

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“Modelagem Analítico-Estocástica de Doenças
Priônicas”**

ARLAN DA SILVA FERREIRA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**“Modelagem Analítico-Estocástica de Doenças
Priônicas”**

Arlan da Silva Ferreira

Dissertação apresentada ao Departamento de Física da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cressoni

Maceió-Brasil
Agosto de 2005

Banca examinadora

1º Examinador: **Prof. Marco Antônio Alves da Silva**
(Membro externo – FCFRP/USP)

2º Examinador: **Prof. Madras Viswanathan Gandhi Mohan**
(Membro interno - UFAL)

3º Examinador: **Prof. José Carlos Cressoni**
(Membro interno / Orientador - UFAL)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Phone: +55 82 214 -1423
Fax : +55 82 214 -1645

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL. Brasil

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
TESE DE MESTRADO**

"Modelagem Analítico-Estocástica de Doenças Priônicas"

por

Arlan da Silva Ferreira

A Banca Examinadora composta pelos professores José Carlos Cressoni (Orientador), do Departamento de Física da Universidade Federal de Alagoas, Madras Viswanathan Gandhi Mohan, do Departamento de Física da Universidade Federal de Alagoas e Marco Antônio Alves da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, consideram o candidato aprovado com grau "A".

Maceió, 05 de agosto de 2005

Prof. José Carlos Cressoni

Prof. Madras Viswanathan Gandhi Mohan

Prof. Marco Antônio Alves da Silva

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e a saúde. Agradeço aos meus pais, José Ferreira do Monte e Alaíde da Silva Ferreira, pela oportunidade de estudar fora. Agradeço ao meu orientador, Jose Carlos Cressoni, pela atenção, paciência, confiança e incentivo.

Aos meus professores do Curso de Graduação e de Mestrado pelos conhecimentos passados e companheirismo. Agradeço, também, a todos os professores com quem não tive o privilégio de estudar.

Aos meus colegas (de turma e de conversa) da graduação e do mestrado pela oportunidade de tê-los conhecido e convivido em momentos tão diversos. A todos os funcionários do departamento de Física (pessoal da administração, limpeza, etc). Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo concedida durante esses dois anos.

Ficam aqui meus sinceros e eternos agradecimentos para todas as pessoas (professores, alunos, funcionários) que contribuíram, de forma direta ou indiretamente, para minha formação.

Resumo

Neste trabalho foram estudadas várias características das chamadas doenças priônicas, uma patologia causada por moléculas de proteínas denominadas Prions. Os Prions podem existir em duas conformações moleculares diferentes. A primeira, denominada PrP^{C} , é normalmente encontrada no organismo dos mamíferos, enquanto que a segunda, muito rara, denominada PrP^{Sc} , é o agente patogênico responsável pelo desencadeamento da doença. A forma de replicação do agente patogênico se dá pela transformação estrutural da primeira para a segunda forma, que opera sobre a primeira forma como um molde, induzindo a transformação. Para estudar esse problema, primeiramente é utilizado um modelo analítico simples que reproduz, qualitativamente, os resultados observados para o tempo de sobrevivência de hamsters infectados com o agente causador da doença. A seguir, a partir da equação de Michaelis-Menten, foi desenvolvido um novo modelo analítico que permitiu relacionar a taxa da reação a duas constantes bastante conhecidas, com valores catalogados para reações bioquímicas. Com esse novo modelo foi então possível estimar o valor médio da taxa da reação associada às reações priônicas para hamsters, cujo resultado recaiu dentro do intervalo conhecido para reações enzimáticas. Foram também empregadas simulações computacionais desenvolvidas em um Automata Celular descrito em uma rede quadrada. Neste caso foi levada em consideração a tendência de formação de agregados da forma patogênica, um modelo de difícil implementação analítica. Os resultados dessas simulações para a distribuição de frequência do tempo de incubação produziram um excelente ajuste quando comparados com as observações experimentais correspondentes para a forma bovina da doença (BSE), mostrando que o modelo computacional é apropriado para descrever a epidemiologia das reações priônicas. Uma análise mais cuidadosa mostrou que os resultados numéricos para a distribuição de frequências se ajustam muito bem a uma distribuição do tipo log-normal. Essa observação permitiu desenvolver um modelo estocástico, com solução analítica, que levou a uma forma funcional para a distribuição do tempo de incubação para a BSE. A curva analítica resultante forneceu uma excelente concordância com dados experimentais, utilizando um único parâmetro de ajuste.

Abstract

In this work one studies several characteristics of the so called prionic diseases, a pathogeny caused by protein molecules, known as Prions. Prions can exist in two different molecular conformations. The first of these, known as PrP^{C} , is normally found in mammals, whilst the second, known as PrP^{Sc} , is the rare pathogenic form, responsible for the development of the disease. The replication of the pathogen is carried out through a structural transformation from the first to the second form, which acts as a template inducing the transformation. In order to study this problem, one first employs a simple analytical model capable of reproducing, qualitatively, the results observed for the survival time of hamsters inoculated with the infectious agent. Making use of the Michaelis-Menten equation, a new analytical model is then developed, which provides a connection between the model rate constant with the rate constants widely known from biochemical reactions. With this new model it was then possible to estimate the average value of the model rate constant for hamsters, which was found to be within the numerical interval known for enzymatic reactions. Computing simulations were then developed as an Automata Cellular in a square lattice. In this case one also took into consideration the tendency of aggregation of the pathogenic form, which would be of a very difficult analytical implementation. The simulation results for the distribution of the frequency of the incubation time produced an excellent fitting with the observed data for the bovine form of the disease (BSE), showing that the computational model is appropriate for describing the epidemiology of the prionic reactions. This fact led to the development of a stochastic model, with analytical solution, which provided a functional form for the BSE incubation time distribution. The analytical curve obtained with such a model, produced an excellent fitting to the observed data, with the use of one single fitting parameter.

Conteúdo

1. Introdução	1
1.1 Surgimento das simulações computacionais	1
1.2 Doenças neurodegenerativas – características e etiologia	2
1.3 Hipótese priônica	9
1.4 Características das doenças priônicas	10
1.5 Objetivos gerais e estudos desenvolvidos	12
2. Autômatos Celulares, Proteínas e equação de Michaelis-Menten	14
2.1 Modelos computacionais	14
2.1.1 Autômatos Celulares	14
2.1.2 Origem dos Autômatos Celulares	15
2.1.3 Características dos Autômatos Celulares	18
2.2 Proteínas	23
2.2.1 Descrição e classificação das proteínas	23
2.2.2 Organização estrutural das proteínas	24
2.3 Proteínas e Doenças Priônicas	26
2.4 Moléculas do tipo Prion	26
2.4.1 Estrutura dos Prions	28
2.5 Equação de Michaelis-Menten	29
3. Principais resultados analíticos das conversões priônicas e estimativas das cinéticas das reações para hamsters	34
3.1 Modelos teóricos das conversões priônicas	34
3.2 Modelos analíticos	36
3.2.1 Modelagem analítica para reações priônicas	37
3.3 Modelo analítico a partir da equação de Michaelis-Menten	44
3.4 Estimativa da constante de Michaelis-Menten para hamsters	49

4. Principais resultados das simulações computacionais e análise estatística para T_I	52
4.1 Algoritmos computacionais utilizados nas simulações	52
4.2 Resultados obtidos através das simulações computacionais	55
4.3 Distribuições de probabilidades e simulações computacionais para o tempo de Incubação.....	62
4.4 Modelo estocástico para o tempo de incubação (BSE)	69
5. Conclusões e perspectivas	74
APÊNDICE A	78
APÊNDICE B	81
PUBLICAÇÕES	83
Referências bibliográficas	94

Lista de Figuras

Figura 1: Casos registrados de Kuru entre os nativos da Papua-Nova Guiné. A doença praticamente desapareceu com o fim da prática canibal (LINDEN, 2003).....	5
Figura 2: Casos de BSE registrados no Reino Unido. A proibição do uso de ração de origem animal contribuiu para a diminuição de casos da doença (DORRELL, 2004). 6	6
Figura 3: Casos de vCJD ocorridos no Reino Unido. Ainda é preocupante uma epidemia dessa doença devido o consumo de carne bovina contaminada com BSE (WILL, 2004).....	7
Figura 4: Em preto, múltiplas plaquetas formadas por depósitos de Prions PrP^{Sc} . Barra de escala, $50 \mu m$ (PRUSINER, 2005).	10
Figura 5: Figura (a), tecido cerebral de uma vítima de CJD, fig(b) vítima de vCJD. Essas figuras têm por principal objetivo mostrar a similaridade das doenças priônicas quanto à sua propriedade de formar agregados (JOHNSON; GIBBS, 1998).	11
Figura 6: Dimensões usuais em um Autômatas Celular.	18
Figura 7: Formas geométricas mais comuns para as células dos Autômatos Celulares.....	18
Figura 8: Vizinhanças mais comuns; a de von Neumann e a de Moore. O número de vizinhos é definido pelo parâmetro r	19
Figura 9: Automata celular 1D, adotando condições de contorno periódicas.	20
Figura 10: A célula refletida deve ser igual à da extremidade (para $r=1$).....	20
Figura 11: A célula refletida deve ser a mesma em todas as extremidades.....	21
Figura 12: Fragmento de um Automata Celular em 1D, com apenas dois estados.	22
Figura 13: Possibilidades de transições para um A.C. em 1D com apenas dois estados. ...	22
Figura 14: Proteína PrP^C , na sua estrutura secundária predomina as alfa hélices (verde)..	28
Figura 15: Proteína PrP^{Sc} , a sua estrutura secundária é rica em folhas beta (azul).....	28
Figura 16: Equação de Michaelis-Menten. Para maiores valores de K_M , maior é a concentração do substrato $[S]$. Essa concentração é igual a K_M quando $v=V_{MAX}/2$, e para $[S] \gg K_M$ a velocidade da reação se aproxima do valor máximo.	33
Figura 17: Modelo mais simples, as moléculas PrP^{Sc} atuam como um catalisador para conversão de moléculas normais para a forma modificadas.	34
Figura 18: Nesse modelo admite-se a volta da reação (indicado pelas setas) entre o estágio intermediário e o início da reação.....	35
Figura 19: Reação de polimerização das moléculas PrP^{Sc} , as moléculas PrP^C convertidas formam agregados (clusters) que crescem continuamente, ocasionando a ruptura das células hospedeiras.	36
Figura 20: A curva em vermelho representa a população de Prion B para uma cinética da reação $K=0.1$, a curva azul para $K=0.08$. A cinética da reação é que determina a velocidade da reação.....	39
Figura 21: Taxa da conversão de Prions A 's para B 's. Como se pode observar nessa figura, existe um ponto de máximo, para o qual a partir dele a eficiência da conversão começa a diminuir. Essa diminuição é devido à falta de A 's.	40
Figura 22: Análise qualitativa para o tempo de sobrevida versus dose de contaminação... 42	42
Figura 23: Representação gráfica qualitativa para o tempo de sobrevida.	43

Figura 24: Representação no plano para o tempo de sobrevida ($B_M > B_I$). Ao lado encontra-se a barra de cores atribuída a cada valor numérico. As cores indicam as regiões onde o tempo de sobrevida se mantém constante.....	43
Figura 25: Modelo analítico simples representado aqui por $K=0.08$ (a) e K_M referenciando o novo modelo, tal que $\alpha=K_T/K_M$ que é equivalente a K quando $K_M \gg (a_0 + b_0)$. De acordo com o gráfico (a), para grandes valores de K_M os dois modelos se aproximam. Na figura (b) fixando $K_M=10^3$ percebe-se que para maiores valores de α a reação ocorre mais rapidamente (como já esperado pois $\alpha \approx K$).	47
Figura 26: Variação do tempo de sobrevida em função de B_I e B_M em 3D.	48
Figura 27: Representação 2D do gráfico do tempo de sobrevida acima ($B_M > B_I$). A barra de cores ao lado da figura mostra o valor numérico de T_S . Pelas cores da figura é possível visualizar as regiões onde o tempo de sobrevida se mantém constante.	49
Figura 28: Dados experimentais da dependência do tempo de incubação e de morte versus dose de infecção obtidos por S. Prusiner (1984). Esse gráfico mostra que o tempo de sobrevida é praticamente independente da dose de infecção inicial exceto para dosagens extremamente pequenas. A regressão foi feita apenas para dose $n > 2$	51
Figura 29: Rede quadrada representando o Automata Celular onde cada quadrículo representa uma célula e seu estado pode ser representado pela cor.	53
Figura 30: Unindo as células das bordas com as do lado oposto, a rede assume a topologia de um toróide.	53
Figura 31: Os quadrados vermelhos representam os Prions tipo B , azul escuro os Prions A 's, os quadrados marrons são os possíveis estados que estão ao alcance de B e os quadrados azul claro representam os espaços vazios.	54
Figura 32: Distribuição final dos Prions na rede em $t=T_I$ (1528 unidades da simulação). Os pontos vermelhos representam os A 's (PrP^C) $N_A(t=0)=400$, e os círculos pretos representam os B 's (PrP^{Sc}), para $N_B(t=0)=6$. Tamanho de rede $N=200$	56
Figura 33: Distribuição final da rede, como na Figura 32, mas com $\rho_A=5\%$ ou $N_A(t=0)=2000$ (figura a). Na figura b mostra uma região, escolhida aleatoriamente da rede, ampliada (x10). Neste exemplo $T_I=160$ unidades da simulação.	57
Figura 34: Rede densamente populada com $\rho_A=5\%$ ($N_A(t=0)=2000$) e $\rho_B=0.6\%$ ($N_B(t=0)=24$). Figura (b) ampliação da parte destacada da figura (a) para dar ao leitor uma melhor visão da formação de agregados pelos Prions B 's (geometricamente simétricos). Neste exemplo $T_I=139$ unidades da simulação.	58
Figura 35: Com $\rho_A=1.5 \cdot N \cdot N/10000$ e $B_I=N \cdot N/1000$. Para pequenos valores de A 's, a reação é dificultada e os pontos começam a divergir para um tempo muito grande (infinito). Esses pontos que apresentavam divergência não foram incluídos no ajuste.	59
Figura 36: O tempo médio de incubação também segue uma lei de potência. Percebe-se que maiores são as inclinações para maiores tamanhos de rede (N).	60
Figura 37: O desvio padrão não depende crucialmente do valor de B_I no intervalo $B_I \sim 40$ a 50	62
Figura 38: Distribuição log-Normal. Gráficos para diferentes valores dos parâmetros que caracterizam a distribuição (σ e μ). Como se pode notar, a forma da distribuição é sensível à variação dos seus parâmetros.	63
Figura 39: Distribuição de frequência do tempo de incubação para diferentes concentrações de ρ_A . Para maiores ρ_A menor é a largura da distribuição.	64
Figura 40: Distribuição de frequência do logaritmo de T_I , a nova distribuição aparenta ser uma gaussiana. As larguras das distribuições são aproximadamente constantes.	65

- Figura 41: Nesta figura é possível notar que para altas concentrações de A 's (a) os dados para o tempo de incubação se ajustam melhor com uma distribuição normal. Para baixas densidades de A 's (b) a distribuição normal não seria a mais indicada. 66
- Figura 42: Utilizando os mesmos dados da figura anterior, tomando agora o logaritmo natural do tempo de incubação, percebe-se que para altas concentrações de A 's (a) os dados não seguem a reta guia em toda sua extensão. Para baixas densidades (b) os dados se ajustam melhor com a reta, indicando que os mesmos seguem uma distribuição normal. 67
- Figura 43: Da esquerda pra direita tem-se $\rho_A=1.8\%$, $\rho_A=1.2\%$, $\rho_A=1.0$, $\rho_A=0.8\%$ e $\rho_A=0.6\%$, respectivamente. Para menores concentrações o logaritmo natural dos T_I 's ($\ln\{T_I\}$) se ajustam melhor com a distribuição normal, portanto os $\{T_I\}$ seguem uma distribuição log-normal. Os gráficos foram divididos para melhor visualização dos dados, e as legendas foram omitidas para não sobrecarregar a figura. 68
- Figura 44: Distribuição de freqüência do tempo de incubação. Quando escalonadas pela média, os pontos tendem a colapsar em uma única curva. O melhor ajuste com os dados experimentais é obtido para pequenos valores de ρ_A 69
- Figura 45: Distribuição log-normal quando escalonada pela sua média depende apenas da constante (σ). 72
- Figura 46: A linha contínua constitui a representação gráfica da distribuição log-normal escalonada ajustada por regressão aos dados experimentais (círculos pretos) referentes à BSE e os quadrados em vermelho representam os pontos da simulação com $\rho_A=0.6\%$. O melhor ajuste foi obtido para $\sigma=0.255$ 73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Com $\rho_A = 1.5 \cdot N \cdot N / 10000$ e $B_I = N \cdot N / 1000$. Resultados obtidos através de uma regressão linear para o desvio padrão do tempo de incubação para diferentes tamanho de rede (N).	60
Tabela 2: Constantes para o desvio padrão do tempo de incubação. Os dados foram obtidos utilizando diferentes tamanho de rede N , $\rho_A = 1.5 \cdot N \cdot N / 10000$ e $B_I = N \cdot N / 1000$	61
Tabela 3: Resultados da regressão para σ_T (desvio padrão do tempo de incubação) utilizando $B_I = 30, 40$ e 50 (com $N = 200, N_B = 6$).	61

Capítulo 1

Introdução

1.1 Surgimento das simulações computacionais

As simulações computacionais surgiram por volta da Segunda Guerra Mundial com o desenvolvimento e o aperfeiçoamento dos computadores da época. Estes eram destinados apenas para fins militares, utilizados para cálculos relacionados com a produção da bomba atômica, cálculos de trajetórias de projéteis, leitura de mensagens codificada. Após o término da guerra, o uso dos computadores ficou disponível também para a comunidade civil.

Os computadores foram mais empregados nos problemas que possuíam soluções analíticas muito complexas (equações não-lineares), e.g., estudo de fase condensada (estado líquido), turbulência. Com o aparecimento do FORTRAN IV (*FORmula TRANslation*), em 1961, e a padronização para esta linguagem de programação, estavam abertas as portas para uma escrita mais fácil dos algoritmos, facilitando a depuração e utilização dos programas desenvolvidos para as simulações computacionais. Foram surgindo, então, várias linguagens de programação que eram voltadas para diversos tipos de problemas.

Hoje em dia as simulações computacionais são utilizadas em diversas áreas da

ciência: Física, Engenharia, Biologia, Economia entre outras. Em uma simulação computacional é possível, através de um modelo reduzido, estudar várias características de um problema impossível de ser descrito por modelos simplesmente matemáticos. Foram Alan Turing e John von Neumann os grandes idealizadores da lógica dos computadores que se conhece atualmente.

A natureza e o comportamento de sistemas complexos surgem a partir das superposições das simples interações que compõem o sistema. Dada uma descrição adequada e completa desse comportamento simples, é possível construir mundos artificiais, dotados de organismos artificiais que interagem entre si, apresentando comportamentos similares aos dos sistemas reais. Sabe-se que é difícil encontrar um mecanismo para a construção de mundos artificiais que suportem todas as leis naturais envolvidas no problema. Para suprir essa deficiência, é necessário fazer simplificações para que o modelo artificial se adapte aos recursos computacionais disponíveis pelo seu executor.

Dada a natureza caótica e estatística dos sistemas complexos, sejam eles biológicos, químicos, etc, é mais conveniente construir um ambiente A.C.¹ onde se possam empregar regras de natureza estocástica que permitam modelar apropriadamente o comportamento do sistema.

1.2 Doenças neurodegenerativas – características e etiologia

O “mal da vaca louca” é uma das estranhas doenças que vem acometendo o gado em diversos países europeus, embora existam casos ocorridos na América do Norte

¹ Referente a Automata Celular, artifício computacional composto por células que interagem com suas vizinhanças de acordo com regras impostas. Essas regras determinam o comportamento e a evolução do sistema.

(Estados Unidos e Canadá). Essa enfermidade pertence ao grupo de doenças neuro degenerativas, onde também estão incluídos o mal de Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob-Disease (CJD), Kuru, etc.

Desde o início da década de 80 têm aumentado a frequência de casos relacionados com doenças neuro-degenerativas, que afetam tanto humanos como animais. Essa doença é caracterizada pela desordem que causa ao sistema nervoso, fazendo com que suas vítimas apresentem sintomas, como perda da coordenação motora, demência, agressividade, levando a uma morte certa e inadiável. Em humanos pode-se citar as doenças de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Kuru, Insônia Familiar Fatal. Em animais, são conhecidas a Scrapie, que acomete ovinos e caprinos e a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), a mais popular, também conhecida como "doença da vaca louca", que dizimou rebanhos inteiros na Inglaterra.

A mais comum em seres humanos é a CJD, e a forma humana vCJD, uma variante da BSE. A CJD está associada a quatro tipos diferentes: esporádica (sCJD, de ocorrência espontânea), familiar (fCJD), iatrogênico (iCJD) e variante (vCJD). A sCJD é a forma mais rara de ocorrer, com incidência em torno de 0.4 a 1.8 casos por 1 milhão de habitantes/ano (GLATZEL, 2003); a fCJD provoca demência e dificuldade de dormir; a forma Iatrogênica é atribuída a intervenções cirúrgicas, como transplantes de tecidos, uso de hormônios derivados de cadáveres contaminados. A doença de Gerstrmann-Straussler-Scheinker (GSS), produz sintomas semelhantes à CJD. A característica hereditária dessa última representa cerca de 90% dos casos, sendo muito mais freqüente que a infecciosa.

A forma Scrapie pertence ao grupo de doenças que afeta somente animais. Seu surgimento data por volta do século 18, ocorrido na França (MCGOWAN, 1922),

manifestada em ovelhas. O nome “Scrapie” é devido ao hábito que os animais infectados tinham de se “coçar” contra as vegetações e as cercas. Nada se conhecia a respeito da doença e sua etiologia. Graças aos esforços de dois pesquisadores franceses (CUILLÉ; CHELLE, 1936) foi demonstrado, através de experimentos, que ovelhas sadias eram infectadas pela injeção de tecido contaminado. Descobriu-se, então, que o agente infeccioso podia ser transmitido para outro animal. Esses experimentos eram trabalhosos e longos, pois o tempo de incubação da doença era em torno de 14 a 22 meses, o que demandava um longo período de observação. Em 1939 os mesmos pesquisadores descobriram, com a repetição dos experimentos, que a doença também era transmitida de ovelha para cabras a uma taxa de 100% de sucesso (CUILLÉ; CHELLE, 1939). Sigurdsson (1954) lançou o termo de “vírus de infecção lenta”.

A descoberta mais marcante, em relação a Scrapie, foi a possibilidade de transmissão para ratos e posteriormente para hamsters. Estava, então, quebrada a “barreira das espécies”. Com ratos e hamsters infectados foi possível estudar melhor a doença, pois nesses animais o tempo de incubação era menor, o que propiciou um grande aumento do número de experimentos e possibilidades a serem exploradas.

Durante os anos 50, quando a Scrapie já havia despertado a atenção de vários pesquisadores, emergiu uma nova epidemia, causada por uma doença misteriosa chamada Kuru. Seu surgimento data em torno de 1900, mas somente ficou oficialmente conhecida em 1957 quando um grande número de nativos de Papua-Nova Guiné começaram a apresentar estranhos sintomas; perda de coordenação motora seguida de demência e morte. A propagação da doença era caracterizada pela prática do canibalismo como um ritual religioso: quando um membro da tribo morria, partes de seu corpo eram consumidas pelos

próprios membros da tribo, como um gesto de respeito ao morto. Isso levou à suspeita, na época, de que a doença era causada por algum tipo de vírus contraído pela ingestão de cérebro de indivíduos infectados. A doença foi controlada pelo término da prática canibal (GAJDUSEK, 1977). Histórico de casos registrados dessa doença é mostrado na Figura 1.

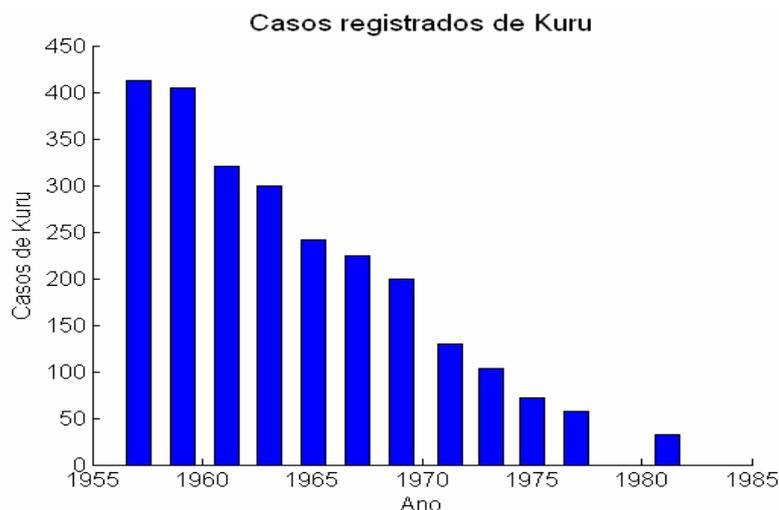


Figura 1: Casos registrados de Kuru entre os nativos da Papua-Nova Guiné. A doença praticamente desapareceu com o fim da prática canibal (LINDEN, 2003).

O “mal da vaca louca” surgiu por volta de 1986 em diversos países do Reino Unido, chegando a 37.280 casos registrados em 1992, e em seguida se espalhou pela Europa. Os sintomas eram os mesmos citados anteriormente; o gado apresentava comportamento agressivo (por isso o nome “mal da vaca louca”) e perdas dos movimentos seguidos da morte do animal. O surgimento da doença foi associado ao uso de vísceras de ovelhas contaminadas com “scrapie” usadas no preparo da ração bovina. Essa ração contaminada contribuiu para a propagação da doença por quase todo o país, pois grande parte dos rebanhos ingleses eram criados em confinamentos e alimentados com essa ração. Acreditava-se que o agente causador da doença já existia nos organismos dos bovinos e

que a ração teria tido uma função semelhante à de um catalisador. O histórico de BSE relatados no Reino Unido é mostrado na Figura 2. A partir do momento que esse país tomou medidas emergenciais para a contenção da doença, foi possível reduzir drasticamente o número de casos de BSE, como se pode observar nessa figura.

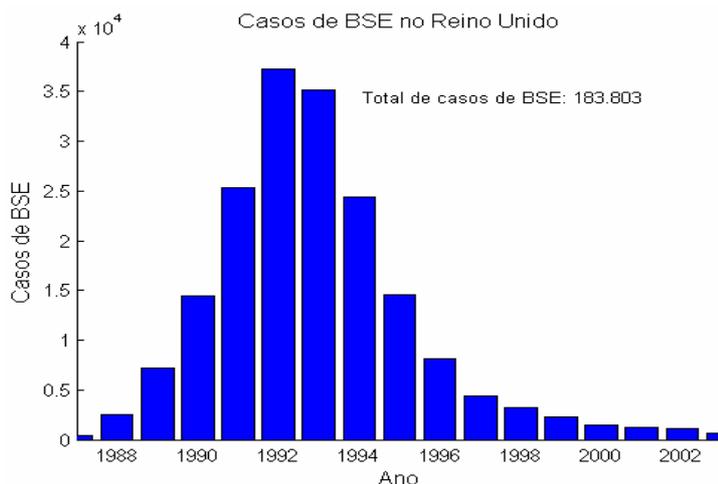


Figura 2: Casos de BSE registrados no Reino Unido. A proibição do uso de ração de origem animal contribuiu para a diminuição de casos da doença (DORRELL, 2004).

Em 1996 uma proibição contra o uso de ração de origem animal conseguiu deter a propagação da epidemia no Reino Unido; o país registrou 612 casos em 2003. No total já foram identificados mais de 180 mil casos de BSE, e modelos computacionais sugerem que 1,9 milhão ainda esteja infectado (PRUSINER, 2004).

A BSE em si também representa uma ameaça à economia agropecuária mundial, pois basta apenas um foco da doença para que seja necessário o extermínio de todo o rebanho vizinho, a fim de evitar o seu alastramento. Como exemplo, pode-se citar o caso ocorrido na Inglaterra, que no ano de 2000 sacrificou, por medida de segurança, quase todo o seu rebanho (os criadores foram indenizados pelo governo) após o surgimento de casos

do mal da vaca louca. Esse país sofreu um prejuízo de bilhões de dólares. Seria desastroso o surgimento de um foco da doença (BSE) em países exportadores de carne bovina, principalmente o Brasil, porque teria seu produto desvalorizado, por muito tempo, no mercado externo e interno.

Essas doenças, particularmente a vCJD, vêm causando uma grande preocupação para os órgãos de Saúde pública. Isso se deve à possibilidade de uma epidemia em seres humanos causada pelo consumo de carne contaminada com BSE (BATEMAN *et al*, 1995), não existindo, atualmente, nenhum tratamento eficaz para a doença. Como a vCJD possui uma progressão lenta, levando mais de dez anos para que os primeiros sintomas se manifestem, é bem provável que uma epidemia ainda esteja por vir. Os primeiros casos relatado de vCJD ocorreu em 1995 (no Reino Unido), com 3 casos confirmados. A figura seguinte mostra o histórico de casos confirmados nesse país.

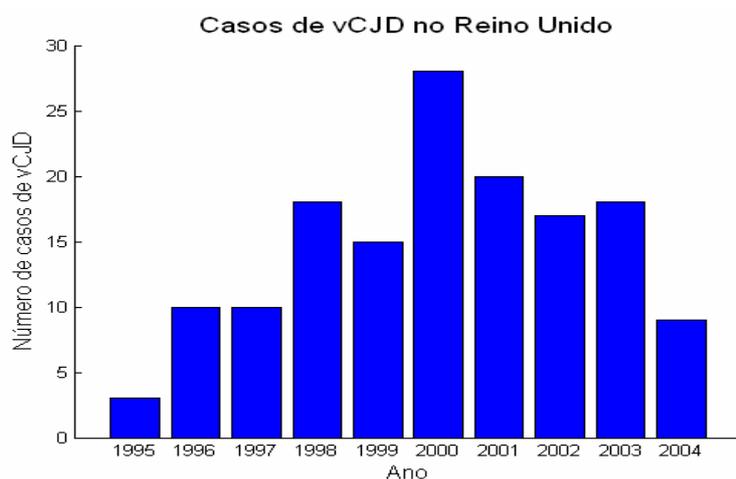


Figura 3: Casos de vCJD ocorridos no Reino Unido. Ainda é preocupante uma epidemia dessa doença devido o consumo de carne bovina contaminada com BSE (WILL, 2004)

A questão atualmente reside na busca de um tipo de tratamento, alguma droga capaz de combater a doença (em humanos e animais) ou evitar o seu contágio. Isso tem se tornado tema de pesquisas em todo o mundo. No entanto, a compreensão dos mecanismos microscópicos associados à doença, por si só representa um desafio para a comunidade científica. Atualmente têm sido observados avanços significativos para o entendimento do mecanismo de infecção e contágio.

Um dos pioneiros das pesquisas foi o Dr. Stanley Prusiner, prêmio Nobel de Medicina em 1997. Seus trabalhos se iniciaram em 1972, ano em que ele era residente da Universidade da Califórnia em São Francisco, no Departamento de Neurologia. Um caso despertou sua curiosidade e a busca de respostas ocorreu quando ele perdeu uma paciente portadora de uma estranha doença, a Creutzfeldt-Jacob Disease (CJD). Essa doença causava perda progressiva da memória (demência) e da coordenação motora. Até então, achava-se que a doença era caracterizada por uma espécie de vírus de ação lenta, pois suas vítimas demoravam cerca de dez anos para apresentar os primeiros sintomas, e a doença não despertava nenhuma reação do sistema imunológico.

Em 1974, quando Stanley Prusiner assumiu a chefia do laboratório de estudo de Scrapie, ainda se acreditava que a doença era causada por uma espécie de vírus. A partir de experimentos, descobriu-se que o agente era altamente estável e resistente à radiação ultravioleta e também sobrevivia a altas temperaturas por um longo tempo. Portanto não podia ser um agente biológico provido de ácido nucléico (DNA ou RNA), pois esse “ser” patológico ainda mantinha sua ação e os tratamentos aos quais foi submetido eliminariam qualquer ação infectante de qualquer organismo biológico que possuísse ácido nucléico. Somente tratamento com enzimas (em altas concentrações) que degradam proteínas foi

capaz de anular a infecção. Mas como seria possível um agente desprovido de ácido nucléico efetuar cópia de si mesmo? Isso não era possível para os dogmas biológicos da época. Griffith (1967), foi o primeiro pesquisador a propor que o agente infeccioso fosse uma proteína. Prusiner (1982) redefinindo a hipótese de Griffith, lançou o termo para essa proteína de Prion (*Protein infection only*).

1.3 Hipótese priônica

A partir de experimentos com ratos e hamsters, Stanley Prusiner provou que o responsável pela doença era uma proteína, a qual ele batizou de Prion. O mistério ainda continuava, porque uma proteína não poderia possuir características infecciosas semelhantes a um micro organismo vivo. Então, o mecanismo de infecção estava mais ligado a aspectos químicos do que biológicos. O desafio agora era conhecer qual era o processo que essas moléculas de proteínas utilizavam para promover o desenvolvimento da doença. Também era imprescindível conhecer sua estrutura molecular e sua função no organismo. Outro aspecto importante era compreender o mecanismo de replicação desse agente infeccioso sendo uma proteína, ele não possui ácido nucléico (DNA e RNA) e, portanto, o mecanismo de replicação deveria ser diferente daquele empregado por bactérias, fungos, etc. Segundo a proposta de Prusiner, a replicação seria possível através de uma reação de transformação da proteína Prion normalmente existente no organismo, em uma forma estruturalmente diferente, infecciosa e hidrofóbica. Estava assim consolidado o arcabouço teórico da hipótese priônica.

Hoje em dia, poucos duvidam da hipótese priônica, i.e., que o Prion é o principal responsável pelas doenças descritas anteriormente. Atualmente Stanley Prusiner é

professor de neurologia e bioquímica da Escola de Medicina da Universidade da Califórnia em São Francisco. Também é membro da Academia Nacional de Ciências, Instituto de Medicina e da Sociedade Filosófica Americana.

1.4 Características das doenças priônicas

Uma das principais características das doenças causadas por Prions é a sua propriedade de formar agregados (placas amilóides) que são encontradas no cérebro das vítimas (DEARMOND; PRUSINER, 1995). Suspeita-se que a formação desses agregados sejam os responsáveis pelas mortes das células, levando, conseqüentemente à morte do indivíduo infectado. A contínua destruição dessas células proporciona ao cérebro um aspecto esponjoso, daí o nome “encefalopatia esponjiforme”.

As figuras 4 e 5 ilustram regiões cerebrais de vítimas acometidas por doenças priônicas. É possível identificar nessas figuras grandes concentrações de aglomerados que se destacam pela sua coloração.

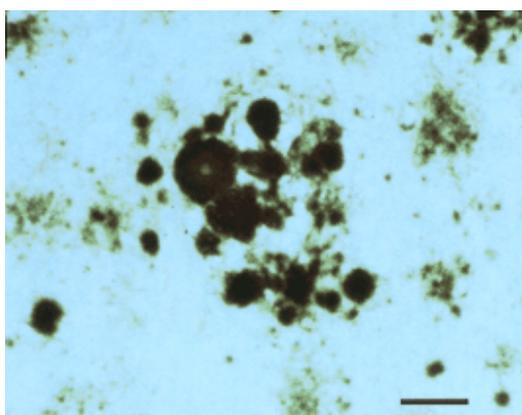


Figura 4: Em preto, múltiplas plaquetas formadas por depósitos de Prions PrP^{SC}. Barra de escala, 50 μm (PRUSINER, 2005).

O próprio organismo possui seus próprios controles reguladores, responsáveis pela remoção de proteínas mal formadas, mas quando a taxa de produção dessas proteínas é maior que a capacidade de remoção, o desenvolvimento da doença é inevitável (PRUSINER, 2004).

Na Figura 5(a,b) pode-se também identificar grandes quantidades de aglomerados de tamanhos variados. A figura (a) representa uma amostra de uma região cerebral de uma vítima de CJD (ampliação x300). Na figura (b), amostra de tecido cerebral de uma vítima acometida pela vCJD, variante da BSE em humanos. As setas servem para orientar o leitor, mostrando as formações de plaquetas amilóides. A Figura 4 e Figura 5 têm por principal objetivo mostrar a similaridade das duas doenças, em geral, características de todas as doenças priônicas.

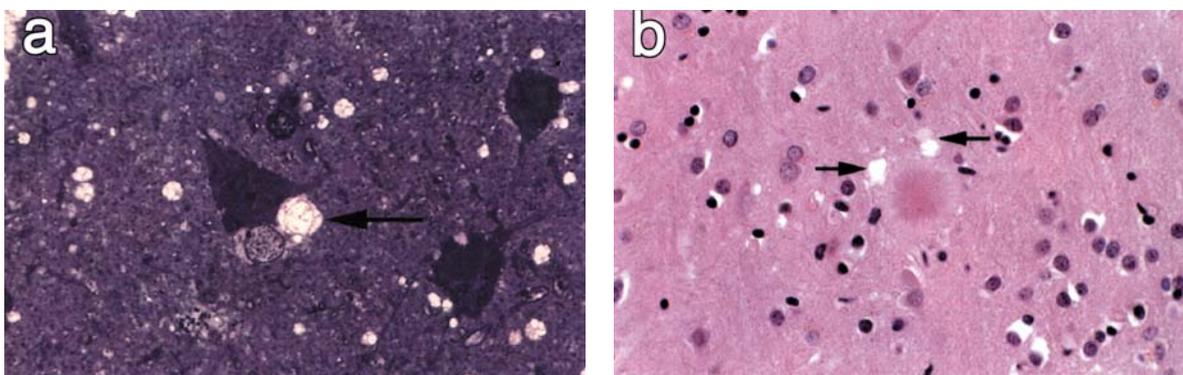


Figura 5: Figura (a), tecido cerebral de uma vítima de CJD, fig(b) vítima de vCJD. Essas figuras têm por principal objetivo mostrar a similaridade das doenças priônicas quanto à sua propriedade de formar agregados (JOHNSON; GIBBS, 1998).

1.5 Objetivos gerais e estudos desenvolvidos

Neste trabalho pretende-se estudar algumas das propriedades das doenças priônicas, mediante modelos analíticos, simulações computacionais e modelagem estocástica. No capítulo 2 são apresentados os principais idealizadores e uma breve revisão bibliográfica dos Autômatos Celulares. Nesse mesmo capítulo serão feitas breves descrições das características básicas das proteínas, principalmente das proteínas Prions, responsáveis pelas doenças degenerativas citadas neste trabalho. Também é feita uma descrição do mecanismo de Michaelis-Menten para reações enzimáticas. No capítulo 3 são apresentados alguns modelos teóricos elaborados para descrever o processo de desenvolvimento da doença. Em seguida, é apresentado um modelo analítico simples para descrever as reações priônicas e alguns resultados obtidos com esse modelo. Neste mesmo capítulo é apresentado um novo modelo analítico, elaborado a partir da equação de Michaelis-Menten, pois esse modelo irá permitir associar a cinética da reação, descrita pelo primeiro modelo analítico, a constantes conhecidas das reações bioquímicas. Na parte seguinte são feitas estimativas das cinéticas das reações para o tempo de incubação e de morte a partir de dados experimentais obtidos com hamsters. No capítulo 4 são feitas algumas descrições do funcionamento do algoritmo utilizado nas simulações computacionais e algumas justificativas dos parâmetros utilizados. Em seguida, são apresentados os principais resultados obtidos através das simulações computacionais, seguida de uma análise estatística dos resultados, e por último é apresentada uma forma funcional, partindo de um modelo estocástico, para o tempo de incubação para a encefalopatia espongiforme bovina

(BSE). No capítulo 5 é apresentada a conclusão do trabalho e possíveis perspectivas para estudos futuros.

Capítulo 2

Autômatos Celulares, Proteínas e equação de Michaelis-Menten

2.1 Modelos computacionais

Numa simulação computacional é possível construir um modelo que descreve melhor o comportamento real das conversões priônicas. A proposta é simular, através de um Autômata Celular, a reação de conversão das moléculas PrP^C em PrP^{Sc} , considerando a formação de agregados, dificilmente implementadas analiticamente. Essas simulações irão propiciar uma análise estatística dos resultados para o tempo de incubação, além de fornecer diretrizes para a elaboração das hipóteses básicas do modelo teórico (capítulo 4). Nesta seção serão apresentados os principais idealizadores e uma breve revisão bibliográfica dos Autômatos Celulares.

2.1.1 Autômatos Celulares

Em física biológica, as evoluções temporais de sistemas dinâmicos são governadas por equações diferenciais parciais não lineares, cujas soluções nem sempre podem ser obtidas analiticamente, sendo necessário recorrer a métodos numéricos. Essas soluções podem ser bastante complexas e sensíveis às condições iniciais, o que pode levar a um comportamento caótico. Modelos discretos, baseados em Autômatos Celulares (A.C.),

propiciam uma alternativa de solução para os modelos do contínuo. Autômatos Celulares são idealizações de sistemas físicos nos quais o tempo e o espaço são discretos e as quantidades físicas também assumem esse comportamento (JEN, 1990). Um autômata celular consiste de uma rede (1D, 2D, etc) regular constituídas por células (sítios) nas quais residem as variáveis que se deseja estudar. O estado do autômata celular é especificado pelos valores atribuídos a cada sítio para os quais a sua vizinhança é usualmente tomada como sendo os vizinhos adjacentes mais próximos. As variáveis em cada sítio são atualizadas simultaneamente em cada instante de tempo, baseado no valor dos sítios vizinhos no tempo anterior.

2.1.2 Origem dos Autômatos Celulares

As teorias modernas dos Autômatos Celulares são atribuídas a Alan Turing e John von Neumann. Antes da II Guerra Mundial, Turing havia descoberto os limites lógicos computacionais. Sua idealização era construir uma máquina capaz de realizar todos os possíveis cálculos numéricos. Essa máquina ideal foi nomeada de “máquina de Turing” (TURING, 1936). Após o término da Guerra, von Neumann consciente dos trabalhos de Turing, na área da computação, pretendia aplicar esse novo conhecimento na área da física matemática, em particular ao problema da turbulência. Em 1944, von Neumann formulou métodos para a tradução de um conjunto de procedimentos matemáticos para uma linguagem computacional que a “máquina” pudesse entender. Ele desenvolveu a idéia de um “diagrama de fluxo” ou programa computacional, que permitiria à máquina, seguindo as instruções do programa, resolver uma variedade de problemas numéricos.

O interesse pelos A.C's., por von Neumann, era a formulação de uma teoria geral para o processamento de informação, que pudesse ser aplicado tanto a sistemas biológicos como tecnológicos. A partir dos trabalhos de Claude Shannon (teoria da comunicação) von Neumann pretendia estender a teoria lógica dos A.C's. para uma teoria probabilística. Essa teoria seria destinada a explorar as complexidades dos sistemas biológicos e tecnológicos. O interesse era investigar como os organismos se auto-replicavam, e a partir daí construir um A.C. capaz, também, de se auto-replicar.

Von Neumann foi capaz de ressaltar os aspectos essenciais para uma auto-replicação. Em seu trabalho intitulado “The General and Logical Theory of Automata” (NEUMANN, 1956), ele tenta estabelecer as primeiras bases para criar organismos artificiais capazes de se reproduzir. Von Neumann estabelece que

- Os organismos vivos são constituídos por partes, de certa forma, independente (chamadas de unidades elementares), e por isso é necessário entender o funcionamento individual dessas partes.
- O entendimento do todo consiste em entender como as unidades elementares estão organizadas, ou seja, o entendimento do todo é caracterizado pelo entendimento das partes que o compõem.

O primeiro item corresponde aos estudos sobre o funcionamento de indivíduos, possuindo um caráter mais descritivo; o segundo corresponde aos aspectos dinâmicos das interações entre os indivíduos no sistema.

O “Automata cinemático” foi o primeiro modelo proposto por von Neumann, com o objetivo de que esse pudesse se auto-replicar. O modelo falhou por ser complexo demais.

Outro personagem importante dessa história foi Stanislaw Ulam, matemático e físico que trabalhou na construção da bomba de hidrogênio. Baseado na fenomenologia do crescimento de cristais, sua idéia foi imaginar uma rede quadrada “infinita”, semelhante a um tabuleiro de jogo de damas, onde cada quadrado representava uma célula, e sua cor (preta ou branca) representaria o seu estado. Essas células conteriam informações que especificariam o seu estado em cada instante de tempo. Cada célula poderia mudar seu estado de acordo com os estados das células vizinhas e das regras que eram impostas para essa transição (ULAM, 1962).

As contribuições de von Neumann e S. Ulam despertaram interesse de muitos físicos pelos A.C's. Dentre eles, pode-se citar Edward F. Moore (1966), com seu trabalho “Machine Models of Self-Reproduction”. A popularidade dos A.C's. aumentou ainda mais com a publicação do “Jogo da Vida”, proposto por John H. Conway em 1960 (BAK, 1989). Esse jogo apresentava as mesmas características que von Neumann buscava, embora fosse mais simples, pois apresentava somente 2 estados, “preto ou branco”.

Significativas contribuições para o desenvolvimento dos A.C's. têm sido dadas por Stephen Wolfram (WOLFRAM, 1983a, 1984a). Seus estudos basearam-se nos comportamentos dos A.C's. elementares no objetivo de estabelecer todas as propriedades desse sistema discreto e desenvolver uma teoria sólida nessa área. Wolfram também estudou as propriedades de auto-organização, auto-similaridade e irreversibilidade dos A.C's. elementares, estabelecendo uma base teórica que demonstra sua capacidade de gerar complexidade a partir de simples interações (WOLFRAM, 1984b). Essa é uma das propriedades mais fundamentais dos A.C's., i.e., eles são capazes de gerar complexidade a partir de unidades idênticas simples. Essa complexidade é gerada pelo efeito cooperativo

de cada um dos componentes. Às vezes, nem sempre é possível desenvolver procedimentos matemáticos capazes de descrever tal complexidade.

2.1.3 Características dos Autômatos Celulares

A seguir, serão citadas algumas das principais características dos A.C's.

- Geometria: a sua geometria deve ser regular. A classificação da geometria do sistema pode ser definida pela dimensão e forma da célula.
 - Dimensão: o A.C. pode ser descrito em 1, 2, 3, ..., D dimensões. Em 1D as células estão distribuídas linearmente, em 2D tem-se uma distribuição no plano, em 3D uma distribuição espacial e assim sucessivamente.

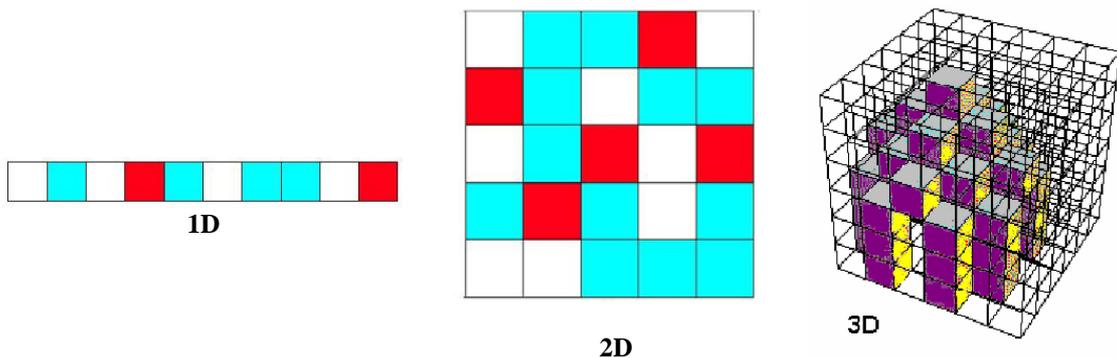


Figura 6: Dimensões usuais em um Autômata Celular.

- Célula: as células podem ser de varias formas (quadrangular, triangular, hexagonal, etc), desde que todas as células do A.C. sejam da mesma forma.

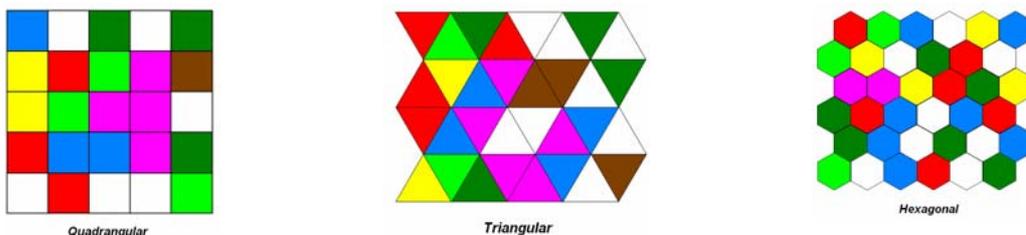
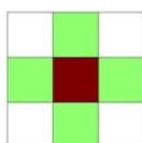


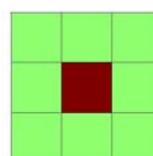
Figura 7: Formas geométricas mais comuns para as células dos Autômatos Celulares.

➤ **Vizinhança:** cada célula atualizará seu estado a partir das informações do estado das células vizinhas, de acordo com as regras de transição. Cada célula poderá ser encontrada em apenas um estado, e todas são atualizadas simultaneamente em uma unidade de tempo arbitrária. Para um A.C. em duas dimensões, as vizinhanças mais comuns são a de von Neumann que utiliza os 4 primeiros vizinhos; e a de Moore que considera também os vizinhos ortogonais. O parâmetro r é que define o número de vizinhos em cada direção. No exemplo a seguir, as células de cor verde representam a vizinhança da célula central com $r=1$

von Neumann

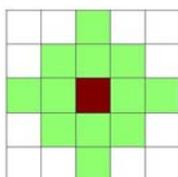


Moore

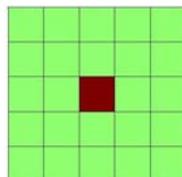


para $r=2$

Von Neumann



Moore



Arbitrária

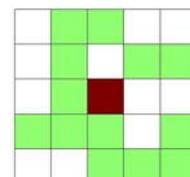


Figura 8: Vizinhanças mais comuns; a de von Neumann e a de Moore. O número de vizinhos é definido pelo parâmetro r .

➤ **Condições de contorno:** o ideal em uma simulação seria que o A.C. fosse infinito em todas as direções, mas devido às limitações computacionais, torna-se conveniente o emprego de condições de contorno (ou limite) para que se possa simular um A.C. infinito.

Existem vários tipos de condições de contorno; serão citados apenas três dos mais conhecidos.

- Limite periódico: obtido ligando as bordas opostas. No caso linear é fácil de visualizar, como mostrado na Figura 9.

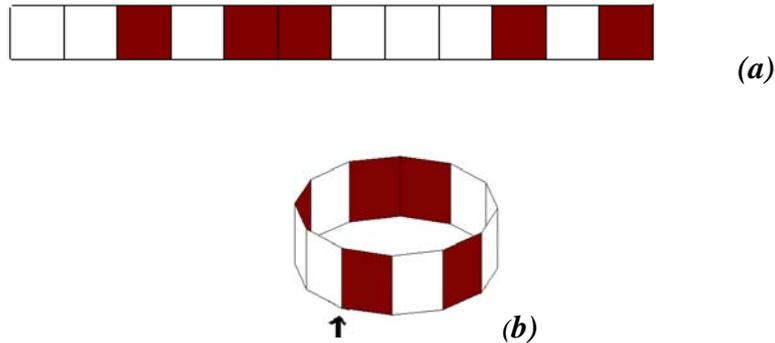


Figura 9: Automata celular 1D, adotando condições de contorno periódicas.

- Limites reflexivos: consiste em refletir as bordas do A.C. em cada extremidade. O tamanho dessa reflexão varia de acordo com r da vizinhança. A Figura 10 mostra um exemplo para $r=1$ em 1D.

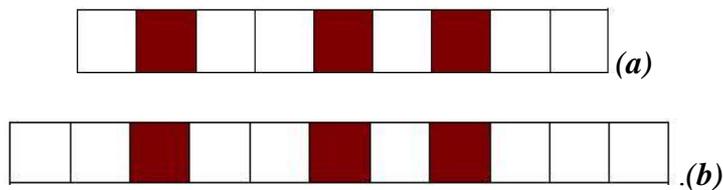


Figura 10: A célula refletida deve ser igual à da extremidade (para $r=1$).

- Limites de valores fixos: escolhe-se um estado qualquer que será estático em todos os limites do A.C. (v. Figura 11 para $r=1$).

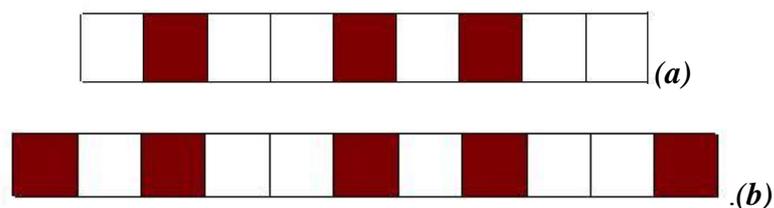


Figura 11: A célula refletida deve ser a mesma em todas as extremidades.

- Número de estados: de maneira geral, pode-se utilizar qualquer número finito de estados. Von Neumann conseguiu construir um A.C. que se auto-replicava com 29 estados e 5 vizinhos (NEUMANN, 1966). Byl (1989) desenvolveu um A.C. que se auto-replicava utilizando apenas 6 estados e 5 vizinhos.
- Regras: as regras determinarão o estado de cada célula a partir do estado da sua vizinhança, essas regras é que farão o sistema evoluir no tempo. As regras adotadas devem estar o mais próximo da realidade do problema a ser modelado.

Existem várias formas de especificar as regras para as transições, citam-se algumas delas:

- Regras totalística: não leva em conta o estados de cada célula vizinha, mas a quantidade de células que se encontram em um determinado estado.
- Regra probabilística: é atribuída uma probabilidade para a transição, que pode ser a mesma para cada célula vizinha. Dessa maneira tem-se que uma célula qualquer não está unicamente determinada pela configuração da sua vizinhança.
- Possibilidades de transição: para k estados possíveis em um A.C. e n células vizinhas, então haverá k^n possibilidades para as possíveis transições de estado. Essa regra é válida para qualquer dimensão.

A Figura 12 mostra o caso de uma rede em 1D com $k=2$ possíveis estados (vazio e ocupado) e $n=3$ vizinhos (esquerda, central e direita), ou seja, é levado em conta também a célula que será atualizada

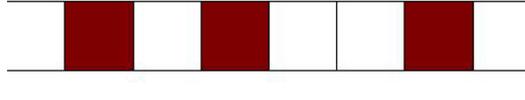


Figura 12: Fragmento de um Automata Celular em 1D, com apenas dois estados.

Tem-se, então, $2^3=8$ possibilidades de transições, representadas na Figura 13.

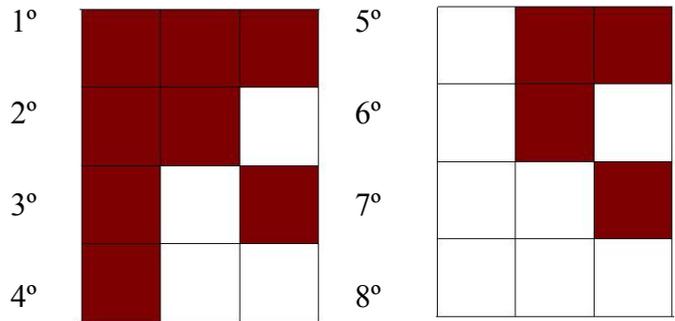


Figura 13: Possibilidades de transições para um A.C. em 1D com apenas dois estados.

Percebe-se que o autômata fica mais complexo para dimensões mais altas, como é natural, e quando há um grande número de estados desse A.C.. É mais conveniente trabalhar da forma mais simples possível, i.e., com poucos estados no A.C.

2.2 Proteínas

As proteínas fornecem a estrutura, catalisam as reações celulares e executam diversas tarefas. O papel central ocupado por elas é evidenciado no fato de que a informação genética é, em última instância, expressa com proteínas. Para cada proteína existe um segmento do DNA que guarda informações, sobre essa proteína, especificando sua seqüência de aminoácidos. A forma e outras propriedades de cada proteína é determinada pela seqüência de aminoácidos que a constitui. Em uma célula típica existem milhares de diferentes tipos de proteínas, cada uma delas codificada por um gene e executando uma função específica. As proteínas estão entre as macromoléculas biológicas mais abundantes e são extremamente versáteis em suas funções (LEHNINGER *et al*, 1995). Essas funções podem ser divididas em dois grupos:

- Dinâmica: associada com o transporte, catálise de reações químicas, controle do metabolismo, etc.
- Estrutura: proteínas como o colágeno e a elastina que promove a sustentação estrutural das células e dos tecidos.

2.2.1 Descrição e classificação das proteínas

As proteínas são compostos macromoleculares formados de polipeptídios, e contêm carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio (algumas contêm também enxofre, fósforo e iodo). As proteínas formam complexos que são chamados de proteínas conjugadas. As lipoproteínas são as proteínas unidas a lipídeos e existem no soro sanguíneo no cérebro. As proteínas se comportam como anfólitos, isto é, funcionam como ácidos ou bases. Como

eletrólitos migram num campo elétrico em direção determinada pela carga da molécula, a qual é influenciada pelo *pH* (concentração de íons H^+) do meio.

As proteínas se dividem em fibrosas e globulares. As fibrosas são formadas por longas cadeias, são insolúveis em água e muito resistentes à digestão pelas enzimas proteolíticas. São exemplos típicos: o colágeno, que é a principal proteína dos tecidos conjuntivos; a elastina, dos tendões e tecidos elásticos; e a queratina, dos cabelos, lâ, unhas. As proteínas globulares possuem suas estruturas espaciais aproximadamente esféricas, são solúveis em água e compreendem todas as enzimas, as proteínas respiratórias e alguns hormônios. Os principais grupos de proteínas globulares são as *albuminas*, solúveis em água e precipitáveis pelo calor; as *globulinas*, pouco solúveis em água, precipitáveis por soluções salinas de varias concentrações; as *histonas*, que são proteínas básicas; as *protaminas*, muito básicas.

2.2.2 Organização estrutural das proteínas

As moléculas de proteínas são formadas de cadeias de polipeptídeos que obedecem a uma estrutura característica. A seqüência de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas constitui o que se denomina estrutura primária, é o nível estrutural mais simples e o mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. Os aminoácidos são unidos por ligações peptídicas e as cadeias podem dobrar-se formando uma espiral em hélice. Uma volta completa da espiral é formada de quatro resíduos de aminoácidos. Essa estrutura é a denominada estrutura secundária, das quais as mais comum são a estrutura em alfa-hélice e a folha beta. A estabilização das cadeias na hélice se deve as pontes de hidrogênio que ligam em geral dois átomos eletronegativos (nitrogênio e oxigênio) às

ligações peptídicas (*CONH*) da cadeia de proteínas. A ligação de hidrogênio se faz entre os grupos $\text{C}=\text{O}$ e H-H. O dobramento das cadeias em hélice prevalece nas proteínas globulares, e ligações de enxofres da cisteína reforçam a estrutura, que recebeu o nome de estrutura terciária. Essa estrutura refere-se à posição espacial de todos os aminoácidos em um polipeptídeo; é a forma tridimensional, como a proteína se “dobra”.

Outras ligações existentes na estrutura terciária são as iônicas, salinas, eletrostáticas, não polares, dissulfeto e de Van der Waals. O fator principal para manter a estrutura helicoidal da cadeia é a presença de ligações de hidrogênio, que é devida à tendência dos átomos de hidrogênio de partilhar elétrons com elétrons dos átomos de oxigênio. Devido ao grande número de ligações de hidrogênio, a molécula se mantém mais estável. A evidência de que as proteínas apresentam essa estrutura helicoidal foi obtida, indiretamente, pelo exame de raios X, em que a difração dos átomos mostra figuras características de grupamentos espaçados regularmente. O estudo com raios X permitiu conhecer a estrutura espacial das proteínas globulares e fibrosas, isto é, a conformação da molécula que se conhece como estrutura quaternária.

Devido a diferenças estruturais, as proteínas são classificadas em grupos e subgrupos de acordo com as propriedades gerais, e a composição química e a forma estrutural. Existem grandes diferenças entre proteínas do mesmo tipo, mas de diferente procedência. Por exemplo, a albumina do soro humano é bem diferente da albumina do cavalo ou de outros animais, mesmo que as propriedades e sua composição sejam muito próximas.

2.3 Proteínas e Doenças Priônicas

Acredita-se que atualmente muitas doenças como o mal de Alzheimer, BSE, Kuru, Scrapie entre outras citadas na introdução deste trabalho, são resultados de uma má formação de proteínas (proteínas deformadas) (JUNQUEIRA *et al*, 1997). Nas doenças priônicas, essas proteínas mal formadas (PrP^{Sc}) tendem a formar agregados. Essa agregação está associada às características hidrofóbicas da PrP^{Sc} (PRUSINER *et al*, 1981), que é devido à tendência dos aminoácidos com radical “R” apolar de se acomodar no interior de uma estrutura dobrada para fugir da água (também apolar). A agregação pode ocorrer no cérebro onde se acredita ser a causa das doenças, devido ao rompimento das células hospedeiras, ocasionadas pelo crescimento dos agregados. Existem várias hipóteses sobre a causa das doenças priônicas, uma delas afirma que a doença é ocasionada pela ausência das moléculas PrP^C convertidas. Neste trabalho considera-se que a morte da vítima seja ocasionada pelos crescimentos dos agregados protéicos.

2.4 Moléculas do tipo Prion

Atualmente, a maioria dos pesquisadores acredita na “hipótese priônica”, i.e., que as doenças neurodegenerativas mencionadas são devidas exclusivamente às proteínas Prions. Essas doenças estão associadas à presença de agregados priônicos localizados no tecido nervoso, constituído por moléculas de proteína Prion. Estas moléculas existem naturalmente no organismo dos mamíferos (e de algumas aves, peixes, etc). Prusiner e Cohen postularam que essa proteína se apresenta em duas conformações moleculares distintas. A primeira prefere ficar em um estado monomérico, denominada isoforma

celular normal (PrP^C). A segunda, (PrP^{Sc}) que se multimeriza, representa a isoforma modificada a partir da normal, é a responsável pelo desencadeamento da doença. De acordo com S. Prusiner, os animais por ele estudados todos possuíam um gene que codificava uma PrP . A forma normal da proteína (PrP^C) é encontrada predominantemente nas células nervosas.

Inicialmente acreditava-se que as proteínas PrP^C e PrP^{Sc} diferiam em algumas seqüências de aminoácidos em sua cadeia polipeptídica. Essa confirmação era sustentada porque se acreditava que elas desenvolviam diferentes funções. Sua conformação foi primeiramente estabelecida por ressonância magnética nuclear, sua sigla em inglês (NMR). Utilizando amostras de ratos (RIEK *et al*, 1996), em hamsters (JAMES *et al*, 1997), humanos (HOSSZU *et al*, 1999) e em bovinos (GARCÍA *et al*, 2000), para determinar a estrutura molecular das proteínas Prions, descobriu que estas possuem a mesma estrutura primária, i.e., mesmas seqüência de aminoácidos (cerca de 250) sua principal diferença está na sua estrutura tridimensional, que ainda é pouco conhecida, existem apenas modelos teóricos que descreve a sua forma apenas para fins ilustrativos.

Ainda não está bem compreendida a principal função da proteína PrP^C no organismo. Experimentos recentes mostraram que a PrP^C pode estar ligada a mecanismo de proteção celular, de regulação da excitabilidade cerebral, de memória, de inflamação, entre outras. Experimentos realizados com camundongos que não possuíam o gene PrP^C , responsável pela decodificação da proteína Prion, evidenciou que esses animais apresentaram excitabilidade cerebral e também ficaram mais susceptíveis a doenças degenerativas associadas com idades avançadas (LINDEN, 2003).

2.4.1 Estrutura dos Prions

Numa proteína a organização espacial dos aminoácidos, da sua “estrutura primária”, resulta na conhecida “estrutura secundária”. Essa organização ocorre de duas maneiras: em um arranjo helicoidal, denominado “alfa-hélice”, e um arranjo planar e pregueado, conhecido como “folha beta”.

A proteína PrP^C é encontrada abundantemente na superfície das células nervosas, embora exista em várias partes do organismo. Sua estrutura secundária é rica em alfa-hélice (40%) e poucas folhas beta (3%) (PRUSINER, 1995) (Figura 14). São facilmente solúveis em água e digeridas por protease. Sua estrutura é mais frágil, podendo ser desnaturada por altas temperaturas e tratamentos químicos. As proteínas PrP^{Sc} são fisicamente mais estáveis que as PrP^C . São mais resistentes às técnicas atuais de degradação, tais como: altas temperaturas, radiação ultravioleta, protease e nucleases² (OESCH *et al*, 1985). Sua estrutura secundária predomina as folhas betas (Figura 15).

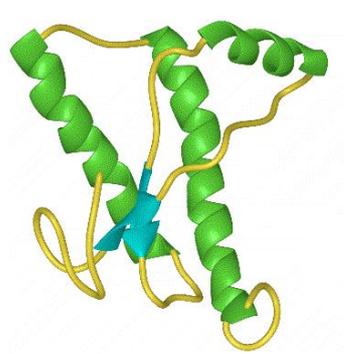


Figura 14: Proteína PrP^C , na sua estrutura secundária predomina as alfa hélices (verde).

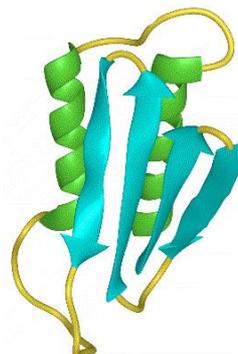


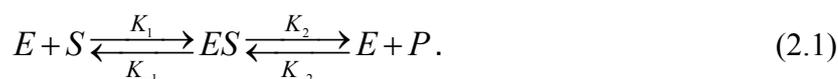
Figura 15: Proteína PrP^{Sc} , a sua estrutura secundária é rica em folhas beta (azul).

² Nuclease são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise do ácido nucléico (DNA, RNA).

O processo de conversão ocorre quando uma proteína PrP^{Sc} encontra uma PrP^C . Nesse caso, a última é induzida a mudar sua conformação molecular (estrutura secundária) para a forma da primeira, que age como um molde (COHEN *et al*, 1994; PAN *et al*, 1993). Essa mudança de configuração deve ser energeticamente favorável, pois as proteínas normais têm sua estrutura molecular mais frágil e são mais instáveis fisicamente, procurando assim a forma mais estável (PrP^{Sc}) que deve estar um nível mais baixo de energia. Ocorre, então, uma reação em cadeia, onde cada proteína normal convertida irá converter outras normais e assim por diante. Essa conversão também ocorre *in vitro* (BESSEN *et al*, 1995). Existem várias hipóteses para descrever o processo de conversão; no início do capítulo 3 são apresentados três modelos simples para representar essa conversão.

2.5 Equação de Michaelis-Menten

O conhecimento da cinética de uma reação é bastante útil para entender o mecanismo das atividades catalíticas das enzimas. A cinética enzimática geralmente começa com um primeiro estágio em que a enzima **[E]** se combina com o substrato **[S]** para formar um complexo. Essa formulação foi dada originalmente por V. Henri, em 1903, e estendida por Michaelis e Menten, em 1913, e por Briggs e Haldane, em 1925. Henri admitiu que o complexo se encontrava em equilíbrio com os reagentes e que o estágio determinante da velocidade da reação catalisada era a decomposição do complexo para dar o produto **P**. Representa-se por **[X]** a concentração de **X**, por exemplo, em Molar (*M*) onde $1M = 1\text{mol/litro}$. O mecanismo proposto para representar a reação é



A equação (2.1) é o esquema para representar, através de uma catálise enzimática, a formação do produto **[P]** de um substrato **[S]**, passando por um estágio intermediário **[ES]**.

A reação inversa entre **E** e **P** para constituir **ES** é, na maioria das vezes, suficientemente lenta e pode ser desprezada (i.e., $K_{-2} \approx 0$) no estágio inicial da reação quando a concentração de **P** é muito baixa. Dessa forma a equação (2.1) representará a evolução dinâmica caracterizada pelo modelo descrito pela Figura 18 da seção (3.1). Com essa aproximação, a velocidade de transformação de **ES**, após um estágio inicial, atinge um estado estacionário, caracterizado por

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1[E][S] - K_{-1}[ES] - K_2[ES] = 0. \quad (2.2)$$

Dessa equação, efetuado uma análise dimensional das cinéticas das reações, tem-se que $K_1 = M^1 s^{-1}$, $K_{-1} = s^{-1}$ e $K_2 = s^{-1}$.

A concentração do estado estacionário **[ES]**, da equação (2.2), torna-se

$$[ES] = \frac{K_1[E][S]}{K_{-1} + K_2} = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (2.3)$$

tal que $K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$, chamada de constante de Michaelis, e sua dimensão é **M** (unidade de concentração).

A velocidade da reação catalisada enzimaticamente (por unidade de volume) torna-se

$$v = \frac{d[P]}{dt} = K_2[ES] = \frac{K_2[E][S]}{K_M} \quad (2.4)$$

Essas equações não são úteis para fins práticos, pois envolvem a concentração desconhecida de enzimas livres $[E]$, enquanto que a quantidade conhecida em laboratório é $[E_0]$. A concentração total de enzima, livre e combinada, na mistura reagente, $[E_0]$, é dada por

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (2.5)$$

e isolando $[E]$ e substituindo em (2.4), obtém-se

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (2.6)$$

A velocidade da reação é obtida substituindo (2.6) em (2.4), fornecendo

$$v = K_2[ES] = \frac{K_2[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (2.7)$$

Da equação (2.7), nota-se que v é uma função de $[S]$, e

$v \rightarrow 0$ quando $[S] \rightarrow 0$,

$v \rightarrow \frac{K_2}{K_M}[E_0][S]$ quando $[S] \ll K_M$,

$v \rightarrow K_2[E_0]$ quando $[S] \gg K_M$.

É mais conveniente reescrever a equação (2.7) em termos da velocidade máxima $V_{\max} = K_2[E_0]$, que é atingida quando $[S]$ torna-se grande o suficiente ($[S] \gg K_M$), obtendo-se, portanto, uma nova equação simplificada

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (2.8)$$

ou

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2.9)$$

chamada Equação de Michaelis-Menten.

Um caso particular da equação de Michaelis-Menten ocorre quando a taxa de reação v/V_{\max} é exatamente igual à metade da velocidade máxima da reação V_{\max} . Nessa circunstância, $v/V_{\max} = \frac{V_{\max}}{2}$, tem-se

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.10)$$

ou

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.11)$$

o que implica em

$$K_M = [S]. \quad (2.12)$$

Isso mostra que quando a velocidade é a metade do valor máximo, a concentração do substrato é $[S]=K_M$. Uma enzima com alto valor de K_M requer maior concentração de substrato para alcançar uma determinada velocidade do que uma enzima com menor K_M . A variação de v/V_{\max} contra $[S]$ é dada pela Figura 16.

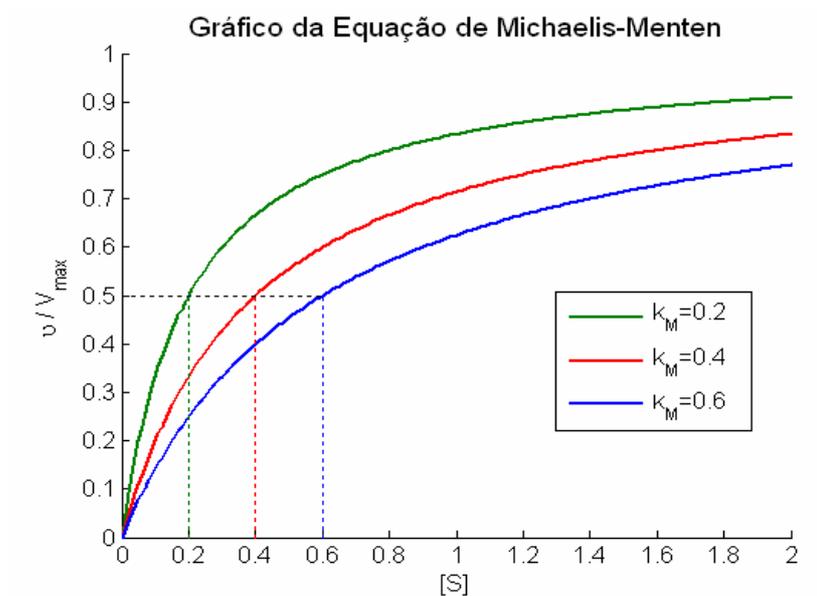


Figura 16: Equação de Michaelis-Menten. Para maiores valores de K_M , maior é a concentração do substrato $[S]$. Essa concentração é igual a K_M quando $v=V_{MAX}/2$, e para $[S] \gg K_M$ a velocidade da reação se aproxima do valor máximo.

De uma forma mais geral, K_2 deve ser substituída por K_T , uma nova constante responsável por englobar todas as possíveis taxas das reações dos estágios intermediários entre ES e $E + P$. Essa nova taxa (K_T) representa o número de moléculas de substrato “turn over³” por moléculas de enzimas por segundo.

³ Termo em inglês que em português pode ser interpretado como “transformados”.

Capítulo 3

Principais resultados analíticos das conversões priônicas e estimativas das cinéticas das reações para hamsters

3.1 Modelos teóricos das conversões priônicas

No modelo mais simples (Figura 17) que descreve uma reação priônica, quando uma proteína PrP^{Sc} encontra uma normal (PrP^C), esta é convertida para forma modificada. Neste modelo ainda não é considerada a formação de agregados. Cada proteína convertida irá contribuir para a conversão de outras proteínas normais, desenvolvendo-se, assim uma reação em cadeia. A população de Prions modificados cresce exponencialmente, só estabilizando quando as proteínas normais começam a faltar no organismo. Essas proteínas normais representam, assim, o “combustível da reação”, i.e., quando elas ficam escassas a reação termina. O modelo analítico descrito na seção 3.2.1 é baseado no esquema da Figura 17.

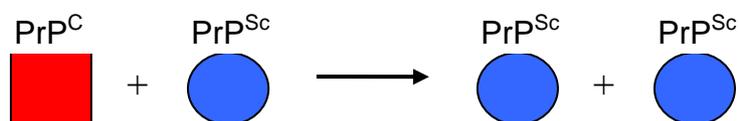


Figura 17: Modelo mais simples, as moléculas PrP^{Sc} atuam como um catalisador para conversão de moléculas normais para a forma modificadas.

No segundo modelo, descrito pela Figura 18, existe um estágio intermediário no qual é possível incluir as atuações de proteínas auxiliaadoras “chaperones” no processo de conversão (dobramento). Nesse estágio intermediário a reação pode ser reversível. Esse modelo será visto na seção 3.3 e no capítulo 4, seção 4.4, para uma modelagem estocástica das reações priônicas. É possível notar que a esquematização desse modelo é semelhante à equação (2.1) da seção 2.5.

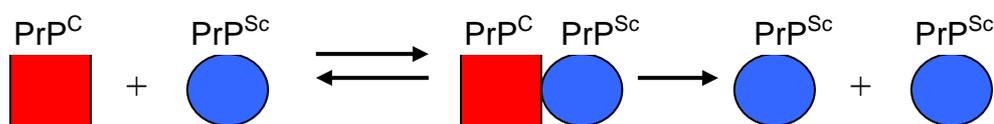


Figura 18: Nesse modelo admite-se a volta da reação (indicado pelas setas) entre o estágio intermediário e o início da reação.

O terceiro modelo (Figura 19) descreve o caso mais próximo do que se observa experimentalmente. Esse modelo leva em conta a formação de agregados que as moléculas PrP^{Sc} tendem a formar, admitindo a existência de um estágio intermediário entre o início e o final da reação. Os aglomerados, observados na prática, formam depósitos de placas amilóides, insolúveis; o seu contínuo crescimento começa a ocasionar a ruptura e a morte das células hospedeiras, e como grande parte dessas células são neurônios, as vítimas apresentam os conhecidos sintomas de demência e dificuldade de locomoção devido à perda dessas células nervosas. A agregação das moléculas de proteínas (Prions) constitui uma característica da BSE, Scrapie e de outras doenças degenerativas. Os algoritmos computacionais descritos adiante foram adaptados a partir do modelo descrito pela Figura 19.

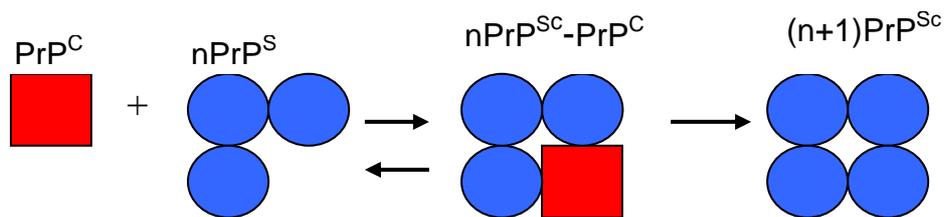


Figura 19: Reação de polimerização das moléculas PrP^{Sc} , as moléculas PrP^C convertidas formam agregados (clusters) que crescem continuamente, ocasionando a ruptura das células hospedeiras.

3.2 Modelos analíticos

Quando se deseja estudar um sistema que evolui e se transforma à medida que o tempo passa, tais como, crescimento populacional; dinâmica competitiva de uma determinada espécie, etc, é possível modelar o seu comportamento através de uma equação diferencial que irá governar a evolução desse sistema. Obtendo a solução dessa equação e os parâmetros que se ajustam a esse sistema, é possível fazer uma estimativa do seu estado no futuro.

Modelos analíticos produzem bons resultados do ponto de vista qualitativo, mesmo aqueles mais simplificados. A seguir serão apresentados alguns dos principais resultados obtidos utilizando um modelo bem simples (GALDINO *et al*, 2001). Esse modelo tem por finalidade descrever a reação de conversão das moléculas de proteínas PrP^C em PrP^{Sc} , e com isso extrair o seu tempo de incubação, sobrevivência e de morte. Com esse modelo foi possível reproduzir, qualitativamente, resultados observados experimentalmente com hamsters, como, por exemplo, que o tempo de sobrevivência (diferença do tempo de incubação e morte) é independente da concentração inicial de Prions PrP^{Sc} com que o animal é infectado (Prusiner, 1984).

3.2.1 Modelagem analítica para reações priônicas

Nesta seção será apresentado um modelo analítico simples para descrever as reações priônicas. A proposta do modelo analítico (ALBUQUERQUE, p.14, 2003; GALDINO *et al*, 2001) consiste em desenvolver uma reação de auto-catálise, e o modelo mais simples possível para descrever a transformação de A para B pode ser representado por



onde $A=PrP^C$, $B=PrP^{Sc}$ (proteína normal e modificada, respectivamente) e K representa a cinética da reação. A equação (3.1) foi elaborada de acordo com o modelo descrito pela Figura 17 que não inclui estágio intermediário nem aglomeração. Quando uma proteína B encontra uma A , esta é convertida para a forma B . A velocidade dessa reação (3.1) é controlada pela constante K que determina a cinética da reação. Considera-se que seja sempre constante a soma das concentrações das proteínas normal ($[A]$) e modificada ($[B]$), ou seja, $[A]+[B]=c$. A equação que descreve o desenvolvimento da doença, segundo esse modelo, é dada pela seguinte equação diferencial

$$\frac{db}{dt} = K \cdot a \cdot b = K \cdot (1 - b) \cdot b \quad (3.2)$$

onde $a=[A]$ e $b=[B]$. Integrando esta equação, obtém-se

$$b(t) = \frac{c}{1 + \left(\frac{c}{b_0} - 1\right) \exp(-K \cdot c \cdot t)} \quad (3.3)$$

para fins de normalização, assume-se que $c=1$, dessa forma

$$b(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{b_0} - 1\right) \exp(-K \cdot t)} \quad (3.4)$$

onde b_0 representa a dose inicial no tempo $t=0$, B representa a proteína do tipo PrP^{Sc} e $[B]=b$ representa a concentração da proteína B . A representação gráfica de $b(t)$ versus t , para uma determinada taxa K constante, permite observar dois regimes: primeiro, a concentração de B 's permanece baixa por um longo período de tempo; segundo, a concentração de B 's atinge um máximo, quando todos os A 's já tiverem sido convertidos.

É possível verificar na Figura 20 como a velocidade da reação é controlada pelo parâmetro K , quando maior for este valor mais rápido ocorrerá a reação, ver equação (3.2). A solução dessa equação é que rege o desenvolvimento da reação de conversão. Sabe-se, no entanto, que os A 's convertidos tendem a formar agregados com os B 's o que não é previsto pelo modelo analítico. Encontrar uma equação diferencial que modele essa formação de agregados é tarefa bastante difícil devido, principalmente, ao grande número de parâmetros envolvidos.

A Figura 20 está de acordo qualitativamente com os resultados observados experimentalmente: longo tempo de incubação, para o qual a doença permanece assintomática; súbito aumento do número de Prions B 's, caracterizando a manifestação dos

primeiros sintomas levando à morte da vítima em um curto espaço de tempo. Será mostrado ao longo dessa seção os resultados obtidos com a utilização desse modelo.

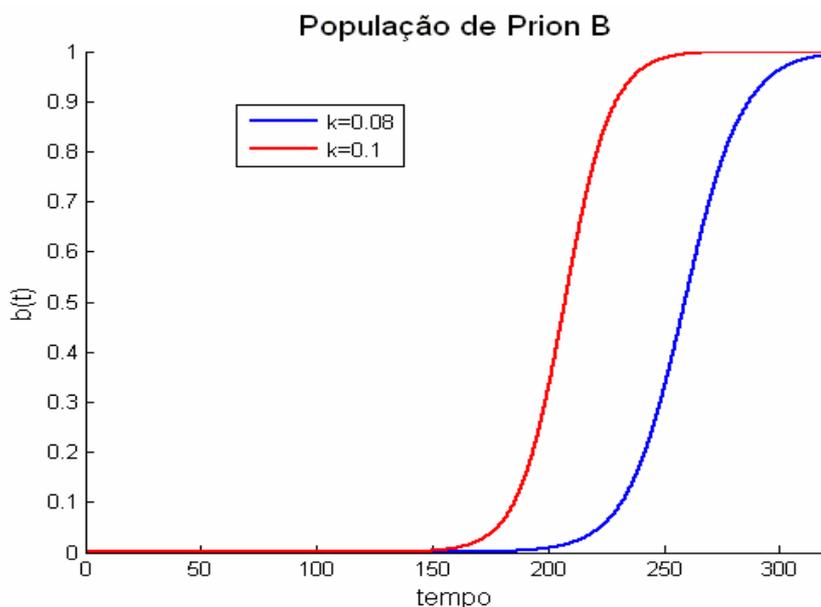


Figura 20: A curva em vermelho representa a população de Prion B para uma cinética da reação $K=0.1$, a curva azul para $K=0.08$. A cinética da reação é que determina a velocidade da reação.

Na Figura 21 é mostrado como se dá a velocidade da conversão de $[A]$ para $[B]$, para valores diferentes de K . A velocidade de formação de B 's cresce continuamente até chegar um ponto de máximo, a partir do qual começam a faltar A 's para a conversão e a velocidade da reação diminui. Nota-se que para maiores valores de K , maior é o valor de pico da velocidade da reação.

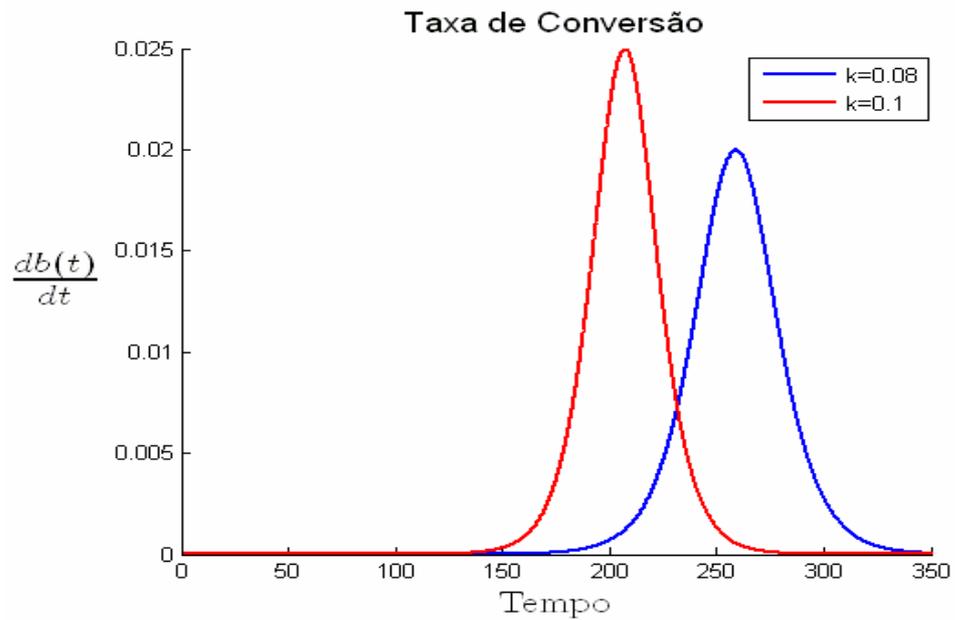


Figura 21: Taxa da conversão de Prions A 's para B 's. Como se pode observar nessa figura, existe um ponto de máximo, para o qual a partir dele a eficiência da conversão começa a diminuir. Essa diminuição é devido à falta de A 's.

O tempo de sobrevivência (T_S) é dado pela diferença entre o tempo de ocorrência da morte e o tempo de incubação T_I , caracterizado pelo surgimento dos primeiros sintomas da doença. Experimentos realizados com a implantação de tecido cerebral de hamsters contaminados com PrP^{Sc} em hamsters sadios (PRUSINER, 1984), comprovaram que o tempo de sobrevivência é independente de b_0 , i.e., da concentração inicial do agente infeccioso. No modelo analítico simples também se pode observar esse resultado como mostra a Figura 22. A expressão analítica para o tempo de sobrevivência pode ser obtida a partir da equação (3.4) isolando o valor de T da forma

$$T = \frac{1}{K \cdot (a_0 + b_0)} \ln \left[\frac{a_0}{b_0} \left(\frac{b(T)}{a_0 + b_0 - b(T)} \right) \right] \quad (3.5)$$

ou

$$T = \frac{1}{K \cdot (a_0 + b_0)} \ln \left[\frac{b(T)}{b_0} \left(\frac{1}{1 + \frac{b_0}{a_0} - \frac{b(T)}{a_0}} \right) \right] \quad (3.6)$$

tal que, $c = a_0 + b_0 = 1$. Assumindo que $\frac{b_0}{a_0} \ll 1$, (i.e., a concentração de Prion normal é

muito maior que o Prion patogênico), a equação (3.6) fica

$$T \simeq \frac{1}{K \cdot a_0} \ln \left[\frac{b(T)}{b_0} \left(\frac{a_0}{a_0 - B(T)} \right) \right]. \quad (3.7)$$

Assumindo que o tempo de incubação ocorra para um valor de $b(T_I) = B_I$, e o tempo de morte para um valor de $b(T_M) = B_M$, da equação (3.7), o tempo de incubação e de morte ficam

$$T_I \simeq \frac{1}{K \cdot a_0} \ln \left[\frac{B_I}{b_0} \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right] \quad (3.8)$$

e

$$T_M \simeq \frac{1}{K \cdot a_0} \ln \left[\frac{B_M}{b_0} \left(\frac{a_0}{a_0 - B_M} \right) \right]. \quad (3.9)$$

Tem-se, então, uma expressão para o tempo de sobrevivência, independente da concentração inicial de infecção b_0 . Pela Figura 22, escolhendo um valor para B_I e B_M , a diferença entre as duas retas é praticamente constante, e o tempo de sobrevivência é descrito pela equação

$$T_S = T_M - T_I \approx \frac{1}{K \cdot a_0} \ln \left(\frac{B_M}{B_I} \cdot \left(\frac{a_0 - B_I}{a_0 - B_M} \right) \right) \quad (3.10)$$

que é independente de b_0 .

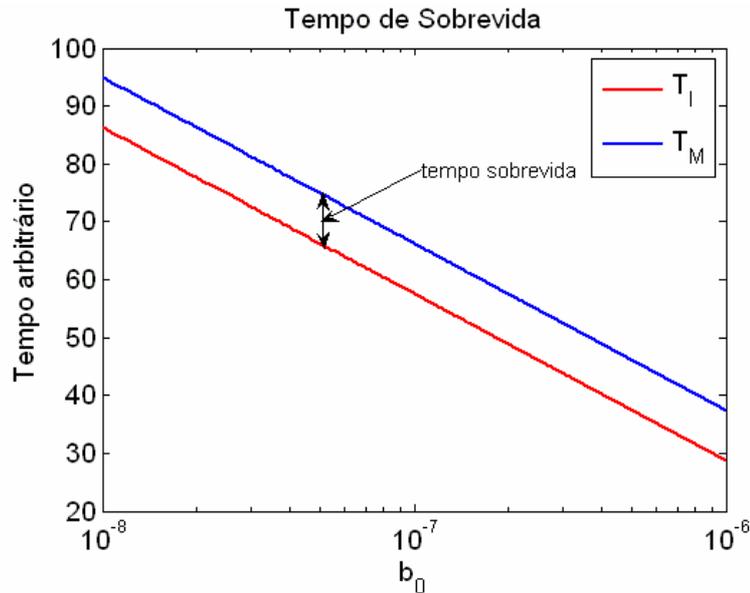


Figura 22: Análise qualitativa para o tempo de sobrevida versus dose de contaminação.

A partir da expressão (3.10), pode-se plotar o seu gráfico 3D e visualizar melhor a variação do tempo de sobrevida em função de B_I e B_M (Figura 23).

Na Figura 24 é mostrada a representação gráfica bidimensional da Figura 23 para o tempo de sobrevida. Os pontos estão representados por cores que correspondem ao eixo-z. Com esse gráfico bidimensional é mais fácil visualizar como o tempo de sobrevida varia com B_I e B_M , também é possível notar as regiões (pela mesma cor) onde o tempo de sobrevida se mantém constante.

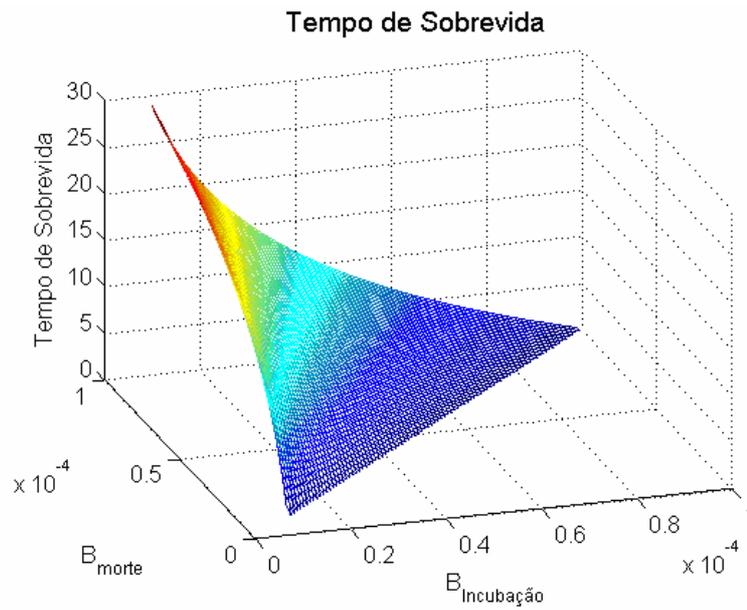


Figura 23: Representação gráfica qualitativa para o tempo de sobrevida.

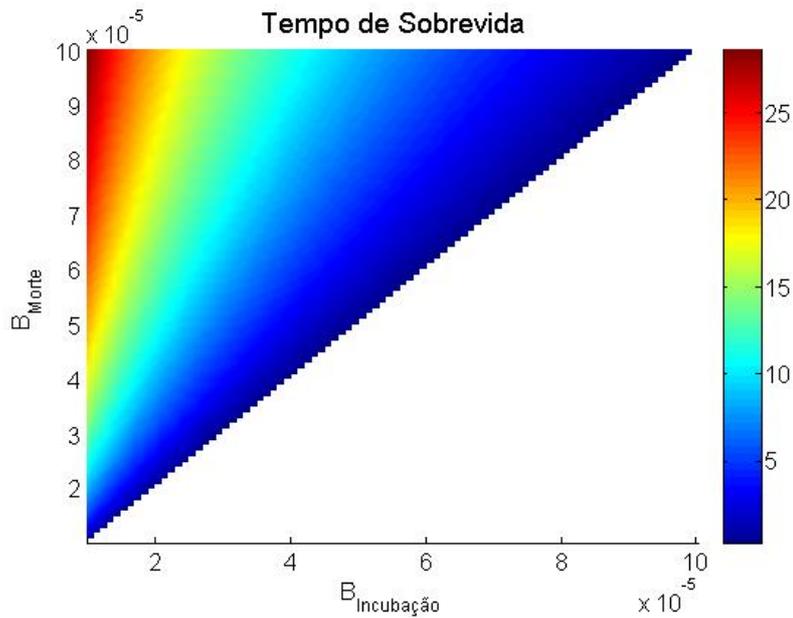


Figura 24: Representação no plano para o tempo de sobrevida ($B_M > B_I$). Ao lado encontra-se a barra de cores atribuída a cada valor numérico. As cores indicam as regiões onde o tempo de sobrevida se mantém constante.

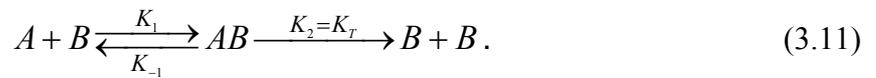
Como foi mostrado, o modelo analítico simples apresentou boa concordância qualitativa com fatos observados experimentalmente, tais como: longo tempo de incubação (Figura 20), morte em um curto período de tempo e independência do tempo de sobrevivência com a dose inicial de infecção (Figura 21). Apesar disso, esse modelo por ser determinístico, não permite fazer uma análise estatística dos resultados. Também, como foi citado anteriormente, não é possível determinar a influência da formação de agregados que os Prions B's tendem a formar, no resultado final de T_I . Para resolver o problema da formação de agregados, simulações computacionais representam um método alternativo mais indicado. As simulações permitem extrair uma variedade de informações e resultados que não seriam possíveis em um modelo analítico. Deve-se notar que, da equação (3.8), se b_0 for associada à dose de infecção n (que será definida na seção 3.4) utilizada por Prusiner (1984) (Figura 22), pode-se obter o valor de K através de inclinação da reta $T_I(n)$. No entanto, esse modelo não permite associar K a nenhuma constante conhecida. Na seção seguinte será definido um novo modelo que permitirá fazer essa associação, através da equação de Michaelis-Menten.

3.3 Modelo analítico a partir da equação de Michaelis-Menten

Nesta seção será discutido brevemente um novo modelo analítico obtido a partir da equação de Michaelis-Menten, já apresentada anteriormente (seção 2.5). Em seguida será feita uma análise comparativa com o modelo analítico simples, descrito nesse mesmo capítulo (seção 3.2.1).

Nesse modelo, admite-se um estágio intermediário entre os estados inicial e terminal da reação (ver Figura 18). Além de ser mais aceitável do ponto de vista

experimental, esta abordagem permite trabalhar com constantes associadas à equação de Michaelis-Menten, bastante utilizada em reações bioquímicas. Essas constantes são extensamente tabeladas na literatura, para reações com enzimas. Isso permitirá comparar valores obtidos pelo modelo com aqueles conhecidos para enzimas, para estimativas da ordem de grandezas desses parâmetros. Partindo, portanto, da equação de Michaelis-Menten (2.1), por analogia, fazendo $[E]=[B]$, $[S]=[A]$ e $[P]=[B]$, tem-se



Utilizando os mesmos procedimentos descritos na seção 2.5, seguindo as equações (2.2 a 2.7) chega-se ao seguinte resultado

$$v = \frac{d[B]}{dt} = \frac{K_T[A][B_0]}{K_M + [A]}. \quad (3.12)$$

Fazendo, da equação (3.12), $a=[A]$ e $b=[B_0]$, tem-se a seguinte equação diferencial

$$\frac{db}{dt} = \frac{K_T \cdot a \cdot b}{K_M + a}. \quad (3.13)$$

Chamando $c = a + b = a_0 + b_0$, pode-se integrar a equação (3.13) até um tempo T , isto é

$$\int_0^T dt = \int_{b_0}^b \frac{K_M + (c - b)}{K_T \cdot (c - b) \cdot b} db \quad (3.14)$$

cuja solução é

$$T = \frac{1}{K_T(a_0 + b_0)} \left[(K_M + a_0 + b_0) \ln \left(\frac{b(T)}{b_0} \right) + K_M \ln \left(\frac{a_0}{a_0 + b_0 - b(T)} \right) \right]. \quad (3.15)$$

Da equação (3.15) não é possível isolar algebricamente o valor de $b(T)$, como foi feito no modelo discutido na seção 3.2.1. Para analisar o comportamento de $b(T)$, é

necessário resolver a equação diferencial (3.13) numericamente. Esta equação é dependente de duas constantes características da reação (K_M e K_T), ao contrário do caso discutido na seção 3.2.1, dependente apenas de K . No que se segue, será definida uma taxa relativa $\alpha = \frac{K_T}{K_M}$ (taxa mencionada somente na Figura 25.b), i.e., $K_T = \alpha \cdot K_M$. Essa

constante foi adotada para referenciar o novo modelo. Nota-se que quando $K_M \gg a_0 + b_0$,

e chamando $K = \alpha = \frac{K_T}{K_M}$ a equação (3.15) torna-se

$$T = \frac{1}{K(a_0 + b_0)} \left[\ln \left(\frac{a_0 \left(\frac{b(T)}{a_0 + b_0 - b(T)} \right)}{b_0} \right) \right] \quad (3.16)$$

idêntica ao modelo da seção 3.2.1, equação (3.5), mas com $K = \frac{K_T}{K_M}$. É conhecido agora

que K , do modelo analítico descrito na seção 3.2.1, representa a razão de duas constantes bastantes conhecidas das reações enzimáticas.

A partir da Figura 25 é possível perceber que a equação de Michaelis-Menten descreve bem, qualitativamente, o comportamento esperado para $b(T)$. Fixando $(a + b) = 1$ e assumindo que $K_M \gg (a_0 + b_0)$, nota-se que para $K_M > 10^3$ já se produz uma boa aproximação entre os dois modelos, conforme mostrado na Figura 25.a.

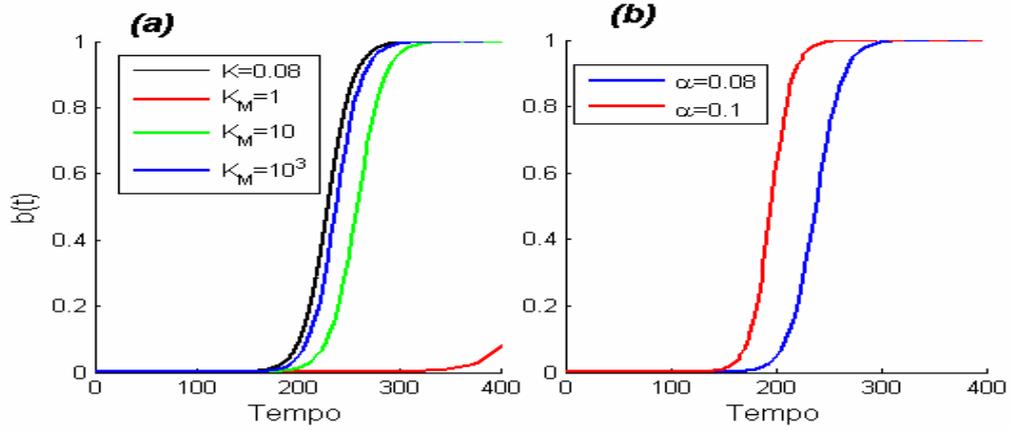


Figura 25: Modelo analítico simples representado aqui por $K=0.08$ (a) e K_M referenciando o novo modelo, tal que $\alpha=K_T/K_M$ que é equivalente a K quando $K_M \gg (a_0 + b_0)$. De acordo com o gráfico (a), para grandes valores de K_M os dois modelos se aproximam. Na figura (b) fixando $K_M=10^3$ percebe-se que para maiores valores de α a reação ocorre mais rapidamente (como já esperado pois $\alpha \approx K$).

Utilizando o mesmo procedimento da seção 3.2.1 para o tempo de incubação

$b(T_I) = B_I$ e o tempo de morte $b(T_M) = B_M$ e considerando novamente $\frac{b_0}{a_0} \ll 1$, tem-se

$$T_I \approx \frac{K_M}{K_T \cdot a_0} \ln \left(\frac{B_I}{b_0} \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right) + \frac{1}{K_T} \ln \left(\frac{B_I}{b_0} \right) \quad (3.17)$$

e

$$T_M \approx \frac{K_M}{K_T \cdot a_0} \ln \left(\frac{B_M}{b_0} \left(\frac{a_0}{a_0 - B_M} \right) \right) + \frac{1}{K_T} \ln \left(\frac{B_M}{b_0} \right). \quad (3.18)$$

O tempo de sobrevivência $T_s = T_M - T_I$ também é independente da concentração inicial de infecção b_0 , i.e.,

$$T_s \approx \frac{K_M}{K_T \cdot a_0} \ln \left[\frac{B_M}{B_I} \left(\frac{a_0 - B_I}{a_0 - B_M} \right) \right] + \frac{1}{K_T} \ln \left(\frac{B_M}{B_I} \right) \quad (B_M > B_I) \quad (3.19)$$

e sua representação gráfica é dada pela Figura 26 e Figura 27. É importante notar da expressão (3.19) que T_s não depende da dose inicial de infecção (b_0). Esse resultado foi experimentalmente verificado por Prusiner (1984). Os valores atribuídos às cores da Figura 26 estão mais bem representados na Figura 27.

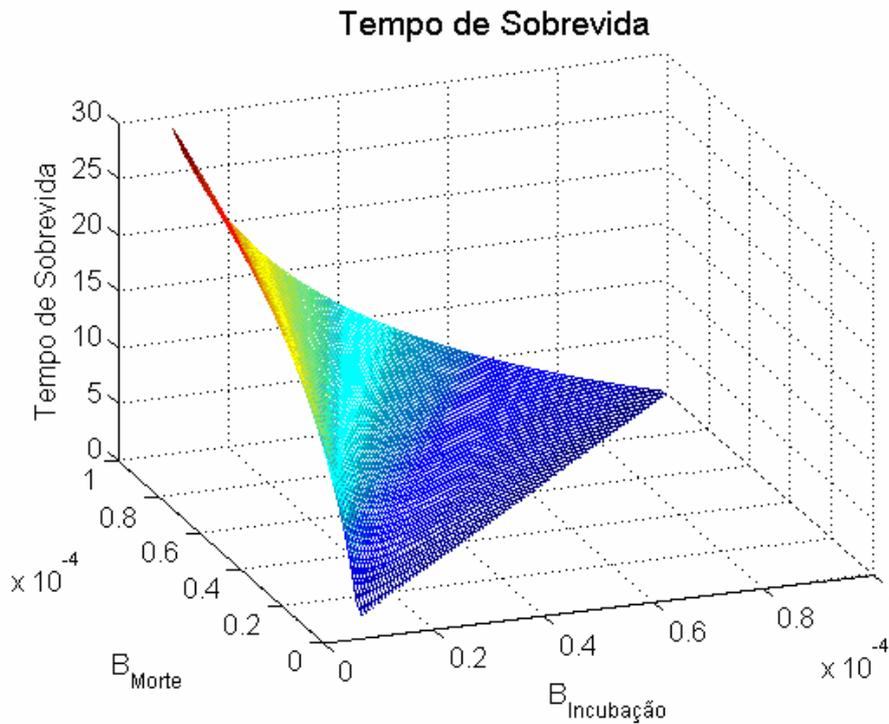


Figura 26: Variação do tempo de sobrevida em função de B_I e B_M em 3D.

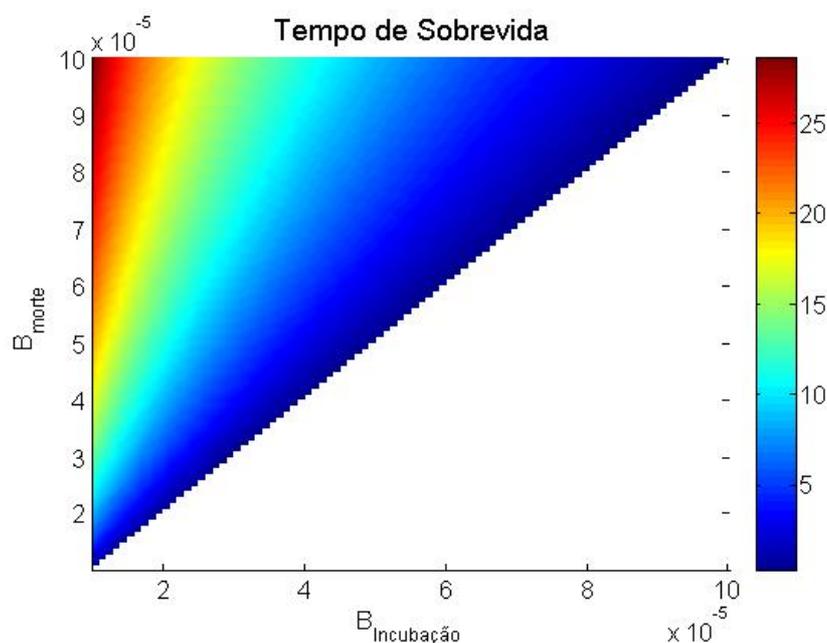


Figura 27: Representação 2D do gráfico do tempo de sobrevida acima ($B_M > B_I$). A barra de cores ao lado da figura mostra o valor numérico de T_S . Pelas cores da figura é possível visualizar as regiões onde o tempo de sobrevida se mantém constante.

3.4 Estimativa da constante de Michaelis-Menten para hamsters

Será feita nesta seção uma estimativa da razão entre as constantes que fazem parte da equação de Michaelis-Menten a partir de dados experimentais obtidos por S. Prusiner (1984). A dependência logarítmica do tempo de incubação em função da dose inicial da infecção (b_0) foi primeiramente observada por S. Prusiner, através de experimentos com hamsters nos quais eram injetadas pequenas quantidades do agente patológico responsável pela forma scrapie da doença. Seus trabalhos experimentais também mostraram que o tempo de sobrevida é praticamente independente da dose inicial de infecção conforme mencionado anteriormente. A partir das equações analíticas (3.8) ou (3.20) também se obtém qualitativamente esse mesmo resultado.

A Figura 28 mostra os dados experimentais para o tempo de incubação e de morte versus a dose inicial de infecção relativa à dose inicial de infecção (Prusiner, 1984). Para adaptar o modelo aos resultados experimentais, define-se a maior dose de infecção como sendo igual a β_0 . Sucessivas diluições serão representadas por $\beta_0/10$, $\beta_0/100$, e assim por diante. Pode-se, dessa maneira, estabelecer uma relação entre a dose inicial de infecção do modelo (b_0) e a dose definida experimentalmente (n) através da relação $\frac{b_0}{\beta_0} = 10^{n-10}$, onde n (dose) varia de 0 (pequenas concentrações) até 10 (grandes concentrações). Pode-se assim reescrever a equação (3.16) (p/ $a_0 \gg b_0$ e $b(T_I) = B_I$) para o tempo de incubação

$$T_I \approx \frac{1}{K \cdot a_0} \ln \left(\frac{B_I}{b_0} \cdot \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right) \quad (3.20)$$

substituindo $b_0 = \beta_0 \cdot 10^{n-10}$ em (3.20), obtém-se

$$T_I \approx \frac{1}{K \cdot a_0} \left[-\ln(10^{n-10}) + \ln \left(\frac{B_I}{\beta_0} \cdot \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right) \right]. \quad (3.21)$$

Utilizando a base 10 para os logaritmos da equação (3.21), chega-se na expressão

$$T_I = -\frac{\ln 10}{K \cdot a_0} \cdot n + \left[\frac{1}{K \cdot a_0} \left(10 \cdot \ln 10 - \log \left(\frac{B_I}{\beta_0} \cdot \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right) \cdot \ln 10 \right) \right]. \quad (3.22)$$

A expressão (3.22) mostra que T_I depende linearmente da dose (n) i.e., $T_I = -\frac{\ln 10}{K \cdot a_0} \cdot n + C$

onde C representa o termo independente da dose de infecção. Na Figura 28 é feito um ajuste linear desconsiderando os pontos para dose $n \leq 2$. Os coeficientes angulares obtidos dessa regressão foram 7.184 (para tempo de incubação) e 6.954 (para o tempo de morte).

Igualando esses valores ao coeficiente angular da equação (3.22) chega-se aos seguintes

resultados; $\frac{1}{K \cdot a_0} = \frac{7.184}{\ln 10} = 3.12$ dia para o tempo de incubação e $\frac{1}{K \cdot a_0} = \frac{6.954}{\ln 10} = 3.02$ dia

para o tempo de morte. Considerando $a_0 \sim 10^{-9} M$ (EIGEN, 1996), transformando dias para

segundos, tem-se $K = \frac{1}{a_0 \cdot (3.12 \text{ dia})} = 3710 M^{-1} s^{-1}$ (para o tempo de incubação) e

$K = \frac{1}{a_0 \cdot (3.02 \text{ dia})} = 3832 M^{-1} s^{-1}$ (para o tempo de morte). Chega-se então a uma estimativa

de $K = K_T / K_M$ da ordem de $10^3 M^{-1} s^{-1}$. Este valor encontra-se dentro do intervalo observado para enzimas (K_M varia de 10^{-7} a $10^{-1} M$ e K_T de 10 a $10^7 s^{-1}$). Esse resultado mostra que o modelo gera valores para as constantes de reação compatíveis com outras reações bioquímicas.

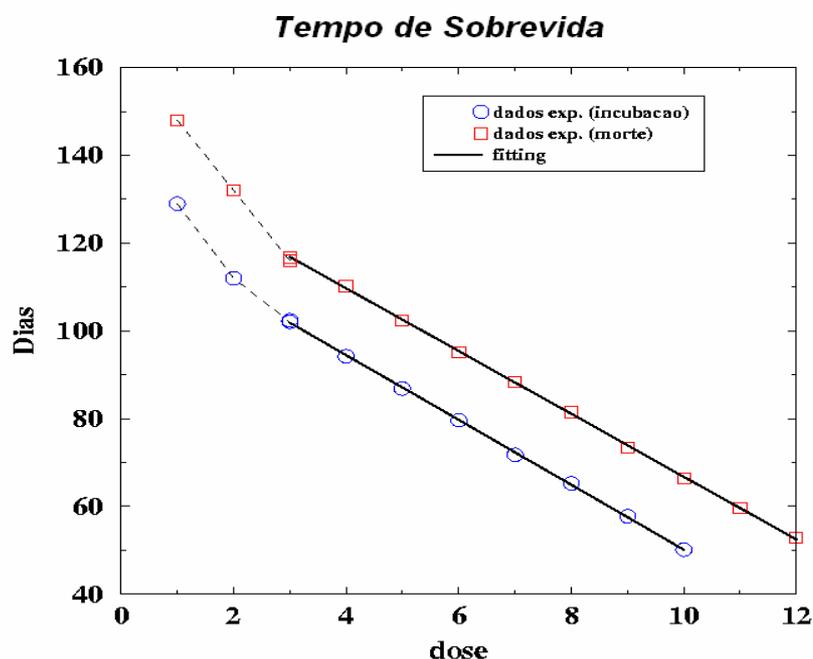


Figura 28: Dados experimentais da dependência do tempo de incubação e de morte versus dose de infecção obtidos por S. Prusiner (1984). Esse gráfico mostra que o tempo de sobrevida é praticamente independente da dose de infecção inicial exceto para dosagens extremamente pequenas. A regressão foi feita apenas para dose $n > 2$.

Capítulo 4

Principais resultados das simulações computacionais e análise estatística para T_1

Este penúltimo capítulo foi dividido em quatro seções: na primeira seção 4.1 serão feitas algumas descrições do funcionamento dos algoritmos utilizado nas simulações; na seção 4.2 são justificados os valores dos parâmetros utilizados nas simulações, e apresentados alguns resultados estatísticos; na seção 4.3 são apresentados os principais resultados obtidos através das simulações computacionais, seguidos de uma análise estatística dos resultados para o tempo de incubação; por último, (seção 4.4), é apresentada uma forma funcional, partindo de um modelo estocástico, para o tempo de incubação associada à encefalopatia espongiforme bovina (BSE).

4.1 Algoritmos computacionais utilizados nas simulações

Nesta seção será discutido o funcionamento dos algoritmos utilizados nas simulações computacionais. Os algoritmos foram escritos em Linguagem de programação C. Vários algoritmos foram elaborados, tentativamente, para descrever o problema em questão. Escolheu-se aquele que melhor se adequou ao problema. As simulações foram executadas em um Automata celular, bidimensional (células quadradas), com condições de

contorno periódicas. Assume-se, para fins ilustrativos, que a rede (Figura 29) represente qualquer Autômata Celular, tal que cada quadrículo colorido signifique um estado desse sistema.

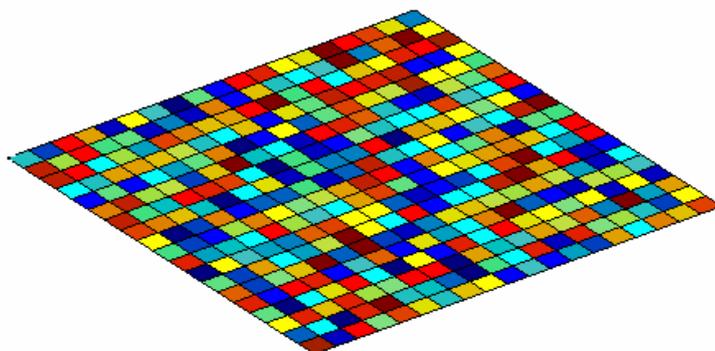


Figura 29: Rede quadrada representando o Automata Celular onde cada quadrículo representa uma célula e seu estado pode ser representado pela cor.

Impondo condições periódicas de contorno, a rede (retangular) passa a ter uma topologia de um toro, uma superfície sem fronteira “infinita”, o que minimiza problemas de tamanho finito. Para se obter tal topologia, basta unir as extremidade oposta dessa rede

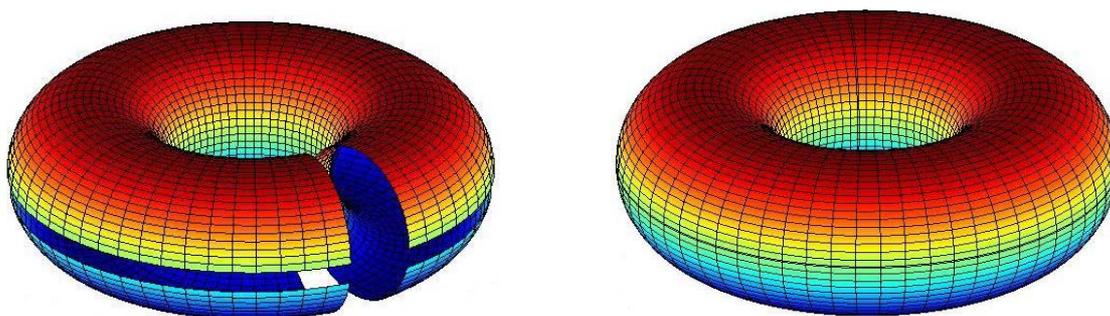


Figura 30: Unindo as células das bordas com as do lado oposto, a rede assume a topologia de um toróide.

O algoritmo consiste em simular uma reação do tipo



em uma rede ($N \cdot N$) populada aleatoriamente, com 3 tipos de elementos (estados do A.C.): tipo A (PrP^C); tipo B_m (PrP^{Sc}); e os sítios vazios Θ . Como os Prions do tipo B tendem a formar agregados, estes serão simulados por uma massa (m) associada a B ($B_{m-1}=m$; $m=1, 2, 3, \dots$); quanto maior a sua massa maior o alcance da interação. A soma da densidade de ($\rho(A) + \rho(B_m)$) é sempre constante. O algoritmo não leva em consideração a contínua criação de proteínas tipo A no organismo.

Passeando por toda a rede, procura-se por um sítio com Prion(s) tipo B e calcula-se seu raio de alcance ($R = \sqrt{B_m}$); verifica-se se existe algum Prion tipo A dentro do círculo de raio R ; se existir, a célula correspondente se tornará um espaço vazio e o Prion B terá sua massa acrescida de 1 unidade. Esse acréscimo de massa simula a formação de agregados, como mostrado no modelo descrito pela Figura 19, que os Prions B tendem a formar (Figura 31).

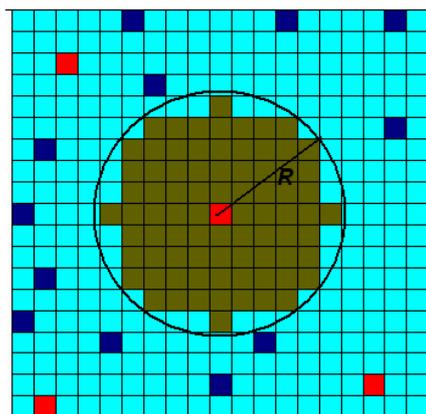


Figura 31: Os quadrados vermelhos representam os Prions tipo B , azul escuro os Prions A 's, os quadrados marrons são os possíveis estados que estão ao alcance de B e os quadrados azul claro representam os espaços vazios.

Após passar pela rede para a conversão (reação) é realizada uma nova passada para a difusão das espécies; cada Prion poderá mudar de posição para os primeiros sítios vizinhos (se estiverem vazios) de acordo com uma certa probabilidade de movimento (ρ_m) igual para todos. Uma unidade de tempo representa o tempo gasto para passar na rede para conversão e difusão das espécies.

4.2 Resultados obtidos através das simulações computacionais

Uma das preocupações, durante a formulação do modelo computacional, foi fazer com que este apresentasse, para uma dada região da rede, as mesmas características qualitativas observadas experimentalmente, como mostrado nas figuras (4 e 5) capítulo 1.

Na simulação considera-se que o tempo de incubação é atingido quando um determinado Prion B (PrP^{Sc} , inicialmente $B_0=1$) atinge um determinado tamanho, chamado de B_I (tamanho característico do cluster). Escolhe-se uma concentração inicial de Prions do tipo A e uma dose de infecção (Prions B) para iniciar a reação. Na simulação os parâmetros ρ_A , ρ_B e B_I são atribuídos em termos de uma fração do tamanho da rede (N^2). Há limites na simulação, pois para um determinado tamanho de rede (N^2), não é possível escolher quaisquer valores para os parâmetros acima. Isto porque existem relações de dependência entre eles que são necessárias para que a doença se manifeste. Essas dependências serão discutidas ao longo do texto.

Para efeito de ilustração, a seguir são apresentadas algumas figuras para o estado final da simulação, após o tempo de incubação ter sido atingido. A Figura 32 representa uma rede quadrada ($N=200$), populada com concentrações de

$\rho_A(t=0)=1\%$ ($N_A(t=0)=400$), $\rho_B=0.015\%$ ($N_B(t=0)=6$) e $B_I=0.1\%$ ($B_I=40$). Deve-se notar que, no modelo, o número de B 's permanece constante. Apenas o seu tamanho cresce, o que, no modelo, corresponde a aumentar o seu raio de ação. Para baixas densidades de Prions tipo A , a reação torna-se muito lenta, pois os B 's necessitam desses A 's dentro do seu raio de ação para que o cluster cresça até o tamanho B_I .

$N=200, T_I=1528$

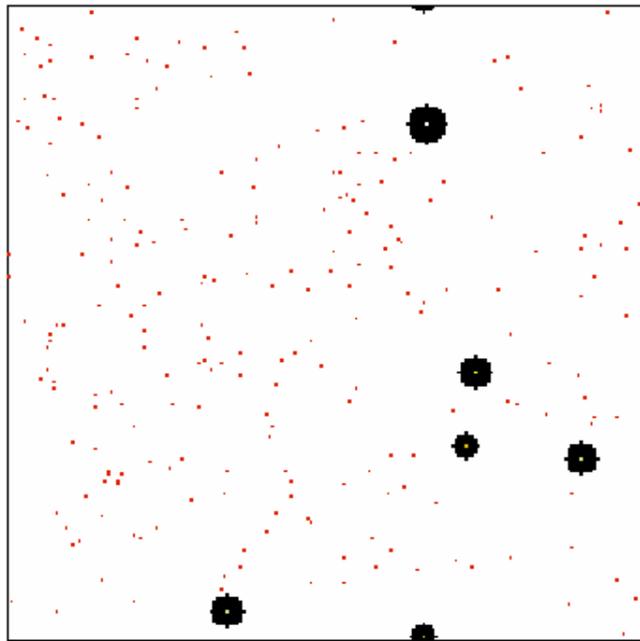


Figura 32: Distribuição final dos Prions na rede em $t=T_I$ (1528 unidades da simulação). Os pontos vermelhos representam os A 's (PrP^C) $N_A(t=0)=400$, e os círculos pretos representam os B 's (PrP^{Sc}), para $N_B(t=0)=6$. Tamanho de rede $N=200$.

Para valores maiores de ρ_A (Figura 33), a reação é mais favorecida e o desenvolvimento da doença ocorre mais rapidamente que no caso anterior. Na Figura 33.a

os parâmetros são os mesmos utilizados na Figura 32, exceto ρ_A que foi fixado em $\rho_A=5\%$ ($N_A(t=0)=2000$). A figura ao lado (Figura 33.b) representa uma ampliação de uma região da rede para ilustrar como os A 's (células em vermelhos) estão distribuídas na rede.

(a) $N=200, T_I=160$

(b)

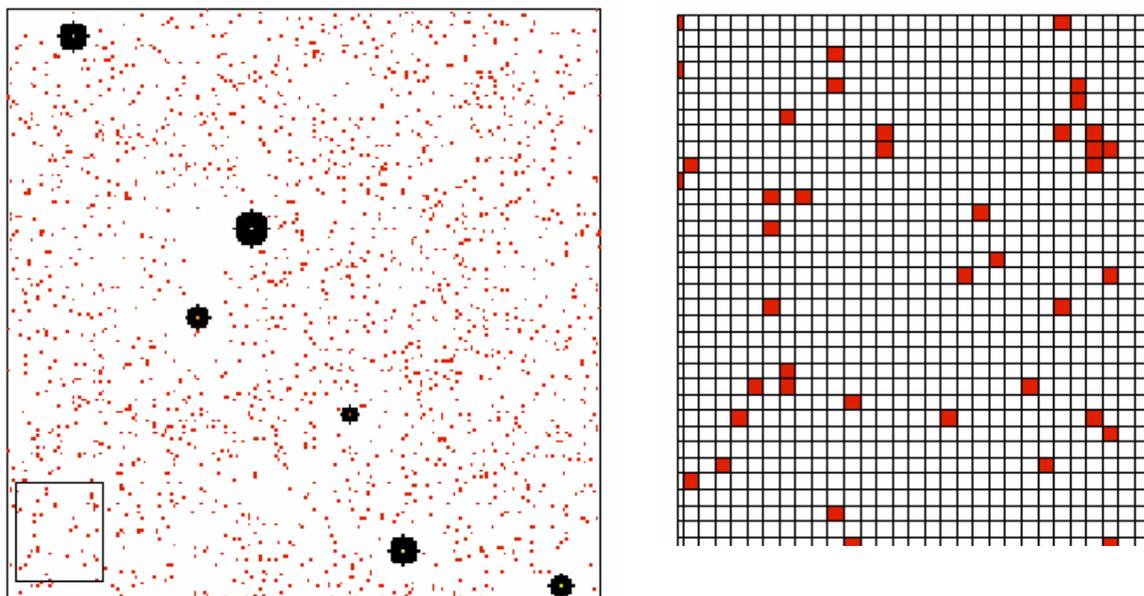


Figura 33: Distribuição final da rede, como na Figura 32, mas com $\rho_A=5\%$ ou $N_A(t=0)=2000$ (figura a). Na figura b mostra uma região, escolhida aleatoriamente da rede, ampliada (x10). Neste exemplo $T_I=160$ unidades da simulação.

A Figura 34.a representa uma situação com maior densidade de B 's ($\rho_B=0.06\%$ ou $N_B(t=0)=24$), quatro vezes maior que os casos anteriores. Essa figura ilustra claramente a não uniformidade dos crescimentos dos aglomerados, pois os B 's que estiverem em locais densamente populadas por A 's terão maior probabilidade de crescer até o tamanho crítico (B_I) em um tempo menor. A Figura 34.b, ao lado, mostra uma seção ampliada 10x.

É importante mencionar que as concentrações priônicas no organismo são supostamente bastante baixas (nanomolares), o que equivale a aproximadamente 0.001%

de PrP^C por área (SLEPOY *et al*, 2001). Por esse motivo, nas simulações finais foram adotados valores mínimos possíveis para ρ_A e ρ_B .

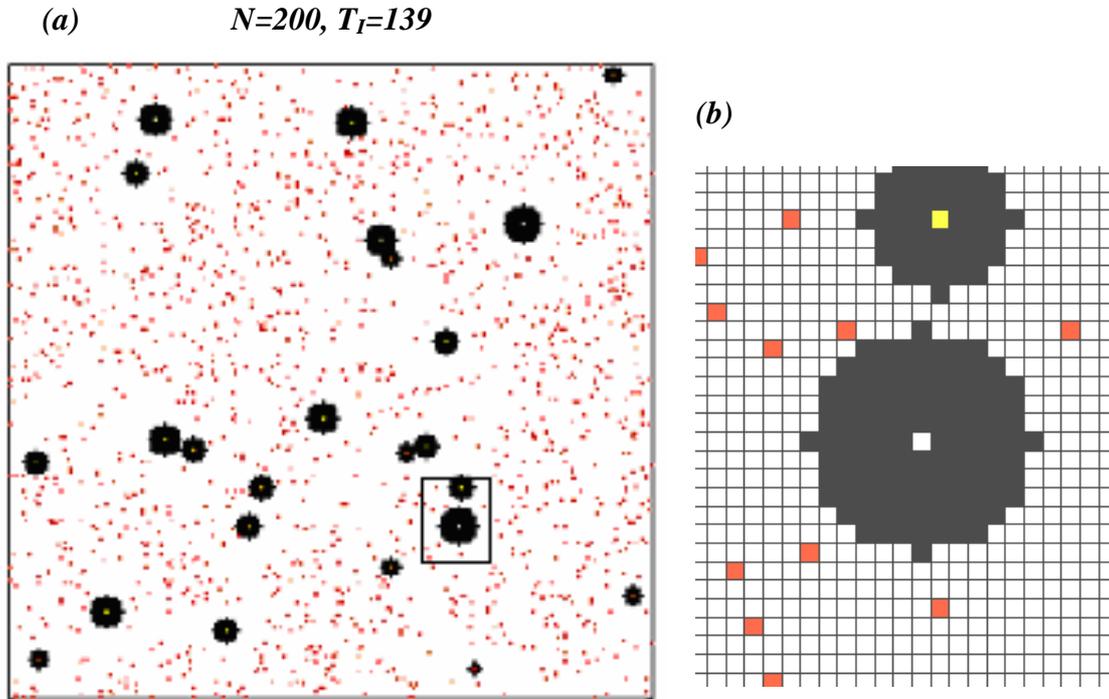


Figura 34: Rede densamente populada com $\rho_A=5\%$ ($N_A(t=0)=2000$) e $\rho_B=0.6\%$ ($N_B(t=0)=24$). Figura (b) ampliação da parte destacada da figura (a) para dar ao leitor uma melhor visão da formação de agregados pelos Prions B 's (geometricamente simétricos). Neste exemplo $T_I=139$ unidades da simulação.

Na Figura 35 mostra-se a dependência do desvio padrão da média do tempo de incubação (T_I), tal que $\sigma^2 = \langle T_I^2 - (\bar{T}_I)^2 \rangle$, para vários valores de N numa escala log-log, em função de ρ_A .

Nota-se que à medida que o tamanho da rede (N) cresce, o coeficiente angular tende para um valor constante. O desvio padrão decai com uma lei de potência, em função da concentração de A's, da forma

$$\sigma_{T_i} \sim \rho_A^\alpha \quad (4.2)$$

com $\alpha < 0$.

Os pontos que estão fora do alcance da reta ajustada (Figura 35) não foram usados na regressão. Como se pode observar nessa figura, o desvio padrão cresce rapidamente para baixas concentrações de A's. Nessas condições, a reação é dificultada, pois esses A's são os “combustíveis da reação”, conforme já salientado acima. Isso é razoável, pois para pequenos valores de ρ_A o tempo de incubação poderá nunca ser atingido. Para maiores tamanhos de rede, os valores mínimos para concentrações de A's também vão aumentando como esperado. Os resultados da regressão linear estão resumidos na tabela 1.

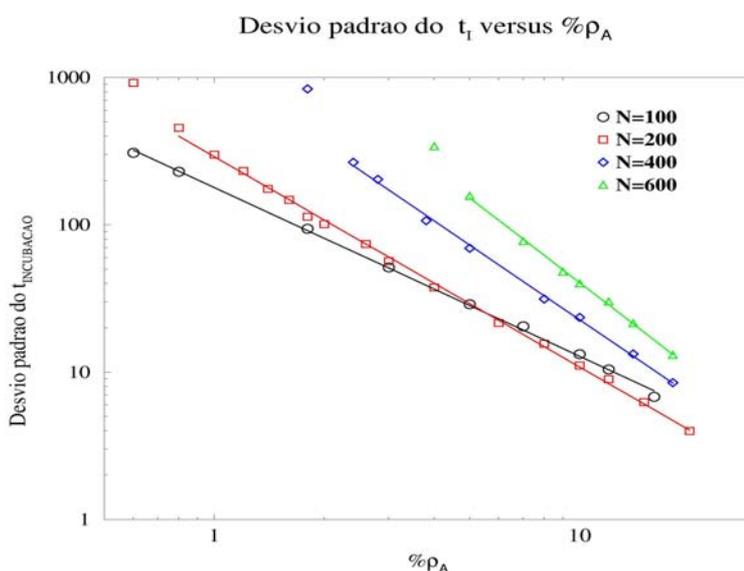


Figura 35: Com $\rho_A = 1.5 \cdot N \cdot N / 10000$ e $B_I = N \cdot N / 1000$. Para pequenos valores de A's, a reação é dificultada e os pontos começam a divergir para um tempo muito grande (infinito). Esses pontos que apresentavam divergência não foram incluídos no ajuste.

σ_{T_i}	Expoente (α)	Coef. correlação (r^2)
N=100	-1.1455	0.9989
N=200	-1.4653	0.9951
N=400	-1.6878	0.9981
N=600	-1.9106	0.9985

Tabela 1: Com $\rho_A = 1.5 \cdot N \cdot N / 10000$ e $B_I = N \cdot N / 1000$. Resultados obtidos através de uma regressão linear para o desvio padrão do tempo de incubação para diferentes tamanho de rede (N).

O tempo de incubação médio versus as concentrações de ρ_A também obedece a uma lei de potência (Figura 36), com seu expoente aproximadamente igual ao do desvio padrão para seus respectivos tamanho de rede (N). Os valores obtidos através da regressão para a média e o desvio padrão do tempo de incubação, versus ρ_A , estão resumidos na tabela 2.

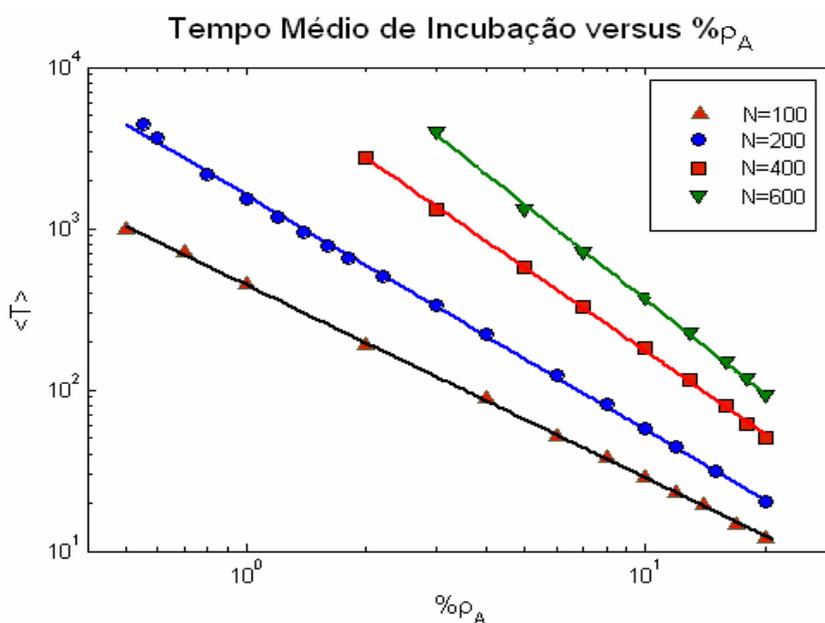


Figura 36: O tempo médio de incubação também segue uma lei de potência. Percebe-se que maiores são as inclinações para maiores tamanhos de rede (N).

T_I	Expoente(α)	Coef. correlação (r^2)
N=100	-1.1975	0.99980
N=200	-1.4557	0.99901
N=400	-1.7131	0.99944
N=600	-1.9475	0.99905

Tabela 2: Constantes para o desvio padrão do tempo de incubação. Os dados foram obtidos utilizando diferentes tamanho de rede N , $\rho_A = 1.5 \cdot N \cdot N / 10000$ e $B_I = N \cdot N / 1000$.

Por razões biológicas, é de interesse obter o comportamento da distribuição para baixas densidades de A 's. Motivados por um trabalho importante da área (SLEPOY *et al*, 2001), e realizando testes para diferentes valores de B_I , resolveu-se adotar $N=200$ e $B_I=40$ (ou equivalentemente 0.1% de $N \cdot N$). Variações nesses parâmetros não produzem mudanças significativas na forma da distribuição final para o tempo de incubação. Na Figura 37, é possível ver que $B_I=50$ e $B_I=40$ possuem aproximadamente a mesma inclinação com um pequeno desvio para $B_I=30$. A tabela a seguir resume os dados da regressão

	Expoente (α)	Coef. correlação (r^2)
$B_I=30$	-1.384335	0.997707
$B_I=40$	-1.480244	0.9929407
$B_I=50$	-1.489209	0.9932913

Tabela 3: Resultados da regressão para σ_T (desvio padrão do tempo de incubação) utilizando $B_I=30, 40$ e 50 (com $N=200, N_B=6$).

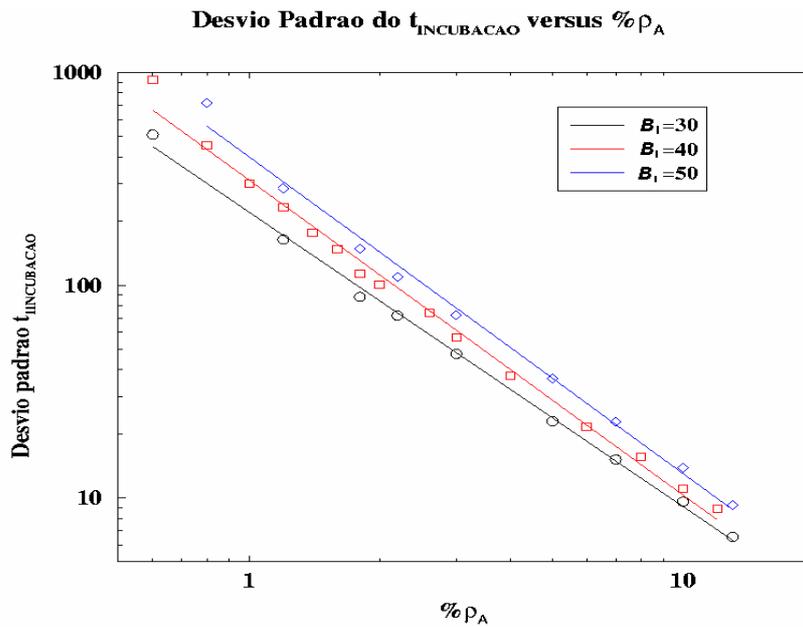


Figura 37: O desvio padrão não depende crucialmente do valor de B_I no intervalo $B_I \sim 40$ a 50.

4.3 Distribuições de probabilidades e simulações computacionais para o tempo de Incubação

A distribuição log-normal é uma distribuição de probabilidades bastante conhecida. Um dos mais famosos trabalhos publicados a respeito dessa distribuição pode ser encontrado em Aitchison *et al* (1957). Sua aplicação é das mais variadas, em diversas áreas da ciência, e.g., biologia, economia, análise de risco, etc. De uma maneira simples, se uma variável aleatória “ x ” segue uma distribuição log-normal, então o “ $\ln(x)$ ” segue uma distribuição normal (gaussiana).

A forma funcional da distribuição gaussiana, já devidamente normalizada, é dada por

$$F(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(x-\mu)^2}{\sigma^2}\right] \text{ com } -\infty < x < \infty. \quad (4.3)$$

Essa distribuição é caracterizada pelo seu valor esperado μ e seu desvio padrão σ , e possui a conhecida forma de um sino. Efetuando uma mudança de variáveis da forma $z = \ln(x)$ e chamando a nova distribuição de $G(z)$, deve-se ter

$$G(z)dz = F(x)dx \quad (4.4)$$

como $dz = \frac{1}{x} dx$, substituindo em (4.4), tem-se a distribuição log-normal

$$G(z) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi} \cdot z} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(z) - \mu)^2}{\sigma^2}\right]. \quad (4.5)$$

Sua representação gráfica é mostrada na Figura 38(a,b), utilizando diferentes valores para σ e μ (parâmetros da distribuição gaussiana). Observa-se que para esta distribuição, os valores de máximos não ficam concentrados em torno do valor médio, como ocorre com a distribuição normal.

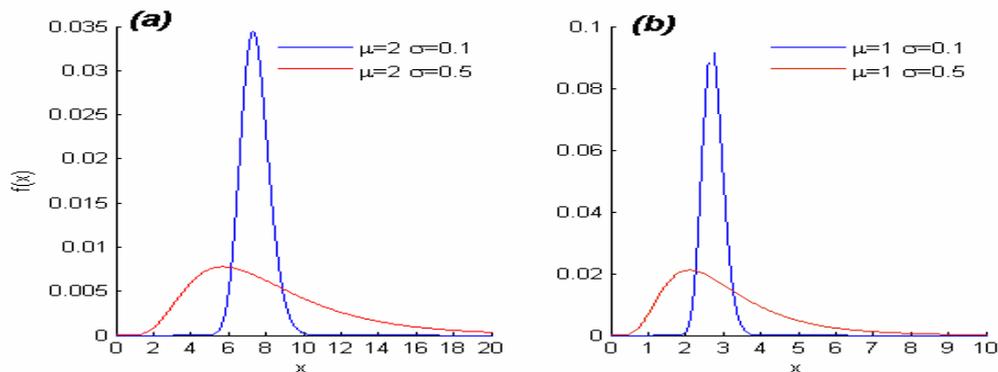


Figura 38: Distribuição log-Normal. Gráficos para diferentes valores dos parâmetros que caracterizam a distribuição (σ e μ). Como se pode notar, a forma da distribuição é sensível à variação dos seus parâmetros.

Voltando agora a atenção para os principais resultados obtidos através das simulações computacionais, na Figura 39 é mostrada a distribuição de frequência do tempo do incubação (T) para várias concentrações de ρ_A . A forma evidentemente assimétrica deixa claro que essa distribuição não é gaussiana. Nessa figura é possível ver que a largura e a média da distribuição diminui para maiores valores de ρ_A , como esperado.

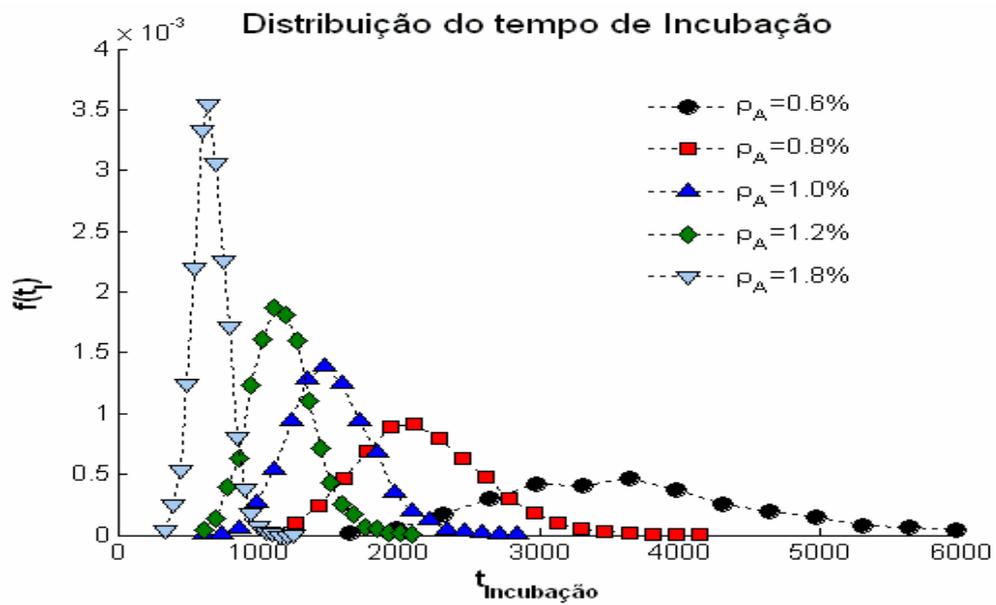


Figura 39: Distribuição de frequência do tempo de incubação para diferentes concentrações de ρ_A . Para maiores ρ_A menor é a largura da distribuição.

Quando é tomado o logaritmo natural desses dados obtém-se distribuições mais familiares (Figura 40). Pela sua aparente simetria, nota-se que essas distribuições estão mais próximas de gaussianas, embora ainda não seja possível saber com certeza a forma dessa distribuição. Nessa mesma figura também se percebe que as larguras das distribuições se mantêm aproximadamente constantes, não existindo mais aquela grande diferença observada na Figura 39.

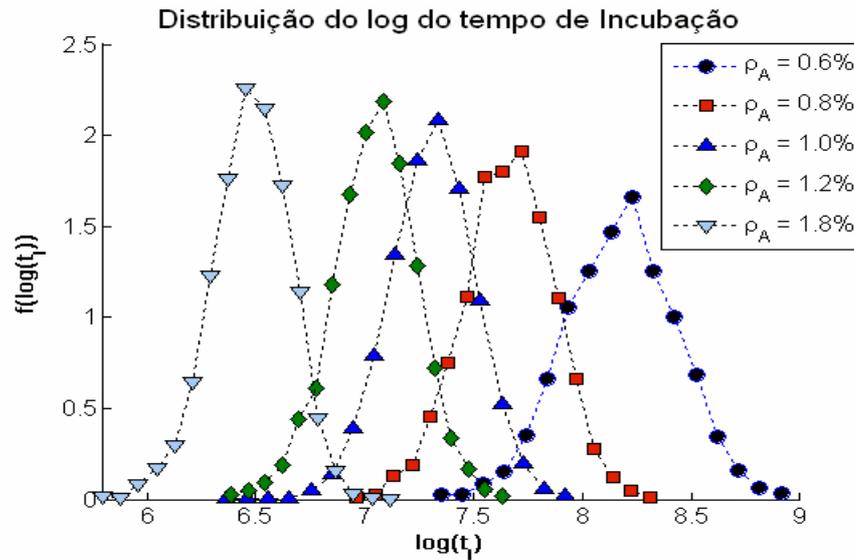


Figura 40: Distribuição de frequência do logaritmo de T_i , a nova distribuição aparenta ser uma gaussiana. As larguras das distribuições são aproximadamente constantes.

Para testar se esse novo conjunto de dados (Figura 40) se ajusta a uma distribuição conhecida, pode-se utilizar um método de análise estatística chamado “probability plot”. Este método indica quantitativamente o quanto um conjunto de dados se aproxima de uma distribuição conhecida. O melhor ajuste é obtido quando esses dados apresentam um comportamento linear, seguindo uma reta guia, quando plotadas contra a inversa da função acumulada dessa distribuição. Neste caso foi utilizado o “normal probability plot”, para verificar o quanto os dados se aproximam de uma distribuição normal.

Testando diferentes concentrações de A 's, será analisada a influência que este parâmetro exerce na forma da distribuição do tempo de incubação. Para altas concentrações de A 's, por exemplo $\rho_A=10\%$ e $\rho_A=8\%$ (Figura 41a), nota-se que os dados para o tempo de incubação se ajustam bem, por quase toda a extensão da reta guia, indicando que esses dados se ajustam bem a uma distribuição normal. Para pequenos

valores de ρ_A , por exemplo $\rho_A=0.6\%$ e $\rho_A=0.8\%$ (Figura 41b), já não é mais observado o mesmo comportamento anterior. Nota-se neste gráfico, que os dados apresentam um comportamento não-linear, sem nenhuma tendência a seguir a reta guia. Portanto para baixos valores de ρ_A esses dados não se ajustam bem a uma distribuição normal.

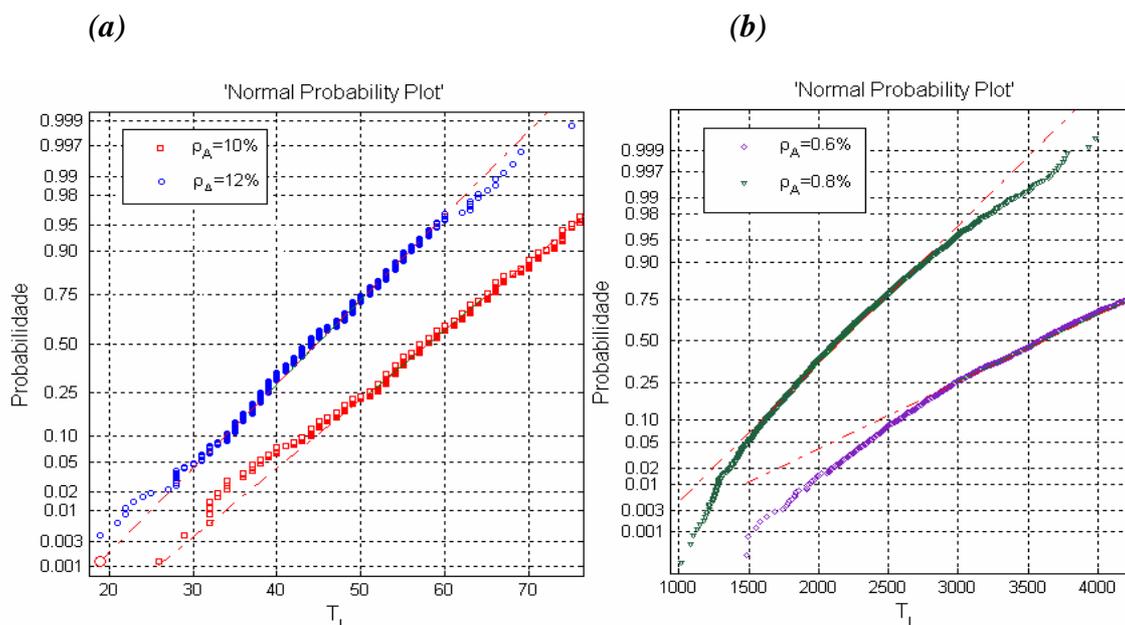


Figura 41: Nesta figura é possível notar que para altas concentrações de A 's (a) os dados para o tempo de incubação se ajustam melhor com uma distribuição normal. Para baixas densidades de A 's (b) a distribuição normal não seria a mais indicada.

Testando novamente com os mesmos valores de ρ_A utilizados na Figura 41(a,b), tomando agora o logaritmo natural do tempo de incubação a situação se inverte. Para altos valores de ρ_A (Figura 42a) o logaritmo do conjunto de dados não seguem mais a reta guia, com a disposição dos dados apresentando um comportamento curvo. Já para baixos valores de ρ_A (Figura 42b) os dados se alinham quase por toda a extensão da reta guia, mostrando que uma distribuição normal para o logaritmo do tempo de incubação representa um bom ajuste. Também é possível observar algo em comum entre os dois casos citados (altos e

baixos valores de ρ_A) que são as grandes flutuações dos dados para menores valores de T_I ou $\ln(T_I)$.

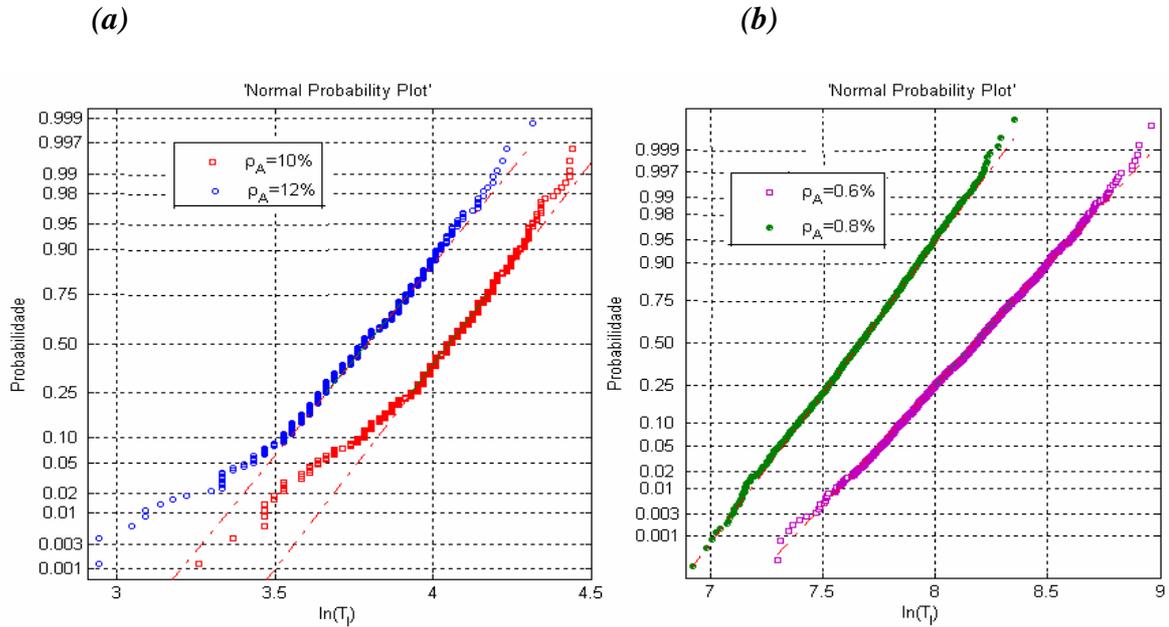


Figura 42: Utilizando os mesmos dados da figura anterior, tomando agora o logaritmo natural do tempo de incubação, percebe-se que para altas concentrações de A 's (a) os dados não seguem a reta guia em toda sua extensão. Para baixas densidades (b) os dados se ajustam melhor com a reta, indicando que os mesmos seguem uma distribuição normal.

A distribuição de frequência do tempo de incubação depende, portanto, da concentração de Prions tipo A , sendo que para baixos valores de ρ_A , $\{\ln(T_I)\}$ segue uma distribuição normal. Mas, como já foi descrito anteriormente, quando a distribuição de frequência do logaritmo natural de uma variável aleatória $\{\ln(t)\}$ for normal, então a distribuição de frequência dessa mesma variável será log-normal. Pode-se concluir, então, que o tempo de incubação se ajusta bem a uma distribuição log-normal para pequenos valores de ρ_A . Na Figura 43 são apresentados os valores mínimos possíveis que se pode chegar nas simulações (nesse caso $\rho_A=0.6\%$). Como se pode observar na figura, da

esquerda para direita, os dados para o tempo de incubação vão se alinhando ao longo da reta guia para menores valores de ρ_A . Nessa mesma figura também é possível notar que as flutuações para menores valores de T_I vão diminuindo a medida que ρ_A diminui.

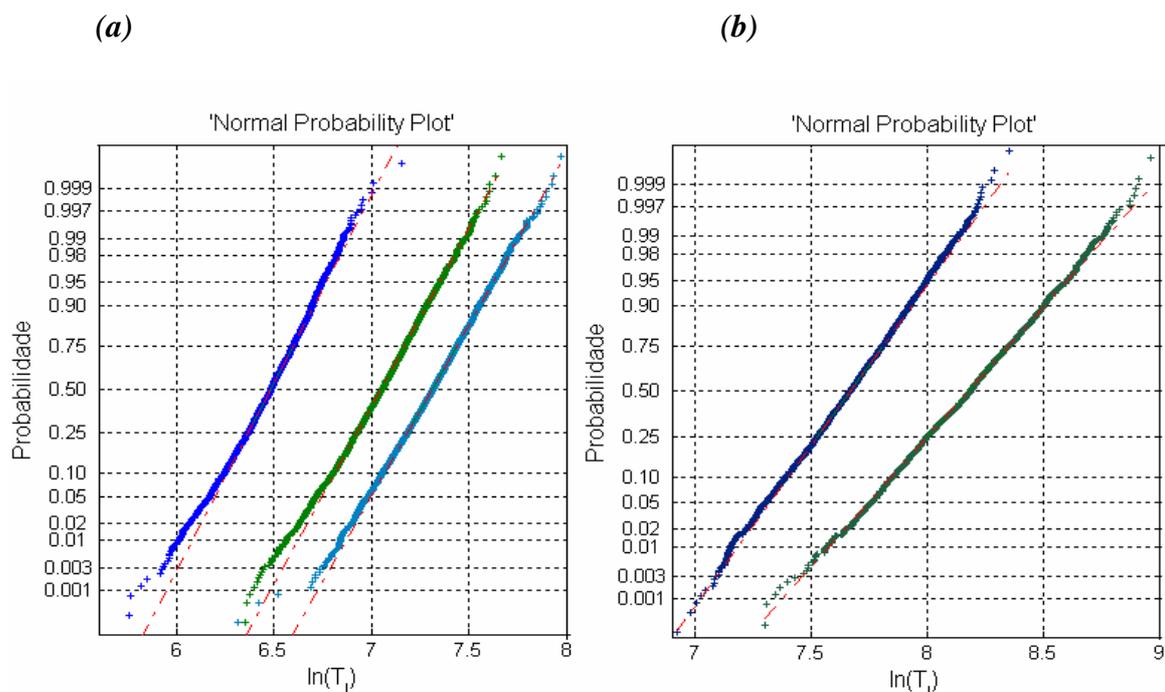


Figura 43: Da esquerda pra direita tem-se $\rho_A=1.8\%$, $\rho_A=1.2\%$, $\rho_A=1.0$, $\rho_A=0.8\%$ e $\rho_A=0.6\%$, respectivamente. Para menores concentrações o logaritmo natural dos T_I 's ($\ln\{T_I\}$) se ajustam melhor com a distribuição normal, portanto os $\{T_I\}$ seguem uma distribuição log-normal. Os gráficos foram divididos para melhor visualização dos dados, e as legendas foram omitidas para não sobrecarregar a figura.

Como a concentração biológica de A 's é bastante baixa (da ordem de 0.001% para uma distribuição superficial) (SLEPOY *et al*, 2001) é de se esperar que o tempo de incubação experimental (para BSE) também siga uma distribuição log-normal. Para verificar isso pode-se escalonar os tempo de incubação pelo seu tempo médio, i.e., $t_I = T_I / \langle T_I \rangle$. Fazendo isso nota-se que os dados tendem a colapsar em uma única curva (Figura 44). Nessa figura os pontos experimentais estão representados por círculos pretos.

Nota-se, visualmente, uma excelente concordância entre os resultados da simulação, particularmente para pequenos valores de ρ_A , e os resultados observados experimentalmente (SLEPOY *et al*, 2001). Em resumo, é razoável admitir, com base nesses resultados, que o tempo de incubação da BSE segue uma distribuição log-normal. Com essa hipótese pode-se agora construir um modelo estocástico capaz de fornecer uma expressão analítica para T_I , no caso da BSE. Será feito isso na próxima seção.

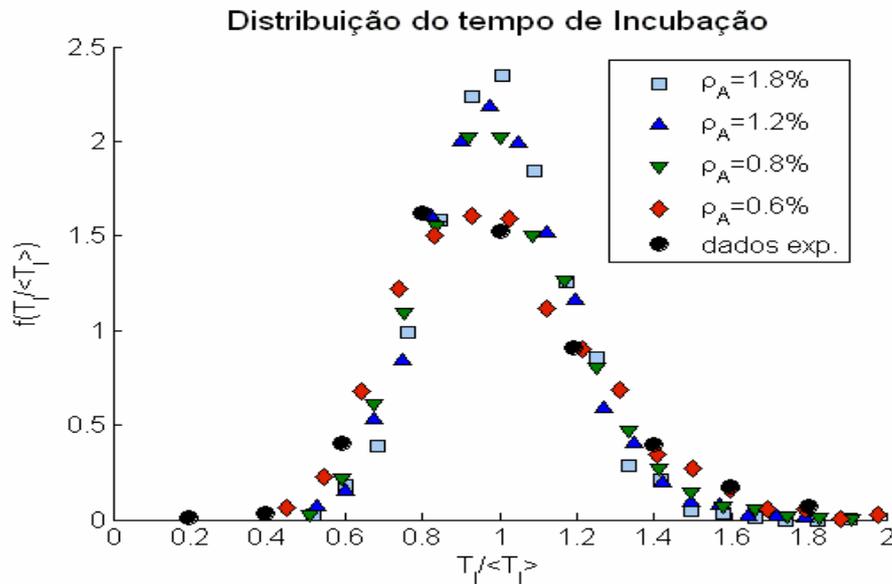


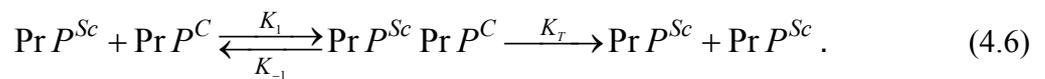
Figura 44: Distribuição de frequência do tempo de incubação. Quando escalonadas pela média, os pontos tendem a colapsar em uma única curva. O melhor ajuste com os dados experimentais é obtido para pequenos valores de ρ_A .

4.4 Modelo estocástico para o tempo de incubação (BSE)

O principal objetivo agora é encontrar uma forma analítica para a distribuição do tempo de incubação partindo de um modelo estocástico simples. Será mostrado que há uma

boa concordância entre o modelo computacional e o estocástico, ou seja, ambos descrevem muito bem os resultados observados experimentalmente.

Na natureza, muitas distribuições de variáveis aleatórias apresentam assimetria em torno do seu valor médio, ao contrário da distribuição normal que é simétrica em torno desse valor. Uma distribuição log-normal de uma variável aleatória está associada com fatores multiplicativos. Processos multiplicativos são bastante comuns, por exemplo, em biologia para descrever a dinâmica de crescimento de populações, em química para descrever cinética de reações, etc. O processo de dobramento (conversão) da proteína PrP^C para PrP^{Sc} envolve vários estágios intermediários. A partir da equação de Michaelis-Menten, o esquema representativo da conversão $PrP^C \longrightarrow PrP^{Sc}$ é resumido por



Nesta equação as constantes de reação representam uma taxa resultante de vários processos multiplicativos principalmente os que ocorrem entre a reação $PrP^{Sc} PrP^C$ e $PrP^{Sc} + PrP^{Sc}$. Nessa reação simplificada, a taxa $K=K_T/K_M$, pode ser pensada como o resultado de todos os fatores (multiplicativos) envolvidos nas reações reais que ocorrem no organismo, e que levam, ultimamente, PrP^C a PrP^{Sc} . Pode-se considerar $\{K\}$ como um conjunto de variáveis aleatórias, resultantes, por exemplo, de uma série de medidas de K , que obedecem a uma distribuição log-normal.

Para adaptar o modelo determinístico, equação (3.8) ou (3.16), ao modelo estocástico assume-se que $\{K\}$ siga uma distribuição log-normal, com T_I dado pela equação

$$T_I \approx \frac{1}{K \cdot a_0} \ln \left(\frac{B_I}{b_0} \cdot \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right) \quad (4.7)$$

p/ $b_0 \ll a_0$ onde $K = \frac{K_T}{K_M}$. Reescrevendo T_I como

$$T_I \approx \frac{1}{K} \left\{ \frac{1}{a_0} \ln \left(\frac{B_I}{b_0} \cdot \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right) \right\} \quad (4.8)$$

os termos dentro do colchete não apresentam nenhum fator que modifique a constante da reação K . Portanto é permitido reescrever essa equação na forma $T_I = D/K$, onde D é uma constante dependente apenas das condições iniciais (a_0 e b_0) e final (B_I). Como $\{K\}$ segue uma distribuição log-normal, por hipótese, $\{T_I\}$ também seguirá a mesma distribuição e com o mesmo desvio padrão da distribuição dos K 's (ver apêndice B). Por outro lado, a distribuição log-normal possui a propriedade que, quando a variável aleatória “ T ” é escalonada pela sua média, i.e., $t = \frac{T}{\langle T \rangle}$, obtém-se uma distribuição dependente apenas da variável σ (ver apêndice A), i.e.

$$g(t) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi} \cdot t} \exp \left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(t) + 1/2\sigma^2)^2}{\sigma^2} \right]. \quad (4.9)$$

Essa forma apresenta uma grande vantagem, pois depende apenas de um parâmetro de ajuste (σ). Maiores detalhes sobre as propriedades básicas dessa distribuição encontram-se no apêndice A. O formato dessa nova distribuição é mostrado na Figura 45.

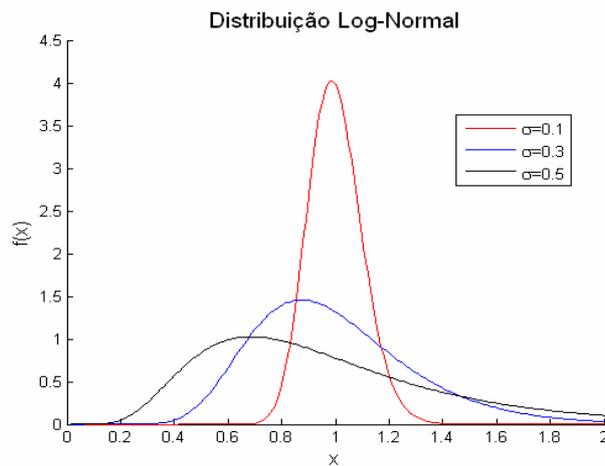


Figura 45: Distribuição log-normal quando escalonada pela sua média depende apenas da constante (σ).

A forma analítica da distribuição dos tempos de incubação, $g(t)$, pode agora ser ajustada aos dados experimentais para BSE, já escalados pela média (SLEPOY *et al*, 2001). A Figura 46 mostra esse ajuste, onde o melhor valor obtido por regressão não-linear, foi $\sigma=0.255$.

Comparando esse resultado com os resultados das simulações, existe uma densidade mínima de A's em que ambas as distribuições coincidem (Figura 44). Nessa figura observa-se que $\rho_A=0.6\%$ se ajusta muito bem aos dados experimentais. Vele lembrar que a concentração biológica de Prions é muito baixa no organismo, cerca de $10^{-9}M$.

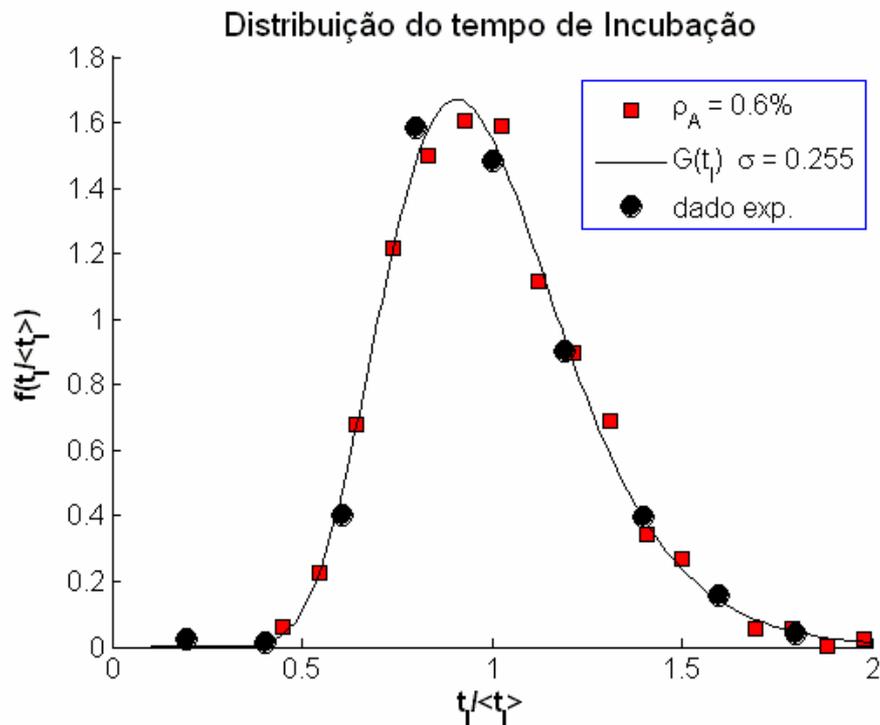


Figura 46: A linha contínua constitui a representação gráfica da distribuição log-normal escalonada ajustada por regressão aos dados experimentais (círculos pretos) referentes à BSE e os quadrados em vermelho representam os pontos da simulação com $\rho_A=0.6\%$. O melhor ajuste foi obtido para $\sigma=0.255$.

Essa figura mostra um excelente ajuste entre o modelo e os resultados experimentais. O modelo foi muito bem aceito pela comunidade, tendo sido publicado numa importante revista da área, o *Physical Review Letters* (FERREIRA *et al*, 2003). Esses resultados serão importantes na formulação de modelos estatísticos para estudar a epidemiologia das doenças priônicas, uma vez que a distribuição de probabilidades possui uma forma analítica bem definida.

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas

Neste trabalho foram realizados estudos do desenvolvimento e das características das doenças priônicas mediante modelos analíticos, computacionais e, por fim, um modelo estocástico com solução analítica. O primeiro modelo analítico utilizado tinha por objetivo modelar uma reação de auto-catálise da forma



onde A representa os Prions normais e B os Prions patogênicos responsáveis pelo desencadeamento da doença, tal que, a velocidade da reação é controlada pela constante K que representa a cinética da reação. Com esse modelo, foi possível reproduzir qualitativamente resultados observados experimentalmente, tais que o tempo de sobrevivência é independente da dose inicial de infecção ($B(t=0)$). Também foi possível encontrar uma equação matemática que relaciona um instante de tempo qualquer, em função da dose de infecção (b_0), dos Prions normais (a_0) e da população de Prion B (representado por $B(t)$). Todavia, através desse modelo não é possível associar a cinética da reação K a nenhuma constante conhecida das reações bioquímicas. Com a introdução de um novo modelo, construído a partir da equação de Michaelis-Menten, foi possível chegar a uma nova equação (3.15) que permitiu associar as constantes de reação do modelo às constantes de

reação associadas a reações enzimáticas. Esse fato produziu o primeiro contato quantitativo do modelo teórico com a realidade. Esse resultado permitiu associar a cinética da reação K a duas constantes bastante conhecidas na literatura, são elas: K_M que representa a constante de Michaelis-Mentem e K_T representa o número de moléculas de substrato “turn over” por moléculas de enzimas por segundo.

Adaptando a equação (3.16) a dados experimentais obtidos por S. Prusiner (1984), utilizando hamsters como cobaias, foi possível estimar a constante K (para o tempo de incubação e de morte) para esses animais. Foi encontrado K da ordem de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, valor este que se encontra dentro do intervalo observados para enzimas (K_M varia de 10^{-7} a 10^{-1} M e K_T de 10 a 10^7s^{-1}).

Com as simulações computacionais (em um Autômato Celular, 2D) foi possível contornar o problema da formação de agregados que os Prions PrP^{Sc} tendem a formar, que não eram previstos pelos modelos analíticos. Também com os resultados das simulações computacionais foi possível fazer análises estatísticas dos resultados, principalmente para o tempo de incubação (T_I) da doença em estudo. Os resultados mostraram que o tempo médio de incubação e seu desvio padrão, em função da concentração de Prions normais (PrP^C ou ρ_A) decai seguindo uma lei de potência. Foram utilizados tamanhos de rede $N=100, 200, 400$ e 600 , que apresentaram o mesmo comportamento. Os expoentes obtidos para o tempo médio de incubação e seu desvio padrão foram aproximadamente iguais para cada N . Obteve-se maiores larguras das distribuições de frequência do tempo de incubação para menores valores de ρ_A . Foi possível notar, também, que tomando o logaritmo natural dessa distribuição as suas larguras permaneciam aproximadamente iguais. Foi constatado que para altas dose de ρ_A (testado com 12% e 10% de $N \cdot N$) o tempo de incubação se

ajustou bem a uma distribuição normal. Para baixas dose de ρ_A (testado com 0.8% e 0.6% de N·N) o melhor ajuste foi obtido utilizando uma distribuição log-normal. Escalonando as distribuições, para o tempo de incubação, pelo seu valor médio, verificou-se que os dados tendiam a colapsar em uma única curva. Quando adicionado a esse mesmo gráfico dados experimentais (também escalonados pela média) para BSE, percebeu-se que uma única distribuição das simulações, correspondente a $\rho_A=0.6\%$, se ajustava perfeitamente com esse dados reais. Sabendo que para esse valor de ρ_A o tempo de incubação seguia a uma distribuição log-normal, então era de se esperar que também o mesmo fosse verdade para os dados experimentais. Com essa hipótese, foi desenvolvido um modelo estocástico simples. Nesse modelo, a taxa $K=K_T/K_M$ foi assumida como sendo todos os fatores multiplicativos envolvidos nas reações reais, que levam PrP^C a PrP^{Sc} . Dessa forma foi considerando $\{K\}$ como um conjunto de variáveis aleatórias que obedecem a uma distribuição log-normal, dessa maneira, foi possível achar uma forma funcional para o tempo de incubação, a partir da equação (4.8) mostrada na seção (4.6). Usando a relação entre T_I e K representada por

$$T_I \approx \frac{1}{K} \left\{ \frac{1}{a_0} \ln \left(\frac{B_I}{b_0} \cdot \left(\frac{a_0}{a_0 - B_I} \right) \right) \right\} \quad (5.2)$$

foi mostrado que T_I também segue a mesma distribuição para os K 's e com o mesmo desvio padrão (como mostrado no apêndice A). Como os resultados experimentais de T_I (para BSE) estavam escalonados pela média, também foi escalonada a forma funcional encontrada para T_I que ficou dependente apenas de um parâmetro de ajuste (σ). Ajustando a função analítica aos dados experimentais o melhor ajuste foi obtido com $\sigma=0.255$.

Perspectivas

Em trabalhos futuros seria interessante conhecer a forma funcional da distribuição dos tamanhos dos clusters em determinados instantes de tempo, principalmente quando o tempo de incubação é atingido. Também seria importante saber se o valor encontrado para σ no caso da BSE, é igual para qualquer espécie animal. Essa possível “universalidade” para o valor de σ pode ser constatada apenas com a obtenção de dados experimentais para o tempo de incubação em outras espécies. Isso seria de extrema valia no estudo, por exemplo, da epidemiologia da vCJD, que acomete humanos, para a qual o tempo de incubação é completamente desconhecido. Também seria interessante conhecer a relação entre as constantes de reação associadas às várias espécies animais.

APÊNDICE A

Distribuição log-normal a partir da gaussiana

Neste apêndice será mostrado como se chega à distribuição log-normal a partir da distribuição gaussiana

$$F(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(x-\mu)^2}{\sigma^2}\right] \text{ com } -\infty < x < \infty. \quad (\text{A.1})$$

Efetuada uma mudança de variável, da forma

$$z = e^x \quad (\text{A.2})$$

derivando, obtém-se

$$\frac{dz}{dx} = e^x = z. \quad (\text{A.3})$$

Fazendo

$$F(x)|dx| = G(z)|dz| \Rightarrow G(z) = F(x) \left| \frac{dx}{dz} \right| \Rightarrow G(z) = F(x) \frac{1}{z} \quad (\text{A.4})$$

isolando o valor de x , da equação(A.2), obtém-se

$$x = \ln(z). \quad (\text{A.5})$$

Substituindo (A.5), (A.4) em (A.1) chega-se a desejada distribuição Log-Normal

$$\boxed{G(z) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi} \cdot z} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(z) - \mu)^2}{\sigma^2}\right] \quad 0 < z < \infty.} \quad (\text{A.6})$$

Valor esperado $\langle Z \rangle$ da distribuição log-normal

Partindo da definição de valor médio, para $G(z)$, tem-se

$$\langle z \rangle = \int_0^{\infty} G(z) \cdot z \cdot dz \quad (\text{A.7})$$

substituindo $G(z)$ dado por (A.6) chega-se a

$$\langle z \rangle = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_0^{\infty} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(z) - \mu)^2}{\sigma^2}\right] dz. \quad (\text{A.8})$$

Efetuada uma mudança de variável, da forma $z \rightarrow y$, obtém-se

$$y = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{\ln z - \mu}{\sigma} \right) \quad (\text{A.9})$$

e seus novos limites de integração dado por

$$\begin{cases} z = 0 \Rightarrow y \rightarrow -\infty, \\ z \rightarrow \infty \Rightarrow y \rightarrow \infty. \end{cases}$$

Isolando o valor de z , a partir da equação (A.9), chega-se a

$z = e^{\sqrt{2}\sigma y + \mu} \Rightarrow dz = \sqrt{2} \cdot \sigma \cdot (e^{\sqrt{2}\sigma y + \mu}) \cdot dy$. Substituindo na equação (A.8), obtém-se

$$\langle z \rangle = \frac{e^{\mu}}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-y^2 + \sqrt{2}\sigma y} dy. \quad (\text{A.10})$$

Completando quadrado do expoente da exponencial

$$-\left(y - \frac{1}{2}\sqrt{2}\sigma\right)^2 = -y^2 + y\sqrt{2}\sigma - \frac{(\sqrt{2}\sigma)^2}{4},$$

adicionado $\frac{(\sqrt{2}\sigma)^2}{4}$, ao expoente, a nova expressão fica

$$\langle z \rangle = \frac{e^{\mu + \frac{\sigma}{2}}}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-(y - \frac{1}{2}\sqrt{2}\sigma)^2} dy. \quad (\text{A.11})$$

Sabendo que $\int_{-\infty}^{\infty} e^{-(w)^2} dw = \sqrt{\pi}$

chega-se ao resultado final

$$\boxed{\langle z \rangle = e^{\mu + \frac{\sigma}{2}}}. \quad (\text{A.12})$$

Distribuição log-normal escalonada pela média

Definindo $t = \frac{z}{\langle z \rangle} \Rightarrow z = \langle z \rangle \cdot t$. Deve-se ter que

$$g(t)|dt| = f(z)|dz| \quad (\text{A.13})$$

Usando a expressão (A.6) para $f(z)$, tem-se

$$g(t)dt = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \frac{1}{t \langle z \rangle} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(t \cdot \langle z \rangle) - \mu)^2}{\sigma^2}\right] \langle z \rangle dt \quad (\text{A.14})$$

substituindo $\langle z \rangle = e^{\mu + \frac{\sigma}{2}}$ no argumento da exponencial da expressão (A.14) chega-se a

$$g(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \frac{1}{t} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{\left(\ln(t) + \left(\mu + \frac{\sigma}{2}\right) - \mu\right)^2}{\sigma^2}\right] \quad (\text{A.15})$$

Desenvolvendo o argumento da exponencial da equação (A.15), chega-se a equação final

$$\boxed{g(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi} \cdot t} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(t) + 1/2\sigma^2)^2}{\sigma^2}\right]}, \quad (\text{A.16})$$

dependente apenas de um parâmetro de ajuste (σ).

APÊNDICE B

Assumindo que K segue uma distribuição log-normal, provar que $T = \frac{D}{K}$ (D constante independente de K) também seguirá a mesma distribuição e com o mesmo desvio padrão.

Para K , assume-se a seguinte distribuição de probabilidade

$$F(K)dK = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi} \cdot K} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(K) - \mu)^2}{\sigma^2}\right] dK \quad 0 < k < \infty. \quad (\text{B.17})$$

Para a distribuição de T_l chamada aqui de $G(T)$, deve-se ter

$$F(K)|dK| = G(T)|dT| \quad (\text{B.18})$$

ou

$$G(T) = F(K) \left| \frac{dK}{dT} \right|, \quad (\text{B.19})$$

com

$$\left| \frac{dK}{dT} \right| = \frac{D}{T^2}. \quad (\text{B.20})$$

Substituindo (B.20) em (B.19) e esta em (B.18), chega-se a seguinte expressão

$$G(T) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi} \cdot K} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln(K) - \mu)^2}{\sigma^2}\right] \frac{D}{T^2}. \quad (\text{B.21})$$

Substituindo $K = \frac{D}{T}$ em (B.21) chega-se à expressão a seguir, o que mostra que T também segue uma distribuição log-normal

$$\boxed{G(T) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi} \cdot T} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(\ln T - \mu')^2}{\sigma^2}\right]}, \quad (\text{B.22})$$

com média

$$\mu' = \ln D - \mu. \quad (\text{B.23})$$

Pela definição de variância

$$\sigma'^2 = \langle \mu'^2 \rangle - \langle \mu' \rangle^2, \quad (\text{B.24})$$

substituindo (B.23) em (B.24), tem-se

$$\sigma'^2 = \langle (\ln D - \mu)^2 \rangle - \langle (\ln D - \mu) \rangle^2. \quad (\text{B.25})$$

Desenvolvendo esta equação

$$\sigma'^2 = \langle \ln D^2 - 2\mu \ln D + \mu^2 \rangle - (\langle \ln D - \mu \rangle \cdot \langle \ln D - \mu \rangle) \quad (\text{B.26})$$

ou

$$\sigma'^2 = \ln D^2 - 2 \langle \mu \rangle \ln D + \langle \mu^2 \rangle - (\ln D^2 - 2 \langle \mu \rangle \ln D + \langle \mu \rangle^2). \quad (\text{B.27})$$

Chega-se à prova que ambas as distribuições possuem o mesmo desvio padrão (ou variância)

$$\boxed{\sigma'^2 = \langle \mu^2 \rangle - \langle \mu \rangle^2 = \sigma^2} \quad (\text{B.28})$$

com média deslocada de $\ln D$ (ver equação (B.23)).

PUBLICAÇÕES

PHYSICA A

“Thermo-kinetic model for Prion diseases”

M.L. Galdino, S.S. de Albuquerque, A.S. Ferreira, J.C. Cressoni, R.J.V. dos Santos.

PHYSICAL REVIEW LETTERS

“Stochastic Modeling Approach to the Incubation Time of Prionic Diseases”

A.S. Ferreira, M.A.A. da Silva, J.C. Cressoni.

Thermo-kinetic model for Prion diseases

M.L. Galdino^a, S.S. de Albuquerque^b, A.S. Ferreira^b,
J.C. Cressoni^b, R.J.V. dos Santos^{b,*}

^a*Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alagoas, Brazil*

^b*Departamento de Física, Universidade Federal de Alagoas 57072-970 Maceió AL, Brazil*

Abstract

A mean field theory of the auto catalytic Prions conversion reaction is developed under a conservation law for Prions density. These reactions take place in the brain where a normally folded Prion protein (PrP^c) is converted into a misfolded, more stable, form (PrP^{Sc}). The results reproduce most of the known facts observed in Prion diseases such as: very long incubation time, rapid death after the first symptoms manifestation, dependence of the incubation and death times on the concentration of the initial contamination dose and the existence of a minimum contamination dose for the detection of the disease. Results of computing simulations are also presented. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

PACS: 87.10.+e; 82.20.Wt

Keywords: Prion diseases; Chemical kinetics

1. Introduction

The eclosion of a large epidemics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in England during the eighty and ninety decades of the last century, the present spread of this disease into many countries of continental Europe and the appearance of the new variant form of CJD (nvCJD) in humans due to the ingestion of contaminated food derived from infected cows, have triggered the interest of the scientific community to study the causes, processes, consequences and eventually a cure for these terrifying diseases.

The most accepted theory to explain the cause of the spongiform encephalopathies was firstly introduced by Griffith [1] and next developed by Prusiner [2] and may be

* Corresponding author. Fax: +55-82-214-1645.

E-mail address: roberto@fis.ufal.br (R.J.V. dos Santos).

summarized as follows: most of the mammals have a gene that encodes for the normally folded Prion proteins, which are present at the periphery of the neuron cells. Those normally folded Prions are easily digested by the enzymes present in the mammal organisms and are called PrP^c . However, the Prion proteins can exist in differently folded conformations called PrP^{Sc} which are much more stable, resistant to enzymes, gamma radiation, ultra-violet radiation and high-temperatures. The misfolded Prion can convert a normally folded Prion into a misfolded one, acting as a template, in a kind of self-catalytic reaction, giving place to a chain reaction in the brain of infected victims. During the course of the disease the conversion of Prion proteins kills many neuron cells causing the appearance of holes in the brain of the victims producing the spongiform. Even though the kinetics of the conversion reaction may be complex, involving the formation of some intermediary forms of the Prion molecules, and/or some coadjuvant molecules [3,4], the final result is that when a PrP^c molecule hits a PrP^{Sc} molecule it has a probability to be converted into a PrP^{Sc} molecule. It seems that the normally folded Prion molecule is in a meta-stable energy well much higher than the more stable energy level of the misfolded protein, so that the conversion reaction must be exothermic and unidirectional.

In this paper, we present a slightly modified version of a very simple mean field theory, previously developed by two of the authors [5], which completely neglects intermediate steps, to study the kinetics of the Prion conversion reaction, under a conservation law for Prions density. We show that the manifestation of the disease is highly correlated with the increase of the conversion rate, so that the model is consistent with the hypothesis that the disease is caused by the rate at which energy is liberated in the conversion reaction. We present also some graphical results of a computer simulation of the conversion reaction on a two dimensional lattice which are in very good qualitative agreement with our analytical results.

2. The model

In this paper, we are going to restrict our analysis to the case of one unique contamination dose, at time $t=0$, of misfolded Prions of the same species of the contaminated victim. That means that the sequence of amino-acids in the polypeptidic chain is the same as the one in the normal protein, the difference between the two arising only from the different conformations of the molecules.

Some further assumptions, all of which are in good agreement with the observed facts [2], are: (i) the immunologic system cannot distinguish between the normal Prions and the misfolded ones belonging to the same species; (ii) the concentration of normal Prions in a healthy mammal is assumed to be roughly constant and uniformly distributed, on average, i.e., for every molecule of the normal protein PrP^c digested by the organism, the system acts through its genetic machinery to produce a new one; (iii) misfolded Prions can exist in various conformations, or various “strains”; Prions of a given strain are able to convert normal Prions only to that particular strain, since they

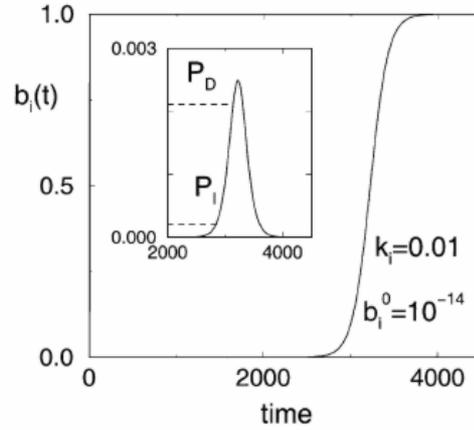


Fig. 1. The density of type PrP^{Sc} Prions as a function of time (arbitrary units) as given by the mean field theory. The inset shows the production rate along with the values of P_I and P_D necessary for determining the incubation and death times (see text and Fig. (3)).

act as a template; and (iv) the conversion reactions of the i th strain are characterized by a reaction rate k_i .

We will restrict our treatment to the case of contamination by only one specific strain. The kinetic evolution of the conversion reaction



can be obtained from the mean field rate equation [6] given by

$$\frac{db_i}{dt} = k_i a b_i = k_i (1 - b_i) b_i, \quad (2)$$

where a is the fraction of PrP^c molecules and b_i is the fraction of PrP^{Sc} molecules of the i th strain. The solution of this equation is readily obtained

$$b_i(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{b_i^0} - 1\right) \exp(-k_i t)}, \quad (3)$$

where b_i^0 is the contamination dose at time $t = 0$. The behavior of $b_i(t)$ is shown in Fig. 1 where it is also shown in the inset the production rate of misfolded Prions. The values of k_i and b_i^0 were arbitrarily chosen to emphasize the existence of two time regimes. At first the number of misfolded Prions increases very slowly, then it suddenly increases very quickly over a short time interval, reaching a plateau when most of the normal Prions have been converted.

In Fig. 2 we show the same two functions for a simulation of the conversion reaction on a $N \times N$ square lattice. We considered $N = 1000$, with 10% of empty sites, one initial site being randomly occupied by a misfolded Prion and the remaining sites being randomly occupied by normal Prions. The misfolded Prion is allowed to walk randomly on the lattice and has a mass m which is set initially to unity. The misfolded Prion has a probability p_c of reacting with the normal Prions at a distance $m^{1/2}$. If the reaction

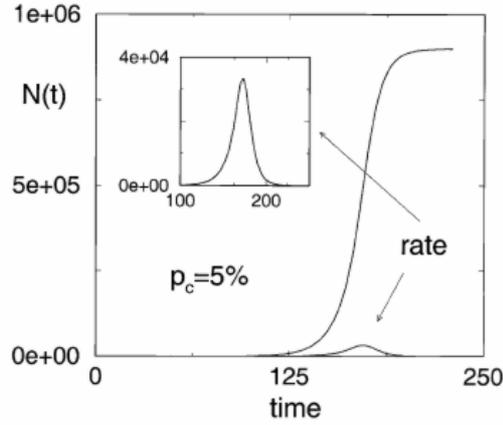


Fig. 2. The number of type PrP^{Sc} Prions as a function of time as obtained by numerical simulation (see text). The inset shows the production rate in the same time scaling.

does occur, the normal Prion disappears and the misfolded Prion has its mass increased by one unity. For Fig. 2 we arbitrarily chose $p_c = 5\%$.

The existence of two time regimes allows us to associate them with the observed long incubation time and the short survival time after the appearance of the first symptoms of the disease. We assume that there is a minimum reaction rate (or equivalently a minimum power at which energy is liberated during the reaction) capable of killing a neuron cell which we shall call P_I . We take the elapsed time from the moment of the contamination until the rate of the conversion reaction reaches that value as the incubation time t_I . By the same reasoning we suppose that when the reaction rate reaches a threshold value P_D the amount of killed neurons will be so high that the victim finally dies and so we define that moment as the death time t_D . From the definitions above it is very easy to show that

$$t_j = \frac{1}{k_i} \ln \left[\frac{1 - b_i^0}{F_j b_i^0} \right], \quad (4)$$

where j stands for I or D , and

$$F_j = \left[\left(\frac{k_i}{2P_j} - 1 \right)^2 - 1 \right]^{1/2} + \frac{k_i}{2P_j} - 1. \quad (5)$$

In Fig. 3 we plot the incubation and death times for various values of the initial contamination dose, according to the relation $b_i^0 = 10^\alpha b_i^{0,m}$ where $\alpha = 0, 1, 2, \dots$ and $b_i^{0,m}$ is the minimum contamination dose.

From Eqs. (4) and (5) one can easily see that the survival time $t_S = t_D - t_I$ is independent of the initial dose, as shown in Fig. 3, confirming the experimental results from the inoculation of mice shown in Ref. [7]. On the other hand, if the initial contamination dose is so small that the incubation time is longer than the remaining time until the natural death of the infected victim, the disease will not be detected since it will still be in the asymptomatic phase. This problem brings out an extra factor of

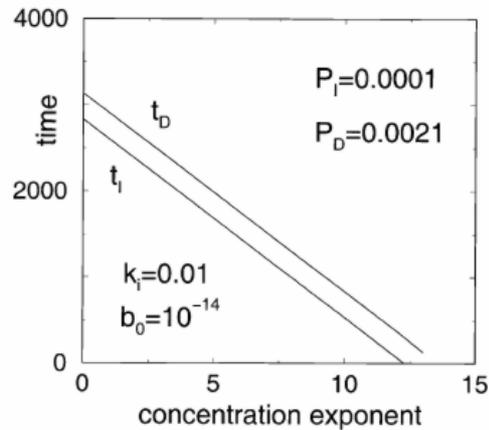


Fig. 3. Incubation (t_I) and death (t_D) times as a function of the concentration exponent α .

concern since many infected cows may have been slaughtered for human consumption before the appearance of the first symptoms. The size of the human epidemics of nvCJD, caused by contaminated food, is so far still a matter of great controversy.

3. Conclusion

The kinetic evolution of the conversion reaction of Prions, considered by most physicians and biologists to be the cause of the spongiform encephalopathies, is modeled by a simple mean field theory. We showed that under a conservation law for the total Prions density, the time evolution of the auto catalytic reaction is in accord with the known facts associated with those diseases, i.e.: very long incubation time when no symptoms of the disease are observable; very short survival time after the appearance of the first symptoms; the complete independence of the survival time on the amount of the initial contamination dose; the linear dependence on the logarithm of the initial contamination dose presented by both the incubation and death times and the existence of a minimal dose for the detection of the disease. Our results are compatible with the hypothesis that the main cause of the death of neurons is directly connected with the proper conversion rate, i.e., the rate at which energy is liberated during the conversion process, since all the variables described above may be obtained from its knowledge. We would also like to call attention to Ref. [8] where it is shown that mice devoid of normal Prions do not develop the disease when inoculated with misfolded Prions, a clear indication that the conversion reaction itself is relevant for the emergence of the disease.

This work was partially supported by CNPq, FINEP, CAPES and FAPEAL.

References

- [1] J.S. Griffith, *Nature* 215 (1967) 1043.
- [2] S.B. Prusiner, *Science* 216 (1982) 136.
- [3] F.E. Cohen et al., *Science* 264 (1997) 530.
- [4] S. DabBurman et al., *PNAS USA* 94 (1997) 13 938.
- [5] M.L. Galdino, R.J.V. dos Santos, *Workshop on Complex Systems, Brasília, Brazil, 1998.*
- [6] J.D Murray, *Mathematical Biology—Biomathematical Texts*, 2nd Edition, Springer, Berlin, 1993.
- [7] S.B. Prusiner, *Sci. Am.* 251 (N4) (1997) 48.
- [8] H. Bueler et al., *Cell* 73 (1993) 1339.

Stochastic Modeling Approach to the Incubation Time of Prionic Diseases

A. S. Ferreira,¹ M. A. A. da Silva,^{2,*} and J. C. Cressoni^{1,†}¹*Departamento de Física, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió (AL), Brazil*²*Departamento de Física e Química, FCFRP, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil*
(Received 27 January 2003; published 13 May 2003)

Transmissible spongiform encephalopathies are neurodegenerative diseases for which prions are the attributed pathogenic agents. A widely accepted theory assumes that prion replication is due to a direct interaction between the pathologic (PrP^{Sc}) form and the host-encoded (PrP^C) conformation, in a kind of autocatalytic process. Here we show that the overall features of the incubation time of prion diseases are readily obtained if the prion reaction is described by a simple mean-field model. An analytical expression for the incubation time distribution then follows by associating the rate constant to a stochastic variable *log normally* distributed. The incubation time distribution is then also shown to be *log normal* and fits the observed BSE (bovine spongiform encephalopathy) data very well. Computer simulation results also yield the correct BSE incubation time distribution at low PrP^C densities.

DOI: 10.1103/PhysRevLett.90.198101

PACS numbers: 87.10.+e, 05.20.Dd, 87.19.Xx

The so-called prion diseases comprise fatal transmissible spongiform encephalopathies such as the well-known bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sheep scrapie. In humans, these progressive neurodegenerative diseases include Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, and fatal familial insomnia. Common pathology includes spongiform degeneration and characteristic formation of plaques in the brain tissue [1]. Variant CJD correlated with a (BSE)-like prion strain have been identified and are believed to be linked to the consumption of contaminated food [2–5].

The protein-only hypothesis [6] states that the infectious agent is a protein, named prion [7,8], which is a pathogenic isoform seemingly able to convert the normal isoform in an autocatalytic process. Two conformations of this protein are important for characterizing the disease, namely, the normally folded host-encoded cellular protein called PrP^C and an abnormal pathogenic conformation named PrP^{Sc}. The latter form is hydrophobic, has a tendency to form aggregates, and may be found in different strains. The pathogenic form PrP^{Sc} is more stable than the endogenous cellular form and is known to be partially resistant to proteolytic treatment, radiation, and high temperatures. One of the most accepted models for prion replication assumes that this form acts as a template for converting the host prion into its own conformation in a kind of autocatalytic reaction [9,10]. Understanding the dynamics of the PrP^C → PrP^{Sc} transformation is crucial if one is attempting to explain and predict the main stages of the disease. The reaction is complex, perhaps involving other participants possibly acting as chaperone, to help mediate protein folding [11]. The number of parameters involved for thoroughly describing the transformation process is thus expected to be very large [12,13]. It is therefore important to be able to recognize which ones are mandatory, i.e., responsible for the major aspects of the dynamics.

Here we present a simple, analytically solvable, mean-field model for describing the prion reaction problem, which focuses on realistically reproducing the incubation time of the disease. For notational convenience it is useful to introduce the following definitions: *A* stands for the host protein (PrP^C) and *B* stands for the pathogenic form (PrP^{Sc}) with $a = [A]$ and $b = [B]$ denoting volume concentrations. We then write the autocatalytic conversion reaction simply as



where *K* is the reaction rate. For simplicity we shall assume that the total concentration $a + b = \rho$ is kept fixed at all times. This means that there is no metabolic decomposition of *B* and any metabolic decomposition of *A* is immediately compensated by the host genetic system. It also implies that the host takes no action for producing new, normal protein, as the reaction takes place. In order to stick to the simplest possible case we are also assuming that the reaction is unidirectional and favors the most stable form PrP^{Sc}. No other strains are supposed to be present and both forms are assumed to be uniformly distributed. The kinetic evolution [14] is then given by $db/dt = Kab = K(\rho - b)b$ which is the simplest possible nonlinear equation describing an autocatalytic reaction. This equation can be easily integrated up to time *T* giving

$$T = \frac{1}{K(a_0 + b_0)} \ln \left[\frac{a_0}{b_0} \left(\frac{b(T)}{a_0 + b_0 - b(T)} \right) \right] \quad (2)$$

with b_0 being the infection dose given at time $t = 0$ and a_0 the initial concentration of *A*. According to this expression $b(t)$ is slowly varying for small *t*, followed by a period of rapid increase in a short time interval, then reaching a plateau for long enough times when the reaction stops [12,15].

We now define the incubation time (T_I) as the time it takes for the number of pathogenic prions to reach a given value b_I , i.e., $b(T_I) = b_I$. (It makes no difference to our calculations whether b_I represents a number of prions or an aggregate with size b_I .) A useful approximation can be obtained by assuming, reasonably, that $b_0/a_0 \ll 1$. This gives

$$T_I \approx \frac{1}{Ka_0} \ln \left[\frac{b_I}{b_0} \left(\frac{1}{1 + b_I/a_0} \right) \right]. \quad (3)$$

This log dependence of the incubation time on the initial dose was quantitatively observed by Prusiner [16] from the inoculation of a form of scrapie in hamsters (Fig. 1). Prusiner's results also indicate that the survival time is practically independent of the dose. Equation (3) is consistent with this finding (see also [15]). If we define the time of death as the time it takes for the number of B 's to reach the value b_D , i.e., $b(T_D) = b_D$, we find that $T_D - T_I$ does not depend on b_0 . Moreover, Eq. (3) can be easily adapted to fit Prusiner's data. In order to mimic the end-

point titration method used in the experiment, we first define all concentrations relative to the largest experimental concentration which we shall call β_0 . We then write $b_0/\beta_0 = 10^{n-10}$ ($n = \text{dose}$) and allow n to vary from $n = 0$ (smallest concentration) to $n = 10$ (largest concentration). We can now apply regression to the data (using only the integral values for n) to obtain the best fit. Notice, however, that the experimental curves are composed of two branches, both exhibiting a sudden increase in the inclination for $n \leq 2$ (see Fig. 1). This behavior seems to be indicative of a threshold, possibly leading to a smaller rate constant at high dilutions. One can simulate a *dose* dependent activation mechanism linked to the rate constant K by making the following "ansatz": we make $K \rightarrow K_{\text{eff}}$ with $K_{\text{eff}} = K\{1 - a_1/[a_2 + \exp(n)]\}$. With these implementations, Eq. (3) reads $T_I = C - [\ln 10/(Ka_0)]n$, with C being a constant (independent of b_0). The phenomenological constants, estimated with a nonlinear least-squares fitting to this equation, with K replaced by K_{eff} , are $a_1 = 0.23(4)$ [0.61(2)] and $a_2 = -0.51(6)$ [2.1(2)] for the incubation (death) curve. The result of the full fitting is shown in the inset of Fig. 1. Notice that K_{eff} rapidly approaches K for $n > 2$.

However, we decided to avoid dealing with the controversial features associated with the region $n \leq 2$ (containing only two points) and stick to the (larger) less inclined part of the experimental curve. Therefore any parameter obtained from the y intercepts in Fig. 1 will not be taken into account. The regression coefficient gives $1/(Ka_0) = 3.12(3)$ days for the incubation part of the curve and $1/(Ka_0) = 3.02(6)$ days for the death part of the curve. This (partial) fitting is represented by the continuous line in the main part of Fig. 1. We can easily check the reasonableness of these figures. Notice that we could have started with the Michaelis-Menten equation, namely, $db/dt = K_T[ab/(K_M + a)]$ with K_T and K_M being the turnover number and the Michaelis constant, respectively [13]. Direct integration of this equation yields

$$K_T \times T = \frac{1}{a_0 + b_0} \left[K_M \ln \left(\frac{a_0}{a_0 + b_0 - b(T)} \right) + (K_M + a_0 + b_0) \ln \frac{b(T)}{b_0} \right] \quad (4)$$

which is consistent with Eq. (2) for $K_M \gg a_0 \gg b_0$ and $K \approx K_T/K_M$. We can therefore estimate the prion K_T/K_M ratio for the scrapie strain used by Prusiner in hamsters. If we assume $a_0 \sim \text{nanomole liter}^{-1}$ [12,13] we find $K_T/K_M \sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This value is within the range expected for enzymes, in which case K_M lies between 10^{-7} to 10^{-1} M and K_T falls in the range from 10 and 10^7 s^{-1} .

Having discussed the behavior of the incubation time on b_0 , we now turn our attention to the dependence of T_I

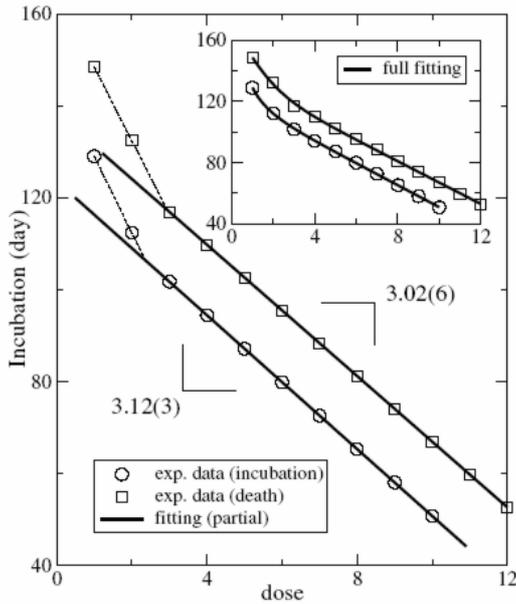


FIG. 1. Dependence of the incubation time (T_I) on the infection (initial) *dose* ($= n$ with $b_0/\beta_0 = 10^{n-10}$). The experimental data were obtained from Prusiner's work [16] and dashed lines are just meant to lead the eye. In the main figure we apply regression to the data ($n > 2$) to obtain the best fit with Eq. (3). The most diluted part ($n \leq 2$) was left out due to the abrupt change in behavior in this region, leaving only two points ($n = 1, 2$) for the fitting. Therefore only the inclinations ($= 1/(Ka_0)$) are kept. The inset shows a nonlinear least-squares full fitting (all n) to Eq. (3) with the ansatz $K \rightarrow K_{\text{eff}} = K\{1 - a_1/[a_2 + \exp(n)]\}$.

on a_0 . The role played by the host prion initial concentration is useful for describing reactions, such as (1), in numerical simulation approaches. The explicit power law dependence of T_I on a_0 can be seen by expanding Eq. (2) in terms of b_I/a_0 . This gives

$$T_I \sim \frac{1}{Ka_0} \left\{ \ln \frac{b_I}{b_0} + \frac{b_I}{a_0} + \mathcal{O} \left[\left(\frac{b_I}{a_0} \right)^2 \right] \right\} \quad (5)$$

and therefore $T_I \sim A_1/a_0 + A_2/a_0^2$. This kind of behavior, having the form of a sum of monomer and dimer terms, has already been suggested in the literature [17]. However, the determination of the explicit dependence of the coefficients A_1 and A_2 on b_I and b_0 , as shown here, was only possible because of the simplicity of the model.

The initial concentration of the endogenous PrP protein is determinant for the dynamics of the prion reaction since it represents the reaction fuel. The higher the initial concentration a_0 , the lower the time for the PrP^{Sc} concentration to reach the value b_I . These results have been obtained through careful computer simulations by Cox *et al.* [17]. They also showed that the incubation time distributions for different a_0 collapse to a single form if the time scale is properly normalized to unity. Will our simple, minimally parametrized model represented by the basic reaction (1) be able to reproduce such results? In order to address this question, we ran computer simulations based on a cellular automata (CA) with rules following a close resemblance to our model.

According to the CA rules, an $N \times N$ ($N = 200$) square lattice is randomly populated with a number (N_{A0}) of the host $A = \text{PrP}^C$ protein and a number ($N_{B0} = 6$) of the $B = \text{PrP}^{\text{Sc}}$ misfolded protein. N_{A0} is given as a small percentage of the total number of sites available and to each of the B sites is assigned a "mass" (m), initially set to unity. The A 's and B 's are allowed to diffuse randomly to their nearest neighbor sites and a reaction occurs when a B is approached by an A at a distance $d \leq \sqrt{m}$. In this case the normal prion disappears and the misfolded prion has its mass increased by 1. The reaction is unidirectional, favoring B , with the A 's slowly disappearing from the system, keeping $A + B = \text{const}$. One site-by-site sweep through the lattice is made for diffusion followed by another one for reaction. The reaction stops when one of the masses reaches the value $m = 40$, the corresponding computer time thus characterizing the incubation time. The above values for the parameters (not the CA rules) were adjusted from the numerical simulations of Cox *et al.* [17] in a hexagonal lattice. The mass is here to mimic clusterization without assigning any geometric form to the cluster. Besides simplifying the computer code and speeding up the simulations, this helps reduce the influence of local topology on the final results.

Figure 2(a) shows the simulation results for the incubation time distributions for several values of N_{A0} , with the time scale normalized by the mean time. Notice that as the PrP^C concentration is decreased, the corresponding distribution converge asymptotically to the experimental results (BSE-infected cattle in the U.K. [17–19]) represented by the full circles. Increasing N_{A0} makes the system more homogeneous which diminishes fluctuations and narrows the distribution. The biological

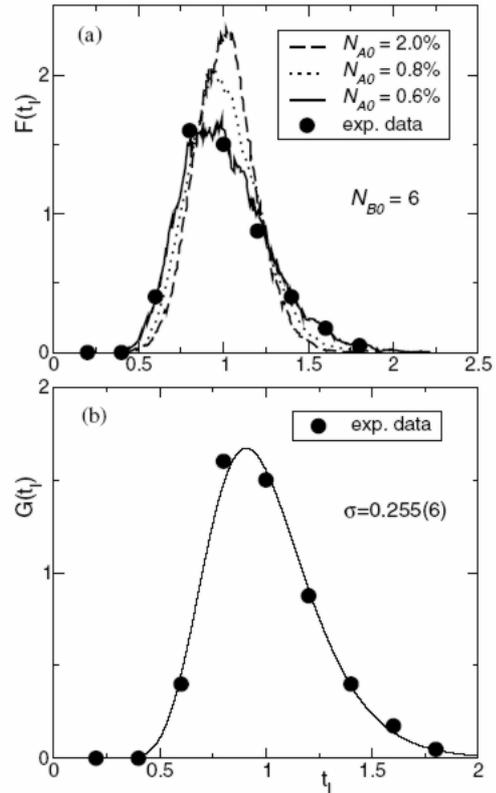


FIG. 2. Incubation time distributions with the time scale normalized by the mean incubation time, i.e., $t_I = T_I/\bar{T}_I$. The full circles represent the observed incubation time distribution for BSE-infected cattle in the U.K. [17–19]. (a) shows the results from computer simulations on an $N \times N$ ($N = 200$) square lattice, with a number of PrP^{Sc} seeds $N_{B0} = 6$ (see text). The values of N_{A0} shown represent the initial PrP^C concentration and only a few curves for N_{A0} were drawn to avoid figure cluttering. Notice the tendency for better agreement with the observed results as N_{A0} gets smaller. (b) shows the same experimental data as in (a), along with the proposed analytical distribution $G(t_I)$, obtained from our model assuming a *log normal* distribution for the rate constant. When the time units are scaled by the mean time we are left with a single parameter, namely, σ , whose best fitted value is given by $\sigma = 0.255 \pm 6$.

concentrations (believed to be nanomolar) correspond to an areal concentration around $N_{A0}^{\text{bio}} = 0.001\%$ [17]. With the CA rules above, such small concentrations would require very large computing time, if feasible at all. The best agreement is obtained for $N_{A0} = 0.6\%$ which is as far as we could go with these simulations.

Our next issue is to search for an analytical form for the incubation time distribution. Knowledge of such a function is not only important to check the reliability of the model but also to provide a distribution that can be used in statistical studies [20]. We need to adapt the deterministic model to accommodate a stochastic variable following a known distribution and associate it with Eq. (2) [or (5)]. Since the protein-folding process actually involve many steps [13], possibly chaperone assisted [21], the end result of the prionic reaction can adequately be viewed as a series of multiplicative processes. It is therefore reasonable to assume that the distribution of the reaction rate K in a population is *log normal* [22]. Since $K \propto 1/T_I$ it is easy to show that T_I also follows a *log normal* distribution with the same deviation. The scaled distribution $G(t_I)$, with $t_I = T_I/\bar{T}_I$, is then readily obtained. One finds

$$G(t_I) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} t_I^{-1} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln t_I + (5/2)\sigma^2}{\sigma}\right)^2\right] \quad (6)$$

which does not depend either on the initial variables or on b_I . We are therefore left with a single fitting parameter, namely, σ , the standard deviation of $\ln K$. Applying nonlinear least-squares fitting to Eq. (6) we get $\sigma = 0.255(\pm 6)$. The final result is shown in Fig. 2(b). In this figure the observed data are the same as used in Ref. [17] for BSE-infected cattle in the United Kingdom born in 1987 [18,19]. It is worth mentioning that the nonscaled incubation time distribution can be shown to narrow with increase in dose, as observed in laboratory experiments.

It should finally be pointed out that aggregation seems to be necessary to separate the time scales of sporadic and infectious diseases. This aspect of prionic reactions, along with the need of fine-tuning of parameters to prevent everyone from getting the disease without infection, has been first addressed by Eigen [13]. However, the simplifying assumption that all K 's are represented by a single K which is log normally distributed seems to be enough to lead to the correct distribution.

In conclusion, a simple mean-field model, based on an autocatalytic mechanism, is shown to contain the basic ingredients necessary to describe the essential features associated with the incubation time of the complex prion

conversion reactions. Assuming that the rate constant is a random variable, following a *log normal* distribution, we were able to provide a closed form for the incubation time distribution of BSE-infected cattle. The surprisingly simple analytical expression derived for the incubation time distribution contains only one parameter, namely, the variance of the logarithm of the rate constant. The simplicity of the model is characterized by the almost naive differential equation upon which it is based, by simple computer simulations, and by the minimal set of parameters used to describe the autocatalytic process.

J. C. C. and A. S. F. acknowledge funding from CNPq (476376/2001-7). J. C. C. is very grateful to Professor R. J. V. dos Santos, Professor S. B. Cavalcanti, and Professor G. M. Viswanathan for discussions. We particularly acknowledge Professor M. L. Lyra for fruitful suggestions and a careful reading of the manuscript.

*Electronic address: maasilva@fcfrp.usp.br

†Electronic address: cressoni@fis.ufal.br

- [1] A. L. Horwich and J. S. Weissman, *Cell* **89**, 499 (1997).
- [2] J. Collinge and M. Rossor, *Lancet* **347**, 916 (1996).
- [3] R. G. Will *et al.*, *Lancet* **347**, 921 (1996).
- [4] M. E. Bruce *et al.*, *Nature (London)* **389**, 498 (1997).
- [5] A. F. Hill *et al.*, *Nature (London)* **389**, 448 (1997).
- [6] J. S. Griffith, *Nature (London)* **215**, 1043 (1967).
- [7] S. B. Prusiner, *Science* **216**, 136 (1982).
- [8] S. B. Prusiner, *Science* **252**, 1515 (1991).
- [9] G. C. Telling *et al.*, *Science* **274**, 2079 (1996).
- [10] S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13 363 (1998).
- [11] G. C. Telling *et al.*, *Cell* **83**, 79 (1995).
- [12] M. Laurent, *FEBS Lett.* **407**, 1 (1997).
- [13] M. Eigen, *Biophys. Chem.* **63**, A1 (1996).
- [14] J. D. Murray, *Mathematical Biology - Biomathematical Texts* (Springer, New York, 1993), 2nd ed., p. 110.
- [15] M. L. Galdino, S. S. de Albuquerque, A. S. Ferreira, J. C. Cressoni, and R. J. V. dos Santos, *Physica (Amsterdam)* **295A**, 58 (2001).
- [16] S. B. Prusiner, *Sci. Am.* **251**, No. 4, 48 (1984).
- [17] A. Slepoy, R. R. P. Singh, F. Pázmándi, R. V. Kulkarni, and D. L. Cox, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 058101 (2001).
- [18] D. J. Stekel, M. A. Nowak, and T. R. E. Southwood, *Nature (London)* **381**, 119 (1996).
- [19] R. M. Anderson *et al.*, *Nature (London)* **382**, 779 (1996).
- [20] N. M. Ferguson *et al.*, *Nature (London)* **415**, 420 (2002).
- [21] J. P. Liautard, *Acta Biotheor.* **47**, 219 (1999).
- [22] B. J. West and M. F. Shlesinger, *Int. J. Mod. Phys. B* **3**, 795 (1989).

Referências bibliográficas

AITCHISON, J.; BROWN, J. A. C. **The Lognormal Distribution**. Cambridge University Press. Cambridge, 1957.

ALBUQUERQUE, Samuel Silva de. **Estudo analítico da evolução cinética de conversão de Prions**. 2003. 66f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Citações em documentos - Informação e documentação**. NBR 10520. Rio de Janeiro, 2002.

BAK, P. *et al.* **Self-organized criticality in the Game of Life**. Nature, 342, 780-782, 1989.

BATEMAN, D. *et al.* Lancet, 346, 1155, 1995.

BESSEN, R.A. *et al.* **Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie Prion protein**. Nature, 375(6533), 698-700, 1995.

BYL, J. **Self-Reproduction in Small Cellular Automata**. Physica D, 34, 295-299, 1989.

COHEN, F.; PRUSINER, S.B. **Structural studies of Prion proteins**. In Prusiner, S. (eds.), Prion Biology and Disease, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp191-228, 1999.

COHEN, F.; PRUSINER, S.B. **Pathologic conformations of Prions proteins**. Ann. Rev. Biochem, 67, 793-819, 1998.

COHEN, F. *et al.* **Structural clues to Prion replication**. Science, 264, 530-531, 1994.

CUILLÉ, J.; CHELLE, P. L. **La maladie dite tremblante du mouton, est-elle inoculable?** C. R. Seances Acad. Sci. (Paris) 203, 1552-1554, 1936.

CUILLÉ, J.; CHELLE, P. L. **Experimental transmission of trembling to the goat**. C. R. Seances Acad. Sci. 208, 1058-1060, 1939.

DORRELL, Stephen. **There is no conceivable risk of BSE being transmitted from cows to people**. Disponível em: <<http://www-micro.msb.le.ac.uk/Tutorials/cow/cow13.html>>. Acesso em 10 dez. 2004.

DEARMOND, S. J.; PRUSINER, S. R. **Prion Protein Amyloid and Neurodegeneration**. Amyloid, 2, 39, 1995.

EIGEN, M. *Biophys. Chem.* 63, A1, 1996.

FERREIRA, A.S.; SILVA, M.A.A.; CRESSONI, J.C. **Stochastic Modeling Approach to the Incubation Time of Prionic Diseases.** *Phys. Rev. Lett.*, 90, 198101, 2003.

GALDINO, M.L.; ALBUQUERQUE, S.S.; FERREIRA, A.S.; CRESSONI, J.C.; SANTOS, R.J.V. **Thermo-kinetic model for Prion diseases.** *Physica A*, 295, 58-63, 2001.

GARCÍA, F. L.; ZAHN, R.; RIEK, R.; WÜTHRICH, Kurt. **NMR structure of the bovine Prion protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97(15): 8334–8339, 2000.

GAJDUSEK, D.C. **Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru.** *Science*. 197, 943-960, 1977.

GLATZEL, Markus *et al.* **Human Prion diseases: epidemiology and integrated risk assessment.** *Lancet Neurol.* 2, 757-763, 2003.

GRIFFITH, J.S. **Self replication and scrapie.** *Nature* 215, 1043–1044, 1967.

HOSSZU, L.L.P. *et al.* **Structural mobility of the human Prion protein probed by backbone hydrogen exchange.** *Nat. Struct. Biol.* 6, 740–743, 1999.

JAMES, T. L.; DONNE, D. G.; VILES, J. H.; GROTH, D.; MELHLHORN, I.; COHEN, F. E.; PRUSINER, S. B.; WRIGHT, P. E.; DYSON, H. J. **Structure of the recombinant full-length hamster Prion protein PrP(29-231): The N terminus is highly flexible** *PNAS*, 94(25), 13452 – 13457, 1997.

JEN, E. **Aperiodicity in one-dimensional cellular automata.** *Physica D*, 45, 3-18, 1990.

JOHNSON, R.T.; GIBBS, C.J. **Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies.** *N. Engl. J. Med.* 339,1994–2004, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO. **Biologia celular e molecular.** 6° ed, São Paulo, Guanabara koogar, 299p, 1997.

LAURENT, M. *FEBS Lett.* 407, 1, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica.** 2° ed, São Paulo, Sarvier, 839p, 1995.

LINDEN, Rafael. **Doenças por Prions.** *Ciência hoje.* 33, 194, 18-25, 2003.

MCGOWAN, JP. **Scrapie in sheep.** *Scott J Agric* 5: 365–375, 1922.

MOORE, E.F. **Machine models of self-reproduction**. Proceeding of the Fourteenth Symposium on Applied Mathematics, 17-33, 1962.

NEUMANN, J.V. **The general an logical theory of automata**. Volume V. England: Pergamon Press.1956.

NEUMANN, J.V. **Theory of Self-Reproducing Automata**. Edited and completed by Arthur W. Burks: University of Illinois Press, Urbana, Illinois, 1966.

OESCH, B. *et al.* Cell 40, 735, 1985.

PAN, K.-M. *et al.* **Conversion of alpha-helices into β -sheets features in the formation of the scrapie Prion proteins**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10962-10966, 1993.

PRUSINER, S.B. **Certo ao mal da vaca louca**. Scientific American Brasil, 27, 82-89, 2004.

PRUSINER, S.B.; MCKINLEY, M.P.; GROTH, D.F.; BOWMAN, K.A.; MOCK, N.I; COCHRAN, S.P. *et al.* **Scrapie agent contains a hydrophobic protein**. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 78(11), 6675-6679, 1981.

PRUSINER, S.B. **The Prion diseases**. Scientific American, 272, 48, 1995.

PRUSINER, S.B. **Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie**. Science 216, 136-144, 1982.

PRUSINER, S.B. **Molecular biology of Prion diseases**. Science, 252: 1515-1522, 1991.

PRUSINER, S.B. Scientific America. 251, 4, 48, 1984.

PRUSINER, S.B. **Prion Diseases and the BSE Crisis**. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/feature/data/prusiner/245.shl>>. Acesso em 22 jan. 2005.

RIEK, R *et al.* **NMR structure of the mouse Prion protein domain PrP(121-321)**. Nature 1996 Jul 11; 382(6587): 180-182, 1996.

SIGURDSSON, B. **Observations on three slow infections of sheep. Maedi, paratuberculosis, rida, a slow encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics**. Br. Vet. J. 110: 255-270, 1954.

SLEPOY, A.; SINGH, R. R. P.; PÁZMÁNDI, F.; VULKARNI, R.V.; COX, D. L. **Statistical mechanics of Prion diseases**. Phys. Rev. Lett. 87, 058101, 2001.

TURING, A.M. **On computable numbers with application to the entscheidungs-problems.** Proc. London Math Soc. Ser., 42 ,230-265, 1936.

WILL, Robert. The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit. Disponível em: <<http://www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm>>. Acesso em 10 dez. 2004.

WOLFRAM, S. **Computation theory of cellular automata.** Communications in Mathematical Physics, 96, 15-57, 1984a.

WOLFRAM, S. **Universality and complexity in cellular automata.** Physica D, 10, 1-35, 1984b.

WOLFRAM, S. **Cellular Automata.** Los Alamos Science, 9, 2-21, 1983a.

WOLFRAM, S. **Statistical Mechanics of cellular automata.** Reviews of Modern Physics, 55, 601-644, 1983b.

ULAM, S.M. **On some Mathematical Problems Connected with Patterns of Growth of Figures:** En Essays on Cellular Automata, editado por Burks, A.W. USA: University of Illinois Press, 1962.