração e também por ser uma das responsáveis pelo metabolismo celular – que é um dos fatores da Doença de Alzheimer –, torna-se relevante uma maior compreensão dos seus mecanismos, assim como avaliar possíveis fármacos que atuam nessa via para tratar as patologias da Doença de Alzheimer, por exemplo, a rapamicina, LY294002, e a NVP-BEZ235.

2.3 Inibidores da via

2.3.1 Rapamicina

A rapamicina (Siromilus) é um composto descoberto nos anos de 1960 como um antifúngico extraído da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Notou-se que o composto era capaz de inibir a proliferação da levedura *Candida albicans* e não afetava o crescimento da bactéria. A rapamicina foi adotada como terapia padrão para prevenir a rejeição de órgãos transplantados e no tratamento de doenças autoimunes. Além dessas aplicações, a rapamicina e seus análogos também estão sendo estudados extensivamente como agentes anticancerígenos por atuarem na antiproliferação de células tumorais, entre outras doenças [10, 80, 61].

O principal papel da rapamicina no organismo é em relação à inibição de mTOR. Por se tratar de uma via responsável por vários processos-chave para o organismo e pela presença de um feedback negativo, a utilização da rapamicina torna-se complexa [54].

A mídia tradicional tem divulgado a rapamicina como o fármaco que retarda o envelhecimento. Alguns estudos em modelos animais mostram que a administração do composto tem um efeito protetor da neurodegeneração e pode induzir a melhora no aprendizado [65, 90]. Apesar de o fármaco ter esse potencial, há um teste clínico registrado para a DA.

2.3.2 LY294002

Inibidores da PI3K ou da AKT também podem contribuir com a inibição de mTORC1 considerando que elas atuam em variáveis que modulam a atividade de mTORC1. A LY294002 é uma substância inibidora ATP competitiva de PI3K e de mTOR [42]. A substância também é considerada tóxica, mas, apesar desses fatores, ela é amplamente utilizada para os estudos da via PI3K/AKT/mTOR [44].

2.3.3 NVP-BEZ235

A inibição de mTOR pode provocar uma ativação da PI3K e AKT por meio do *feedback* negativo existente na via. A abordagem para atingir múltiplos alvos da via é uma alternativa. Nessa perspectiva, a NVP-BEZ235 (BEZ; dactolisib) é um candidato a fármaco oral sintética da classe Imidazoquinoline que inibe PI3K e mTOR1/2 sendo testada em diferentes tipos de tumores de mama, endométrio, pâncreas e renal [44, 21, 88, 66, 69]. A substância se liga ao sítio para ATP nas quinases, sendo uma potente substância capaz de inibir seus alvos com uma concentração nanomolar [71].

[5] utilizaram a NVP-BEZ235 no tratamento de camundongos submetidos a injeção de $A\beta_{1-42}$ humano no hipocampo. A substância foi administrada uma vez ao dia durante 7 dias, e os resultados obtidos foram de uma prevenção no desenvolvimento dos déficits cognitivos induzidos pelo peptídeo. Essa melhora cognitiva também foi obtida em experimentos com camundongos com uma mutação da APP tratados com o candidato a fármaco [6]. Portanto, BEZ235 é uma substância com potencial a ser utilizada para o tratamento da doença de Alzheimer, de modo que essa ação deve ser ainda mais investigada.

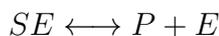
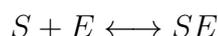
Capítulo 3

Modelagem Computacional

Neste capítulo, apresentamos de que forma as vias de sinalização biológicas são modeladas computacionalmente e podem ser classificadas como determinísticas ou estocásticas. Além disso, apresentamos os conceitos de cadeia de Markov, que é uma forma de representar modelos estocásticos.

3.1 Reações bioquímicas

Uma via de sinalização é um conjunto de reações entre as moléculas que produz um determinado resultado, ou uma alteração na célula, iniciado por um estímulo. Essas reações podem ser descritas por formalismos que descrevem as transformações de uma quantidade de moléculas, os reagentes, em outra molécula, os produtos. Um exemplo de reação conhecida é a Michaelis-Menten que é expressa por:



onde E é uma enzima que catalisa a produção de P a partir do substrato S . A seta bidirecional da primeira reação representa que ela é reversível, ou seja, ocorre nas duas direções. É possível definir que a “velocidade”, ou taxa de reação, é diretamente proporcional à concentração de cada reagente elevado ao seu coeficiente estequiométrico. Essa taxa é conhecida como a lei de ação das massas que explica o comportamento das soluções em equilíbrio dinâmico. Por exemplo, para produzir SE , a velocidade é proporcional a $[S][E]$. Isso é o mesmo que dizer que S e E são consumidos a uma taxa $k_f[S][E]$. Dessa forma, podemos representar as reações considerando essas taxas conforme ilustrado nas reações:



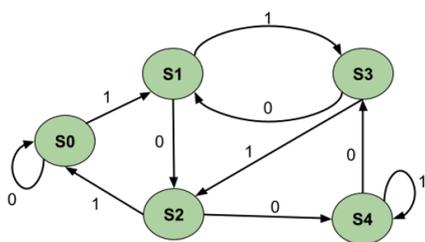


3.2 Modelos determinísticos e estocásticos

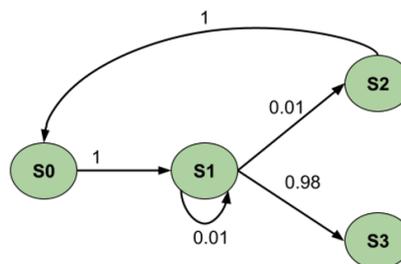
O conjunto das reações que descrevem as vias de sinalização do modelo biológico pode ser formalizado matematicamente considerando dois aspectos de comportamento: o determinístico ou estocástico, ilustrado nas figuras 3.1a e 3.1b, respectivamente. Um modelo determinístico sempre produz o mesmo resultado dada uma condição de entrada. Comportamentos determinísticos podem ser descritos, por exemplo, usando equações diferenciais ordinárias, que podem ser resolvidas por meio de abordagens de análise numérica, como o algoritmo Simplex e o método de Newton-Raphson.

Figura 3.1: Diferenças entre modelo determinístico e estocástico.

(a) Exemplo de um comportamento determinístico. Dada uma sequência de carácter, um autômato determinístico executa as transições. O resultado sempre será o mesmo para a mesma sequência de entrada.



(b) Exemplo de um comportamento estocástico. A transição de um estado para o outro é definida por uma distribuição probabilística.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As reações bioquímicas modeladas utilizando equações diferenciais ordinárias (EDO) descrevem como as concentrações das moléculas evoluem ao longo do tempo. Considerando as reações 3.1, 3.2 e 3.3, cada uma das variáveis é definida como a diferença da velocidade com que ela é produzida e consumida. Por exemplo, a variação da molécula S ao longo do tempo é dada pela sua produção, a reação 3.2, e o seu consumo, reação 3.1. Dessa forma, considerando as reações 3.1, 3.2 e 3.3, temos o conjunto de equações diferenciais ordinárias listadas abaixo.

$$\frac{dS}{dt} = k_b[SE] - k_f[S][E]$$

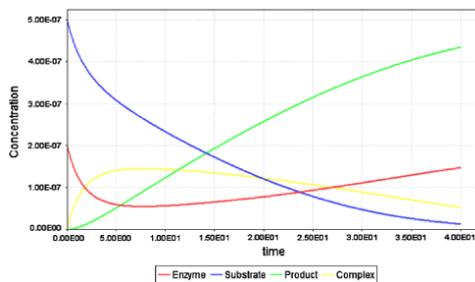
$$\begin{aligned}\frac{dE}{dt} &= (k_b + k_p)[SE] - k_f[S][E] \\ \frac{dSE}{dt} &= k_f[S][E] - (k_b + k_p)[SE] \\ \frac{dP}{dt} &= k_p[SE]\end{aligned}$$

Por outro lado, o comportamento do modelo pode ser estocástico, que é definido por um conjunto de variáveis aleatórias, e o próximo estado não é mais definido apenas pelo estado atual, mas sim por uma distribuição probabilística para os próximos estados conhecida como *propensity function*. Esta função probabilística descrevem as reações e podem ser expressas também pela lei da ação das massas. Assim, as funções para a produção do complexo SE são dadas por $c_f[S][E]$, onde c_f é a constante estocástica e $[S]$ e $[E]$ são as quantidades das espécies S e E , respectivamente.

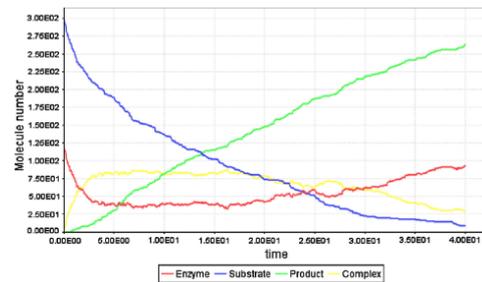
Os modelos determinísticos e estocásticos podem ter o mesmo comportamento aproximado. As figuras 3.2a e 3.2b mostram a simulação de um modelo determinístico e estocástico, respectivamente. Nota-se que as curvas possuem a mesma característica. Contudo, os sistemas biológicos não são determinísticos, assim, uma abstração estocástica aproxima-se mais do que ocorre.

Figura 3.2: Dois exemplos de simulação de um sistema Michaelis-Menten.

(a) Solução numérica baseada em ODE. Nota-se que as curvas são contínuas.



(b) Solução estocástica. Percebe-se nas curvas a característica discreta da alteração dos valores das variáveis.



Fonte: [106].

3.3 Processos de Markov

As cadeias de Markov são particularmente úteis por apresentarem a propriedade de Markov, segundo a qual o próximo estado depende apenas do estado atual. No âmbito computacional, essa propriedade torna desnecessário o armazenamento de todos os estados

anteriores, ou o histórico do sistema, para definir a escolha do próximo estado. As cadeias de Markov podem ser de tempo discreto — *Discrete Time Markov Chain* (DTMC) —, ou como uma cadeia de Markov de tempo contínuo — *Continuous Time Markov Chain* (CTMC) [2].

Um modelo DTMC é caracterizado pela existência de estados finitos, e as transições possuem pesos com valores probabilísticos que ocorrem em um tempo discreto. A transição é escolhida aleatoriamente, com base na sua probabilidade de ocorrência. Por exemplo, na Figura 3.3a, quando o sistema estiver no estado S1, as transições para os estados S2, S3 e S4 podem acontecer com uma probabilidade de 30%, 30% e 40%, respectivamente. A definição de DTMC é dada por:

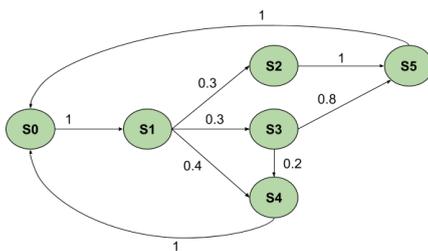
Definição 1. DTMC D é uma tupla (S, s, M, L) onde S é um conjunto finito de estados, s é o estado inicial, $M : S \times S \rightarrow [0, 1]$ é a probabilidade da transição, e $L : S \rightarrow 2^{AP}$ é a função de marcação associada aos estados com as respectivas funções atômicas AP [2].

Cada elemento $M(s, s')$ da matriz probabilística de transição dá a probabilidade da ocorrência da transição do estado s para o estado s' . A soma das probabilidades das transições a partir do estado s tem que ser igual a 1. Estados terminais, aqueles que não se deslocam para outro estado, são modelados com uma auto transição com a probabilidade igual a 1. Considerando o exemplo da Figura 3.3a, ele pode ser representado pela matriz probabilística de transição:

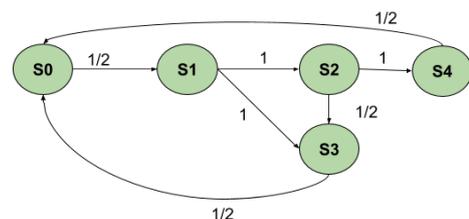
$$M = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0.3 & 0.3 & 0.4 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0.2 & 0.8 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Figura 3.3: Exemplos de um autômato DTMC e de um processo CTMC.

(a) Autômato DTMC. Nesse modelo, as transições ocorrem a uma probabilidade em um tempo discreto.



(b) Processo CTMC. Nesse modelo, as transições são dadas por uma taxa exponencial e podem ocorrer em qualquer momento do tempo.



Quando a visão discreta do tempo não é suficiente para a modelagem, a CTMC permite que o modelo tenha mais expressividade. As transições nesse tipo de modelo não são disparadas probabilisticamente; elas possuem uma taxa de atraso entre as ocorrências das transições, definidas por uma distribuição exponencial. Além disso, os eventos de mudança de estado podem ocorrer em qualquer momento do tempo [20]. A Figura 3.3b é um exemplo de modelo CTMC onde a transição do estado $S0$ para $S1$ ocorre em uma taxa de atraso de $\frac{1}{2}$, enquanto as transições de $S1$ para $S2$ e para $S3$ ocorrem em uma taxa de atraso de 1.

Definição 2. CTMC C é uma tupla (S, s, R, L) onde S é um conjunto finito de estados, s é o estado inicial, $R : S \times S \rightarrow [0, \infty)$ é a matriz de taxas, e $L : S \rightarrow 2^{AP}$ é a função de marcação associada aos estados com as respectivas funções atômicas AP [40].

A probabilidade de uma transição ocorrer entre o estado s e o estado s' ocorrer em t unidade de tempo é $1 - e^{-R(s,s') \cdot t}$. O tempo decorrido no estado s , antes de a transição ocorrer, é uma distribuição exponencial com a taxa de saída dada por $E(s) = \sum_{s' \in S} R(s, s')$. A probabilidade de a transição do estado s para o s' ocorrer é dada por $P(s, s') = \frac{R(s,s')}{E(s)}$ [79]. A probabilidade de a transição do estado s para o s ocorrer em t unidades de tempo é definida por [26]:

$$P(s, s', t) = \frac{R(s, s')}{E(s)} \times (1 - e^{-R(s,s') \cdot t})$$

No modelo CTMC pode ocorrer que, em determinado tempo, um estado S tenha mais de uma opção de transição para escolher o próximo caso, o que é conhecido como condição de corrida. Nessas circunstâncias, a transição é escolhida por meio de uma função probabilística [104, 60].

Um caminho de um modelo CTMC iniciado no estado s_0 é uma sequência infinita $\pi = s_0 t_0 s_1 t_1 \dots$ onde $s_i \in S, t_i \in R_{\geq 0}$ é o tempo decorrido no estado s_i e $R(s_i, s_{i+1}) > 0$ para todos $i \geq 0$.

Capítulo 4

Statistical Model Checking

Model Checking, ou verificação de modelos, é uma técnica automática para a verificação exaustiva de sistemas. Um dos grandes desafios da área é lidar com o número de estados, que cresce exponencialmente com o número de variáveis existentes nos sistemas complexos e dinâmicos, impedindo eficientemente a verificação das propriedades.

Neste capítulo são descritos os conceitos básicos de verificação de modelos e da lógica temporal, além de ser apresentada uma introdução sobre o *Statistical Model Checking* (SMC), uma abordagem que lida com o problema de explosão de estados.

4.1 Verificação de modelos

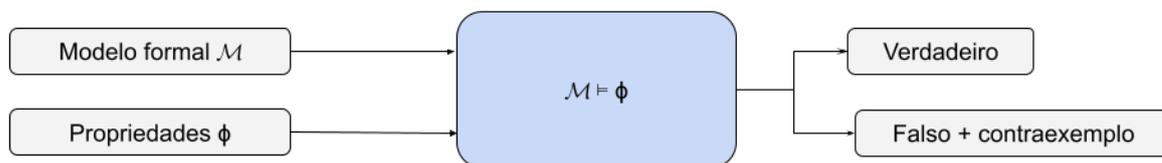
Esta técnica foi proposta independente e simultaneamente por Edmund M. Clarke e Ernest A. Emerson [38, 25, 23] e por Jean P. Queille e Joseph Sifakis [83]. Em 2007, Clarke, Emerson e Sifakis compartilharam o Prêmio Turing por sua contribuição na fundação do campo de verificação de modelos.

A verificação de modelos consiste na técnica de modelar os sistemas em máquinas de estados finitos, os quais são descritos em linguagem de alto nível, e definir propriedades que serão verificadas por uma especificação em lógica temporal. Essas propriedades são verificadas através de uma busca exaustiva do estado de espaço automaticamente. Isso permite a detecção de até mesmo pequenos erros que podem passar despercebidos por outras técnicas como simulação e testes. Finalmente, se o modelo não respeita alguma propriedade dada, o verificador de modelos geralmente produz um contraexemplo, que é útil para entender e corrigir o erro. Esse contraexemplo apresenta o caminho e os valores atribuídos às variáveis que tornam a propriedade falsa, o que permite identificar e entender erros existentes no sistema para correção.

As propriedades são especificadas frequentemente utilizando-se tipos especiais de lógica, como a *Computation Tree Logic* (CTL). A especificação geralmente contém requisitos de segurança, como a ausência de *deadlocks* e de estados críticos que possam causar a

falha do sistema. A Figura 4.1 apresenta a visão geral dessa técnica, em que há o modelo M e as propriedades Φ como entrada do software verificador.

Figura 4.1: Fluxograma das entradas e saídas de um verificador.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No entanto, a técnica possui algumas limitações. Essa exploração exaustiva do espaço de estados causa o problema clássico de verificação do modelo da explosão do espaço de estados. O número de estados cresce exponencialmente com o número de variáveis, o que torna inviável a aplicação da técnica em grandes sistemas. Por exemplo, em um modelo de N variáveis de tamanho k cada, há k^N estados [56]. A busca por técnicas que reduzem o espaço de estados é um campo ativo da área. A primeira, e uma das contribuições mais importantes, foi feita em [73], que propôs o uso de *Binary Decision Diagrams* (BDDs), originalmente criados por [13], para representar, simbolicamente, as relações de transição entre os estados.

Essa representação codifica cada estado como a atribuição de valores booleanos às variáveis do sistema. Assim, as transições podem ser expressas como fórmulas booleanas em termos de dois conjuntos de variáveis, um conjunto que codifica o estado anterior e outro conjunto que codifica o estado atual. Isso possibilita uma descrição mais compacta do modelo, aumentando o tamanho da representatividade dos modelos de 10^5 para 10^{20} estados [104].

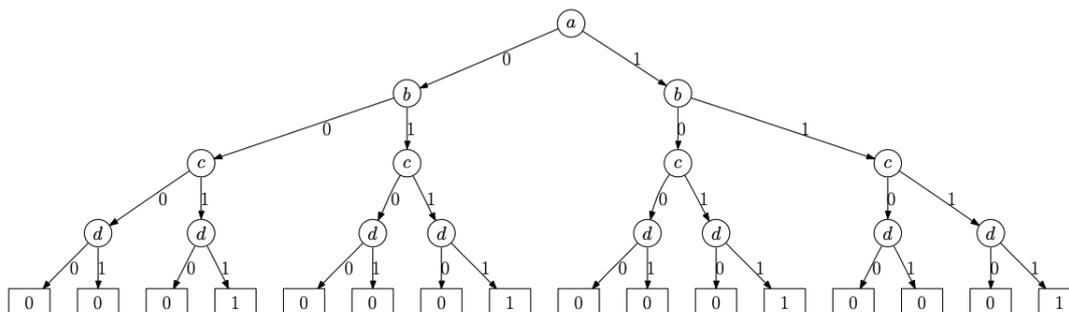
Outras pesquisas se seguiram objetivando lidar com a explosão dos estados, a saber: *Partial Order Reduction* [43], que explora as transições concorrentes que resultam no mesmo estado; *Symmetry Reduction* [28], que reduz a presença de estados replicados em um modelo; e *Compositional Reasoning* [7], que divide o modelo em subsistemas mais simples para verificá-los. [105] apresentou um modelo híbrido de verificação, o qual mescla simulação com verificação, chamado *Statistical or Approximate Model Checking* (SMC).

4.1.1 Binary Decision Diagrams

Uma estrutura de dados chamada *Binary Decision Diagram* (BDD) é usada para representar funções booleanas de uma forma compacta, eficiente e canônica, conforme descrito pela primeira vez em [13]. Um BDD é compacto porque descarta informações

redundantes; eficiente porque permite percorrer um grafo rapidamente; e canônico porque é fácil verificar se duas funções booleanas são equivalentes. Essa estrutura de dados é frequentemente usada na verificação de modelo simbólico para representar sistemas de estados finitos, embora existam outras representações.

Figura 4.2: Árvore binária de decisão para a função booleana $(a \wedge b) \vee (c \wedge d)$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

BDDs representam funções booleanas como um tipo especial de árvores binárias de decisão, que é uma árvore direcionada com dois tipos de vértices: vértices terminais e não terminais (abreviados como terminais e não terminais, respectivamente). Em uma árvore binária de decisão, um vértice não terminal v é rotulado com uma variável booleana, dada por $var(v)$, que tem dois sucessores: $zero(v)$, quando $var(v) = 0$, e $um(v)$, quando $var(v) = 1$. Um vértice terminal v assume apenas o valor zero (falso) ou um (verdadeiro), dado pela função $valor(v)$. As arestas da árvore são rotuladas com o valor zero ou um.

A Figura 4.2 mostra um exemplo de árvore binária de decisão para a função booleana $(a \wedge b) \vee (c \wedge d)$. Um caminho na árvore começa no vértice raiz, e a escolha entre $zero(v)$ e $um(v)$ direciona para um terminal que representa a avaliação da função. No exemplo, a avaliação da variável ($a = 1, b = 0, c = 1, d = 0$) leva a um vértice terminal $zero$, o que significa que a função booleana é falsa para essa atribuição, enquanto uma atribuição diferente pode levar a um terminal que a função é verdadeira.

As árvores de decisão binárias podem ter muitas informações redundantes. Por exemplo, na Figura 4.2 existem oito subárvores cujas raízes são rotuladas com uma função booleana d . Um BDD é obtido mesclando subárvores idênticas e eliminando nós com informações repetidas. A estrutura resultante é um grafo acíclico direcionado (DAG) chamado de BDD que, ao contrário das árvores, permite vértices e subestruturas compartilhados. Vale ressaltar o aspecto canônico dos BDDs, o que significa que duas funções são iguais se, e somente se, seus BDDs associados forem isomorfos.

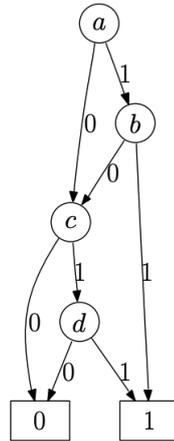
[13] primeiro mostrou como obter uma representação canônica de funções booleanas impondo duas restrições aos BDDs. Primeiro, as variáveis devem aparecer no BDD na mesma ordem ao longo do caminho de sua raiz até um terminal. Essa restrição é satisfeita fixando uma ordem para as variáveis que rotulam os vértices do BDD ($var_1 < var_2 < \dots < var_n$). Isso significa que, se um vértice u precede um v não terminal (começando

da raiz BDD), então, a variável que rotula o vértice u precede a variável que rotula v na ordem ($var(u) < var(v)$). Em segundo lugar, subárvores ou vértices isomórficos não devem existir no BDD. A restrição é satisfeita aplicando repetidamente três regras de transformação que não alteram a função representada pelo BDD:

1. Remova os terminais duplicados: mantenha apenas dois terminais, um terminal zero e outro terminal um. Redirecione todas as bordas de entrada dos terminais removidos para esses dois terminais exclusivos;
2. Remova os não terminais duplicados: se dois não terminais u e v são rotulados com a mesma variável ($var(u) = var(v)$) e têm os mesmos sucessores ($zero(u) = zero(v) \wedge um(u) = um(v)$), remova o vértice v e redirecione suas arestas de entrada para o vértice u ;
3. Remova os filhos redundantes: se um v não terminal tiver $zero(v) = um(v)$, remova v e redirecione todos os seus vértices de entrada para $zero(v)$.

A forma canônica do BDD, obtida pela imposição dessas duas restrições, é chamada de *Ordered Binary Decision Diagram*. A Figura 4.3 mostra o BDD ordenado para a árvore de decisão binária da Figura 4.2, considerando a ordem das variáveis $a < b < c < d$.

Figura 4.3: Exemplo de um BDD reduzido para a Árvore binária de decisão para a função booleana $(a \wedge b) \vee (c \wedge d)$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora os BDDs tenham várias vantagens, eles têm suas próprias desvantagens. O principal é a ordem das variáveis que aparecem na função booleana que está sendo representada. Dependendo disso, o BDD pode ser altamente compactado ou completamente redundante. No entanto, o problema de escolher a ordenação das variáveis que minimiza o tamanho do BDD é co-NP-completo [13]. Existem heurísticas para aproximar esse problema, como a apresentada por [9], que também fazem uma breve revisão de várias outras heurísticas baseadas em busca local. No entanto, as ordenações de variáveis

são frequentemente encontradas empiricamente, uma vez que é esperado que elas estejam relacionadas à semântica do modelo.

Outro problema com BDDs é a complexidade do espaço. Uma vez que os BDDs são essencialmente uma representação exaustiva do modelo, no pior caso, ele é exponencial ao número de variáveis da função booleana [13].

4.1.2 Estrutura de Kripke

A representação utilizada no MC para indicar o comportamento do sistema é um grafo direcionado de transição de estados, conhecida como estrutura de Kripke. Ela é uma variação de uma máquina finita não determinística de estado, em que os nós representam os estados alcançáveis do sistema e as arestas representam as transições possíveis entre os estados.

Definição 3. Estrutura de Kripke M sobre AP é uma tupla (S, I, R, L) , como definido por [27], em que S é um conjunto de estados finitos, $I \subseteq S$ é o conjunto de estados iniciais, $R \subseteq (S \times S)$ é a relação de transição que tem que ser total; exemplo, para cada estado $s \in S$, existe um estado $s' \in S$, dado por $R(s, s')$, $L : S \rightarrow 2^{AP}$ é uma função que marca cada estado com o conjunto de proposições atômicas (AP) que são verdadeiras naquele estado. As AP de um modelo são um conjunto de expressões booleanas de variáveis, constantes, e outros símbolos do modelo.

A Figura 4.4a é um exemplo de uma estrutura Kripke de dois estados, S_0 e S_1 , e as suas possíveis transições: $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_0$, e $S_1 \rightarrow S_1$. Nela, os componentes de M da estrutura de Kripke são:

- $S : \{S_0, S_1\}$
- $I : \{S_0\}$
- $R : \{(S_0, S_1), (S_1, S_0), (S_1, S_1)\}$
- $L(S_0) = \{A, B\}, L(S_1) = \{A, \neg B\}$

Com base nesse conjunto de estados e transição, a Figura 4.4c mostra o desdobramento da estrutura na árvore computacional com os diferentes caminhos possíveis. Um caminho na estrutura de Kripke M a partir de um estado s_0 é uma sequência infinita de estado $\pi = s_0, s_1, s_2, \dots$, onde $s_0 = s$, e a relação $R(S_i, S_{i+1})$ é válida para todo $i \geq 0$. A Figura 4.4b ilustra um caminho possível no exemplo da estrutura.

4.1.3.1 Fórmulas CTL

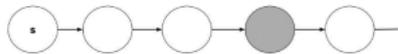
As fórmulas CTL são compostas pela combinação dos quantificadores de caminho (*path quantifiers*) e dos operadores temporais (*temporal operators*). Os quantificadores de caminho são utilizados para verificar o caminho em que as propriedades são verdadeiras. Eles podem ser de dois tipos:

- “Para todo”: $\mathbf{A} \Phi$ – para todos os caminhos, Φ é verdadeiro.
- “Existe”: $\mathbf{E} \Phi$ – existe um caminho em que Φ é verdade.

Os operadores temporais descrevem propriedades considerando as sequências de estados em que uma propriedade é válida. Os 4 tipos de operadores temporais são listados abaixo e mostrados na figura a seguir (figuras 4.5 a 4.8). Os estados preenchidos na cor preta e cinza são aqueles em que a propriedade Φ é verdadeira.

- Eventualmente $\mathbf{F}\Phi$ – Φ é verdadeiro em um estado futuro.

Figura 4.5: O operador “Eventualmente”: F.



Fonte: Elaborado pelo autor.

- Globalmente $\mathbf{G}\Phi$ – Φ é verdadeiro em todos os estados futuros.

Figura 4.6: O operador “Globalmente”: G.



Fonte: Elaborado pelo autor.

- Próximo $\mathbf{X}\Phi$ – Φ é verdadeiro no próximo estado.

Figura 4.7: O operador “Próximo”: X.



Fonte: Elaborado pelo autor.

- Até $\Phi_1 \mathbf{U} \Phi_2$ – Φ_1 é verdadeiro até que Φ_2 seja verdadeiro. Na figura abaixo, há um exemplo dessa propriedade o qual Φ_1 é representado pela circunferência preenchida em cinza, e Φ_2 pela circunferência preenchida preta.

Figura 4.8: O operador “Até”: U.

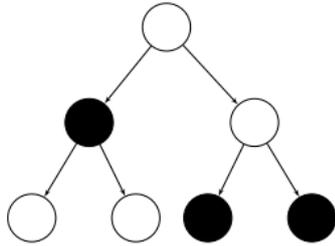


Fonte: Elaborado pelo autor.

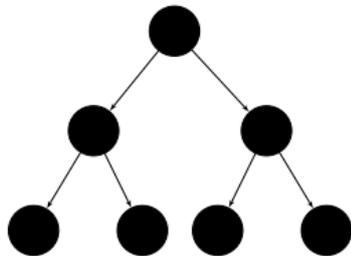
Em CTL, os operadores temporais são precedidos pelo quantificador de caminho, tendo-se no final 8 operadores: AX, EX, AG, EG, AF, EF, AU e EU. Na Figura 4.9 há a demonstração de 4 desses operadores. Considerando o primeiro nó do topo da árvore o estado corrente, a Figura 4.9a indica que a propriedade Φ é eventualmente observada em todos os caminhos a partir do estado atual (operador AF). Na Figura 4.9b, há uma representação do operador EF, em que eventualmente existe um estado onde Φ é verdadeiro. Em Figura 4.9c, a propriedade é sempre verdadeira, para todos os caminhos da árvore (operador AG). Já o operador EG representa que existe pelo menos um caminho onde, em todos os estados, a propriedade Φ é observada, conforme mostra a Figura 4.9d.

Figura 4.9: Representação de 4 propriedades CTL na árvore computacional.

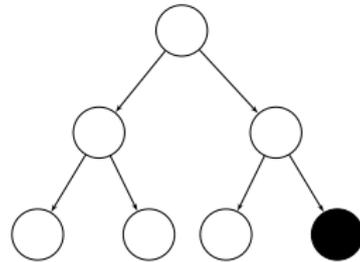
(a) Operador AF Φ – É inevitável que Φ seja verdadeiro.



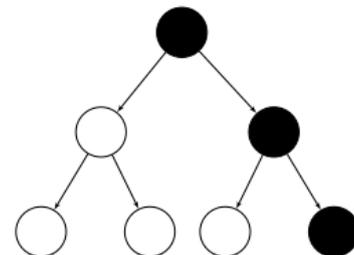
(c) Operador AG Φ – Φ é sempre verdade.



(b) Operador EF Φ – Φ é alcançável em algum caminho.



(d) Operador EG Φ – Há um caminho que Φ é sempre verdade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Aplicações

A verificação de modelos é utilizada em diferentes tipos de sistemas, por exemplo, sistemas em tempo real [3, 18, 19], robótica [57], redes veiculares [39] e também em estudos de sistemas biológicos. Em relação a estes, [94] utilizam MC para analisar a regulação do ciclo celular de mamíferos, e [12] verifica o funcionamento da bomba de sódio e potássio através de probabilístico. Por sua vez, [45], assim como [100], aplicam MC em um modelo do câncer pancreático para analisar a apoptose, a proliferação, o ciclo celular e a relação entre os fatores de risco de câncer em pacientes com diabetes por meio de redes booleanas e MC.

4.2 Statistical Model Checking

O *Statistical Model Checking* (SMC), introduzido por [105], teve como motivação a modelagem e a verificação de sistemas estocásticos assíncronos, os quais são abundantes no mundo real. Um sistema estocástico é uma coleção de variáveis aleatórias que assumem valores no espaço de estado o qual pode ser alcançado e ocupado por alguma duração antes que um evento provoque uma transição [2].

Esses modelos são difíceis de interpretar, devido à sua natureza não determinística, o que dificulta definir se o comportamento observado em uma “fotografia” é o usual ou uma anomalia. A abordagem proposta é baseada em métodos de inferência estatística para verificar se a probabilidade de uma propriedade Φ ser satisfeita é maior ou igual a threshold θ , ou seja, se $Pr \geq \theta(\Phi)$. A Figura 4.10 apresenta a visão geral do método, na qual as entradas são um modelo estocástico M , os parâmetros estatísticos de confiança, a taxa de erro e as especificações das propriedades que serão verificadas.

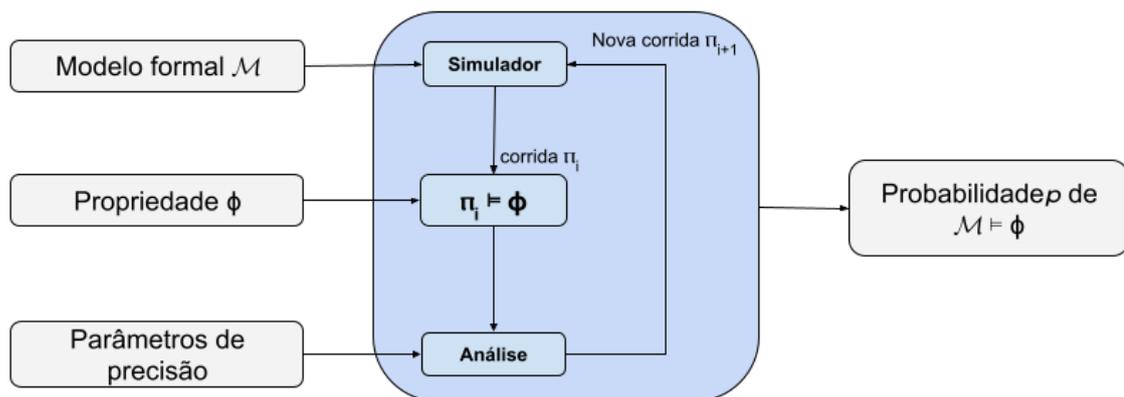
As propriedades podem ser definidas pela lógica temporal clássica, como em CTL, e por uma lógica temporal estocástica, que enriquece as propriedades do modelo, permitindo especificações do tipo: “a probabilidade de inibir a atividade de uma quinase em 50% em 20 horas é menor de 0,01”.

A lógica temporal estocástica pode ser classificada em duas categorias [2, 30]:

1. Qualitativa: A probabilidade de X satisfazer a propriedade Φ é maior que um *threshold* θ ?
2. Quantitativa: Qual é a probabilidade de o programa X satisfazer a propriedade Φ ?

Por meio de simulação estocástica, os verificadores geram execuções que são utilizadas para verificar se $M \models \Phi$. Um dos benefícios da utilização de verificadores SMC em relação ao processo de simulação tradicional é que as simulações são geradas automaticamente, até que os resultados encontrados atinjam o índice de confiança escolhido.

Figura 4.10: Representação da engrenagem de verificação de um SMC. A partir de um modelo, um conjunto de propriedades e parâmetros de precisão, simulações são executadas para verificar se $M \models \Phi$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.1 Verificadores SMC

Existem diferentes verificadores que, além de executarem a verificação clássica dos modelos, possibilitam utilizar o SMC para análise de sistemas estocásticos. Foram avaliadas três ferramentas disponíveis: Prism [59], Plasma Lab [11] e Uppaal [15].

O **Prism** é uma ferramenta de modelagem e análise de modelos que apresentam comportamento aleatório ou probabilístico. É especificado em uma linguagem própria, o *Prism Language*, e as propriedades são definidas na lógica temporal *probabilistic* CTL, a qual permite definir propriedades quantitativas, como: “Qual é a probabilidade de a bomba de sódio e potássio estar aberta na presença da palitoxina em 100 unidades de tempo?” [12]. A ferramenta é gratuita, de código aberto, e é mantida pela Universidade de Oxford.

O **Plasma Lab** é uma biblioteca, escrita em Java, que encapsula o verificador SMC, possibilitando utilizá-lo em diferentes contextos. Por exemplo, é possível executar as análises SMC no Scilab/Matlab e desenvolver um software utilizando a sua estrutura. A ferramenta permite definir o modelo utilizando o *Prism Language* e as propriedades na lógica temporal *Bounded Linear Temporal Logic*. Além disso, a biblioteca possui

arquitetura distribuída, possibilitando a sua utilização em grids. O Plasma Lab é gratuito e é mantido pelo Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique.

O **Uppaal** é uma ferramenta de modelagem e verificação de sistemas em tempo real cujos modelos são definidos por autômatos temporizados, chamados de *Priced Timed Automata* (PTA). Ele permite a modelagem de equações diferenciais ordinárias e a implementação de funções utilizando uma linguagem estilo C. As propriedades são definidas na lógica temporal *Weighted Metric Temporal Logic Formula* (WMTL), e a ferramenta também possui uma arquitetura distribuída. O Uppaal apresenta outras funcionalidades, como a simulação do modelo passo a passo, o que permite acompanhar a evolução das etapas, e uma função para construção de gráficos com os resultados das propriedades. Devido a esse conjunto de facilidades e à possibilidade de modelar sistemas híbridos, optou-se por essa ferramenta na execução deste projeto. No Capítulo 5, descreve-se com mais detalhes o formalismo utilizado no Uppaal.

Capítulo 5

Uppaal

O Uppaal é uma ferramenta de *model checking* de sistemas em tempo real desenvolvido pelas universidades UPPsala e AALborg. É dividido em três componentes: linguagem de descrição do comportamento do modelo; simulador, que possibilita examinar a execução do sistema; e módulo de verificação, que avalia as propriedades definidas. O Uppaal-SMC (*Statistical Model Checking*) é uma versão que permite a verificação de propriedades de sistemas estocásticos. Nas próximas seções deste capítulo, são apresentadas as principais funcionalidades dessa ferramenta, o formalismo dos modelos que ela é capaz de verificar, a lógica temporal disponibilizada e, enfim, uma descrição de como modelar sistemas biológicos em um modelo formal por meio do Uppaal.

5.1 Modelagem

A modelagem no Uppaal é realizada por uma interface gráfica, onde é possível definir os autômatos temporais (*timed automata*). Esses autômatos são máquinas de estados finitos que possuem variáveis inteiras, reais, de relógio (*clock*) e implementação de código utilizando uma linguagem *C-like*. Os vários autômatos, em rede, são processados paralelamente e podem se sincronizar por meio de canais (o formalismo dessa estrutura é detalhada em 5.1.1).

Um exemplo desse mecanismo de comunicação entre autômatos pode ser observado nas figuras 5.1a e 5.1b. Na Figura 5.1a há dois estados: o inicial, representado por dois círculos concêntricos, e o chamado de “produced”. A transição do estado inicial para o “produced” só ocorre se ele receber o sinal “NFTPProduced”, que será enviado por outro autômato, representado na Figura 5.1b, quando a transição ocorrer.

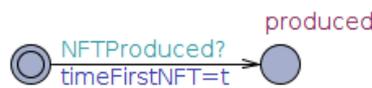
As figuras 5.1c e 5.1d apresentam os parâmetros que podem ser definidos na transição:

1. “*Select*”: neste atributo define-se um conjunto de valores a ser escolhido de forma aleatória, o qual é atribuído a uma variável.

2. “*Guard*”: indica restrições que devem ser satisfeitas para que a transição seja efetuada. Na Figura 5.1d há um exemplo desse requisito, segundo o qual, para executar a transição, são necessárias ao menos uma molécula de *AggTau* e uma de *NFT*.
3. “*Sync*”: executa a sincronização entre processos. Essa definição permite que diferentes autômatos se comuniquem de forma assíncrona.
4. “*Update*”: neste campo define-se quais atualizações serão realizadas quando uma transição ocorrer. Na Figura 5.1c, há um exemplo cuja variável *timeFirstNFT* é atribuída com o valor da variável *t*.

Figura 5.1: Representação da sincronização de dois autômatos, e a descrição de suas arestas.

(a) Autômato que a transição ocorrerá somente quando receber o sinal de sincronização.



(b) Autômato que envia o sinal de sincronização quando a transição é efetuada.



(c) Detalhamento da aresta do autômato que escuta o sinal de sincronização.

(d) Detalhamento da aresta do autômato que propaga o sinal.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.1 PTA e SHA

O Uppaal possibilita que um sistema seja modelado de forma discreta, contínua e por equações diferenciais ordinárias. Os modelos discretos e contínuos no Uppaal são representados por *priced timed automata* (PTA), em que os *clocks* do sistema podem evoluir com taxas diferentes. A definição formal de um PTA é dada por:

Definição 4. PTA é uma tupla $A = (L, l_0, X, \Sigma, E, R, I)$ onde L um conjunto finito de estados; $l_0 \in L$ é o estado inicial; X é um conjunto finito de *clock*; $\Sigma = \Sigma_i \uplus \Sigma_o$ é um conjunto finito de ações dividido em entradas (Σ_i) e saídas (Σ_o); E é o conjunto de arestas; R é um vetor de taxas de cada *clock*, e; I atribui um invariante para cada estado [31].

Uma extensão dos PTA são os *stochastic hybrid automata* (SHA), que possibilitam que as taxas dos relógios não dependam somente de valores de variáveis discretas, mas também de outros *clocks*. Esses autômatos têm a seguinte definição:

Definição 5. SHA é uma tupla $H = (L, l_0, X, \Sigma, E, F, I)$ onde L um conjunto finito de estados; $l_0 \in L$ é o estado inicial; X é um conjunto finito de variáveis contínuas; $\Sigma = \Sigma_i \uplus \Sigma_o$ é um conjunto finito de ações dividido em entradas (Σ_i) e saídas (Σ_o); E é o conjunto de arestas; F é uma função de *delay* para cada estado, e; I é um conjunto de invariante de cada estado [30].

5.2 Simulação

O Uppaal possui um módulo de simulação, que permite analisar o comportamento do sistema ao longo do tempo. As simulações podem ser executadas de maneira automática ou manual. Na abordagem automatizada, os valores e as transições ocorrem de maneira aleatória, enquanto a abordagem manual permite que o usuário escolha os valores e as mudanças de estados [75].

5.3 Verificação

Para a verificação do sistema, o Uppaal tem como entrada um PTA, ou SHA, M e um conjunto de propriedades Φ (detalhadas em 5.3.1). A tela de verificação pode ser vista na Figura 5.2. Diferente dos verificadores que retornam “Verdadeiro” ou “Falso + contraexemplo” como saída, o Uppaal-SMC permite obter resultados mais elaborados, como a probabilidade de um determinado evento ocorrer.

Figura 5.2: Módulo de verificação do Uppaal onde as propriedades são definidas. A ferramenta ainda permite que gráficos sejam gerados a partir dos resultados da verificação das propriedades.

The screenshot shows the Uppaal Verifier interface with the following content:

```

Editor | Simulator | ConcreteSimulator | Verifier | Yggdrasil
-----
Overview
Pr[<=86400*4] (<=> controllNFT.produced)
Pr[<=86400*4] (<=> !controllNFT.produced)
Pr[!<=86400*2] (! !controllAbetaPlaque.produced)
simulate 100 [<=86400*4] {AbetaPlaque, NFT} : 1 : (controllNFT.produced and !controllAbetaPlaque.produced)
Pr[<=86400*2] (<=> timeFirstNFT < timeFirstAbetaPlaque)
Pr[<=86400*2] (<=> (controllNFT.produced and !controllAbetaPlaque.produced))
simulate 100 [<=86400*2] {Tau_P2, AggTau} : 1 : (Tau_P2==0 and AggTau>0)
Pr[<=86400*2] (<=> Tau_P2 == 0 and AggTau > 0)

Query
simulate 100 [<=86400*2] {Tau_P2, AggTau} : 1 : (Tau_P2==0 and AggTau>0)

Comment

-----
Status
Established direct connection to local server.
(Academic) UPPAAL version 4.1.19 (rev. 5648), July 2014 -- server.
Disconnected.
Established direct connection to local server.
(Academic) UPPAAL version 4.1.19 (rev. 5648), July 2014 -- server.
Disconnected.
Established direct connection to local server.
(Academic) UPPAAL version 4.1.19 (rev. 5648), July 2014 -- server.
simulate 100 [<=86400*2] {Tau_P2, AggTau} : 1 : (Tau_P2==0 and AggTau>0)
Verification/kernel/elapsed time used: 91,09s / 0,44s / 91,612s.
Resident/virtual memory usage peaks: 10.028KB / 45.356KB.
Property is not satisfied.
  
```

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.1 Lógica Temporal

O objetivo de um verificador é conferir se as especificações definidas por uma lógica temporal – por exemplo, o CTL – são satisfeitas ou não em um modelo. Em sistemas estocásticos, essas propriedades são definidas com base em probabilidade e delimitadas por um período. O Uppaal implementa um subconjunto de propriedades CTL e uma linguagem estocástica própria, conhecida como *weighted metric temporal logic formula* ($WMTL_{\leq}$).

Definição 6. $WMTL_{\leq}$ é definida pela gramática: $\varphi ::= ap | \neg\varphi | \varphi_1 \wedge \varphi_2 | O\varphi | \varphi_1 U^x \leq d\varphi_2$ onde ap é uma proposição atômica, d é um número natural, e x é o *clock*. O operador O representa operador próximo estado, e o U descreve a proposição “até”. Essa especificação é válida quando φ_1 é verdadeira até o momento que φ_2 seja verdadeira e isso ocorre até um tempo $x + d$ [14].

Essa gramática permite definir uma propriedade $P_M(\Phi)$, que verifica a probabilidade de que uma corrida aleatória de um NPTA/SHA M satisfaça Φ . A partir dessa lógica, é possível verificar se $P_M(\langle \rangle_{x \leq C} \Phi) \geq p$ ($p \in [0, 1]$), onde x é o *clock*, C é o limite do tempo, e Φ é um predicado de estado. A verificação dessa propriedade é obtida de forma aproximada por algoritmos baseados em simulações.

Seguem alguns exemplos de propriedades que podem ser definidas no Uppaal.

1. Subconjunto CTL (descrito na Tabela 5.1): para verificar se uma propriedade é satisfeita ou não (“Verdadeiro” ou “Falso”).

Consulta	Semântica
$A \square p$	p é satisfeito em todos os estados alcançáveis.
$A \langle \rangle p$	em todas os possíveis caminhos, p é eventualmente verdadeiro.
$E \square p$	existe um caminho onde p é sempre verdade.
$E \langle \rangle p$	existe um estado que p é satisfeito.
$p \text{ -- } \langle \rangle q$	se a propriedade p é verdade, então, eventualmente q também será verdade.

Tabela 5.1: Subconjunto de operações CTL implementadas no Uppaal.

2. “Simulação” automática do sistema: para visualizar o comportamento das variáveis e a aparência gráfica das curvas.

```
simulate 100 [ <=1000 ] { PI3K, mTORC1, amTORC1 }
```

3. “Teste de hipótese” para certificar se uma propriedade é satisfeita em certo grau de probabilidade. No exemplo, verifica-se se, em um tempo menor ou igual a 1000, a probabilidade de aAKT ser maior que AKT é maior ou igual a 0.70.

$$\text{Pr}[\langle \rangle_{x \leq 1000} (\langle \rangle \text{ aAKT} > \text{ AKT}) \geq 0.7$$

4. “Estimativa estatística”: para identificar qual é a probabilidade de uma propriedade ser satisfeita. Neste exemplo, o Uppaal irá estimar a probabilidade de amTORC1 ser maior que mTORC1.

$$\text{Pr}[\langle \rangle_{x \leq 1000} (\langle \rangle \text{ amTORC1} > \text{ mTORC1})$$

5. Para identificar a média do valor máximo ou mínimo de uma expressão, pode-se utilizar a consulta abaixo. No exemplo, executam-se 10 simulações, limitadas em um tempo de 1000 unidades, e calcula-se a média dos valores máximos da variável TAU.

$$E[<=1000; 10](\max: \text{Tau})$$

6. Para comparar as probabilidades de duas expressões, pode-se definir a consulta abaixo. Nela, verifica-se se a probabilidade de $\text{amTORC1} > \text{mTORC1}$ ser menor ou igual à probabilidade de $\text{PI3K} < \text{aPI3K}$.

$$\Pr[<=1000](<> \text{amTORC1} > \text{mTORC1}) \leq \Pr[<=1000](<> \text{PI3K} < \text{aPI3K})$$

Capítulo 6

O Modelo

Neste capítulo é apresentado como o nosso modelo formal da via PI3K/AKT/mTOR/Tau para análise dos efeitos da rapamicina, LY294002, e da BEZ235 foi desenvolvido. Também é descrito como as reações químicas são transformadas em autômatos no verificador Uppaal.

6.1 Processo de modelagem

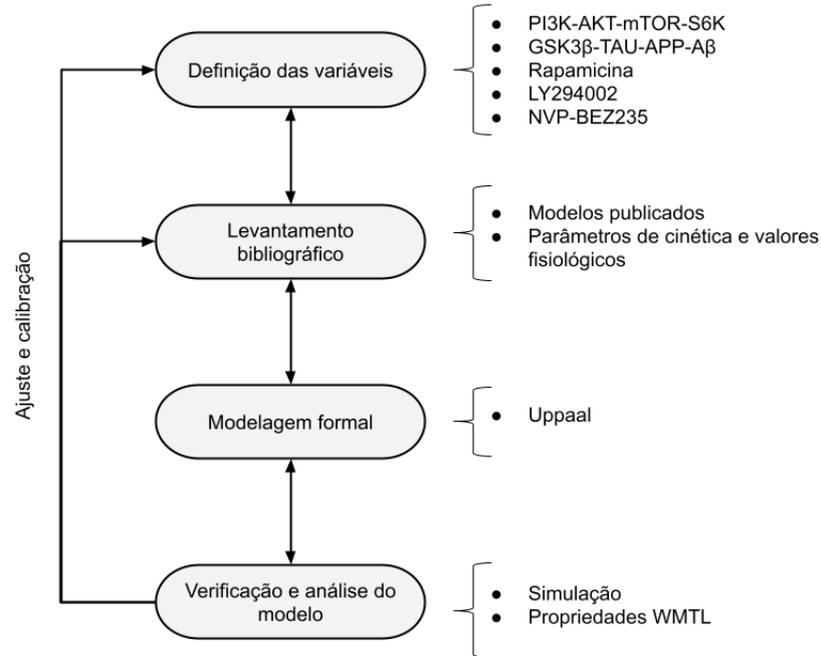
A construção de um modelo dinâmico possibilita que substâncias bioativas sejam testadas por meio de ferramentas computacionais antes da execução de experimentos *in vivo/in vitro*, e/ou testes clínicos. Esses modelos dinâmicos descrevem um conjunto de reações que, juntas, indicam como as células respondem a uma perturbação, como a administração de uma substância. Conhecendo esse relacionamento dinâmico, mesmo que se trate de abstração da realidade, torna-se possível responder à questão de como manipular essa rede bioquímica para modular a função celular [76].

Dessa forma, para a construção do nosso modelo formal, definimos as variáveis de nossa abstração que foram apresentadas na Figura 2.1. A partir dessas variáveis e do entendimento do mecanismo da via de sinalização, identificamos na literatura modelos matemáticos que descrevem como parte da interação dessas variáveis. Alguns modelos descrevem somente a via PI3K/AKT/mTOR, outros abordam a fosforilação de GSK3 β por AKT, a fosforilação de Tau, a produção da A β e alguns dos trabalhos descrevem a atuação das substâncias em PI3K e mTORC1. Tais trabalhos foram utilizados para identificar os valores iniciais das constantes cinéticas das reações bioquímicas do nosso modelo.

Esse modelo é refinado e testado iterativamente, de modo que seja capaz de reproduzir o comportamento das variáveis conforme descrito na literatura. Assim, o modelo é ajustado de forma que seja capaz de responder às perguntas. Todas essas etapas de desenvolvimento estão ilustradas na Figura 6.1 e são detalhadas nas próximas subseções

deste capítulo.

Figura 6.1: Descrição das etapas do desenvolvimento do modelo formal. Com base na definição das variáveis-chave, identificamos os valores dos parâmetros de cinética na literatura a partir de modelos já publicados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 Modelos de referência

A sinalização da PI3K/AKT/mTOR e a fosforilação de Tau possuem modelos dinâmicos na literatura, nos quais nos baseamos para a definição do nosso modelo. [81] apresentam um modelo com o *feedback* negativo da via, no qual a ativação de mTORC1 induz a inibição de PI3K. Além disso, esse modelo contempla a ativação de mTORC2 pela ação da PI3K. [58], por sua vez, descrevem um modelo em que a via é estimulada pela insulina e analisam-se os efeitos na fosforilação de GSK3 β , FOXO1 e mTORC1. Nesse modelo, os autores consideram o *feedback* negativo de mTORC1 sobre o complexo do receptor de insulina através da S6K.

[44] estudaram os valores de associação, dissociação e do IC_{50} da rapamicina, da BEZ235 e da LY294002 na inibição de mTORC1 e PI3K. Em [97], é apresentado o modelo de inibição de mTORC1 e mTORC2 por meio da atividade inibitória da subunidade Deptor. Essa modelagem também considera o *feedback* negativo da via na inibição do

complexo receptor de insulina por meio da S6K fosforilada por mTORC1. [35] descrevem um modelo simplificado da dinâmica de inibição de mTORC1 e mTORC2 utilizando a rapamicina em diferentes momentos e concentrações. Nesse trabalho, os autores não consideraram outras espécies envolvidas, tais como PI3K e AKT.

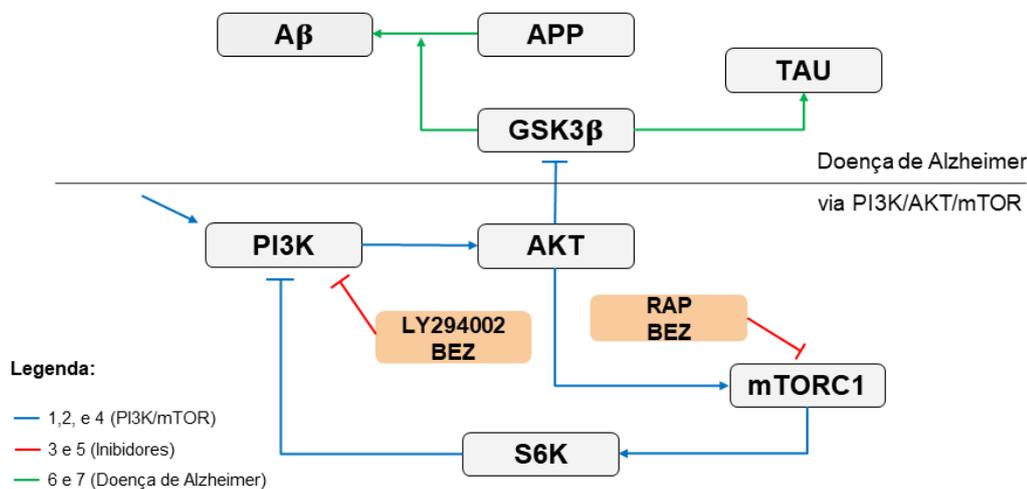
Um modelo matemático da regulação da fosforilação de Tau e da formação de placas amiloides por GSK3 β é apresentado por [82]. Nesse trabalho os autores consideram os efeitos da AN-1792 (alzforum) na via. Já [47] desenvolvem um modelo de hiperfosforilação da Tau, formação de placas amiloides, recrutamento de astrócitos, micróglias, liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias e, também, morte neuronal. O modelo também considera a administração de um composto antiamilóide, a aducanumabe, que atua na fagocitose e na depuração de A β mediadas pelas micróglias.

A Tabela 6.1 sintetiza estes modelos com as variáveis abordadas e as e a estratégia de modelagem. Estes modelos foram agrupados pelas variáveis e transições que eles abstraem. As transições em azul são modeladas por [81, 58, 97]; em vermelho os modelos que abordam os inibidores são: [44, 35]; e em verde, [82, 47] abstraem a formação de A β . Nenhum destes trabalhos associam a via PI3K/AKT/mTOR com a formação do peptídeo A β e a fosforilação de Tau. Dessa forma, o nosso modelo o primeiro trabalho a descrever estas variáveis em um único modelo. Isto torna o nosso trabalho inovador e capaz de avaliar os impactos de qualquer candidato a fármaco, ou mais de um, que atue na via nos biomarcadores da DA. Além disso, diferentemente destes modelos que utilizam um abordagens numéricas por EDOs ou Equação Diferencial Parcial (EDP), a nossa abstração é estocástica o que a aproxima do comportamento aleatório dos modelos biológicos [106].

Tabela 6.1: Resumo dos modelos matemáticos utilizados como referência. Nenhum dos modelos integra a via PI3K/AKT/mTOR com a Doença de Alzheimer.

Contexto	Índice	Referência	Variáveis analisadas	Modelagem
PI3K/mTOR	1	[81]	IR-IRS1-Akt-TSC-mTORC1-S6K1	EDO
	2	[58]	IR-PI3K-Akt-mTOR-S6K-GSK3 β	EDO
	3	[44]	Rapamicina-mTOR	EDO
	4	[97]	IR-IRS-Akt-mTORC1-mTORC2-DEPTOR	EDO
	5	[35]	Rapamicina-mTORC1-mTORC2	EDO
DA	6	[82]	APP-A β -GSK3 β -Tau-NFT	EDO
	7	[47]	APP-A β -GSK3 β -Tau-NFT-Morte neuronal	EDP

Figura 6.2: Via de sinalização com as referências agrupadas. Em azul são as transições da via PI3K/mTOR modeladas por [81, 58, 97]; em vermelho os modelos que abordam os inibidores [44, 35]; e em verde os modelos que abstraem a formação de $A\beta$ e fosforilação de Tau [82, 47]



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Reações do modelo

O modelo formal proposto, ilustrado na Figura 6.3a, considera dois estados para cada proteína. São eles: o estado inativo, representado pelo nome da proteína; e o estado ativado, que possui a sigla “a” acompanhada do nome da proteína.

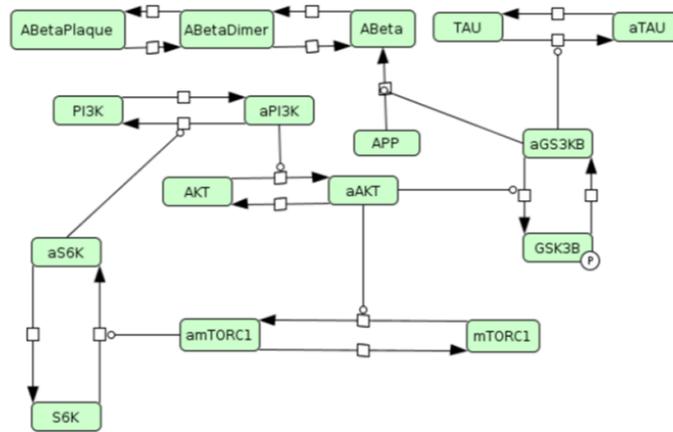
Algumas decisões de projeto foram tomadas com o objetivo de simplificar o modelo inicial. Não foi considerado mTORC2 no modelo, devido à sua resistência às substâncias. Dessa forma, adotou-se que a fosforilação de AKT, para sua total ativação, ocorre por meio da PI3K. A hiperfosforilação da Tau por GSK3 β nos resíduos S404, S400 e S396 também não é abordada no modelo. Assim, apresenta-se que o estado de hiperfosforilação, representado por aTAU, ocorre em uma única etapa. O modelo também não abrange a degradação nem a síntese das proteínas envolvidas.

Em relação à rapamicina, LY294002, e à BEZ235, o processo de degradação foi modelado, e o tempo de absorção após a administração foi desconsiderado nesta fase do projeto. Compreende-se que o mecanismo de inibição ocorre pela ligação das substâncias às quinases. A rapamicina, ou BEZ235, se associa tanto a mTORC1 inativo quanto a mTORC1 ativo, como ilustrado na Figura 6.3c. Essa estratégia também é utilizada para a ligação de LY294002 e BEZ235 com PI3K e aPI3K, conforme apresentado na Figura 6.3b. Neste trabalho consideramos apenas a inibição de PI3K por LY294002 por ser o alvo principal do composto. A Tabela 6.2 apresenta essas reações e as constantes cinéticas utilizadas em nosso modelo obtidas, inicialmente, através dos modelos de referências e

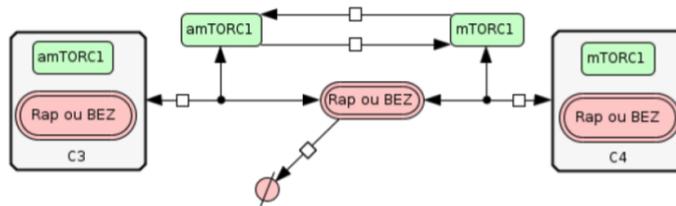
que foram ajustadas manualmente.

Figura 6.3: Ilustração do modelo da via de sinalização PI3K/mTOR e da fosforilação de Tau por meio da GSK3β.

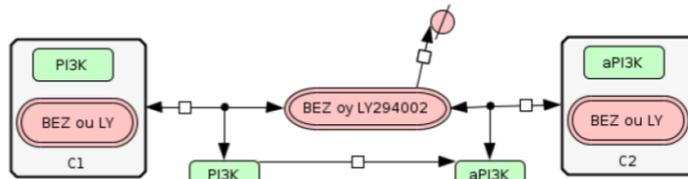
(a) Representação da via de sinalização modelada. As quinases envolvidas são representadas pelo estado ativo e inativo.



(b) Rapamicina e BEZ se associam com a forma ativa e inativa de mTORC1. A degradação, ∅, das substâncias também foram modeladas.



(c) BEZ e LY294002 se associam com a forma ativa e inativa de PI3K. A degradação, ∅, das substâncias também foram modeladas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Reação	Descrição	Constante estocástica
$PI3K \rightarrow aPI3k$	Ativação de PI3K	0.1
$aPI3K \rightarrow PI3k$	Inibição de PI3K	1
$AKT + aPI3K \rightarrow aAKT + aPI3K$	Ativação de AKT por PI3K	0.005
$aAKT \rightarrow AKT$	Inibição de AKT	2
$mTORC1 + aAKT \rightarrow amTORC1 + aAKT$	ativação de mTORC1 por aAKT	0.1
$amTORC1 \rightarrow mTORC1$	Inibição de mTORC1	1

$S6K + amTORC1 \rightarrow aS6K + amTORC1$	Ativação de S6K	1
$aS6K \rightarrow S6K$	Inibição de S6K	0.01
$aPI3K + aS6K \rightarrow PI3K + aS6K$	Inibição de PI3K por S6K	0.1
$aGSK3 + aAKT \rightarrow GSK3 + aAKT$	Inibição de GSK3 β por AKT	0.003
$aGSK3 \rightarrow ABeta + aGSK3$	Formação de A β por GSK3 β	0.002
$TAU + aGSK3 \rightarrow aTAU + aGSK3$	Fosforilação de Tau por GSK3 β	0.01
$aTAU \rightarrow TAU$	Fosfatase de Tau	0.01
$GSK3 \rightarrow aGSK3$	Ativação de GSK3 β	0.1
$2 * Abeta \rightarrow Abetadimer$	Formação de dímeros	3×10^{-6}
$Abetadimer \rightarrow 2 * Abeta$	Dissociação de dímeros	1×10^{-6}
$2 * Abetadimer \rightarrow Abetaplaque$	Formação de placa amiloide	0.2
$Abetaplaque \rightarrow 2 * Abetadimer$	Dissociação de placa amiloide	2×10^{-4}
$mTORC1 + RAP \rightarrow mTORC1_RAP$	Ligação de mTORC1 com a rapamicina	0.92×10^{-4}
$mTORC1_RAP \rightarrow mTORC1 + RAP$	Dissociação de mTORC1 e rapamicina	2.2×10^{-6}
$amTORC1 + RAP \rightarrow amTORC1_RAP$	Ligação de amTORC1 com a rapamicina	1.92×10^{-6}
$amTORC1_RAP \rightarrow amTORC1 + RAP$	Dissociação de amTORC1 e rapamicina	2.2×10^{-6}
$RAP \rightarrow degradao$	Degradação da rapamicina	0.016
$PI3K + LY \rightarrow PI3K_LY$	Ligação de PI3K com a LY294002	1.6
$PI3K_LY \rightarrow PI3K + LY$	Dissociação de PI3K e LY294002	0.96
$aPI3K + LY \rightarrow aPI3K_LY$	Ligação de aPI3K com a LY294002	1.6
$aPI3K_LY \rightarrow aPI3K + LY$	Dissociação de aPI3K e LY294002	0.96
$LY \rightarrow degradao$	Degradação de LY294002	0.0455
$mTORC1 + BEZ \rightarrow mTORC1_BEZ$	Ligação de mTORC1 com a BEZ235	2.5
$mTORC1_BEZ \rightarrow mTORC1 + BEZ$	Dissociação de mTORC1 e BEZ235	1.4
$amTORC1 + BEZ \rightarrow amTORC1_BEZ$	Ligação de amTORC1 com a BEZ235	2.5

$amTORC1_BEZ \rightarrow amTORC1 + BEZ$	Dissociação de amTORC1 e BEZ235	1.4
$PI3K + BEZ \rightarrow PI3K_BEZ$	Ligação de PI3K com a BEZ235	2.5
$PI3K_BEZ \rightarrow PI3K + BEZ$	Dissociação de PI3K e BEZ235	4.2
$aPI3K + BEZ \rightarrow aPI3K_BEZ$	Ligação de aPI3K com a BEZ235	2.5
$aPI3K_BEZ \rightarrow aPI3K + BEZ$	Dissociação de aPI3K e BEZ235	4.2
$BEZ \rightarrow degradao$	Degradação de BEZ235	0.0787

Tabela 6.2: Lista de reações do modelo com a descrição e constante estocástica que define a *propensity function*.

6.4 Convertendo reações em autômatos

Para a transformação das reações, utilizamos a modelagem apresentada por [98]. Como exemplo, utilizaremos a reação de ativação de AKT por PI3K que ocorreu a uma velocidade γ :



Considere-se um modelo estocástico onde as moléculas são representadas por um valor discreto e inteiro, e a velocidade da reação, por um valor real declarado no sistema, conforme a Figura 6.4a. O autômato da reação (FIGURA 6.4b) é obtido da seguinte forma:

1. A transição no autômato ocorre quando a reação é efetuada;
2. Para a reação ocorrer no exemplo, são necessárias uma molécula de AKT e uma molécula de $aPI3K$. Essa condição é o “guarda” da transição, definida pela expressão $AKT > 0 \ \&\& \ aPI3K > 0$;
3. A reação consome uma AKT e produz uma $aAKT$, além de manter $aPI3K$. Assim, ao executar a transição no autômato, os valores das moléculas são atualizados: $AKT --$, $aAKT ++$;

4. A probabilidade de essa reação ocorrer é definida pelo produto dos reagentes com constante cinética. Assim, neste exemplo, a taxa de atraso para a ocorrência da próxima reação é: $\gamma * AKT * aPI3K$;
5. Caso o sistema possua mais reações, cada uma delas é modelada como um processo paralelo.

Figura 6.4: Modelo PTA de reação de ativação de AKT por PI3K.

(a) Definição e inicialização das variáveis do sistema que representam a quantidade de cada molécula e a velocidade de reação.

```
const double k3a = 0.005;
int aPI3K=0;
int AKT = 100;
int aAKT = 0
```

(b) Autômato que representa a reação.

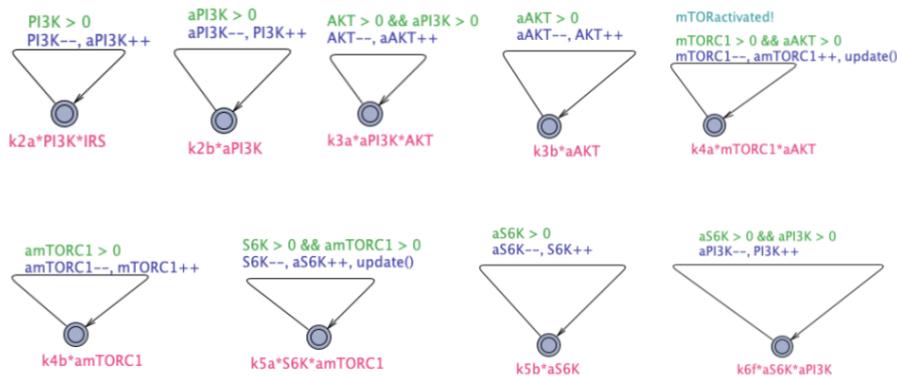


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.5 Modelo formal

Nosso modelo formal compreende um conjunto de PTAs que descrevem cada reação apresentada na Tabela 6.2. Na Figura 6.5 temos alguns exemplos dos PTAs que foram definidos a partir das reações. Em nossa abstração, uma unidade de tempo representa 1 hora e foram utilizadas variáveis do tipo *clock* para representar o tempo decorrido.

Figura 6.5: Alguns autômatos do modelo formal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O momento da administração das substâncias e a dose são controlados por um autômato específico para essa operação. Na Figura 6.6, temos um exemplo desse procedimento, em que BEZ235 é administrada nos tempos 100, 200 e 300 em uma dose de

50 unidades. Esses valores podem ser ajustados, o que torna a modelagem *in silico* uma excelente ferramenta para projetar experimentos *in vivo* ou *in vitro*. O conjunto completo dos autômatos está presente nos Apêndices A-H.

Figura 6.6: Autômato que representa a administração da substância em diferentes momentos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.6 Simulações

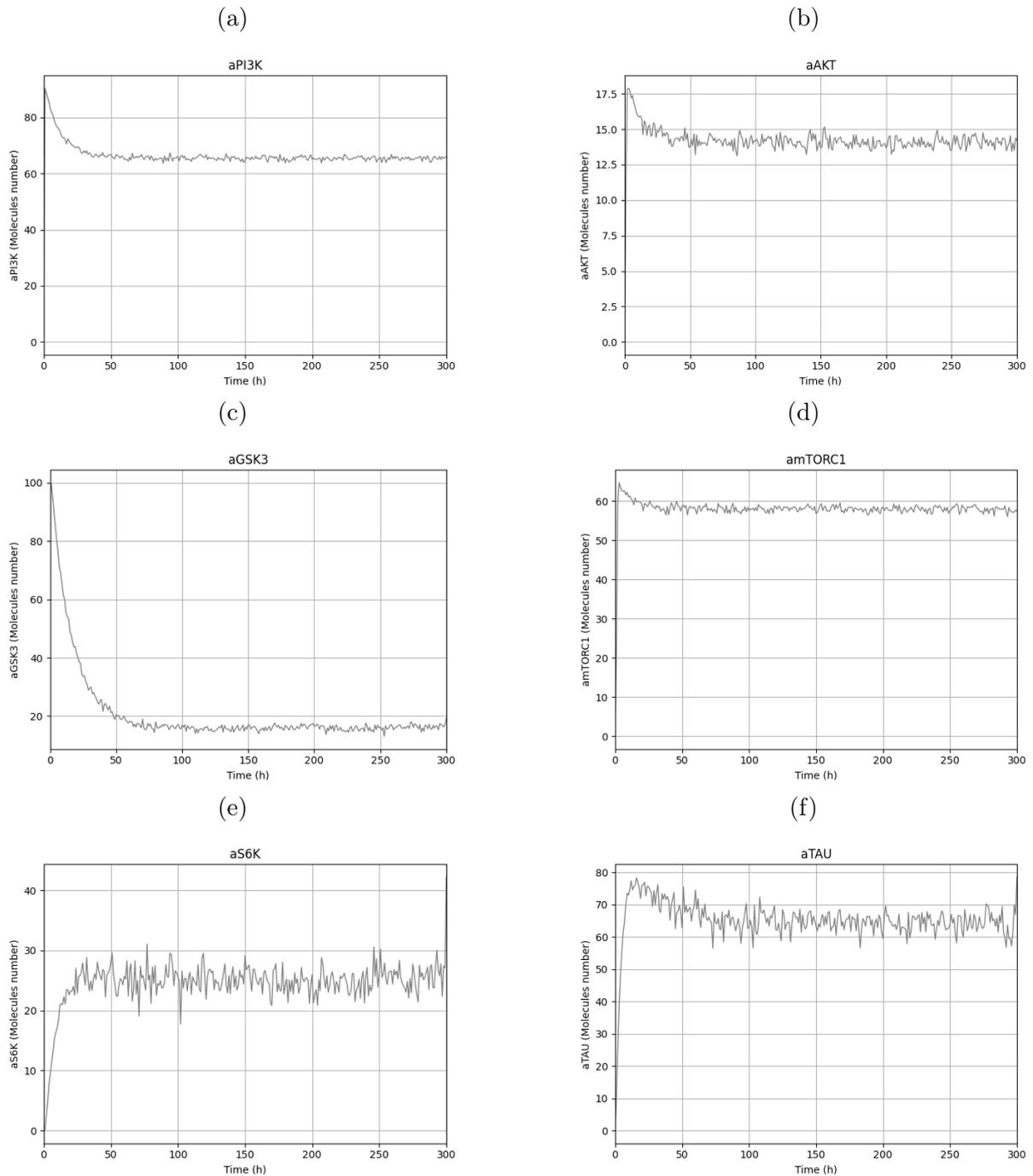
Com o objetivo de calibrar os parâmetros do modelo e averiguar o comportamento das espécies, algumas simulações foram executadas no Uppaal. Os gráficos da Figura 6.7 mostram como a ativação de PI3K, AKT, GSK3 β , mTORC1, S6K e Tau evoluem ao longo do tempo. Observa-se que a última espécie a se estabilizar é GSK3 β que ocorre após o tempo de 75 horas. Nota-se também que o gráfico não possui a característica de uma curva contínua e suave. As oscilações são características do sistema estocástico e pela discretização das variáveis.

O comportamento de fosforilação da tau é mostrado na Figura 6.7f. Esse mesmo comportamento é apresentado também na pesquisa de [47], apesar de existir uma diferença em relação ao tempo e à proporção da proteína fosforilada, que se deve a diferentes estratégias de modelagem (concentração inicial e unidade de tempo, por exemplo).

6.7 Propriedades WMTL verificadas

Com o objetivo de avaliar as eficácias dos potenciais medicamentos na doença de Alzheimer, definimos propriedades WMTL para verificar como algumas variáveis reagem às substâncias avaliadas. O intervalo de probabilidade é calculado considerando 95% de nível de confiança. Para a avaliação das propriedades, utilizamos um computador pessoal de processador 3.6 Ghz i3 Quad-Core com 8 GB de memória DDR4, e a versão 4.1.26 para MAC OS do Uppaal.

Figura 6.7: Comportamento de aPI3K, aAKT, aGSK3, amTORC1 e aS6K. O eixo x é o tempo decorrido, em horas, da simulação, e o eixo y apresenta o número de ativas de cada uma das proteínas. Os gráficos representam o comportamento médio de 100 simulações.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Qual o efeito da substância em $A\beta$?

Propriedade 1: Qual a quantidade média produzida de $A\beta$?

E [$\leq 300, 200$] (max: ABeta)

Propriedade 2: Qual a probabilidade de reduzir a produção de $A\beta$ 5%?

$$\text{Pr}[\leq 300] (\langle \rangle (\text{drugAdded}) \ \&\& \ (\text{ABETA} < 113 * 0.95))$$

O valor 113 foi obtido a partir da Propriedade 1 considerando o cenário controle onde não houve inserção de nenhum composto no modelo.

Qual o efeito da substância na fosforilação de Tau?

Propriedade 3: Qual a probabilidade de a fosforilação de Tau ser reduzida?

$$\text{Pr}[\leq 300] (\langle \rangle \text{aTAU} > \text{TAUactivation.maxATAU} \ \&\& \ \text{drugAdded})$$

Qual o efeito da substância em S6K?

Propriedade 4: Qual a probabilidade de S6K ter o mesmo comportamento de antes da inserção da substância?

$$\text{Pr}[\leq 300] (\langle \rangle (\text{drugAdded}) \ \&\& \ (\text{aS6K} > \text{S6Kactivation.maxAS6K}))$$

6.8 Cenários avaliados

As propriedades WMTL citadas foram verificadas em diferentes doses, que são 50 unidades, 500 unidades para cada candidato a fármaco. Os medicamentos foram inseridos no sistema em uma dose única às 100 horas de evolução do modelo. Esse momento foi determinado considerando que a $GSK3\beta$ é a proteína a se estabilizar próximo desse momento. Também foi avaliado o uso contínuo do medicamento por 7 dias administrando uma dose diária de 50 unidades. O resultado ideal esperado para a administração das substâncias é a redução na formação do peptídeo $A\beta$ e a redução na fosforilação de Tau. Além disso, consideramos que o aumento em uma dessas duas variáveis é desfavorável. Os resultados obtidos são detalhados nos capítulos 7, 8, e 9 com a avaliação da rapamicina, LY294002 e BEZ235, respectivamente.

6.9 Discussão

Neste trabalho desenvolvemos um modelo estocástico formal da via PI3K/AKT/mTOR e o associamos a formação do peptídeo $A\beta$ e a fosforilação de Tau. Esta integração permite avaliar os efeitos de qualquer composto que atue na via nestes biomarcadores da DA. Para isto, a primeira etapa para adicionar um novo fármaco no modelo é a identificação das constantes cinéticas de associação e dissociação com a proteína alvo, e a constante de degradação. Ressalta-se que nosso modelo permite não apenas a análise de uma substância, mas também permite avaliar uma estratégia de compostos combinados com diferentes doses e administradas em momentos distintos através de autômatos que são facilmente ajustados pelo verificador Uppaal.

Na construção do nosso modelo utilizamos os modelos descritos na seção 6.2 para referência inicial dos valores cinéticos das reações. Utilizamos de simulações para ajustarmos estes valores para realizar a integração das variáveis destes diferentes modelos e que elas se comportassem como descrito na literatura. Além do nosso modelo ser o único a apresentar a integração da via PI3K com a DA, somos o primeiro modelo a fazê-lo utilizando uma abordagem estocástica que é uma característica dos sistemas biológicos. Outra novidade do nosso trabalho é a utilização das técnicas de verificação formal para avaliar o comportamento do sistema o que nos permite extrapolar nas análises das variáveis comparadas as técnicas de simulações.

Capítulo 7

Rapamicina

Neste capítulo apresentamos os nossos resultados referentes à eficácia da rapamicina em reduzir a produção do peptídeo amiloide e na redução da fosforilação de Tau. Ao final, apresentamos a discussão e os trabalhos relacionados que corroboram com os nossos resultados *in silico*.

7.1 Resultados

7.1.1 Simulando a administração da rapamicina no sistema

Foi gerado um conjunto de 100 simulações de 300h – tempo do modelo – para diferentes doses da rapamicina inseridas no sistema no tempo 100 e o comportamento das espécies pode ser observado na Figura 7.1. No cenário de administração de 50 unidades da rapamicina no tempo 100, houve uma redução de aS6K e uma manutenção no comportamento de aAKT, aGSK3 e aTAU. A ativação de AKT só sofreu alteração no comportamento à medida que a dose da rapamicina aumentou. Em todos os cenários avaliados, a GSK3 β e Tau fosforilada não apresentaram alterações. Os gráficos da Figura 7.1 mostram o comportamento de cada uma dessas espécies nos diferentes cenários de administração da rapamicina.

As figuras 7.2a e 7.2c mostram o comportamento de PI3K, mTORC1 e S6K, após perturbação do sistema no tempo 100 horas. Podemos visualizar a ação do *feedback* negativo da via. A Figura 7.2a mostra que a inibição da mTORC neste teste não foi suficiente para reduzir a atividade da S6K, conseqüentemente, o aumento da atividade da PI3K. Porém, nos cenários representados pelas figuras 7.2b e 7.2c, percebemos o *feedback* negativo do comportamento. O acionamento desse *feedback* negativo é o responsável pela redução da fosforilação de Tau.

7.1.2 O efeito da rapamicina na formação de $A\beta$

Analisamos a formação de $A\beta$ através de simulação de 200 execuções ao longo de 300 horas do modelo de tempo e não identificamos mudanças significativas nesse processo biológico quando a terapia foi adicionada ao sistema conforme apresentado na Tabela 7.1. Também testamos se o fármaco foi capaz de reduzir pelo menos 5% da formação do peptídeo. A Tabela 7.2 mostra o resultado e endossa a ineficácia da rapamicina nessa resposta biológica.

Cenário	Valor médio de $A\beta$
Sem administração de substâncias	113.30 ± 0.75
50 RAP	113.26 ± 0.69
500 RAP	113.38 ± 0.79
50 unidades de RAP – 1x ao dia por 7 dias.	113.10 ± 0.68

Tabela 7.1: Valor médio da quantidade do peptídeo $A\beta$ após a simulação de 300h de evolução do sistema.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	383	200	55.56 – 65.54
50 RAP	375	218	58.36 – 68.35
500 RAP	384	208	58.09 – 68.09
50 unidades de RAP – 1x ao dia por 7 dias	381	210	55.02 – 65.02

Tabela 7.2: Diferentes cenários foram testados com rapamicina (RAP) o intervalo representa a probabilidade de redução $A\beta$ em 5%. Nesse caso, o valor mais alto é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

7.1.3 O efeito da rapamicina na fosforilação de Tau

Também avaliamos a probabilidade de Tau ser fosforilada após a rapamicina ter sido adicionada ao sistema. Os resultados estão na Tabela 7.3 e revelam que as melhores doses de rapamicina para reduzir a fosforilação de Tau são de 500 unidades de dose. Nessa dose, a probabilidade de a fosforilação de Tau ultrapassar seu pico máximo – que ocorre antes da estabilização do sistema – está entre o intervalo de 5,19% e 15,16%,

enquanto, em um cenário de controle, essa probabilidade está entre 9.94% e 19.94%. Isso significa que a rapamicina reduz a ocorrência de fosforilação de Tau. Além disso, o uso contínuo de rapamicina em 50 unidades tem o mesmo desempenho de apenas uma dose. Há modelos animais que mostram que a fosforilação de Tau é reduzida quando se usa a rapamicina [67, 78] o que corrobora com o nosso modelo.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	245	195	9.94 – 19.94
50 RAP	217	205	7.12 – 17.09
500 RAP	179	153	5.19 – 15.16
50 unidades de RAP – 1x ao dia por 7 dias	217	182	7.73 – 17.72

Tabela 7.3: Diferentes cenários foram testados com rapamicina (RAP) o intervalo representa a probabilidade de aumento da fosforilação de Tau. Nesse caso, o valor mais baixo é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

7.1.4 O efeito da rapamicina em S6K

Os gráficos das figuras 7.2a e 7.2c mostraram que S6K tem o seu comportamento afetado devido a inibição direta de mTORC1 pela rapamicina. Avaliando se é possível S6K restabelecer o seu comportamento, nossas análises mostram que a probabilidade disso ocorrer é abaixo em todas as doses avaliadas conforme apresentado na Tabela 7.4. Observa-se que na dose 500 unidades da rapamicina é o cenário com a menor probabilidade de haver esta recuperação. Se compararmos este cenário com a probabilidade de reduzir a fosforilação de Tau (TABELA 7.3), é o cenário com melhor resultado em fosforilação de Tau.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	313	167	66.75 – 76.74
50 RAP	316	287	21.87 – 31.85
500 RAP	68	59	00.00 – 09.81
50 unidades de RAP – 1x ao dia por 7 dias	199	160	06.51 – 16.49

Tabela 7.4: Diferentes cenários foram testados com rapamicina (RAP) o intervalo representa a probabilidade de recuperação do comportamento S6K sem perturbação O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

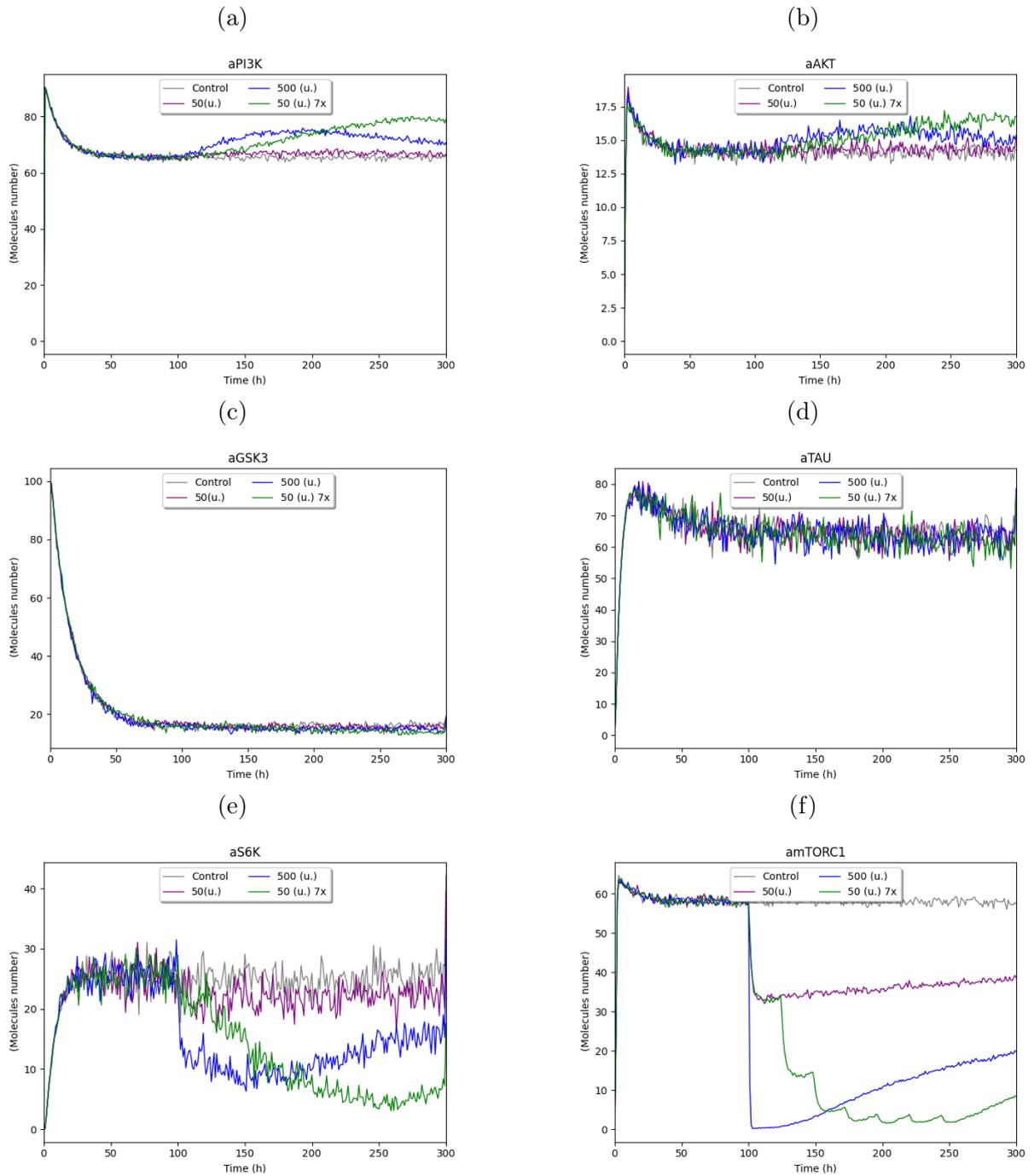
7.2 Discussão

Usando o *Statistical Model Checking*, mostramos que a rapamicina desenvolve um efeito positivo na fosforilação de Tau, reduzindo a probabilidade de esse evento ocorrer. Mostramos também que não é necessário aumentar a dose do fármaco para obter os melhores resultados. Essas compreensões do sistema revelaram a capacidade do SMC de gerar simulações para verificar a propriedade definida, que não foi possível identificar apenas com simulações.

Existem poucos experimentos *in vivo* que podem corroborar com nosso modelo. Os trabalhos de [67] e [78] mostram a redução da fosforilação de Tau após o tratamento com a rapamicina. Além de nosso trabalho mostrar o mesmo resultado, também mostramos que não é necessário aumentar a dosagem de rapamicina para reduzir a fosforilação de Tau. Além disso, mostrou-se que a rapamicina não é capaz de inibir totalmente a S6K, mas a redução da atividade dessa proteína pela rapamicina é suficiente para reduzir a fosforilação de Tau. Nota-se que as doses que dificultam o retorno da atividade normal de S6K coincidem com as doses em que há redução na fosforilação de Tau, o que demonstra que, para a DA, o *feedback* negativo da via pode ser benéfico.

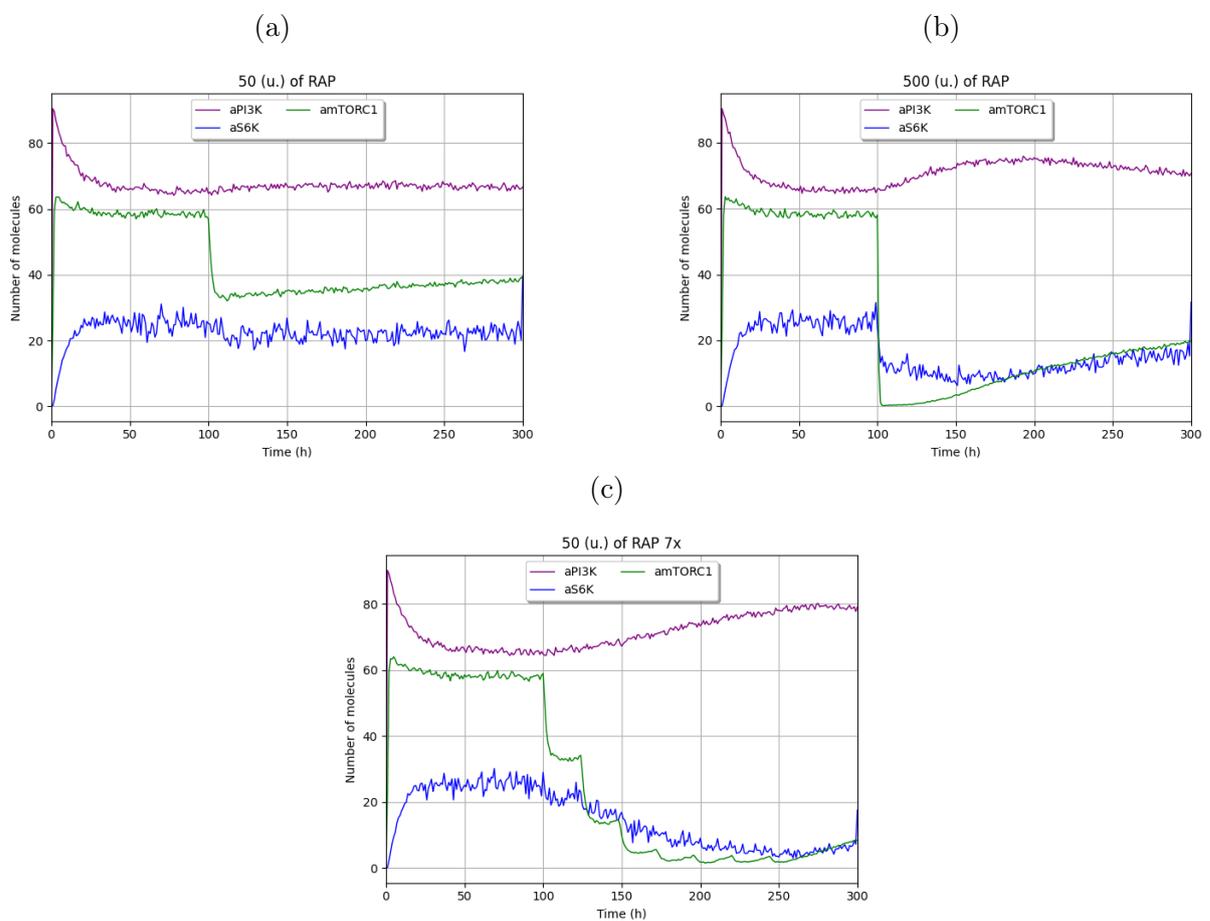
A técnica também confirmou que o fármaco não poderia retardar o processo de formação de $A\beta$, assim como mostra em [91]. Tudo isso indica que nosso modelo pode ser potencialmente usado para projetar e testar, *in silico*, outros potenciais fármacos que têm como alvo a via PI3K/AKT/mTOR, além de analisar suas consequências na doença de Alzheimer.

Figura 7.1: Comportamento das espécies com a administração da rapamicina no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7.2: Comportamento de aPI3K, aAKT, amTORC1, e aS6K nas diferentes dosagens da rapamicina



Fonte: Elaborado pelo autor.

Capítulo 8

LY294002

Neste capítulo apresentamos os nossos resultados referentes à eficácia da LY294002 em reduzir a produção do peptídeo amiloide e na redução da fosforilação de Tau.

8.1 Resultados

8.1.1 Simulação da administração da LY294002 no sistema

Com o intuito de observar o efeito da LY294002 no sistema, 100 simulações de 300 horas foram geradas, para diferentes doses. Além dos cenários em que administramos apenas a LY294002, avaliamos também o comportamento do sistema quando ela é inserida combinada com a rapamicina. Dessa forma, pudemos observar a resposta do sistema quando ocorre a inibição de duas variáveis do modelo. Para esse cenário, utilizamos o IC_{50} desses compostos em nosso modelo, que são 50 unidades de LY294002 e 50 unidades da rapamicina.

Com base na análise da Figura 8.1b e da Figura 8.1f, nota-se que aAKT e amTORC1, respectivamente, têm o seu comportamento alterado para quaisquer doses de LY294002. A alteração em aGSK3 só é perceptível quando se insere a substância bioativa 7 vezes em um intervalo de 24 horas, como se pode observar na Figura 8.1c. A mesma resposta é observada em aTAU (FIGURA 8.1d). Já em relação a S6K, não é possível notar alteração em nenhum dos cenários, como mostra a Figura 8.1f.

Ao analisar a resposta de cada cenário em aPI3K, amTORC1, e aS6K como mostram as figuras 8.2a e 8.2d, constatamos que amTORC1 tem sua atividade reduzida por ser um downstream da inibição de PI3K, mas que isso não ocorre com aS6K. Assim, não há uma ativação do mecanismo de *feedback* negativo da via.

8.1.2 O efeito de LY294002 na formação de $A\beta$

Nos cenários testados, apenas o uso diário por 7 dias apresentou um aumento acima do desvio padrão do cenário sem administração da substância (TABELA 8.1). Entretanto, a técnica SMC mostrou que neste mesmo cenário é possível reduzir em 5% a formação do peptídeo $A\beta$ como apresentado na Tabela 8.2. Também, observa-se que a LY294002 tem potencial em abrandar em 5% a produção de $A\beta$ em todos os outros cenários quando administrada individualmente. Por outro lado, quando administrada junto com a rapamicina ocorre o efeito contrário.

Cenário	Valor médio de $A\beta$
Sem administração de substâncias	113.30 ± 0.75
50 LY294002	114.10 ± 1.73
500 LY294002	112.85 ± 2.08
50 unidades de LY294002 – 1x ao dia durante 7 dias	115.90 ± 0.6
50 LY294002 + 50 RAP	113.00 ± 0.74

Tabela 8.1: Valor médio da quantidade do peptídeo $A\beta$ após a simulação de 300h de evolução do sistema.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	383	200	55.56 – 65.54
50 LY294002	390	387	62.08 – 72.07
500 LY294002	380	433	62.46 – 72.44
50 unidades de LY294002 – 1x ao dia durante 7 dias	380	901	60.35 – 70.35
50 LY294002 + 50 RAP	363	334	52.84 – 62.84

Tabela 8.2: Diferentes cenários foram testados com LY294002; o intervalo representa a probabilidade de redução $A\beta$ em 5%. Nesse caso, o valor mais alto é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

8.1.3 O efeito de LY294002 na fosforilação de Tau

Por ser um inibidor da PI3K, a LY294002 altera o comportamento de AKT e pode influenciar na alteração da $GSK3\beta$. Conseqüentemente, espera-se uma resposta

da substância na fosforilação de Tau. Em todos os cenários avaliados mostra-se que há uma maior probabilidade de a proteína Tau ser fosforilada, assim como apresentado na Tabela 8.3. Nossos resultados também revelam que a administração da rapamicina combinada com LY294002 não é suficiente para uma melhora nesse resultado.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	245	195	9.94 – 19.94
50 LY294002	291	516	17.09 – 27.08
500 LY294002	338	723	27.55 – 37.53
50 unidades de LY294002 – 1x ao dia durante 7 dias	386	1408	48.98 – 58.96
50 LY294002 + 50 RAP	324	583	18.74 – 28.73

Tabela 8.3: Diferentes cenários foram testados com LY294002; o intervalo representa a probabilidade de aumento da fosforilação de Tau. Nesse caso, o valor mais baixo é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

8.1.4 O efeito de LY294002 em S6K e no feedback negativo da via

Os nossos resultados, detalhados na Tabela 8.4, mostram que LY294002 produz um pequeno impacto no comportamento de S6K quando administrada em dose única isolada ou combinada com a rapamicina. Contudo, no uso contínuo, temos que a recuperação de S6K é prejudicada.

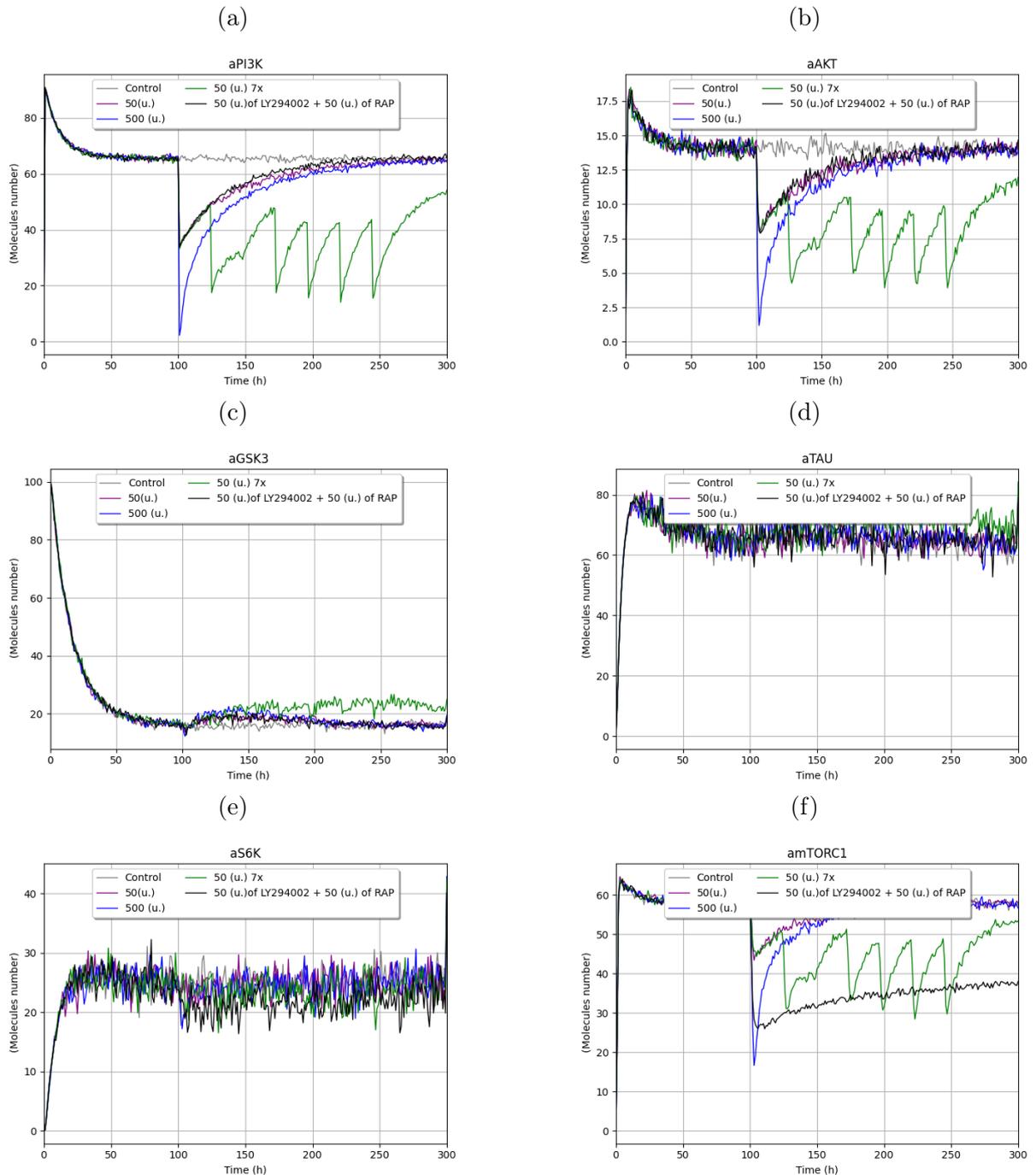
Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	313	167	66.75 – 76.74
50 LY294002	351	487	63.42 – 73.40
500 LY294002	378	743	61.90 – 71.89
50 LY294002 – 1x ao dia durante 7 dias	402	1454	66.63 – 76.60
50 LY294002 + 50 RAP	354	489	40.26 – 50.26

Tabela 8.4: Diferentes cenários foram testados com LY294002; o intervalo representa a probabilidade de recuperação do comportamento S6K sem perturbação O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

8.2 Discussão

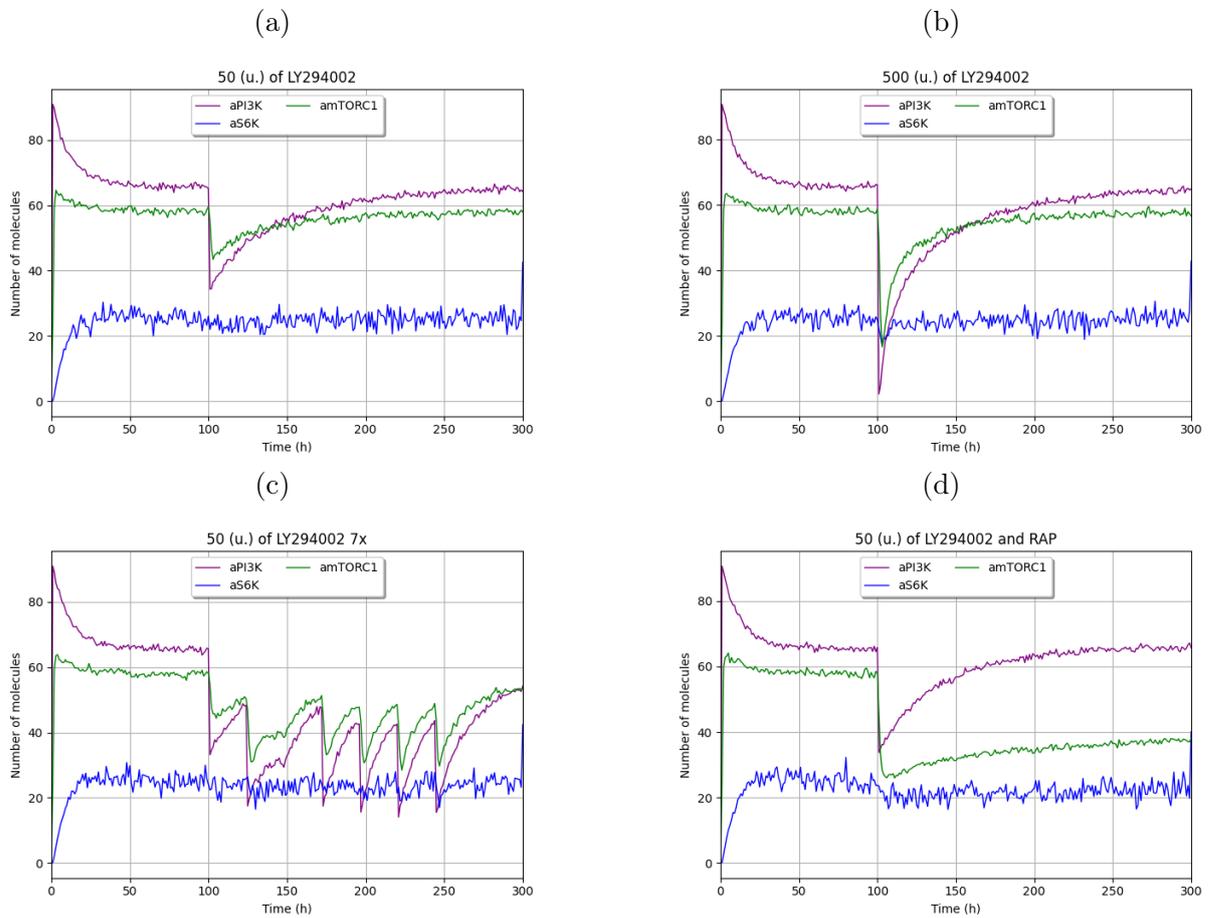
Podemos constatar que a LY294002 tem potencial em reduzir a produção do peptídeo $A\beta$ e pode contribuir para uma aceleração na fosforilação de Tau. Entretanto, a substância tem uma grande probabilidade de acelerar a fosforilação de Tau. Isso era esperado porque a modulação de $GSK3\beta$, quinase responsável por fosforilar Tau, é um downstream de PI3K. Entretanto, nossos resultados mostraram que, mesmo com a utilização da rapamicina, não foi possível reverter essa resposta. Uma das possíveis razões é que a dose da rapamicina utilizada não é a suficiente para acionar o mecanismo de *feedback* negativo através da inibição de S6K. Apesar de LY294002 não ser um composto clinicamente viável, ela tem a sua importância no estudo da via PI3K/AKT/mTOR em revelar e quantificar que inibidores de PI3K podem induzir um quadro patológico.

Figura 8.1: Comportamento das espécies com a administração da LY294002 no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8.2: Comportamento de aPI3K, amTORC1, e aS6K nas diferentes dosagens da LY294002. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Capítulo 9

NVP-BEZ235

Neste capítulo apresentamos os nossos resultados referentes à eficácia da NVP-BEZ235 em reduzir a produção do peptídeo amiloide e na redução da fosforilação de Tau.

9.1 Resultados

9.1.1 Simulando a administração da BEZ no sistema

As figuras 9.1a e 9.1f mostram como cada uma das proteínas evoluíram ao longo de 300 horas (tempo de modelo) de simulação para as diferentes doses de BEZ235 que foi inserida no tempo 100. A Figura 9.1a mostra a inibição de PI3K pela substância, e observa-se que AKT replica o mesmo comportamento como mostra a Figura 9.1b. Observa-se que uma única dose de 500 unidades ou a inserção de 50 unidades de BEZ235 uma vez ao dia durante 7 dias provocam uma maior ativação de GSK3 β (Figura 9.1c) e, em resposta a isto, a fosforilação de Tau (Figura 9.1d) também aumenta nessas doses. Além disso, essas doses são capazes de alterar o comportamento de S6K (Figura 9.1e). Podemos observar na Figura 9.1f que após a administração de BEZ235 há uma tendência de se manter a inibição de mTORC1 por um longo período, diferentemente do que ocorre com PI3K.

Nas figuras 9.2a e 9.2c temos os gráficos do comportamento de PI3K, mTORC1, e S6K para cada um dos cenários. Podemos observar, que a dose de 50 unidades de BEZ235 não afeta o comportamento de S6K. Já nas doses de 500 unidades em dose única e 50 unidades inseridas continuamente a cada 24 horas altera o comportamento de S6K. Além disso, apesar de BEZ235 ser um inibidor de PI3K, nota-se que o número de moléculas ativas de PI3K aumenta quando há inibição de S6K.

9.1.2 O efeito de BEZ235 na formação de $A\beta$

Ao se avaliar a formação do peptídeo $A\beta$, a NVP-BEZ235 mostrou que pode provocar um aumento no número médio dessa proteína na dose de 500 unidades ou quando administrada 1 vez ao dia por uma semana. Em ambas as estratégias os valores obtidos foram próximos, como apresentado na Tabela 9.1. Entretanto, ao avaliar a capacidade da substância em reduzir em 5% a formação do peptídeo, estes cenários se mantiveram similares ao cenário controle como descrito na Tabela 9.2. Isto mostra uma das vantagens da utilização da técnica SMC em relação aos métodos tradicionais como a simulação a qual pode observar esta melhora neste biomarcador.

Cenário	Valor médio de $A\beta$
Sem administração de substâncias	113.30 ± 0.75
50 NVP-BEZ235	113.44 ± 0.52
500 NVP-BEZ235	119.99 ± 0.65
50 NVP-BEZ235 – 1x ao dia durante 7 dias	119.78 ± 0.78

Tabela 9.1: Valor médio da quantidade do peptídeo $A\beta$ após a simulação de 300h de evolução do sistema.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	383	200	55.56 – 65.54
50 NVP-BEZ235	371	252	54.32 – 64.30
500 NVP-BEZ235	386	216	55.28 – 65.28
50 NVP-BEZ235 – 1x ao dia durante 7 dias	377	305	52.85 – 62.85

Tabela 9.2: Diferentes cenários foram testados com NVP-BEZ235; o intervalo representa a probabilidade de redução $A\beta$ em 5%. Nesse caso, o valor mais alto é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

9.1.3 O efeito BEZ235 na fosforilação de Tau

A NVP-BEZ235, mesmo sendo um inibidor duplo de PI3K e mTORC1, mostrou que ela pode aumentar a probabilidade de fosforilar a Tau como pode ser observado na Tabela 9.3. Comparando com as mesmas doses de LY294002, a NVP-BEZ235 tem um maior potencial em acelerar esse processo.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	245	195	9.94 – 19.94
50 NVP-BEZ235	326	356	18.92 – 19.95
500 NVP-BEZ235	124	94	85.89 – 95.86
50 NVP-BEZ235 – 1x ao dia durante 7 dias	79	78	90.19 – 100

Tabela 9.3: Diferentes cenários foram testados com NVP-BEZ235; o intervalo representa a probabilidade de aumento da fosforilação de Tau. Nesse caso, o valor mais baixo é melhor para o tratamento de Alzheimer. O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

9.1.4 O efeito de BEZ235 em S6K e no feedback negativo da via

Em todos os cenários avaliados o comportamento de S6K foi afetado com a administração de BEZ235. Observa-se na Tabela 9.4 que esta alteração é mais acentuada com a maior dose, 500 unidades, sendo que neste cenário S6K tem a menor probabilidade de retornar com o seu comportamento padrão.

Cenário	Número de simulações	Tempo (s)	Intervalo de probabilidade
Sem administração de substâncias	313	167	66.75 – 76.74
50 NVP-BEZ235	328	374	24.36 – 34.34
500 NVP-BEZ235	29	42	0.00 – 9.81
50 NVP-BEZ235 – 1x ao dia durante 7 dias	124	179	7.12 – 17.08

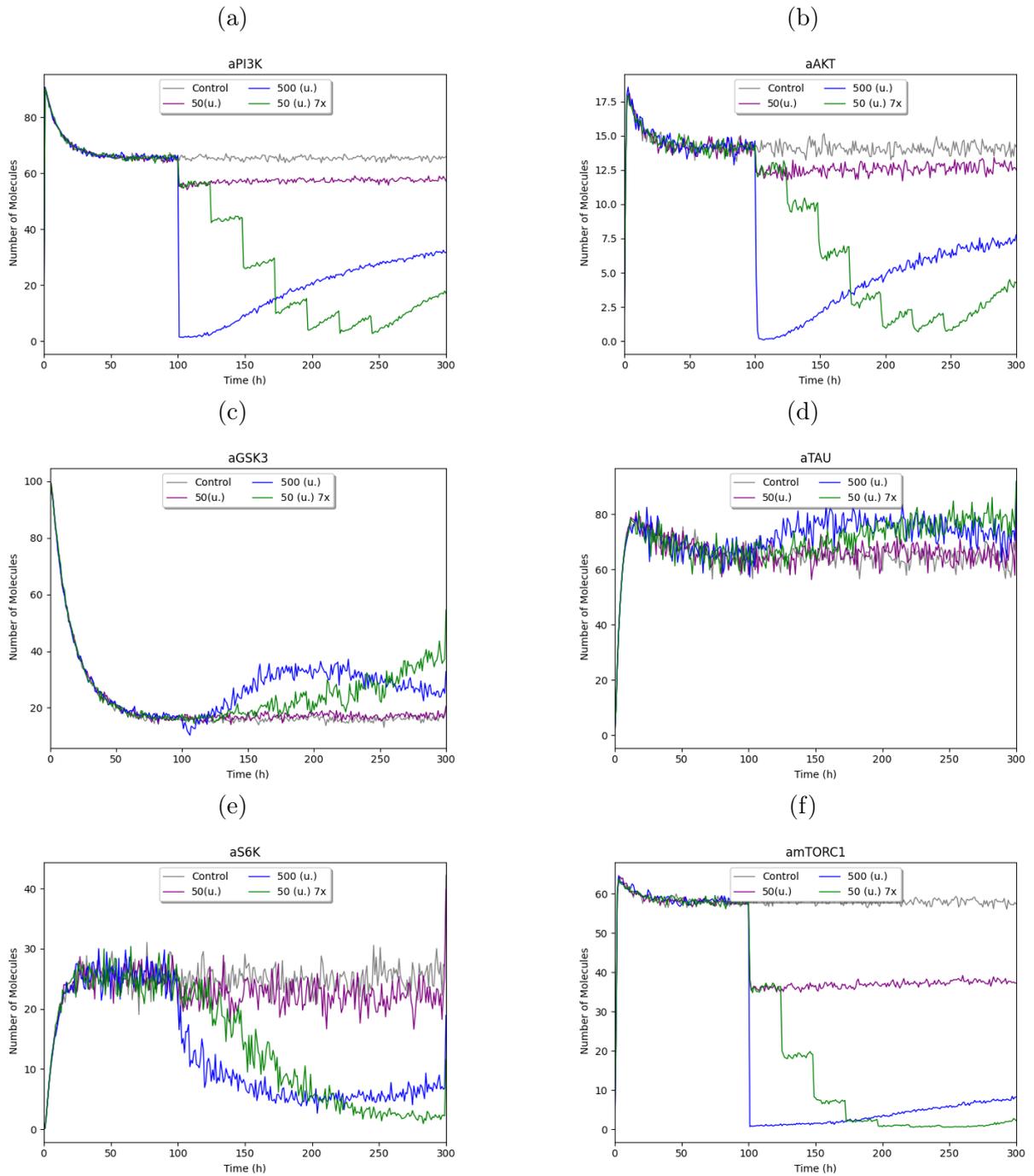
Tabela 9.4: Diferentes cenários foram testados com NVP-BEZ235; o intervalo representa a probabilidade de recuperação do comportamento S6K sem perturbação O intervalo de probabilidade é dado considerando 95% de confiança.

9.2 Discussão

A BEZ235 mostrou ser um potente inibidor de PI3K e mTORC e capaz de aumentar a fosforilação de Tau tanto no cenário de dose única do candidato a fármaco quanto no uso contínuo o que pode ser maléfico e levar a morte neuronal. Em relação a formação do peptídeo $A\beta$, BEZ235 não apresentou uma grande melhora comparada ao cenário controle. Este efeito de BEZ235 em $A\beta$ difere com os encontrados em modelos animais

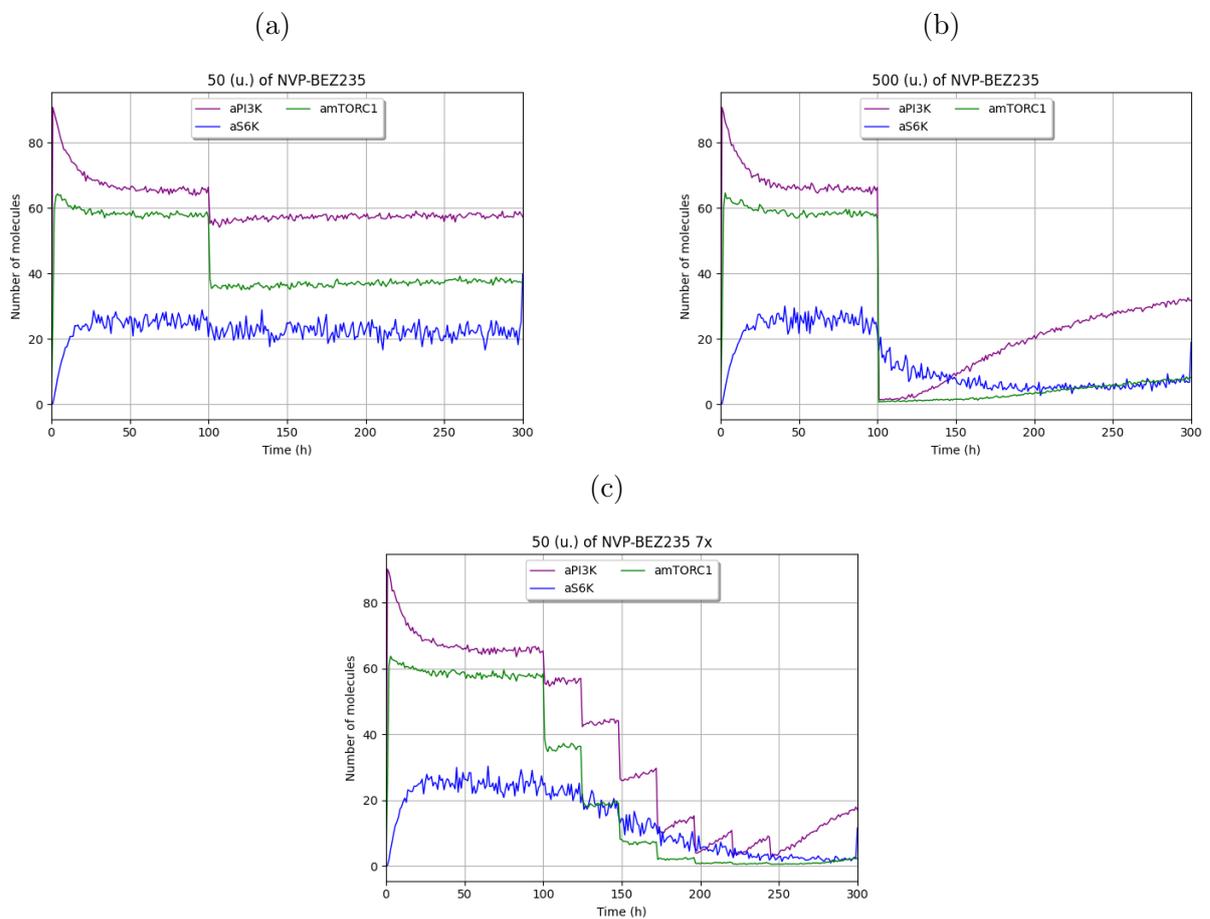
apresentados por [5, 6] que mostraram uma redução no peptídeo. Apesar dos nossos resultados divergirem dos obtidos em experimentos com animais em relação ao aumento da formação do peptídeo $A\beta$, é importante frisar que tal diferença pode estar associada aos valores das doses administradas e que a nossa abstração não contempla outros processos biológicos como a autofagia.

Figura 9.1: Comportamento das espécies com a administração da BEZ235 no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9.2: Comportamento das espécies com a administração da BEZ235 no tempo 100h. O eixo x representa a evolução do tempo de simulação e o eixo y representa a proporção da molécula ativa em relação ao total de moléculas. O cenário controle é onde não há a perturbação do sistema com nenhum composto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Capítulo 10

Conclusão

10.1 Discussão

Apresentamos um modelo formal da via PI3K/AKT/mTOR e sua contribuição na formação do peptídeo $A\beta$ e na fosforilação de Tau, que são os dois principais biomarcadores da doença de Alzheimer. Dessa forma, é possível avaliar como estes biomarcadores se comportam quando uma substância, ou a combinação de substâncias, que atuam em alguma variável da via são administradas no sistema. Além disso, a modelagem estocástica aproxima a nossa abstração do comportamento aleatório inerente dos sistemas biológicos. O nosso modelo é robusto e adaptável para avaliar qualquer substância que atue na via. Uma limitação, não apenas da nossa abordagem, mas das técnicas *in silico*, é a necessidade de identificar os parâmetros cinéticos na literatura ou a disponibilidade de dados que nos permitam calcular esses parâmetros. Embora em muitos casos seja possível determinar esses valores, existem situações em que é inviável ou difícil de fazê-lo.

Nosso modelo permite testar diferentes estratégias farmacológicas, como doses, momentos de administração e até combinação de substâncias. Neste trabalho, avaliamos o impacto da administração da rapamicina, LY294002, e NVP-BEZ235 na formação de $A\beta$ e na fosforilação de Tau. Esperava-se que os compostos fossem capazes de reduzir a formação de $A\beta$ e/ou fosforilação de Tau. Usando o *Statistical Model Checking*, mostramos que a rapamicina desenvolve um efeito positivo na fosforilação da Tau, reduzindo a probabilidade desse evento. Este comportamento da Tau na presença de rapamicina foi observado em modelos animais [67, 78] e demonstra um potencial da rapamicina a ser reposicionado para outras taupatias. Nossos resultados não reproduziram a redução da formação de $A\beta$ após o tratamento com rapamicina como descrito em [91]. Um dos motivos dessa divergência é que a rapamicina pode atuar em outras variáveis biológicas não presentes no modelo atual, como o aumento da atividade autofágica, que pode ser responsável por reduzir a formação do peptídeo $A\beta$.

Ao contrário da rapamicina, a LY294002 reduziu a formação de $A\beta$. Entretanto, o fármaco aumentou a probabilidade de fosforilação da Tau. Para mitigar esse efeito

colateral, também testamos se a administração de LY294002 combinada com rapamicina exerceria algum efeito na doença de Alzheimer. No entanto, o cenário testado com esta combinação não foi eficaz – a inibição de PI3K por LY294002 tem uma resposta mais rápida na fosforilação de Tau do que o *feedback* negativo iniciado pela inibição de mTORC1 pela rapamicina.

Além disso, analisamos o efeito de NVP-BEZ235 na doença de Alzheimer, que se revelou um potente inibidor de PI3K e mTORC1. O composto também aumentou a fosforilação da Tau, que pode ser considerada prejudicial e pode levar à morte neuronal. O NVP-BEZ235 é um novo candidato a fármaco em ensaios clínicos para o tratamento do câncer e existem poucos trabalhos relacionados à doença de Alzheimer que descrevem a melhora nos déficits cognitivos e redução nas placas $A\beta$, mas não há trabalho experimental avaliar o efeito na fosforilação da Tau.

A Tabela 10.1 resume nossas análises e em todos os cenários testados não alcançamos o resultado ideal para a redução da fosforilação de $A\beta$ e Tau. No entanto, temos uma nova e importante percepção de que os compostos que inibem a PI3K provavelmente aumentarão a fosforilação da Tau. Isto expõe os riscos de efeito colateral ao inibir uma quinase que esteja no início de uma via de sinalização. Revelamos que mesmo substância de dupla inibição, como NVP-BEZ235, ou a administração de outra substância como rapamicina, não foram capazes de mitigar o efeito deletério da inibição de PI3K na fosforilação da Tau. Nossos resultados indicam a importância de avaliar a hiperfosforilação de Tau em experimentos *in vivo* e/ou *in silico* considerando o impacto desta reação na doença de Alzheimer e em outras taupatias.

É importante salientar a importância da técnica SMC para a obtenção desses resultados. Para cada propriedade e para cada cenário, um número diferente de simulações foi gerado, para que a resposta fosse dada com 95% de confiança. Ainda assim, apesar dos poucos trabalhos publicados referentes ao comportamento de Tau após a administração das substância bioativas abordadas neste trabalho, nossas análises qualitativas são similares ao relatado por [67, 78] indicando que nossa abstração tem representatividade em modelos animais. A técnica mostrou-se eficiente na verificação das propriedades considerando o baixo tempo computacional de processamento sem a necessidade de grandes recursos computacionais que normalmente são requeridos nas abordagens numéricas tradicionais.

Considerando que a via PI3K/mTOR está envolvida em diferentes outras doenças tais como as neoplasias e metabólicas, o modelo pode ser adaptado para a avaliação dos efeitos de substâncias bioativas também nestas anomalias após os ajustes no modelo a fim de representar as especificidades da doença em estudo. Além disso, a metodologia proposta pode ser aplicada a outras vias de sinalização e doenças tornando uma ferramenta útil para análises de efeitos colaterais e toxicidades dos compostos que têm potencial a serem reposicionados. Contudo, para isto, é necessário a obtenção dos valores cinéticos

das reações ou de dados que possibilite o cálculo destes parâmetros. Esta é uma das limitações da nossa abordagem considerando que nem sempre estas informações estão disponíveis.

Cenário	Formação de $A\beta$	Fosforilação de Tau
Ideal	↓	↓
50 RAP	-	↓
500 RAP	-	↓
50 RAP 1x ao dia por 7 dias	-	↓
50 LY294002	↓	↑
500 LY294002	↓	↑
50 LY294002 1x ao dia por 7 dias	↓	↑
50 LY294002 + 50 RAP	↓	↑
50 NVP-BEZ235	-	↑
500 NVP-BEZ235	-	↑
50 BEZ 1x ao dia por 7 dias	-	↑

Tabela 10.1: Sumário do resultado de cada molécula nas variáveis verificadas. O cenário ideal é uma estratégia capaz de reduzir a produção de $A\beta$ e a fosforilação da Tau. Nenhum dos cenários testados em nosso modelo alcançou tal resultado.

10.2 Considerações finais

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa em que um dos sintomas é a perda severa da memória. Trata-se do caso mais comum de demência, e a expectativa é que as ocorrências da doença cresçam com o envelhecimento da população. Alguns dos desafios da doença são a identificação de um biomarcador confiável para seu diagnóstico precoce e a falta de estratégias efetivas de prevenção e de tratamento.

Uma estratégia que pode ser utilizada é o reposicionamento de drogas, o qual permite a redução de custos e do tempo de testes, tendo em vista que algumas etapas até a aprovação não precisam ser refeitas. Além disso, modelos computacionais podem contribuir para essas pesquisas, pois as ferramentas computacionais de simulação, análise e verificação de modelos possibilitam que hipóteses e estratégias farmacológicas sejam experimentadas antes de testes *in vitro* e/ou *in vivo*.

Dessa forma, desenvolvemos um modelo estocástico formal da via PI3K/AKT/mTOR que vem sendo estudada devido ao seu potencial em reduzir as placas amiloides através do processo de autofagia. Contudo, esta via possui associações com a GSK3 β que é uma quinase conhecida por participar dos processos de fosforilação de Tau e na formação do peptídeo $A\beta$. Dessa forma, integramos a via com estes dois biomarcadores da doença

de Alzheimer tornando a nossa abstração apta a avaliar, *in silico*, os efeitos nestes biomarcadores de diferentes substâncias, ou a combinação entre elas, que atuem em alguma variável da via.

Utilizamos o Uppaal, que é um verificador SMC, para analisar as propriedades do modelo, codificadas em lógica temporal. Neste trabalho, mostramos o impacto da rapamicina, LY294002 e NVP-BEZ235, em diferentes cenários na doença de Alzheimer. Identificamos que a inibição de PI3K por LY294002 e NVP-BEZ235. Espera-se que esse comportamento ocorra com qualquer substância que atue para inibir essa proteína. Também mostramos que a rapamicina não foi capaz de mitigar o efeito colateral do LY294002. Ressaltamos que estes resultados foram identificados devido a capacidade do Uppaal em avaliar as propriedades gerando simulações de forma eficientes, e, que, com apenas o processo de simulação, poderiam não ser detectados. Dessa forma, esperamos contribuir para apresentar a eficiência da área de verificação formal em auxiliar no desenho experimental de estratégias farmacológicas que possam ser aplicadas não apenas na doença de Alzheimer, mas como outras doenças que atingem a população e ainda não há tratamento.

10.3 Trabalhos futuros

Neste trabalho suscitamos a hipótese de que compostos que inibem PI3K têm uma maior probabilidade de aumentar a fosforilação da Tau, o que poderia ser maléfico para o paciente. Dessa forma, pretendemos explorar mais nesta descoberta executando experimentos laboratoriais para avaliar essa hipótese. Adquirimos anticorpos Tau e p-Tau para os experimentos que serão executados. Além disso, pretendemos avaliar outras substâncias bioativas análogas à rapamicina considerando que este fármaco apresentou ter um potencial na redução na fosforilação, podendo, assim, contribuir não apenas para a Doença de Alzheimer mas em outras taupatias.

No âmbito da modelagem *in silico* pretendemos avaliar outros medicamentos que atuam na via para identificar outros fármacos, ou a combinação de fármacos, que tenham potencial em mitigar os efeitos da doença de Alzheimer. Além disso, pretendemos expandir o modelo com novas variáveis que abstraem o processo de autofagia que pode contribuir diretamente na redução das placas amiloides. Como não há modelos que descrevem estas reações, buscaremos dados brutos experimentais para aplicarmos técnicas de estimativa de parâmetros para a abstração destas reações.

Referências

- [1] Alan Aderem. Systems biology: Its practice and challenges. *Cell*, 121(4):511–513, May 2005.
- [2] Gul Agha and Karl Palmskog. A survey of statistical model checking. *ACM Transactions on Modeling and Computer Simulation*, 28:1–39, 2018.
- [3] Rajeev Alur and David L. Dill. A theory of timed automata. *Theoretical Computer Science*, 126:183–235, 1994.
- [4] Karim Belarbi and Susanna Rosi. Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 2013.
- [5] Paula Maria Quaglio Bellozi, Isabel Vieira de Assis Lima, Juliana Guimarães Dória, Érica Leandro Marciano Vieira, Alline Cristina Campos, Eduardo Candelario-Jalil, Helton José Reis, Antônio Lúcio Teixeira, Fabíola Mara Ribeiro, and Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid- β 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment. *Scientific Reports*, 6(1), May 2016.
- [6] Paula Maria Quaglio Bellozi, Giovanni Freitas Gomes, Leonardo Rossi de Oliveira, Isabella Guimarães Olmo, Érica Leandro Marciano Vieira, Fabíola Mara Ribeiro, Bernd L. Fiebich, and Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. NVP-BEZ235 (dactolisib) has protective effects in a transgenic mouse model of alzheimer’s disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10, November 2019.
- [7] Sergey Berezin, Sérgio Vale Aguiar Campos, and Edmund M. Clarke. Compositional reasoning in model checking. In *Revised Lectures from the International Symposium on Compositionality: The Significant Difference*, COMPOS’97, pages 81–102, London, UK, UK, 1998. Springer-Verlag.
- [8] Kiran Bhaskar, Megan Miller, Alexandra Chludzinski, Karl Herrup, Michael Zagorski, and Bruce T Lamb. The PI3k-akt-mTOR pathway regulates $\alpha\beta$ oligomer induced neuronal cell cycle events. *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), March 2009.
- [9] B. Bollig and I. Wegener. Improving the variable ordering of OBDDs is NP-complete. *Computers, IEEE Transactions on*, 45(9):993–1002, sep 1996.

- [10] Jordi Bové, Marta Martínez-Vicente, and Miquel Vila. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(8):437–452, July 2011.
- [11] Benot Boyer, Kevin Corre, Axel Legay, Sean Sedwards, Benot Boyer, Kevin Corre, Axel Legay, and Sean Sedwards Plasma-lab A Flexible. PLASMA-lab : A Flexible , Distributable Statistical Model Checking Library To cite this version : HAL Id : hal-01088411. In *Quantitative Evaluation of Systems (QEST 2013)*, volume 8054 of *LNCS*, pages 160–164. Springer, 2013.
- [12] Fernando Braz, João Amaral, Bruno Ferreira, Jader Cruz, Alessandra Faria-Campos, and Sérgio Campos. A probabilistic model checking analysis of the potassium reactions with the palytoxin and na^+/k^+ -ATPase complex. In *Advances in Bioinformatics and Computational Biology*, pages 181–193. Springer International Publishing, 2013.
- [13] Randal E. Bryant. Graph-based algorithms for boolean function manipulation. *IEEE Trans. Comput.*, 35:677–691, August 1986.
- [14] Peter Bulychev, Alexandre David, Kim Guldstrand Larsen, Axel Legay, Guangyuan Li, Danny Bøgsted Poulsen, and Amelie Stainer. Monitor-Based Statistical Model Checking for Weighted Metric Temporal Logic. *Electronic Proceedings in Theoretical Computer Science*, 7180:168–182, 2012.
- [15] Peter Bulychev, Alexandre David, Kim Gulstrand Larsen, Marius Mikučionis, Danny Bøgsted Poulsen, Axel Legay, and Zheng Wang. UPPAAL-SMC: Statistical Model Checking for Priced Timed Automata. *Electronic Proceedings in Theoretical Computer Science*, 85(Qapl):1–16, 2012.
- [16] Eugene C Butcher, Ellen L Berg, and Eric J Kunkel. Systems biology in drug discovery. *Nature Biotechnology*, 22(10):1253–1259, October 2004.
- [17] Rita Cacace, Kristel Slegers, and Christine Van Broeckhoven. Molecular genetics of early-onset alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & Dementia*, 12(6):733–748, March 2016.
- [18] Campos, Clarke, Marrero, Minea, and Hiraishi. Computing quantitative characteristics of finite-state real-time systems. In *1994 Proceedings Real-Time Systems Symposium*, pages 266–270. IEEE Comput. Soc. Press, 1994.
- [19] Sérgio Campos, Edmund M Clarke, and Marius Minea. Symbolic techniques for formally verifying industrial systems. *SCIENCE OF COMPUTER PROGRAMMING*, 29:79–98, 1997.

- [20] Miguel Carrillo, Pedro A. Góngora, and David A. Rosenblueth. An overview of existing modeling tools making use of model checking in the analysis of biochemical networks. *Frontiers in Plant Science*, 3:1–13, 2012.
- [21] Daniel C. Cho, Matthew B. Cohen, David J. Panka, Michael Collins, Musie Ghebremichael, Michael B. Atkins, Sabina Signoretti, and James W. Mier. The efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 compared with rapamycin in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 16(14):3628–3638, July 2010.
- [22] Daniel D. Christensen. Alzheimer's disease: Progress in the development of anti-amyloid disease-modifying therapies. *CNS Spectrums*, 12(2):113–123, February 2007.
- [23] E. M. Clarke, E. A. Emerson, and A. P. Sistla. Automatic verification of finite-state concurrent systems using temporal logic specifications. *ACM Trans. Program. Lang. Syst.*, 8:244–263, April 1986.
- [24] E. M. Clarke, Orna Grumberg, and Doron A. Peled. *Model checking*. MIT Press, 1999.
- [25] Edmund Clarke and E. Emerson. Design and synthesis of synchronization skeletons using branching time temporal logic. In Dexter Kozen, editor, *Logics of Programs*, volume 131 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 52–71. Springer Berlin / Heidelberg, 1982. 10.1007/BFb0025774.
- [26] Edmund M. Clarke, James R. Faeder, Christopher J. Langmead, Leonard A. Harris, Sumit Kumar Jha, and Axel Legay. Statistical model checking in BioLab: Applications to the automated analysis of T-Cell receptor signaling pathway. In *Proceedings of the 6th International Conference on Computational Methods in Systems Biology*, CMSB '08, pages 231–250, Berlin, Heidelberg, 2008. Springer-Verlag.
- [27] Edmund M Clarke, Jr, Orna Grumberg, and Doron Peleg. *Model Checking*. The Cyber-Physical Systems Series. MIT Press, London, England, December 1999.
- [28] E.M. Clarke, E.A. Emerson, S. Jha, and A.P. Sistla. Symmetry reductions in model checking. In AlanJ. Hu and MosheY. Vardi, editors, *Computer Aided Verification*, volume 1427 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 147–158. Springer Berlin Heidelberg, 1998.
- [29] Jeffrey Cummings, Garam Lee, Kate Zhong, Jorge Fonseca, and Kazem Taghva. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 7(1), January 2021.

- [30] Alexandre David, Dehui Du, Kim G. Larsen, Axel Legay, Marius Mikučionis, Danny Bøgsted Poulsen, and Sean Sedwards. Statistical Model Checking for Stochastic Hybrid Systems. *Electronic Proceedings in Theoretical Computer Science*, 92:122–136, 2012.
- [31] Alexandre David, Kim G. Larsen, Axel Legay, Marius Mikučionis, Danny Bøgsted Poulsen, Jonas Van Vliet, and Zheng Wang. Statistical model checking for networks of priced timed automata. In *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, volume 6919 LNCS, pages 80–96, 2011.
- [32] Isabel Vieira de Assis Lima, Leandro Francisco Silva Bastos, Marcelo Limborço-Filho, Bernd L. Fiebich, and Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira. Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Mediators of Inflammation*, 2012:1–13, 2012.
- [33] Alexandre A. de Castro, Elaine F.F. da Cunha, Ander F. Pereira, Flavia V. Soares, Daniel H.S. Leal, Kamil Kuca, and Teodorico C. Ramalho. Insights into the drug repositioning applied to the alzheimer's disease treatment and future perspectives. *Current Alzheimer Research*, 15(12):1161–1178, September 2018.
- [34] Bruno Cabral de Lima Oliveira, Paula Maria Quaglio Bellozi, Helton José Reis, and Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Inflammation as a possible link between dyslipidemia and alzheimer's disease. *Neuroscience*, 376:127–141, April 2018.
- [35] Mohammadreza Dorvash, Mohammad Farahmandnia, Pouria Mosaddeghi, Mitra Farahmandnejad, Hosein Saber, Mohammadhossein Khorraminejad-Shirazi, Amir Azadi, and Iman Tavassoly. Dynamic modeling of signal transduction by mTOR complexes in cancer. *Journal of Theoretical Biology*, 483:109992, 2019.
- [36] Billy Dunn, Peter Stein, and Patrizia Cavazzoni. Approval of aducanumab for alzheimer disease—the fda's perspective. *JAMA internal medicine*, 181(10):1276–1278, 2021.
- [37] Fernando Durães, Madalena Pinto, and Emília Sousa. Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals*, 11(2):44, May 2018.
- [38] E. Allen Emerson and Edmund M. Clarke. Characterizing correctness properties of parallel programs using fixpoints. In *Proceedings of the 7th Colloquium on Automata, Languages and Programming*, pages 169–181, London, UK, 1980. Springer-Verlag.
- [39] B Ferreira, F A F Braz, A A F Loureiro, and S V A Campos. A probabilistic model checking analysis of vehicular ad-hoc networks. *Vehicular Technology Conference (VTC Spring), 2015 IEEE 81st*, pages 1–7, 2015.

- [40] Bruno Ferreira, Felipe D. Cunha, Raquel Mini, Antonio A F Loureiro, Fernando A F Braz, and Sergio V A Campos. Intelligent service to perform overtaking in vehicular networks. *Proceedings - IEEE Symposium on Computers and Communications*, 2016-Febru:669–676, 2016.
- [41] Sami Gabbouj, Simo Ryhänen, Mikael Marttinen, Rebekka Wittrahm, Mari Takalo, Susanna Kemppainen, Henna Martiskainen, Heikki Tanila, Annakaisa Haapasalo, Mikko Hiltunen, and Teemu Natunen. Altered insulin signaling in alzheimer’s disease brain – special emphasis on PI3k-akt pathway. *Frontiers in Neuroscience*, 13, June 2019.
- [42] Severine I. Gharbi, Marketa J. Zvelebil, Stephen J. Shuttleworth, Tim Hancox, Nahid Saghir, John F. Timms, and Michael D. Waterfield. Exploring the specificity of the PI3k family inhibitor LY294002. *Biochemical Journal*, 404(1):15–21, April 2007.
- [43] P. Godefroid, D. Peled, and M. Staskauskas. Using partial-order methods in the formal validation of industrial concurrent programs. *Software Engineering, IEEE Transactions on*, 22(7):496–507, jul 1996.
- [44] Alexey Goltsov, Ghassan Tashkandi, Simon P. Langdon, David J. Harrison, and James L. Bown. Kinetic modelling of in vitro data of PI3k, mTOR1, PTEN enzymes and on-target inhibitors rapamycin, BEZ235, and LY294002. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97:170–181, January 2017.
- [45] Haijun Gong, Paolo Zuliani, and Edmund M. Clarke. Model checking of a diabetes-cancer model. *AIP Conference Proceedings*, 1371:234–243, 2011.
- [46] Haijun Gong, Paolo Zuliani, Qinsi Wang, and Edmund M. Clarke. Formal analysis for logical models of pancreatic cancer. In *IEEE Conference on Decision and Control and European Control Conference*. IEEE, December 2011.
- [47] Wenrui Hao and Avner Friedman. Mathematical model on Alzheimer’s disease. *BMC Systems Biology*, 10(1):108, 2016.
- [48] David Heras-Sandoval, Jazmin M. Pérez-Rojas, Jacqueline Hernández-Damián, and José Pedraza-Chaverri. The role of PI3k/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular Signalling*, 26(12):2694–2701, December 2014.
- [49] Rachel A. Hillmer. Systems biology for biologists. *PLOS Pathogens*, 11(5):e1004786, May 2015.

- [50] Paul A. Hubbard, Colleen L. Moody, and Ramachandran Murali. Allosteric modulation of ras and the PI3k/AKT/mTOR pathway: emerging therapeutic opportunities. *Frontiers in Physiology*, 5, December 2014.
- [51] Michael D. Hurd, Paco Martorell, Adeline Delavande, Kathleen J. Mullen, and Kenneth M. Langa. Monetary costs of dementia in the united states. *New England Journal of Medicine*, 368(14):1326–1334, April 2013.
- [52] Richard S. Isaacson, Christine A. Ganzer, Hollie Hristov, Katherine Hackett, Emily Caesar, Randy Cohen, Robert Kachko, Josefina Meléndez-Cabrero, Aneela Rahman, Olivia Scheyer, Mu Ji Hwang, Cara Berkowitz, Suzanne Hendrix, Monica Mureb, Matthew W. Schelke, Lisa Mosconi, Alon Seifan, and Robert Krikorian. The clinical practice of risk reduction for alzheimer's disease: A precision medicine approach. *Alzheimer's & Dementia*, 14(12):1663–1673, November 2018.
- [53] Sangyun Jeong. Molecular and cellular basis of neurodegeneration in alzheimer's disease. *Molecules and Cells*, 2017.
- [54] Matt Kaeberlein and Veronica Galvan. Rapamycin and alzheimer's disease: Time for a clinical trial? *Science Translational Medicine*, 11(476), January 2019.
- [55] Hiroaki Kitano. Computational systems biology. *Nature*, 420(6912):206–210, November 2002.
- [56] Chuan Hock Koh, Sucheendra K Palaniappan, PS Thiagarajan, and Limsoon Wong. Improved statistical model checking methods for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*, 13(S17), December 2012.
- [57] Savas Konur, Clare Dixon, and Michael Fisher. Analysing robot swarm behaviour via probabilistic model checking. *Robotics and Autonomous Systems*, 60(2):199–213, 2012.
- [58] Hiroyuki Kubota, Rei Noguchi, Yu Toyoshima, Yu ichi Ozaki, Shinsuke Uda, Kanako Watanabe, Wataru Ogawa, and Shinya Kuroda. Temporal Coding of Insulin Action through Multiplexing of the AKT Pathway. *Molecular Cell*, 46(6):820–832, 2012.
- [59] M. Kwiatkowska, G. Norman, and D. Parker. PRISM 4.0: Verification of probabilistic real-time systems. In G. Gopalakrishnan and S. Qadeer, editors, *Proc. 23rd International Conference on Computer Aided Verification (CAV'11)*, volume 6806 of *LNCS*, pages 585–591. Springer, 2011.
- [60] Marta Kwiatkowska, Gethin Norman, and David Parker. Stochastic model checking. *Formal Methods for Performance Evaluation*, pages 220–270, 2007.

- [61] Dudley W. Lamming, Lan Ye, David M. Sabatini, and Joseph A. Baur. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3):980–989, March 2013.
- [62] Yat Shing Lee, Wan Ning Vanessa Chow, and Kwok-Fai Lau. Phosphorylation of FE65 at threonine 579 by GSK3 β stimulates amyloid precursor protein processing. *Scientific Reports*, 7(1), September 2017.
- [63] Beth Levine and Guido Kroemer. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1):27–42, January 2008.
- [64] Qian Li, Yi Liu, and Miao Sun. Autophagy and alzheimer’s disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(3):377–388, June 2017.
- [65] Ai-Ling Lin, Jordan B Jahrling, Wei Zhang, Nicholas DeRosa, Vikas Bakshi, Peter Romero, Veronica Galvan, and Arlan Richardson. Rapamycin rescues vascular, metabolic and learning deficits in apolipoprotein e4 transgenic mice with pre-symptomatic alzheimer’s disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(1):217–226, July 2017.
- [66] Ta-Jen Liu, Dimpny Koul, Tiffany LaFortune, Ningyi Tiao, Rui Jun Shen, Sauveur-Michel Maira, Carlos Garcia-Echeverria, and W.K. Alfred Yung. Nvp-bez235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(8):2204–2210, 08 2009.
- [67] Yudong Liu, Ying Su, Jiajia Wang, Shenggang Sun, Tao Wang, Xian Qiao, Xiaoqin Run, Hui Li, and Zhihou Liang. Rapamycin decreases tau phosphorylation at Ser214 through regulation of cAMP-dependent kinase. *Neurochemistry International*, 62(4):458–467, 2013.
- [68] María Llorens-Marín, Jerónimo Jurado, Félix Hernández, and Jesús Ávila. Gsk-3 β , a pivotal kinase in alzheimer disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 2014.
- [69] Hui Luo, Yu-Yu Yu, Hong-Mei Chen, Wei Wu, Yong Li, and Hong Lin. The combination of NVP-BEZ235 and rapamycin regulates nasopharyngeal carcinoma cell viability and apoptosis via the PI3k/AKT/mTOR pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, October 2019.
- [70] Seiji Mabuchi, Hiromasa Kuroda, Ryoko Takahashi, and Tomoyuki Sasano. The PI3k/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 137(1):173–179, April 2015.

- [71] Sauveur-Michel Maira, Frédéric Stauffer, Josef Brueggen, Pascal Furet, Christian Schnell, Christine Fritsch, Saskia Brachmann, Patrick Chène, Alain De Pover, Kevin Schoemaker, Dorian Fabbro, Daniela Gabriel, Marjo Simonen, Leon Murphy, Peter Finan, William Sellers, and Carlos García-Echeverría. Identification and characterization of nvp-bez235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7):1851–1863, 07 2008.
- [72] Shohreh Majd, John Power, and Zohreh Majd. Alzheimer’s disease and cancer: When two monsters cannot be together. *Frontiers in Neuroscience*, 13, March 2019.
- [73] Kenneth Lauchlin McMillan. *Symbolic model checking: an approach to the state explosion problem*. PhD thesis, Carnegie Mellon University, 1992.
- [74] Fiammetta Monacelli, Michele Cea, Roberta Borghi, Patrizio Odetti, and Alessio Nencioni. Do cancer drugs counteract neurodegeneration? repurposing for alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(4):1295–1306, December 2016.
- [75] Aaamir Naeem, Farooque Azam, Anam Amjad, and Muhammad Waseem Anwar. Comparison of Model Checking Tools Using Timed Automata - PRISM and UPPAAL. *2018 IEEE International Conference on Computer and Communication Engineering Technology, CCET 2018*, pages 248–253, 2018.
- [76] Nicolas Le Novère. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nature Publishing Group*, 16, 2015.
- [77] Bob Olsson, Ronald Lautner, Ulf Andreasson, Annika Öhrfelt, Erik Portelius, Maria Bjerke, Mikko Hölttä, Christoffer Rosén, Caroline Olsson, Gabrielle Strobel, Elizabeth Wu, Kelly Dakin, Max Petzold, Kaj Blennow, and Henrik Zetterberg. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 15(7):673–684, June 2016.
- [78] Sefika Ozcelik, Graham Fraser, Perrine Castets, Véronique Schaeffer, Zhiva Skachokova, Karin Breu, Florence Clavaguera, Michael Sinnreich, Ludwig Kappos, Michel Goedert, Markus Tolnay, and David Theo Winkler. Rapamycin Attenuates the Progression of Tau Pathology in P301S Tau Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 8(5):2–8, 2013.
- [79] David Parker. *Implementation of Symbolic Model Checking for Probabilistic Systems*. PhD thesis, University of Birmingham, 2002.

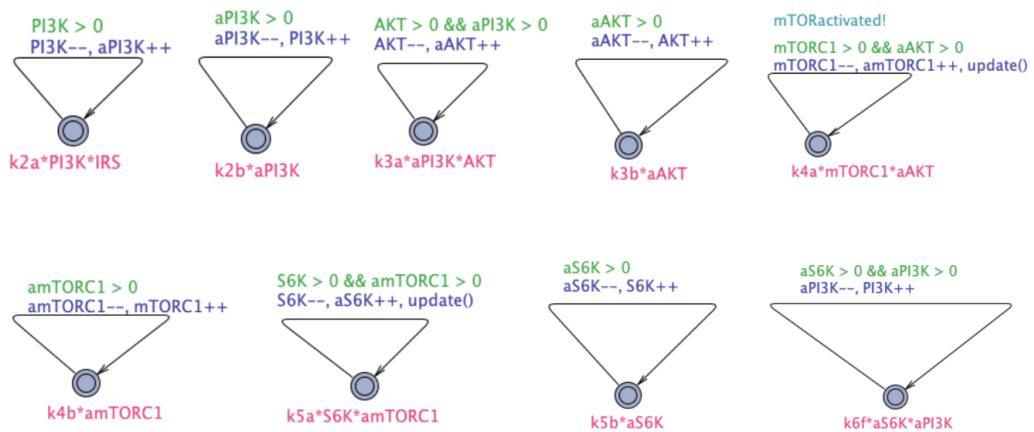
- [80] Linda Partridge, Matias Fuentealba, and Brian K. Kennedy. The quest to slow ageing through drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(8):513–532, May 2020.
- [81] Piero Dalle Pezze, Annika G. Sonntag, Antje Thien, Mirja T. Prentzell, Markus Gödel, Sven Fischer, Elke Neumann-Haefelin, Tobias B. Huber, Ralf Baumeister, Daryl P. Shanley, and Kathrin Thedieck. A dynamic network model of mTOR signaling reveals TSC-independent mTORC2 regulation. *Science Signaling*, 5(217):1–18, 3 2012.
- [82] Carole J. Proctor and Douglas A. Gray. GSK3 and p53 - Is there a link in Alzheimer's disease? *Molecular Neurodegeneration*, 5(1):1–15, 2010.
- [83] J. P. Queille and J. Sifakis. A temporal logic to deal with fairness in transition systems. In *Proceedings of the 23rd Annual Symposium on Foundations of Computer Science*, SFCS '82, pages 217–225, Washington, DC, USA, 1982. IEEE Computer Society.
- [84] Robert A. Saxton and David M. Sabatini. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 168(6):960–976, March 2017.
- [85] Vanessa Schmidt, Katharina Baum, Angelyn Lao, Katja Rateitschak, Yvonne Schmitz, Anke Teichmann, Burkhard Wiesner, Claus Munck Petersen, Anders Nykjaer, Jana Wolf, Olaf Wolkenhauer, and Thomas E Willnow. Quantitative modelling of amyloidogenic processing and its influence by SORLA in alzheimer's disease. *The EMBO Journal*, 31(1):187–200, October 2011.
- [86] Lon Schneider. A resurrection of aducanumab for alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 19(2):111–112, February 2020.
- [87] M. Clara Selles, Mauricio M. Oliveira, and Sergio T. Ferreira. Brain inflammation connects cognitive and non-cognitive symptoms in alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1):S313–S327, June 2018.
- [88] Violeta Serra, Ben Markman, Maurizio Scaltriti, Pieter J.A. Eichhorn, Vanesa Valero, Marta Guzman, Maria Luisa Botero, Elisabeth Llonch, Francesco Atzori, Serena Di Cosimo, Michel Maira, Carlos Garcia-Echeverria, Josep Lluís Parra, Joaquin Arribas, and José Baselga. Nvp-bez235, a dual pi3k/mtor inhibitor, prevents pi3k signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating pi3k mutations. *Cancer Research*, 68(19):8022–8030, 09 2008.
- [89] George J. Siegel. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Elsevier, 7th edition, 2006.

- [90] Robert Siman, Ryan Cocca, and Yina Dong. The mTOR inhibitor rapamycin mitigates perforant pathway neurodegeneration and synapse loss in a mouse model of early-stage alzheimer-type tauopathy. *PLoS ONE*, 10(11):e0142340, November 2015.
- [91] Patricia Spilman, Natalia Podlutskaya, Matthew J. Hart, Jayanta Debnath, Olivia Gorostiza, Dale Bredesen, Arlan Richardson, Randy Strong, and Veronica Galvan. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid- β levels in a mouse model of alzheimer’s disease. *PLoS ONE*, 5(4):1–8, 2010.
- [92] Bart De Strooper, Robert Vassar, and Todd Golde. The secretases: enzymes with therapeutic potential in alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(2):99–107, February 2010.
- [93] Nurgazy Sulaimanov, Martin Klose, Hauke Busch, and Melanie Boerries. Understanding the mtor signaling pathway via mathematical modeling. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 9(4), February 2017.
- [94] Pauline Traynard, Adrien Fauré, François Fages, and Denis Thieffry. Logical model specification aided by model-checking techniques: application to the mammalian cell cycle regulation. *Bioinformatics*, 32(17):i772–i780, 08 2016.
- [95] Mukhtar Ullah and Olaf Wolkenhauer. *Stochastic Approaches for Systems Biology*. Springer New York, 2011.
- [96] Bart Vanhaesebroeck, Julie Guillermet-Guibert, Mariona Graupera, and Benoit Bilanges. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3k signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(5):329–341, April 2010.
- [97] Thawfeek M. Varusai and Lan K. Nguyen. Dynamic modelling of the mTOR signaling network reveals complex emergent behaviours conferred by DEPTOR. *Scientific Reports*, 8(1):1–14, 2018.
- [98] Gabriel Domingo Vilallonga, Daniel Edgardo Riesco, Antonio-Carlos Guimaraes Almeida, Antonio Marcio Rodrigues, and Sergio V. A. Campos. In silico laboratory experiments using statistical model checking: A new model of the palytoxin-induced pump channel as case study. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, pages 1–1, 2020.
- [99] Chong Wang, Jin-Tai Yu, Dan Miao, Zhong-Chen Wu, Meng-Shan Tan, and Lan Tan. Targeting the mTOR signaling network for alzheimer’s disease therapy. *Molecular Neurobiology*, 49(1):120–135, July 2014.

-
- [100] Qinsi Wang and Edmund M Clarke. Formal methods for biological systems : Languages , algorithms , and applications, 2016.
- [101] Eileen L Whiteman, Han Cho, and Morris J Birnbaum. Role of akt/protein kinase b in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(10):444–451, December 2002.
- [102] Anders Wimo, Serge Gauthier, and Martin Prince. Alzheimer’s disease international, 2018.
- [103] Olaf Wolkenhauer. Why model? *Frontiers in Physiology*, 5, 2014.
- [104] Håkan L. S. Younes, Marta Kwiatkowska, Gethin Norman, and David Parker. Numerical vs. statistical probabilistic model checking. *International Journal on Software Tools for Technology Transfer*, 8(3):216–228, January 2006.
- [105] Hakan Lorens Samir Younes. *Verification and Planning for Stochastic Processes with Asynchronous Events*. PhD thesis, Carnegie Mellon University, 2005.
- [106] Paolo Zuliani. Statistical model checking for biological applications. *International Journal on Software Tools for Technology Transfer*, 17(4):527–536, August 2014.

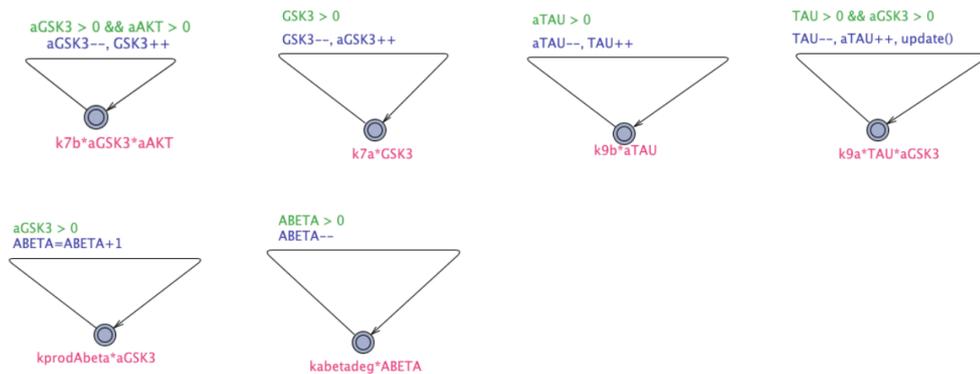
Apêndice A

Conjunto de autômatos que representam a via PI3K/mTOR



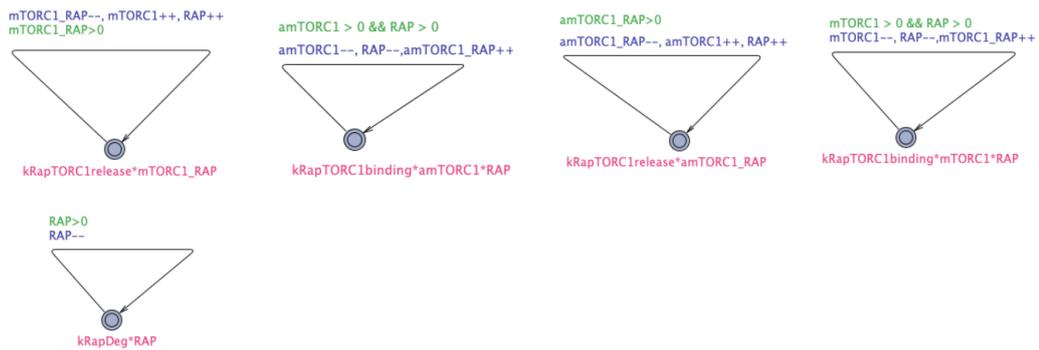
Apêndice B

Conjunto de autômatos que representam a formação do peptídeo amiloide beta e fosforilação de Tau



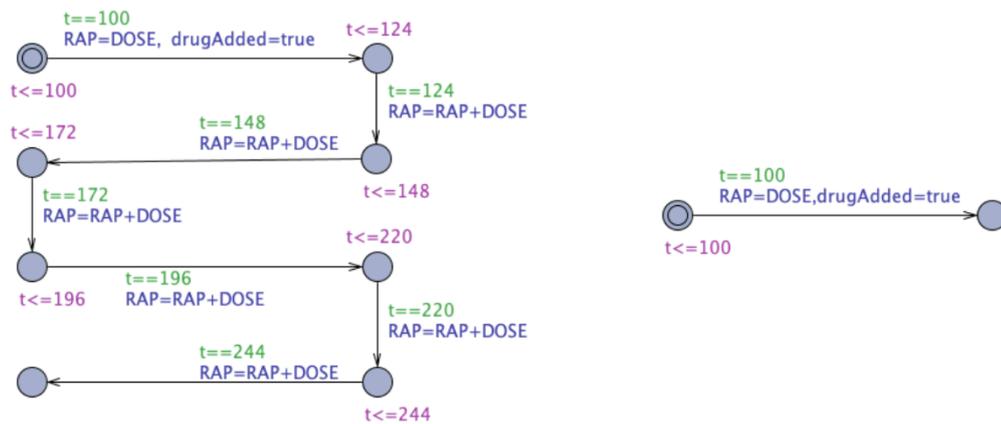
Apêndice C

Conjunto de autômatos que representam o processo de associação, desassociação, e degradação da rapamicina



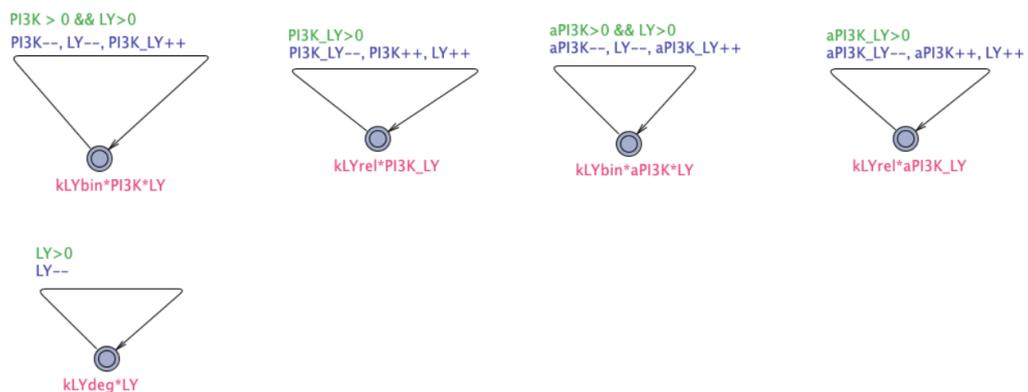
Apêndice D

Autômatos de inserção da rapamicina no tempo 100 horas e de uso contínuo durante uma semana



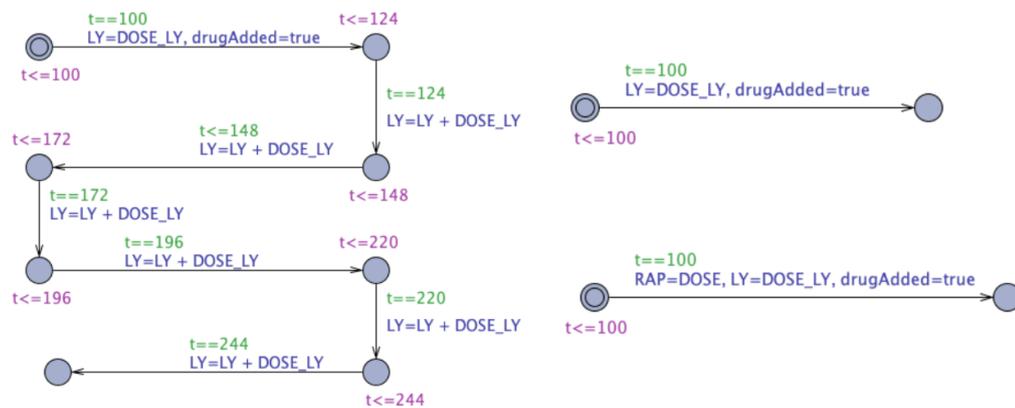
Apêndice E

Conjunto de autômatos que representam o processo de associação, desassociação, e degradação da LY294002



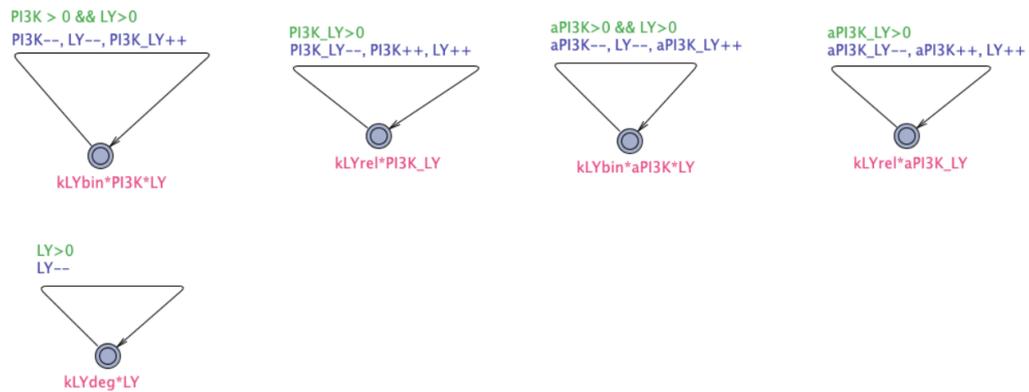
Apêndice F

Autômatos de inserção da LY294002 no tempo 100 horas e de uso contínuo durante uma semana



Apêndice G

Conjunto de autômatos que representam o processo de associação, desassociação, e degradação da BEZ235



Apêndice H

Autômatos de inserção da BEZ235 no tempo 100 horas e de uso contínuo durante uma semana

